UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLAS DE HIDALGO

FACULTAD DE QUIMICO FARMACOBIOLOGIA

"Tipificación molecular de *Escherichia coli* enteropatógena, enteroinvasiva y de adherencia difusa en Michoacán, México"

Tesis profesional que, en cumplimiento para obtener el título de Licenciatura en Quimicofarmacobiología presenta,

Octavio Silva García

Asesores

Biol. Juan Luis Jaime Sánchez.

D.C. Irvin Eduardo Jácome Galarza.

Febrero 2011

1 ÍNDICE

1 ÍNDICE 1

2 INDICE DE FIGURAS 4

3 ABREVIACIONES 5

4 RESUMEN 6

5 INTRODUCCIÓN 7

5.1 LA DIARREA 7
5.1.1 ETIOLOGÍA DE LA DIARREA EN MÉXICO. 9
5.2 *ESCHERICHIA COLI* COMO AGENTE DIARREAGÉNICO. 11
5.2.1 GENERALIDADES DE *E. COLI*. 11
5.2.2 FISIOLOGÍA Y ESTRUCTURA BACTERIANA. 12
5.2.3 EL GENOMA BACTERIANO. 13
5.3 INMUNIDAD INTESTINAL DEL HOSPEDERO CONTRA BACTERIAS PATÓGENAS: 14
5.3.1 MECANISMOS INTESTINALES DE PROTECCIÓN NO ESPECÍFICA: 14
5.3.2 MECANISMOS INTESTINALES DE PROTECCIÓN ESPECÍFICA (INMUNIDAD INTESTINAL): 15
5.3.3 INMUNIDAD CELULAR LOCAL. 17
5.4 PATOTIPOS DE *ESCHERICHIA COLI*. 17
5.4.1 ESCHERICHIA COLI ENTEROPATÓGENA. 19
5.4.2 *ESCHERICHIA COLI* ENTEROINVASIVA (EIEC) 25
5.4.3 *ESCHERICHIA COLI* DE ADHERENCIA DIFUSA. (DAEC) 27
5.5 CARACTERIZACIÓN DE BACTERIAS. 32
5.6 TRATAMIENTO DE LA DIARREA. 42
5.6.1 TRATAMIENTO DE LA DIARREA CON ANTIBIÓTICO. 45
5.6.2 PREVENCIÓN 49

6 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA. 52

7 JUSTIFICACIÓN. 54

8 HIPOTESIS. 55

9 OBJETIVOS 56

9.1 OBJETIVO GENERAL: 56
9.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS: 56

10 IDENTIFICACIÓN DEL ESTUDIO. 57

11 MATERIALES Y MÉTODOS 58

11.1 DIAGRAMA DE ACTIVIDADES: 58
11.2 CARACTERIZACIÓN DE LAS MUESTRAS. 58
11.2.1 TOMA DE MUESTRA. 59

11.2.2 REGISTRO DE DATOS. 59
11.2.3 TRANSPORTE DE LA MUESTRA. 59
11.3 IDENTIFICACIÓN BIOQUÍMICA. 59
11.3.1 COPROCULTIVO. 59
11.3.2 PRUEBAS BIOQUÍMICAS. 60
11.3.3 CONTROL DE CEPAS POSITIVO Y NEGATIVO. 60
11.4 ANÁLISIS Y MANIPULACIÓN DE ACIDOS NUCLEICOS. 60
11.4.1 PREPARACIÓN DE LA MUESTRA PARA EXTRACCIÓN. 60
11.4.2 EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS TOTALES. 60
11.4.3 CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS. 62
11.4.4 PCR EN TIEMPO REAL. 62
11.4.5 PROTOCOLO DE PCR. 63
11.5 VISUALIZACIÓN DE LA PCR. 65
11.5.1 CURVAS MELTING. 65
11.5.2 ELECTROFORESIS. 65
11.6 SUCEPTIBILIDAD A LOS ANTIBIÓTICOS. 66

12 RESULTADOS. 68

12.1 CARACTERIZACIÓN DE LAS MUESTRAS. 68
12.2 IDENTIFICACIÓN BIOQUÍMICA. 72
12.3 TIPIFICACIÓN MOLECULAR. 73
12.4 RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS. 79

13 DISCUSIÓN DE RESULTADOS 86

13.1 CARACTERIZACIÓN DE LAS MUESTRAS. 86
13.2 PRUEBAS BIOQUÍMICAS. 87
13.3 ANÁLISIS Y MANIPULACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS. 87
13.4 ANÁLISIS DE LA RESISTENCIA A ANTIBIÓTICO. 89

14 DISCUSIÓN GENERAL 95

15 PERSPECTIVAS. 97

16 CONCLUSIONES. 98

17 ANEXOS. 99

17.1 TOMA DE MUESTRA Y REGISTRO DE DATOS. 99
17.2 COPROCULTIVO. 103
17.3 PRUEBAS BIOQUÍMICAS. 104
17.4 EXTRACCIÓN DE DNA POR PERLAS MAGNÉTICAS. 105
17.4.1 MATERIAL: 105
17.4.2 EXTRACCIÓN AUTOMATICA DE ÁCIDOS NUCLEICOS TOTALES 106
17.4.3 PROCEDIMIENTO DE EXTACCIÓN EN EL ROBOT MAGNA PURE LC: 110
17.5 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA EN TIEMPO REAL 116
17.6 ELABORACIÓN DE GELES DE AGAROSA PARA ELECTROFORESIS. 117
17.7 RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS, LECTURA DE LOS HALOS DE INHIBICIÓN E INTERPRETACIÓN. 121

18 BIBLIOGRAFÍA. 123

INDICE DE TABLAS

Tabla 1 Patologías asociadas a infecciones gastrointestinales agudas en 10
Tabla 2. Etiología de la diarrea bacteriana en México. 10
Tabla 3. Características de los grupos de Escherichia coli causantes de Diarrea. 18
Tabla 4. Función de las proteínas secretadas por EPEC. 23
Tabla 5. Adhesinas codificadas por genes relacionados AFA/DAA/DRA. En E. coli patógenas en humanos 28
Tabla 6. Condiciones estándar de una Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) 37
Tabla 7. Clasificación de los antibióticos 45
Tabla 8. Antibióticos utilizados en el tratamiento de las principales causas bacterianas de diarrea aguda[101.] 47
Tabla 9. Características de los inicadores (primers) empleados en este estudio. 62
Tabla 10. Mezcla de reacción de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) 63
Tabla 11. Mezcla de reacción de una PCR 63
Tabla 12. Distribución de Iniciadores Primers para la PCR 64
Tabla 13. Programa para el Termociclador en Tiempo Real LigthCycler 480 65
Tabla 14. Antibióticos utilizados en este estudio y su referencia para determinación de Sensibilidades 67
Tabla 15. Identificación Bioquímica de E. coli 72
Tabla 16. Valor de las Curvas Melting de los Productos de PCR obtenidas a partir de los Controles Positivos 74
Tabla 17. Características de los casos de E. coli patotipo EPEC 78
Tabla 18. Contenido del Kit de Extracción MagNA Pure Total Nucleic Acid Isolation 106
Tabla 19. Accesorios utilizados en el Robot de Extracción Magna Pure LC 109

2 INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Producción de anticuerpos por parte del sistema inmune intestinal. 16
Figura 2. Lesión característica de EPEC A/E observada en el ileum 19
Figura 3. Esquema propuesto por Donnenber y Kaper en 1992. Infección de EPEC. 21
Figura 4. Ensayo de adherencia desarrollado por Cravioto y colaboradores. 22
Figura 5. Complejo de Secreción tipo 3 (Complejo Aguja) 23
Figura 6. Interacción de EIEC con las células epiteliales. 26
Figura 7. Interacción de DAEC con células epiteliales. 30
Figura 8. Ejemplo de una amplificación y la localización de los valores de Ct.[23] 40
Figura 9. Ejemplo de una Curva Melting. [23] 41
Figura 10. Esquema propuesto para el manejo de la diarrea. 42
Figura 11. Manejo de la diarrea tipo Disenteriforme. 43
Figura 12. Extracción de Ácidos Nucleicos Totales utilizando la técnica de Perlas Magnéticas 61
Figura 13. Porcentaje de muestras con cultivos de *E. coli* positivos. 68
Figura 14.Porcentaje de muestras procesadas para extracción de ADN. 69
Figura 15. Procedencia de las muestras según la unidad de muestreo. 70
Figura 16. Jurisdicciones de procedencia de las muestras procesadas. 70
Figura 17. Se muestra la incidencia de género de los pacientes. 71
Figura 18.Distribución etaria de los pacientes. 71
Figura 19. PCR en tiempo real de las Cepas utilizadas como Controles Positivos. 73
Figura 20. Curvas Melting obtenidas de los Controles Positivos. 74
Figura 21. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR en tiempo real 75
Figura 22. PCR en tiempo real de la muestra 80. 76
Figura 23. Identificación en gel de Agarosa de una Muestra Positiva del Gen EAE. 77
Figura 24. Curva Melting del Control Positivo para el gen EAE. 77
Figura 25. Distribución de los patotipos encontrados en las muestras positivas 78
Figura 26. Resistencia de EPEC a los Antibióticos. 80
Figura 27. Resistencia de E. coli ETEC a los antimicrobianos. 81
Figura 28.Resistencia de EAEC a los antimicrobianos. 82
Figura 29. Resistencia de las cepas de *E. coli* que no resultaron negativas para algún patotipo. 83
Figura 30. Comparación de la resistencia entre patotipos a antimicrobianos 84
Figura 31. Comparación de la resistencia a antimicrobianos por grupos, patógenos y no patógenos. 85
Figura 32. Hisopado Rectal. 99
Figura 33. Medio de transporte Cary-Blair. 100
Figura 34. Encuesta Epidemiologia para estudio de Colera. 101
Figura 35. Encuesta Epidemiológica de Diarreas por Rotavirus. 102
Figura 36. Medios de cultvio diferenciales para Enterobacterias 103
Figura 37. Estriado en placa con medio EMB. 103
Figura 38. Crecimiento de *E. coli* en medios EMB (arriba) y MacConkey (Abajo). 104
Figura 39. Batería bioquímica para Identificación de *E. coli.* 104
Figura 40. Preparación de la Muestra para Extracción de Ácidos Nucleicos 110
Figura 41. Colocación de los Consumibles en el Robot Magna Pure LC 111
Figura 42. Orden de colocación de los Reactivos en la Charola del Robot Magna Pure LC 111
Figura 43. Accesorios para Desecho de Reactivos. 112
Figura 44. Introducción de muestras y protocolo en el Software del Robot Magna Pure LC 113
Figura 45. Programación del Software MagnaPure LC 114
Figura 46. Monitoreo de Extracción de ácidos nucleicos en el Robot Magna Pure LC 115
Figura 47. Placa de 96 pocillos utilizada en Termociclador *LightCycler ® 480* 116
Figura 48. Curva de amplificación positiva y negativa en Termociclador *LightCycler* 480 116
Figura 49. Siembra en placa y resistencia a antibioticos 122

3 ABREVIACIONES

A/E	Adherencia y eliminación.
BFP	Pilus formador de penachos
CA	Complejo aguja
Célula M	Célula membranosa
DAEC	*Escherichia coli* de adherencia difusa
DNA	Ácido desoxirribonucleico.
E.coli	*Escherichia coli*
EAEC	*Escherichia coli* enteroadherente.
EAF	Factor de adherencia de *Escherichia coli.*
EHEC	*Escherichia coli* enterohemorrágica.
EIEC	*Escherichia coli* enteroinvasiva.
EPEC	*Escherichia coli enteropatógena.*
Esp	Proteínas de secreción de *Escherichia coli.*
ETEC	*Escherichia coli* enterotoxigénica.
IgA	Inmunoglobulina A.
IgG	Inmunoglobulina G.
IL-8	Interleucina 8.
LA	Adherencia local.
LAL	Adherencia similar a la local.
LESP	Laboratorio Estatal de Salud Pública
LPS	Lipopolisacárido.
MDa	Megadaltones.
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa.
Pinv	Plásmido de invasividad.
RNA	Ácido ribonucleico.
TIR	Receptor translocado de intimina.
UFC	Unidad formadora de colonia.
VIP	Péptido vasoactivo intestinal

4 Resumen

De acuerdo al sistema Nacional de Información en Salud (SINAIS) en 2008 las infecciones intestinales son la principal causa de muerte en niños de edad preescolar en nuestro país, siendo *Escherichia coli* el principal agente bacteriano causante de infecciones diarreicas, aunque a *E. coli* se le considera como biota normal, existen cepas de *E. coli* que pueden provocar diarrea por mecanismos distintos, estas son enterotoxigénica (ETEC), enterohemorrágica (EHEC), enteroinvasiva (EIEC), enteropatógena (EPEC), enteroagregativa (EAEC) y de adherencia difusa (DAEC. Sin embargo, la identificación de los biotipos de *E. coli* es sumamente difícil pues por métodos bioquímicos convencionales resultan indiferenciables de las cepas de flora normal, las pruebas serológicas resultan inviables por la cantidad de antisueros necesarios y la producción de reacciones cruzadas. Las pruebas de PCR(Reacción en cadena de la polimerasa) son las que han mostrado mayor precisión y sensibilidad para la identificación de biotipos pues se basa en la búsqueda de genes que confieran la capacidad de sintetizar factores de virulencia a las bacterias. Por último la resistencia a los tratamientos antimicrobianos en épocas recientes es un foco de alarma en el tratamiento de infecciones bacterianas no solo de las de tipo gastrointestinal sino en general de todas las infecciones, es por tanto, que es de suma importancia conocer el agente etiológico de la infección gastrointestinal para elegir el esquema de tratamiento mas adecuado, pues los agentes etiológicos que con mayor frecuencia causan gastroenteritidis son los virus, ante los cuales la diarrea tiende a ser autolimitada y no es necesario el empleo de antimicrobianos.

5 INTRODUCCIÓN

5.1 LA DIARREA

De acuerdo a la NORMA Oficial Mexicana NOM-031-SSA2-1999, para la atención a la salud del niño, la diarrea aguda definida es la serie de tres o más evacuaciones anormalmente blandas o líquidas en 24 horas por menos de dos semanas o al menos 1 con mucus, pus o sangre. De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud, la diarrea es uno de los cinco principales problemas de salud pública en el orbe. Es ampliamente reconocida la importancia de determinar su etiología y comprender sus mecanismos fisiopatológicos para establecer el diagnóstico y los esquemas de tratamiento más apropiados sobre todo para evitar los efectos indeseables de la deshidratación, la desnutrición y del uso inapropiado de los antimicrobianos[31].

La OMS estima que cada año se presentan 1647 millones de casos de diarrea en niños menores de 5 años, con una frecuencia anual de 3.6 episodios de diarrea por niño anualmente, esta cifra varía de 0.8 a 10.7, siendo en países desarrollados 0.5 a 2 y en países en vías de desarrollo de 5 a 12. Constituyendo de esta manera a la causa de al menos 5 millones de muertes anualmente siendo la deshidratación la responsable de entre el 60 al 70% de las muertes.[31]

En México, la diarrea es la segunda causa de morbilidad en la población general y la principal causa de demanda de consulta externa y hospitalaria en los niños menores de cinco años, quienes representan el grupo más vulnerable y con mayor riesgo de evolución grave. Durante 1990, en las instituciones públicas de salud se registraron 2, 389, 365 casos de diarrea aguda en niños menores de cinco años, con un total de 14, 011 defunciones para una tasa de mortalidad de 146.3 por 100 mil niños[25,26,95].

La diarrea se clasifica en 2 tipos dependiendo de su duración:

1. La diarrea aguda.- Es aquella que tiene menos de dos a tres semanas de duración, generalmente es autolimitada y responde a un manejo conservador.
2. Diarrea crónica.- Es aquella que tiene una duración mayor o bien es recurrente y se caracteriza por un aumento del bolo fecal [31].

O dependiendo de su fisiología:

- Coleriforme (parecida al cólera).- cuando cursa con heces líquidas, en general abundantes, sin sangre, mucus o pus. No se acompaña en general de fiebre y los agentes causales, que se localizan en el intestino delgado, no provocan acción patógena ni reacción inflamatoria morfológicamente ostensible y no se observan leucocitos en las materias fecales.
- Invasivo o disenteriforme.- cuando se presenta con materias líquidas o semilíquidas acompañadas de la emisión de sangre, mucus o pus y presencia de leucocitos en la observación microscópica. Se puede asociar con fiebre, alteraciones morfológicas e inflamatorias a nivel del colon y extensión extraentérica de entidad y frecuencia variable enteroinvasora [4].

Mecanismos básicos en la producción de diarrea:

1) La presencia en la luz intestinal de sustancias osmóticas activas (Diarrea osmótica).
2) La secreción activa de iones hacia el intestino (Diarrea secretoria).
3) Inhibición del proceso normal de absorción iónica.
4) Movilidad intestinal alterada.
5) Exudación hacia la luz intestinal de moco, sangre y proteínas a partir de sitios inflamados[30].

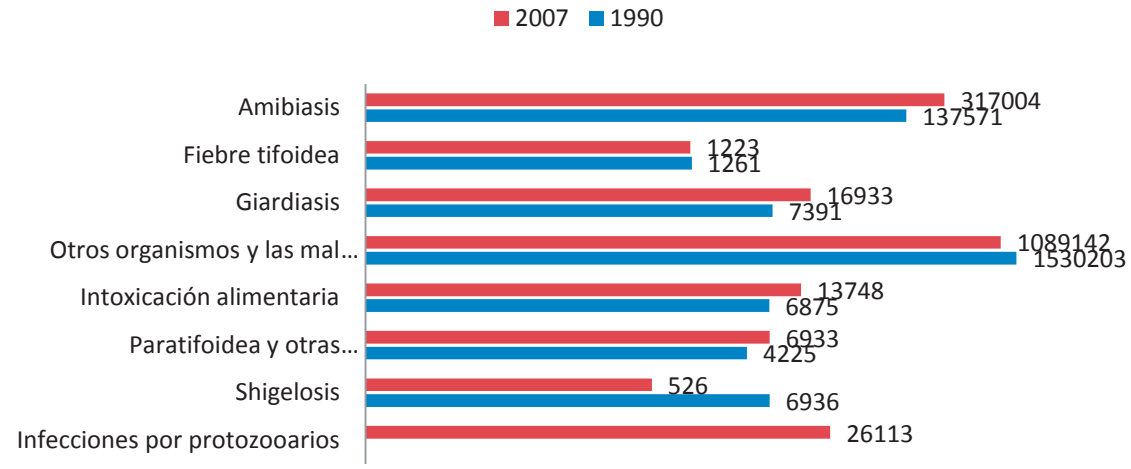
La deshidratación es la complicación más frecuente de las enfermedades diarreicas agudas por lo que hay pérdida de agua y electrolitos [52,130]. Los efectos deletéreos de la diarrea sobre el estado de nutrición del niño se producen por reducción en la ingestión dietética, absorción disminuida de nutrientes, aumento en el catabolismo, pérdida directa de nutrientes por el intestino e ineficiencia metabólica debida a deficiencias de micro nutrientes. Tomando en cuenta la deshidratación y los signos y síntomas se clasifica al niño como hidratado, deshidratado o con choque hipovolémico[31].

A pesar del desarrollo y difusión de la rehidratación oral, la enfermedad diarreica aguda continúa siendo una causa importante de morbilidad y mortalidad en niños menores de 5 años. Ya que se calcula que en países en vías de desarrollo, los niños presentan entre 3 y 10 episodios de diarreas anuales durante los primeros 5 años de vida, con una duración promedio de estos episodios de 4 a 6 días[31].

5.1.1 ETIOLOGÍA DE LA DIARREA EN MÉXICO.

En base al agente etiológico diversos estudios demuestran que las causas más frecuentes de infección gastrointestinal son los virus (Ej. Rotavirus, adenovirus, Norwalk) y toxiinfección alimentaria (Ej. Toxina botulínica, toxina estafilocócica, toxinas de *E.* coli) siendo la combinación de ambas la responsable de entre el 75 y 90% de las causas (Tabla **1**). En los casos que se identifica una bacteria significativa predomina en casi todos los estudios *E.* coli tipificable[107]. Durante el verano de 1996 los resultados en coprocultivos de 419 muestras diarreicas en un laboratorio de referencia ubicado en el área metropolitana mostraron causa no bacteriana. En 92 %; en los casos que se consideró significativa la presencia de una bacteria, predominó *Escherichia coli* toxigénica con 39 % (Tabla 2). En cuanto a las parasitosis intestinales, de 23 011 estudios realizados en ese año sólo 5 % resultó positivo, correspondiendo 66 % a personas adultas y 34 % a niños[102].

Tabla I. Patologías asociadas a infecciones intestinales agudas en pacientes menores de 5 años (1990-2007)



Fuente: Sistema único de información para la vigilancia epidemiológica/ Dirección general de epidemiología/ SSA compendios de anuarios de

Tabla 1 Patologías asociadas a infecciones gastrointestinales agudas en pacientes menores a 5 años (1990-2007)

Tabla II Etiología de la diarrea bacteriana en México

Cultivos	(n=419) %	Positivos %	Mecanismo
Escherichia coli (Serotipificable)	13	39	Inv + Toxig
Salmonella enteritidis	8	24	Invasor
Shigella spp.	6	18	Invasor
Aeromona hidrophyla	3	9	Invasor
Vibrio fluvialis	2	6	Toxigenico
Plesiomona shigelloides	1	3	Invasor
Total	33	100	

Inv= invasor Toxig= toxigénico

Según una base de 5237 coprocultivos, de los que solo 419 mostraron presencia de una bacteria potencialmente significativa

Fuente: Microorganismos patógenos aislados en junio 1996, en el INDRE, laboratorio de referencia, México (1996)

Tabla 2. Etiología de la diarrea bacteriana en México.

5.2 *ESCHERICHIA COLI* COMO AGENTE DIARREAGÉNICO.

Epidemiología de la diarrea producida por *E. coli* en México.

Cortez A. y colaboradores reportan en un estudio hecho en el valle de Chalco del valle de México que consistió en la tipificación de 1118 muestras una incidencia de 62% ETEC (739/1188), 44.6% correspondiente a LT, 11.2 a ST y 44.1 para ST y LT juntas. El 0.84% a EIEC (10/1188), 0.84 (10/1188) a EPEC, 0.08% (1/1188) a EHEC no O157:H7. Sepúlveda y colaboradores reportan 28% EPEC, 13 % ETEC en un estudio hecho al sur de la Cd. De México [106]. En 1990, Guerrat y colaboradores encuentran que ETEC es causa principal de la diarrea del turista en todo el mundo [120].

5.2.1 GENERALIDADES DE *E. COLI*.

Se considera que el colon de los animales de sangre caliente es el habitad "normal" de *E. coli* donde establece una relación simbiótica con su hospedero, su localización en el suelo o el agua se asociaba a contaminación fecal pues se consideraba que no podía reproducirse en el medio exterior[114]. Actualmente se sabe que las cepas patógenas pueden habitar y reproducirse no solo en el intestino grueso, sino también en la sangre o el tracto urinario, además se han encontrado cepas de *E. coli* en otras fuentes como agua de desagüe y adicional a esto se describe que la variedad genética encontrada en estos nichos es mayor e incluso diferente a las cepas de los posibles hospederos[19].

En el colon humano encontramos una densidad aproximada de 1 a 10 millones de células por gramo de colon (se divide 1 vez por día aprox.), lo que hace de *E. coli* un componente menor de la flora bacteriana de esta parte del intestino, donde hay una densidad de $1X10^{10}$ células por gramo de colon. Esta bacteria es una de las primeras en colonizar el intestino del recién nacido por cepas provenientes del canal de parto, las heces de su madre o por la ingesta de alimentos contaminados[106]. Se considera que en el intestino hay siempre una cepa

dominante, aunque esta dominancia no es absoluta, ya que la dinámica natural de procesos aleatorios como la ingesta de ciertos alimentos o antibióticos modifican constantemente esta condición[67].

5.2.2 FISIOLOGÍA Y ESTRUCTURA BACTERIANA.

Escherichia coli Pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*, tribu *Escherichia;* el cual comprende cinco especies: *Escherichia blattae, Escherichia coli, Escherichia fergusonnii Escherichia hermannii* y *Escherichia vulneris*. De las especies anteriores solo *Escherichia coli* es considerada como bacteria de importancia clínica. Fué descrita por primera vez por el Bacteriólogo Alemán Theodor Escherich en el año de 1885, inicialmente le llamo *Bacterium coli.* Posteriormente se le denomino *Escherichia coli* en honor a dicho científico[14].

E. coli es un bacilo gram negativo de tamaño intermedio (de 1X3-6µm), generalmente móvil con flagelos perítricos y no forma esporas. Fermentan la glucosa, reducen los nitratos a nitritos, son catalasa positivos y oxidasa negativos, siendo la ausencia de actividad citocromo oxidasa una característica importante[14].

La clasificación bacteriana se realiza en base al lipopolisacárido O y el antígeno flagelar H; el LPS O es muy variable aún entre bacterias de la misma especie por lo que es un buen criterio de clasificación serológica. Kauffman desarrolló este esquema de Serotipificación que continuamente varía y que actualmente tiene 176 antígenos somáticos (O), 112 flagelares (H) y 60 capsulares (K). El antígeno “O” es el responsable del serogrupo; la determinación del antígeno somático y flagelar (O:H) indica el serotipo, el cual en ocasiones se asocia con un cuadro clínico en particular.[32,85]

5.2.3 EL GENOMA BACTERIANO.

El genoma cromosomal de *Escherichia coli* contiene 4, 639,221 pares de bases de DNA circular de doble cadena. El 87.8% de este genoma codifica para proteínas, el 0.8% codifica para RNAs estables y 0.7% consiste en DNA repetido que no tiene función conocida[64]. Entre estos genes se destacan las llamadas "islas de patogenicidad" (regiones donde se encuentran los genes que confieren capacidades patógenas a una bacteria) [88].

El genoma de E. coli es dinámico y sus elementos extracromosomales (plásmidos) son aún más. Esta bacteria puede sobrevivir sin ningún plásmido o tener un buen porcentaje de su genoma total en ellos[17,53]. El número y tipo de plásmidos dentro de una célula esta regulado por dos fuerzas: el número de réplicas de un mismo plásmido dentro una bacteria - fenómeno controlado en parte por el mismo plásmido- y la entrada de nuevos plásmidos por conjugación o trasformación[70-72]. La información contenida en estos elementos extracromosomales es variable, ya que en ellos se puede encontrar información para asimilar azúcares raros, para producir substancias alelopáticas que matan a posibles competidores de la misma especie- resistencias a antibióticos y a metales pesados, inmunidad contra fagos, genes que codifican para intercambio genético y fimbrias relacionadas con la patogenicidad y toxinas, entre otros [68].

La gran plasticidad genómica de E. coli le confiere una plasticidad ecológica notable, ya que gracias a ella pueden adaptarse rápidamente a vivir en diferentes ámbitos y pueden de esta forma pasar de ser organismos de vida libre a ser comensales mutualistas del colon en los animales de sangre caliente, hasta ser un patógeno mortal en humanos y animales[72].

5.3 INMUNIDAD INTESTINAL DEL HOSPEDERO CONTRA BACTERIAS PATÓGENAS:

5.3.1 MECANISMOS INTESTINALES DE PROTECCIÓN NO ESPECÍFICA:

Producción de mucopolisacáridos: Una gran cantidad de células distribuidas a lo largo del intestino sintetizan una glucoproteína denominada mucina cuya estructura es muy similar a los ligandos que presentan las células epiteliales para las bacterias enteropatógenas. Esta mucina tiene como función principal la de impedir la adherencia de las bacterias, este mecanismo se refuerza por los movimientos peristálticos.

Flora bacteriana: La presencia constante de bacterias predominantes anaeróbicas en el colon, interfiere con los sitios disponibles para otras bacterias o parásitos. Así mismo, los lipopolisacaridos bacterianos estimulan la proliferación y localización de células linfoides de intestino. La administración de antibióticos puede alterar a los componentes de la flora y por lo tanto interferir con este mecanismo de protección.

Factores solubles: Son moléculas liberadas a la luz intestinal como lactoferrina, lisozima, peroxidasa los cuales tienen actividad antimicrobiana.

Reforzamiento de la protección intestinal por anticuerpos biliares: Se ha demostrado que la llegada de los alimentos al duodeno, provocan la liberación de la hormona colecistocinina la que por la circulación general llega a la vesícula biliar, provoca se contracción y la liberación de anticuerpos de clase IgA sintetizados en la mucosa de la vesícula biliar los que a su vez son descargados hacia el duodeno.

Competencia con receptores: Los oligosacáridos presentes en la superficie de las células epiteliales favorecen la adherencia de bacterias y parásitos. Los anticuerpos de clase IgA presentan en su estructura oligosacáridos similares a los de las células epiteliales, gracias a esto pueden interferir por este mecanismo con la adherencia de enteropatógenos. De manera similar actuarían los lactobacilos ingeridos en la dieta.

Componentes celulares asociados al intestino: En el lumen intestinal encontramos macrófagos que potencialmente podrían fagocitar partículas extrañas e inducir una respuesta inmunitaria. También se ha reportado la presencia de linfocitos citotóxicos, los cuales pueden ser muy activos cuando se incuban con linfocinas como la interleucina-2 o con polipéptidos intestinales como el VIP.

Células cebadas: Existe una gran cantidad de estas células distribuidas en el intestino delgado y grueso, las cuales liberan mediadores como histamina y eliminan parásitos intestinales.

Eosinófilos: Son elementos celulares muy importantes que responden a factores quimiotácticos producidos por las células cebadas y que de esta manera coadyuvan en la eliminación de parásitos.[42]

5.3.2 MECANISMOS INTESTINALES DE PROTECCIÓN ESPECÍFICA (INMUNIDAD INTESTINAL):

El proceso digestivo normal da como resultado la degradación de los alimentos hasta oligopéptidos y oligosacáridos en la luz intestinal que pudieran actuar como material antigénico. La presencia constante de este material provoca la inducción de una respuesta inmunitaria local de anticuerpos IgA que retardan su entrada y esto permite un mayor contacto con las enzimas pancreáticas e intestinales y lograr una digestión más completa y disminuir su capacidad inmunogénica. Las

células epiteliales de las mucosas impiden que el material antigénico interaccione directamente con las células del tejido linfoide asociado al intestino. Destacan dentro de la población de células epiteliales, las células denominadas M que recubren las placas de Peyer, que son las encargadas de transportar antígenos y completar su degradación intracelularmente. Estas células tienen en su membrana, antígenos de histocompatibilidad de la clase II de manera similar a los macrófagos presente en la luz intestinal. También es importante considerar a los linfocitos que se encuentran entre las células epiteliales que se denominan teliolinfocitos, los que pueden responder a los antígenos en forma específica.[42]

Es necesario considerar que la respuesta inmunitaria para la síntesis y producción de anticuerpos de clase IgA e IgG requiere de varios días, como se muestra en la (Figura 1), por lo que la llegada de toxinas a la luz intestinal ejercerían su acción inmediatamente y sólo se podría impedir su actividad por medio de anticuerpos, con base a lo anterior es necesario promover las medidas que impiden la llegada de toxinas, iniciar rápidamente la hidratación oral o realizar inmunoprofilaxis.[42]

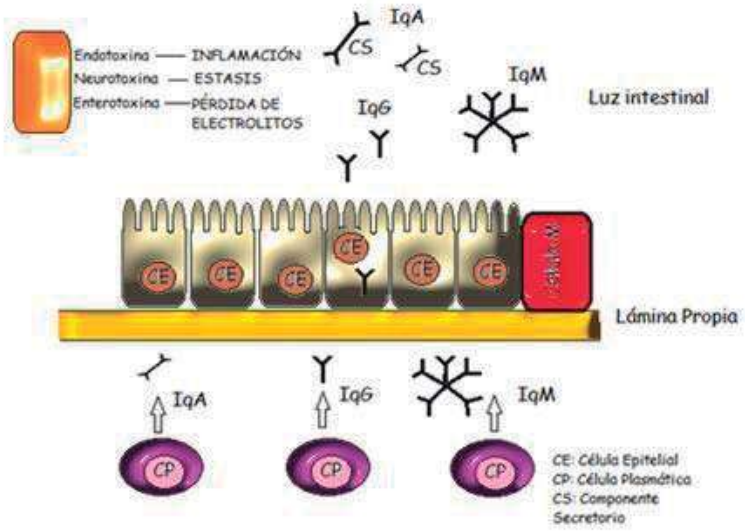


Figura 1. Producción de anticuerpos por parte del sistema inmune intestinal.

En síntesis las funciones de los anticuerpos IgA presentes en secreciones serían:

- Exclusión de material antigénico presente en el intestino
- Interferencia con la adherencia de bacterias, parásitos y virus
- Actividad neutralizante de toxinas

5.3.3 INMUNIDAD CELULAR LOCAL.

Los linfocitos T se encuentran distribuidos en el epitelio y lámina propia del intestino delgado y del grueso. Una característica de las células epiteliales es su recambio y desprendimiento de la superficie, por lo que los linfocitos son sustituidos constantemente provenientes de las placas de Peyer y ganglios linfoides mesentéricos. Una función muy importante de los linfocitos T es su papel en la eliminación de parásitos intracelulares, sin embargo su activación y estimulación constante por el material antigénico derivado de los alimentos o de los parásitos en la luz intestinal puede alterar el epitelio y provocar atrofia de las vellosidades intestinales.[42]

5.4 PATOTIPOS DE *ESCHERICHIA COLI*.

Escherichia coli. Es la especie de bacteria recuperada con mayor frecuencia en los laboratorios clínicos y ha sido incriminada en enfermedades infecciosas que afectan casi a cualquier tejido y sistema orgánico humano. Es uno de los microorganismos más frecuentes involucrados en la sepsis por gramnegativos y en el shock inducido por endotoxinas. Otras infecciones habituales producidas por *E. coli* son las de las vías urinarias y la de las heridas, enteritis y gastroenteritis, la neumonía en los pacientes hospitalizados inmunosuprimidos y la meningitis de los recién nacidos[58]. Escherichia coli coloniza el intestino del hombre pocas horas después del nacimiento y se considera de flora normal, pero existen descritos seis grupos diferentes de E. coli con la capacidad de producir diarrea también denominados patotipos, estos seis patotipos son *E. coli* enterotoxigénica (ETEC),

enterohemorrágica (EHEC), enteroinvasiva (EIEC), enteropatógena (EPEC), enteroagregativa (EAEC) y de adherencia difusa (DAEC) (Tabla 3). La bacteria *E. coli* se puede aislar e identificar tradicionalmente tomando en cuenta sus características bioquímicas o serológicas pero también se pueden estudiar sus mecanismos de patogenicidad mediante ensayos en cultivos celulares o modelos animales y, más recientemente, empleando técnicas de biología molecular que evidencian la presencia de genes involucrados en dichos mecanismos[97].

Tabla III CARACTERISTICAS DE LOS GRUPOS DE ESCHERICHIA COLI CAUSANTES DE DIARREA

GRUPO	SINTOMAS CLÍNICOS	EPIDEMIOLOGÍA	SEROTIPOS MAS COMUNES	FACTORES DE PATOGENICIDAD
ETEC	Diarrea aguda acuosa	Niños menores de 2 años y diarrea del viajero.	O8:H9, O15:H11, O20:H-, O27:H7, O78:H12, O148:H28, O159:H20	Toxina termoestable, toxina termolábil, factor de colonización antigénico.
EHEC	Síndrome urémico hemolítico, diarrea con sangre (10% de los casos), dolor abdominal, fiebre, vomito	Niños y adultos que la adquieren por comer carne cruda o mal cocida	O157:H7, O26:H11, O103:H2, O113:H21, O119, O128, O145	Toxina shiga, intimina, pO157
EIEC	Diarrea con moco y sangre o diarrea acuosa	Niños menores de seis meses	O28:H, O122ac:H, O144:H, O152:H	Plásmido de invasividad de 140MDa
EPEC	Diarrea aguda, dolor abdominal, vómito, fiebre baja	Niños menores de seis meses hasta dos años	O55,O86, O142, O111:H-O127	Pili con forma rizada, Plásmido de factor de adherencia de 50 a 70MDa
EAEC	Diarrea líquida, verde con moco, sin sangre, diarrea persistente de hasta 20 días	Recién nacidos y niños menores de dos años	O44:H18	Fimbria AAFI y II, Toxina termo estable de cepas enteroagregativas, Proteínas Pet, Pic y de membrana externa, plásmido de 60MDa y Citotoxina
DAEC	Diarrea acuosa sin sangre	Niños de 1 a 5 años	O126:H27	Fimbria F1845 y proteína de membrana externa

Tabla 3. Características de los grupos de Escherichia coli causantes de Diarrea.

Adaptado de Guadalupe A. 2002. Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de Escherichia coli. salud pública de méxico.44(5). 464:475.

Nos involucraremos en el estudio y caracterización de los patotipos de *E. coli* enteropatógena, enteroinvasiva y de adherencia difusa, por lo que se procederá a la descripción de estos 3 patotipos.

5.4.1 ESCHERICHIA COLI ENTEROPATÓGENA.

Escherichia coli enteropatógena es una de las principales causas de diarrea en niños menores de dos años en países en vías de desarrollo.[126] A mediados de la década de 1940 se identificaron en Inglaterra brotes de diarrea asociados a *E. coli* en niños de guarderías. A las bacterias encontradas se las llamó *E. coli* enteropatógenas para diferenciarlas de las *E. coli* de Flora normal, este término fue utilizado por primera vez por Neter y col en 1955[68]. Estas cepas produjeron una diarrea de tipo acuoso que comúnmente presentó vómito y con un periodo de incubación de 3-24 horas en individuos experimentales que ingirieron un inoculo de $1X10^9$ a $1X10^{10}$ UFC [21,85].

El sello en la infección causada por EPEC es la patología de adherencia y eliminación “A/E” (attaching and effacing por sus siglas en inglés, llamado también locus “eae”) observada en biopsias intestinales de humanos y animales infectados, fenómeno que puede ser reproducido in vitro (Figura 2) [5,56,61,83,93,98,115,117,112,124].

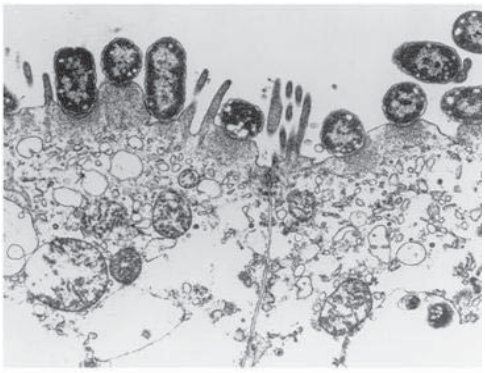


Figura 2. Lesión característica de EPEC A/E observada en el ileum después de la inoculación oral en cochinillos.

Observe el accesorio íntimo de las bacterias a la membrana del enterocito con la interrupción del citoesqueleto de la célula. El aspecto de una bacteria que se sienta en un "pedestal" de la membrana de la célula es absolutamente característico. Nataro y Kaper 1998

Se observa un borrado de las microvellocidades del enterocito y una íntima unión entre la bacteria y la célula huésped, además de cambios en el citoesqueleto que incluyen polimerización de fibras de actina que se observan justo debajo de la adhesión de la bacteria formando una "pedestal". Esta estructura de pedestal se puede extender más de 10μm fuera de la célula en formas similares a un pseudópodo[83].

Otros cambios en el citoesqueleto son presencia de α-actina, talina, ezrina y haces de cadenas de miosina [36]. En la punta del pedestal bajo la membrana plasmática se ubican proteínas fosforiladas en residuos de tirosina [100].

Sin embargo las lesiones de A/E no son exclusivas de estas cepas bacterianas ya que se han observado igualmente en infecciones por *Hafnia alvei* recuperadas de niños con diarrea[1-2] y en cepas de *Citrobacter rodentium* (*Citrobacter freundii* biotipo 4280) aunque en la infección por esta cepa no se observa diarrea [103]. Esta observación sugiere que la diarrea causada por EPEC no depende solo de la lesión A/E.

Para lograr un mejor estudio de la infección por EPEC, esta se ha dividido en 3 fases o etapas. Este esquema fue propuesto por Donnenberg y Kaper en 1992 [27] y son:

- Adherencia inicial.
- Inyección de Factores y transducción de señales.
- Contacto íntimo y formación de pedestales (Figura 3).

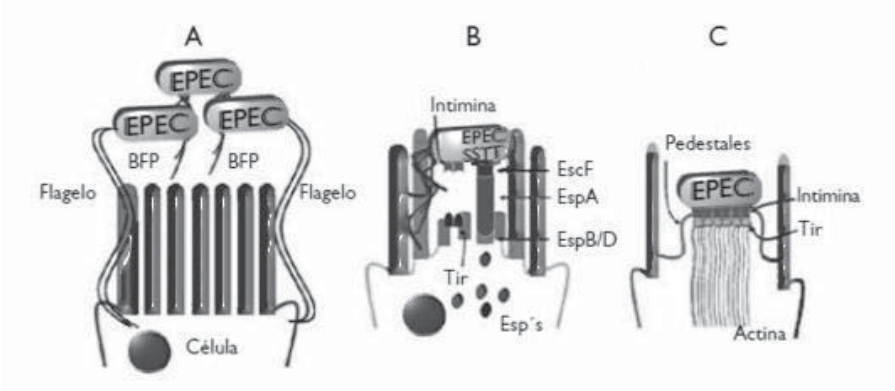


Figura 3. Esquema propuesto por Donnenber y Kaper en 1992. Infección de EPEC.

A) Los PFP permiten que las bacterias interactúen entre ellas para formar una microcolonia y el flagelo establece el contacto inicial de la bacteria con la célula epitelial. B) Una vez adherida a la célula, EPEC inyecta factores de virulencia (Esp) mediante el SSTT-translocón, entre ellos Tir, que se inserta en la membrana de la célula y expone una región en el espacio extracelular. C) La intimina (una proteína de membrana externa) se une con firmeza a Tir y se induce el reacomodo del citoesqueleto, lo cual favorece la formación de los pedestales de actina y la desaparición de las microvellosidades absortivas; ello da lugar a la lesión A/E . Vidal JE. Y col 2007

Adherencia inicial.

La adherencia inicial es un proceso crucial para la patogénesis de EPEC, y se divide en 2 pasos, el primero es la adherencia entre las mismas bacterias y el segundo es la adhesión de las bacterias a las células huésped, estos pasos dependen de 2 factores de virulencia que son los pelos formadores de penachos y el flagelo[44,121]. De esto surge una clasificación de las cepas de EPEC dependiendo de la presencia o ausencia del plásmido EAF:

- Tipo I o típicas.- codifican el plásmido EAF y presentan un fenómeno de adherencia localizada (LA del inglés Local adherence).Figura 4 – A.

- Tipo II o atípicas.- No codifican el plásmido EAF y presentan un fenómeno de adherencia similar a la localizada (LAL del inglés Local adherence-like) Figura 4 – B.[122]

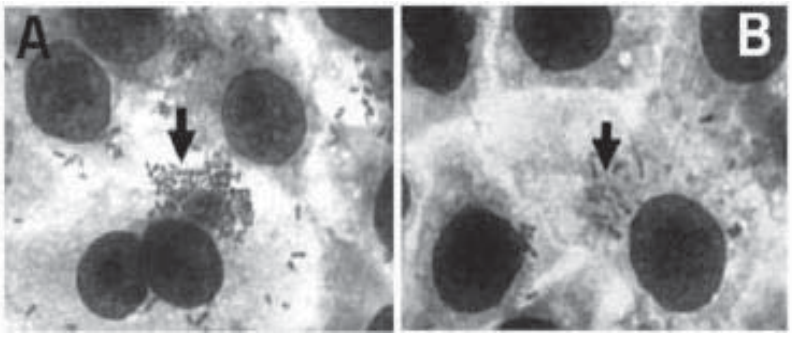


Figura 4. Ensayo de adherencia desarrollado por Cravioto y colaboradores.

Células HEp-2 en cultivo in vitro infectadas durante tres horas con cepas diarreagénicas de E. coli, fijadas con metanol al 70%, teñidas con el colorante de Giemsa y observadas bajo microscopia de luz convencional. A) Adherencia localizada (LA) de cepas de EPEC de tipo I, también llamadas cepas de EPEC típicas (flecha). B) Adherencia parecida a la localizada (LAL) de cepas de EPEC tipo II o atípicas; nótese que el tamaño de la microcolonia y el número de bacterias adheridas son menores respecto de las cepas con LA (flecha) Cravioto y col. 1979

Inyección de Factores y Transducción de señales.

La adherencia de EPEC a células epiteliales induce una variedad de vías de transducción de señales en la célula eucariota. Los genes responsables de estos cambios están localizados en una isla de patogenicidad de 35 Kb (kilo bases) dentro del cromosoma bacteriano, a esta isla de patogenicidad se le llama locus de eliminación del enterocito o LEE (del inglés Locus Enterocyte-Effacement)[40,55,59].

El LEE está organizado en 5 operones policistrónicos (LEE1-LEE5) y forma 3 dominios de virulencia que codifican los siguientes genes:

Los operones LEE1, LEE2 y LEE3 codifican las proteínas de un sistema de secreción tipo III llamado complejo aguja (CA) (Figura 5). En el LEE4 están los genes que codifican para las proteínas secretadas por el CA conocidas como proteínas secretadas por EPEC o Esp (del inglés *E. coli* secreted proteins). (Tabla 4). El LEE5 codifican la adhesina bacteriana intimina y su receptor llamado receptor translocado de intimina Tir (del inglés translocated intimin receptor). Por que se transloca por la misma bacteria a través del CA hacia el interior de la célula[18,24,30].

Tabla IV Función de las proteínas secretadas por EPEC.

Proteína	**Función**
EspF	Redistribuye proteínas importantes de las uniones estrechas intercelulares (atenuación de la resistencia transepitelial.
Esp G y G_2	Degradan la red de microtúbulos por debajo de donde se encuentra la bacteria adherida a la célula.
EspH	Modula la estructura del citoesqueleto de actina y la formación de filopodios durante la lesión A/E.
EspZ	Se acumula en zonas del crecimiento de los pedestales, pero se desconoce su función patológica.
Map	Se asocia con proteínas mitocondriales y propicia la liberación de citocromo C e inducción de apoptosis.
Tir	Se transporta a través del CA por una chaperona llamada CesT. Su fragmento hidrofóbico se inserta dentro de la membrana plasmática y expone hacia el espacio extracelular un fragmento de 107 aminoácidos conocido como TIBA (unión a intimina).

Tabla 4. Función de las proteínas secretadas por EPEC.

Adaptado de : Vidal J., Canizález A., Gutiérrez J., Navarro F. 2007. Patogénesis molecular, epidemiología y diagnóstico de Escherichia coli enteropatógena Salud Publica Mex 2007;49:376-386..

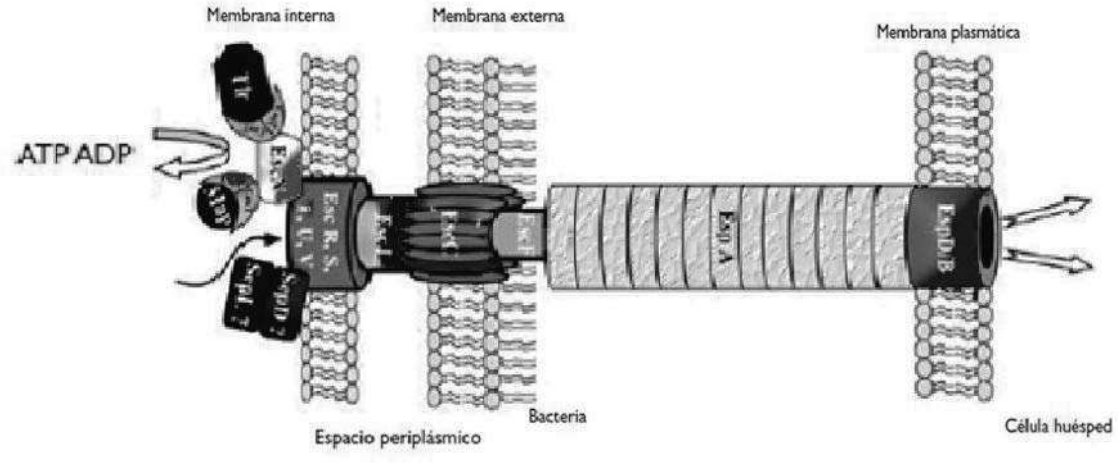


Figura 5. Complejo de Secreción tipo 3 (Complejo Aguja)

A través del CA pasan 3 proteínas codificadas en el LEE conocidas como proteínas translocadoras. La primera, EspA (25KDa) se ensambla directamente con la EscF y se polimeriza para permitir al CA extenderse y formar un ducto que permita el contacto bacteriano con la célula hospedera (37). A través del ducto formado pueden pasar las proteínas EspB (38KDa) y EspD (40KDa) que se ubican en la membrana de la célula y forma el anclaje del CA por el cual EPEC inyecta directamente las proteínas efectoras de virulencia. Las proteínas efectoras se clasifican en proteínas codificadas en el LEE (EspF, EspG, EspH, EspZ, Map y Tir) y no codificadas en el LEE (Cif, $EspG_2$, NleC y NleD). (37-41). Adaptado de : Vidal J., Canizález A., Gutiérrez J., Navarro F. 2007. Patogénesis molecular, epidemiología y diagnóstico de Escherichia coli enteropatógena Salud Publica Mex 2007;49:376-386.

Contacto Íntimo y formación de pedestales.

Tras la unión de Tir con intimina, Tir se fosforila en el residuo 474 por una proteína Src-cinasa [92]. La forma fosforilada de Tir adapta la proteína Nck, que atrae, interacciona y activa a otras proteínas del citoesqueleto. Estas proteínas activadas polimerizan y reorganizan finalmente al citoesqueleto[71].

Los pedestales se forman debajo de donde la bacteria está adherida y se componen de actina polimerizada y otras proteínas como actina-α, fimbrina, miosina, talina y ezrina. La reorganización proteica conduce a la pérdida estructural y funcional de la célual infectada[71].

La diarrea por EPEC

Aunque la lesión A/E producida por EPEC reduce de manera importante la función de absorción del enterocito, se ha establecido que el periodo de incubación de la bacteria hasta la aparición de la diarrea es muy corto (hasta 2.9 horas), Esta rapidez sugiere que un mecanismo secretor más activo está implicado en la diarrea causada por EPEC y que una variedad de mediadores intracelulares del transporte intestinal de iones, tales como calcio, PKC de los fosfatos de inositol y de tirosin-cinasa es afectada por la infección de EPEC. Se tienen informes recientes de que EPEC altera activamente el transporte de iones en células epiteliales. Además estudios recientes sugieren que la proteína EspC induce la salida masiva de iones al espacio extracelular [81]. En experimentos llevados a cabo por Navarro-García se demostró que la proteína EspC induce daño al citoesqueleto de células HEp-2 y que el gen EspC solo ha podido reconocerse en cepas EPEC tipo I (las más virulentas) [81].

Epidemiología.

En México se reporta EPEC endémica hasta en 6% de la población [37]. En un estudio hecho en Guadalajara en 1987, se aisló EPEC en 17% de los casos de niños menores de 2 años con diarrea aguda (por encima de patógenos como *Shigella sp., Salmonella sp., Giardia* lamblia o rotavirus). En 1991 Cravioto y col. Reportaron 19% de EPEC en casos de diarrea infantil en Morelos. El hospital infantil de México aisló EPEC tipo I en 7% de 208 casos de diarrea infantil y 12% de EPEC tipo II en el mismo grupo de pacientes [49]. Estrada-Garcia reportaron EPEC atípicas en 21% de 62 casos de diarrea infantil del hospital de la ciudad de México y Villahermosa Tabasco [34].

5.4.2 *ESCHERICHIA COLI* ENTEROINVASIVA (EIEC)

Escherichia coli enteroinvasiva es una causa importante de diarrea endémica en México, Sudamérica y Europa del este [118], responsable de 5% de casos de diarrea en turistas de E.U.A. en México y ha sido implicada en epidemias alimentarias en países en desarrollo [50,111,123]. Se ha calculado que *E. coli* enteroinvasiva provoca 630 millones de casos de diarrea en el mundo y aproximadamente 775.000 muertes, afectando fundamentalmente a la población infantil del tercer mundo [14].

Históricamente fue descrita en 1944 cuando fue llamada *Paracolon Bacillus*, posteriormente clasificada como *E. coli* enteroinvasiva O124 [8,82,99]. Este biotipo de *E. coli* está emparentado biológica y genotípicamente con *Shigella sp*., siendo la mayoría de cepas de EIEC lactosa negativa, inmóviles y lisina descarboxilasa negativa [35,109]. Las pocas características bioquímicas que permiten distinguir EIEC de *Shigella sp*. Incluyen al mucato y acetato debido a que EIEC puede ser positiva para una o ambas pruebas, mientras que *Shigella* no lo es para ninguna [35].

El esquema patogénico de EIEC aún no está claro, pero se sugiere que su patogenicidad es virtualmente idéntica a la de *Shigella sp.* [45,90]. Ambos organismos han mostrado la capacidad de invadir el epitelio del colon (Figura 6), un fenotipo mediado por locus plasmídicos y cromosómicos además de la elaboración de 1 o mas enterotoxinas secretoras que pueden desempeñar un papel en la patogénesis de la diarrea [45].

La invasividad de EIEC comprende 5 fases:

1. Penetración a la célula epitelial.
2. Lisis de la vacuola endocítica.
3. Multiplicación intracelular.
4. Movimiento intracitoplasmático.
5. Expansión entre células adyacentes.

En una infección severa esta secuencia induce una fuerte reacción inflamatoria que se manifiesta como una ulceración[101].

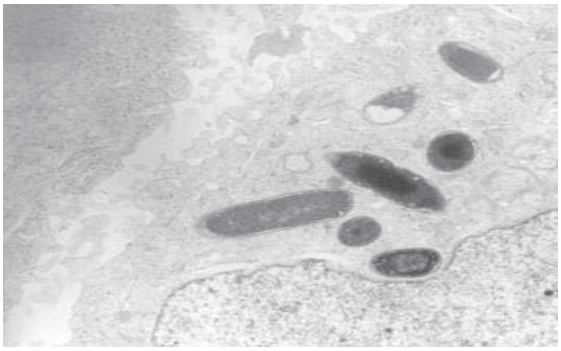


Figura 6. Interacción de EIEC con las células epiteliales.

Como *Shigella*, las cepas de EIEC invaden las células epiteliales intestinales, lisan la vacuola lisosomal, y se mueven a través del citoplasma, separándose en última instancia a las células epiteliales adyacentes. Esta fotomicrografía electrónica demuestra un organismo de EIEC libre dentro del citoplasma de una célula infectada. Nataro y Kaper 1998.

La capacidad de invasividad de EIEC se encuentra en un plásmido de 140 MDa designado como pinv [110]. Remarcado entre los genes plasmídicos está el gen mxi y spa, que codifican para un sistema de secreción tipo III semejante al de EPEC [79,3]. Esta maquinaria es necesaria para la secreción de múltiples proteínas (IpaA-IpaD), de las cuales IpaB, IpaC e IpaD son efectores del fenotipo de invasión [110], IpaC ha mostrado ser un promotor de la admisión intracelular de *Shigella sp*. dentro de la célula eucariota[74,] donde también IpaB se cree que funciona lisando la vacuola fagocítica y en la inducción de apoptosis de los macrófagos [132].

La presencia de una proteína de un tamaño de 63KDa derivada de un gen llamado sen en el plásmido pInv ha mostrado ser la causa de la actividad enterotóxica de EIEC ya que una mutación de este gen reduce la actividad enterotóxica de la cepa. A pesar de que el papel de la enterotoxina no está probado su presencia puede explicar la diarrea acuosa observada en la infección por EIEC la cual se caracteriza por un periodo de diarrea acuosa que precede a la aparición de deposiciones tipo disentería que contienen moco y sangre aunque en muchos pacientes puede no ser evidente[85].

5.4.3 *ESCHERICHIA COLI* DE ADHERENCIA DIFUSA. (DAEC)

El término "*E. coli* de adherencia difusa" fue utilizado inicialmente para referirse a cualquier cepa de E. coli capaz de adherirse a células HEp-2 que no formaban microcolonias como las de EPEC tipo I.[85]

Hasta hace poco se desconocía mucho del rol patógeno de las *E. coli* que presentaban adherencia difusa (DA), la cual se aislaba de niños con diarrea acuosa [85]. DAEC es un grupo heterogéneo de bacterias aisaladas, las cuales presentan un patrón de adherencia difusa a células epiteliales, como lo demuestra la prueba de adhesión a células HEp-2 (carcinoma epidermoide) o a células HeLa (cáncer cérvico uterino) [20].

En muchos casos la adherencia de DAEC se debe a la producción de adhesinas codificadas por una familia de operones llamados afa/dra/daa [63] Tabla 5.

Tabla V. Adhesinas codificadas por genes relacionados afa/daa/dra. En *E. coli* patógenas en humanos.

Patotipo	Subtipo de Adhesina	Operón	Receptor celular identificado	Patogenicidad	Cepa de referencia	Morfología
DAEC	Afa-EI	afa-1	DAF	D, UTI	KS52	A/F
	Afa-EII	afa-2	DAF	D, UTI	A22	A
	Afa-EIII*	afa-3	DAF CEACAM1, CEA, CEACAM6	D, UTI	A30	A
	Afa-EV	afa-5	DAF	D, UTI	AL851	A
	DR*	Dra	DAF, CEACAM1, CEA, CEACAM6, collagen type-4	UTI	IH11128	F
	DRII	dra2	DAF	UTI	7732	A
	F1845	Daa	DAF CEACAM1, CEA, CEACAM6	D, UTI	C1845	F
	Nfa-I	nfa-1	DAF, CEA	UTI	827	A
EXPEC	Afa-EVIII	afa-8	Desconocido	UTI	AL862	A

Tabla 5. Adhesinas codificadas por genes relacionados AFA/DAA/DRA. En E. coli patógenas en humanos

Datos: DAEC, *E. coli* de adherencia difusa; EXPEC, E. coli patógena extraintestinal; D, diarrea, UTI, infecciones de vías urinarias; A, afimbrial; F, thin fimbrial; DAF,decay-accelerating factor; CEACAM, carcinoembryonic, antigen-related molecule. Adaptado de (Le Bouguenec et al., 1993; J. Guignot, I. Kansau, A.L. Servin).

Estas proteínas de adhesión han sido asociadas a infecciones por cepas de E. coli tanto intestinales como extraintestinales [113]. Cabe resaltar que el gen afa-E es altamente heterogéneo y conduce a la producción de adhesinas antigénicamente diferentes [63]. También se ha encontrado que las cepas que solo codifican para este factor de virulencia han sido reportadas como causa de diarrea poco severa en niño mayores de 2 años[63]. Los ensayos de sondas y PCR basados en la secuencia daa y afa detectan también la presencia de los operones de toda la familia de adhesinas [65].

Los subtipos genéticos afaE1, afaE2, afaE3, afaE5, dra, dra2, daa y nfa codiican para adhesinas designadas como afa/dr [87,66,108]. Estas adhesinas son expresadas por cepas de *E. coli* aisladas de humanos y además muestran la capacidad de reconocer el grupo de antígenos designados como Croner blood human decay-acelerating factor (DAF o CD55) como receptores celulares [87]. DAF es una glicoproteína presente en la superficie celular que regula la cascada del complemento y está ampliamente distribuida en células hematopoyéticas, epitelio intestinal, urinario y células endoteliales.

El responsable de la adhesión es la porción SCR3 (Shortcut concens repeat)del DAF que se acumula justo debajo de la unión entre la célula y la bacteria [47]. Además de todo DAF es una molécula que actúa como traductora de señales y su activación se acompaña de una inducción de la extensión de las microvellocidades en la superficie del enterocito infectado provocando un contacto estrecho con la bacteria (Figura 7), esta extensión de las microvellocidades está controlada por señales que incluyen la activación de Cdc42, GTP-asa Rho y la fosforilación de ezrina, radixina y moesina [9].

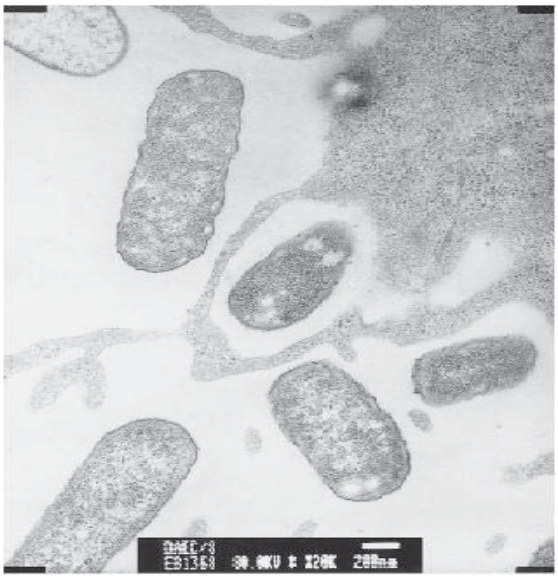


Figura 7. Interacción de DAEC con células epiteliales.

Se observa la asociación de la bacteria con la membrana y la formación de proyecciones citoplasmáticas del enterocito en forma de dedo que emanan de la superficie celular. Estas proyecciones envuelven a la bacteria en un fenotipo denominado "inclusión". Nataro y Kaper 1998.

Dado que se han aislado cepas clones diarreagénicas y uropatógenas sin importar el su subtipo de gen codificante para adhesina que producen ya sea afa/dr estas pueden causar infecciones intestinales y extraintestinales. Las afaE1, afaE3 y afaE5 son las más prevalentes. Cabe resaltar que afaE8 nunca ha sido aislado como enteropatógeno, pero es el más prevalente uropatógeno [66,54].

Las proteínas codificadas en los operones afa/dra/daa son estructuras adhesivas amorfas bacterianas llamadas afimbrias (en el caso de afaE1 y afaE3) y fimbrias (caso F1845 y dr) que se ensamblan para formar organelos superficiales de variedad morfológica [67,13, 39]. Análisis microscópicos de quimeras entre afa-E3 y daa que codifican tanto para estructuras fimbrias como afimbrias indican que la morfología de la estructura adhesiva depende de la secuencia del gen codificante para adhesina [39].

A pesar de que se han observado una variedad de factores virulentos en cepas aisladas DAEC de pacientes con infecciones intestinales, extraintestinales y casos control, no ha podido relacionarse a estas un sistema secretor asociado a las cepas afa/dr [15]. De cualquier manera, las lesiones celulares observadas en células intestinales de individuos infectados son independientes de la adhesión, esto sugiere la presencia de otros factores de patogenicidad [91].

Está claramente demostrado que el flagelo es un importante factor de virulencia involucrado en la respuesta proinflamatoria como lo es la inducción de IL-8, que procede a la infección por EPEC, EAEC, EHEC y DAEC [11]. Recientemente se ha reportado que las cepas DAEC móviles Dr y F1845 son mas capaces de inducir producción de IL-8 que las cepas inmóviles [6].

Otros factores de virulencia.

Se ha determinado que el riesgo relativo de padecer una diarrea por infección con DAEC aumenta con la edad del niño desde los 18 meses hasta los 5 años [48,69,102]. La portación intestinal de cepas afa/dr DAEC también se ha reportado en niños mayores y adultos aunque la consecuencia de esta persistencia se desconoce, se ha sugerido que está involucrada con el desarrollo de enfermedades crónico inflamatorias del intestino [102].

El reconocimiento de células epiteliales infectadas como resultado de la unión con dra o F1845 está asociado a reacomodos del citoesqueleto que implican a proteínas como F-actina, vilina, α-actina, ezrina y tropomiosina [10]. En los cultivos celulares infectados con DAEC, se observa una lesión en las microvellocidades que es consecuencia de el desensamblaje de 2 proteínas importantes del citoesqueleto (F-actina y vilina), como resultado de la activación de señales dependientes de Ca++ [91].

La infección por DAEC también conlleva a un aumento de la permeabilidad paracelular y un dramático rearreglo en la distribución de las proteínas asociadas a las uniones estrechas intercelulares ZO-1 y ocluidina, sin afectar la resistencia eléctrica transepitelial [91]. Además la infección por DAEC produce una fuerte respuesta inflamatoria, pues incrementa la expresión del MHC-I, una molécula central en la respuesta inmune inmediata y eleva los niveles de producción de IL-8 que resulta de la activación de protein-cinasas mitógenas ERK1/2, P38 y Jun-C [11].

La IL-8 induce una transmigración de leucocitos polimorfonucleares a través de la barrera transepitelial que promueve la producción de TNFα e IL-1β, que actúan como promotores de la expresión de DAF [11]. Estos LPMNs tienen un marcado aumento de la apoptosis debido a la aglutinación causada por las adhesinas Afa/Dr [16]. El reparto de componentes deletéreos que incluyen citocinas proinflamatorias, especies reactivas de oxígeno y enzimas proteolíticas por los LPMNs apoptóticos puede ser un factor que incrementa la respuesta inflamatoria en la infección por DAEC[10], y en consecuencia agrava el cuadro diarreico.

5.5 CARACTERIZACIÓN DE BACTERIAS.

Coprocultivo.

Es el estudio de la materia fecal para el aislamiento e identificación de bacterias productoras de diarrea, para tal fin se hacen crecer a las bacterias en medios de cultivo diferenciables como el agar MacConkey, TCBS, EMB, verde brillante, etc. Su objetivo es la diferenciación de cepas bacterianas con base en las características morfológicas de las colonias que crecen en un medio determinado[32].

Pruebas bioquímicas.

El estudio se basa en la determinación de la presencia o ausencia de diferentes enzimas codificadas por el material genético del cromosoma bacteriano. La presencia de estas enzimas (catalasa, oxidasa, coagulasas, descarboxilasas, desaminasas, ureasas, peroxidasas, etc.) puede ser evidenciada en medios de cultivo especiales que contienen los sustratos específicos de la enzima que se pretende buscar junto con un sistema indicador que pone de manifiesto la degradación del sustrato o la presencia de un metabolito específico[4].

Tinción.

La falta de contraste de las células bacterianas dificulta su observación al microscopio, las técnicas de tinción permiten su observación y pueden emplearse para distinguir entre tipos diferentes de bacterias o para revelar la presencia de determinados constituyentes celulares tales como flagelos, esporas, cápsulas, paredes celulares, centros de actividad respiratoria, etc. La mayoría de los colorantes utilizados son compuestos orgánicos que tienen una afinidad específica por los materiales celulares. Ejemplos de colorantes utilizados en microbiología son: azul de metileno, cristal violeta, safranina, rojo congo, eosina, fucsina ácida, etc[32].

Técnicas serológicas.

Las pruebas de detección inmunológicas tienen como fundamento la detección de un antígeno específico mediante la unión de este con su anticuerpo específico el cual puede tener una molécula accesoria que se utiliza para evidenciar la unión con el antígeno mediante técnicas enzimáticas, colorimétricas, inmunofluorecentes o aglutinantes[85].

En el estudio de los serotipos de *E. coli* actualmente se reconcocen 176 antígenos somáticos (O), 112 flagelares (H) y 60 capsulares (K). El antígeno somático O define el serogrupo y la determinación del antígeno somático y flagelar (O:H) define el serotipo.

La Serotipificación de *E. coli* requiere de un gran número de antisueros y como son pocos laboratorios quienes la realizan se prefere identificar las cepas en base a sus características fenotípicas que evidencíen sus factores de virulencia. Aunado a esto la baja sensibilidad y la variabilidad en la presencia de uno u otro antígeno complican la identificación de una cepa, dado que si se tiene una cepas de un serotipo específico y que además posea un antígeno K, el anticuerpo no podrá unirse al antígeno dando como resultado un falso negativo, además se pueden tener reacciones cruzadas con otros serotipos e incluso con otras especies de bacterias que compartan características antigénicas. Entre estas técnicas podemos mencionar: aglutinación directa con antisuero, Inmunodetección, Elisa, citometría de flujo, etc.[85]

Análisis Fenotípicos.

EPEC

- Adherencia localizada en células Hep-2 y HeLa (Fig. 4).
- Prueba de FAS (Tinción fluorescente de actina).

EIEC

- Prueba de Sereny en cobayo (invasión de la conjuntiva).
- Invasividad de células HeLa.
- Captación de rojo congo.

DAEC

- Adherencia difusa en células Hep-2 y HeLa.[49]

Técnicas moleculares.

Colony blot y Stool blot.

Estas técnicas consisten en la siembra de cepas bacterianas en cajas pétri con medio de cultivo adecuado, se inoculan de 30 a 50 colonias por placa y se incuban 6 a 8 horas, posteriormente las colonias son transferidas a una membrana de nitrocelulosa y son lisadas, se desnaturaliza el ADN y se hibrida con una sonda específica marcada radiactivamente para que de esta manera al exponerla a una película de rayos X se pueda observar si ocurrió la hibridación o no. Existe una variante del método en la cual se utilizan anticuerpos para la evidenciación de antígenos, pero representa los mismo problemas que las técnicas inmunológicas.

El stool blot tiene como diferencia el hecho de que en esta técnica se puede utilizar la materia fecal directamente sobre la membrana de nitrocelulosa, las ventajas que tiene es que las cepas no necesitan ser aisladas y puede incrementar la sensibilidad del método si la cepa patógena representa una minoría de la flora bacteriana.[85]

Las desventajas de estos métodos es que requieren grandes cantidades de organismos patógenos (10^5 a 10^6 por g de materia fecal) para brindar resultados definitivos y la sensibilidad y especificidad son bajas si se compara con otras técnicas como el PCR[85].

La PCR (Reacción en cadena de la polimerasa).

La PCR es una técnica cuya idea básica es la síntesis de un gran número de copias de un fragmento de ADN, esto se logra invitro simulando las condiciones intracelulares durante la replicación natural del ADN. Se utiliza para tal fin una enzima ADN polimerasa capaz capaz de trabajar a temperaturas muy elevadas, esta enzima proviene de la bacteria *Thermus aquaticus* que vive a altas temperaturas (79 a 85°C) de ahí su nombre comercial mas conocido: Taq polimerasa.

Para llevar a cabo una PCR se deben mezclar los componentes necesarios para ello: la polimerasa, el ADN que se pretende analizar, los oligonucleótidos ("primers" o "iniciadores") necesarios para comenzar la transcripción, dinucleótidos (dNTPs), $MgCl_2$, KCl y pueden requerirse otros reactivos dependiendo de la polimerasa y de la técnica. Una vez que se tienen los componentes anteriores en las concentraciones adecuadas, el siguiente paso consiste en calentar la mezcla de reacción a 95°C para desnaturalizar el ADN, durante este paso las cadenas dobles de ADN se abren quedando en forma de cadenas sencillas, posteriormente se reduce la temperatura a un intervalo entre 40 y 60°C llamada temperatura de alineamiento en la que los oligonucleótidos se unen de manera específica a la región complementaria en el ADN en caso de que se encuentre dicha región formando así un pequeño fragmento de doble cadena.

La ADN polimerasa se une a este pequeño pedazo de ADN y comienza a copiar en sentido 5'-3', por último se ajusta la temperatura a 72°C que es la temperatura óptima de actividad de la enzima con el fin de sintetizar la secuencia complementaria a la cadena molde y se repite este ciclo de 3 temperaturas entre 20 y 35 veces.

Durante el primer ciclo se sintetizan los primeros fragmentos a partir del AND molde, aunque aun no tendrán el tamaño esperado debido a que la polimerasa sintetizará hasta donde le sea posible, sin embargo estas "cadenas largas" se sintetizarán en poca cantidad (2 por cada ciclo). Durante el segundo ciclo además de unirse al ADN de inicio, también se une a los fragmentos recién sintetizados y se sintetizan 2 fragmentos largos copiados directamente del ADN original y 2 fragmentos del tamaños esperado (el tamaño entre los oligos que hemos empleado), a partir de aquí con cada ciclo de incrementa de manera exponencial el número de fragmentos sintetizados del tamaño esperado.

Para amplificar un fragmento de ADN se requiere que 1 de los oligonucleótidos tenga la misma secuencia que una de las cadenas de ADN a investigar y que se encuentre flanqueando la zona del ADN que se pretende amplificar, el segundo oligonucleótido deberá encontrarse flanqueando el final del fragmento (por lo cual se les llama "forward" y "reverse") para que uno sea complementario a la cadena que forma el otro.

Entonces con 1 sola molécula de ADN en el ciclo 1 se producen 2^1=2 fragmento nuevos, en el ciclo 2 se formarán 2^2=4 fragmentos nuevos y después de 35 ciclos se formarán $2^1+2^2\ldots+2^{34}+2^{35}=2^{36}$ nuevos fragmentos de los cuales 70 serán fragmentos largos.

Condiciones para la amplificación.

Concentración de Reactivos.

Se requiere utilizar concentraciones de reactivo ya establecidas para los oligonucleótidos que se estén utilizando, si es un oligonucleótidos diseñado de manera original se desarrolla la técnica en condiciones estándar (Tabla 6) y a partir de los resultados obtenidos se pueden realizar ajustes.

Condiciones estándar de una PCR a volumen de 50µL			
Reactivo	Concentración inicial	Concentración final	Cantidad necesaria por tubo
dNTPs Mix	10 mM c/u	200µM c/u	1µL
$MgCl_2$	25mM	1.5mM (se puede probar de 1 a 4 mM)	3µL
Oligo 5'	10µL	1µM (se puede probar de 0.1 a 1µM)	5µL
Oligo 3'	10µL	1µM (se puede probar de 0.1 a 1µM)	5µL
Enzima	5U/µL	1U	0.2µL
Buffer	10X	1X	5µL
Agua PCR	--	--	29.8µL
ADN	0.1mg	0.1 mg genómico máximo 500 ng, de bacterias 1 a 10 ng	11µL

Tabla 6. Condiciones estándar de una Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Adaptado de Asuar L. Guía práctica de PCR. Las Herramientas moleculares 2005.

Temperaturas.

Se recomienda buscar en artículos relacionados al organismo, gen o tipos de ADN y trabajar con las temperaturas que se reportan, en caso de no disponer de datos se utilizan las temperaturas y ciclos descritos a continuación.

1. Desnaturalización inicial 95°C de 5 a 10 minutos.
2. 30 ciclos con desnaturalización a 95°C por 30 segundos, alineamiento a 50°C por 30 segundos y extensión a 72°C tiempo variable (1 minuto por cada 1000pb aproximadamente).
3. Extensión final a 72°C por 10 minutos para amplificar los fragmento que hayan quedado inconclusos.
4. Conservación de la muestra a 4°C.

Dependiendo de los resultados es probable que la temperatura de alineamiento requiera ser ajustada, si está demasiado baja se obtendrá un producto menos específico y si es demasiado elevada no se amplificará nada debido que los oligos no podrán establecer las uniones con el ADN molde y no podrá comenzar la replicación. Para tener una aproximación de la temperatura ideal para la reacción se calcula la Tm (temperatura melting) que se refiere a la temperatura a la cual los oligonucleótidos se hibridan, este proceso depende de la cantidad de dobles y triples enlaces de hidrógeno que se establezcan entre el ADN molde y los oligonucleótidos. Una manera de calcularla es:

Visualización de la PCR.

Para poder analizar los fragmentos de ADN obtenidos en la PCR se emplea de manera rutinaria el análisis electroforético en geles de agarosa o acrilamida, la diferencia entre ambos es que la acrilamida tiende a formar geles mas compactos con poros más pequeños y uniformas que la agarosa, la desventaja es que el revelado de este tipos de gel requiere radioactividad o tinción con plata que resulta muy laboriosa, por estas razones se prefiere el uso de los geles de agarosa.

El principios de la electroforesis separar los fragmentos de ADN en base a su tamaño forzando al ADN a pasar a través de los poros del gel utilizando una corriente eléctrica y jalándolos hacia el polo positivos ya que la carga de la molécula de ADN es negativa debido a la presencia de grupos fosfato. Los fragmentos más cortos migrarán de manera más rápida que los largos pues estos quedan atrapados entre los poros del gel y si existen muchos fragmentos de tamaño similar migrarán de manera similar y se agruparán formando lo que se conoce como "banda" al revelar el gel[33].

PCR en tiempo real.

Esta técnica es esencialmente una PCR convencional en la que los equipos de amplificación (termocicladores) llevan incorporados un sistema de detección de fluorescencia basándose la tecnología en la utilización de unas moléculas llamadas fluoróforos y quenchers. Ambas moléculas permiten monitorear en tiempo real lo que ocurre en la reacción de PCR durante cada ciclo de amplificación y sustituye los pasos de amplificación, electroforesis y análisis de imagen de una PCR convencional.

Un parámetro fundamental en la PCR en tiempo real es que permite la cuantificación de la reacción, este parámetro se denomina ciclo umbral (Threshold Cycle o Ct) que se define como el ciclo a partir del cual la fluorescencia es significativa por encima del ruido de fondo (Figura 8) y sus propiedades son: separa el ruido de fondo, determina el ciclo inicial de la reacción y es inversamente proporcional al número de copias del template (DNA templado).

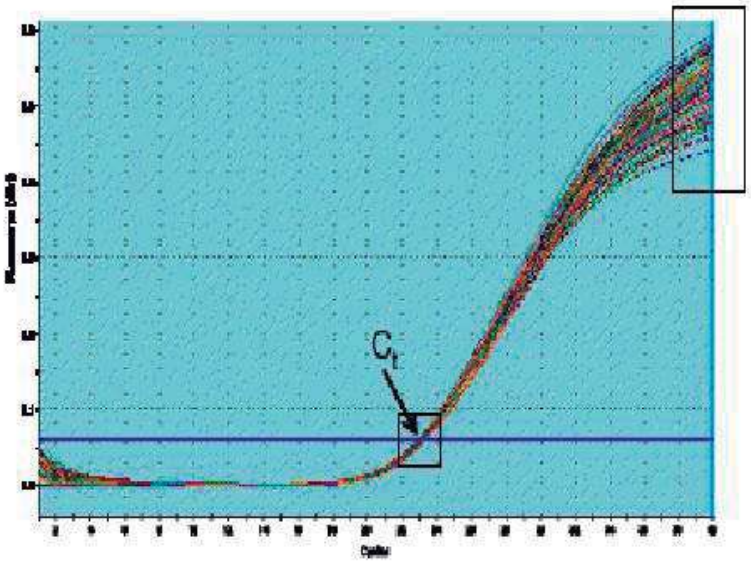


Figura 8. Ejemplo de una amplificación y la localización de los valores de Ct.[23]

Mecanismo de acción de los fluoróforos.

- No específicos. Detectan todos los DNA de cadena doble producidos durante la reacción de amplificación. Es el método estándar y consiste en añadir un agente intercalante a la doble cadena de ADN o un fluoróforo que emite fluorescencia cuando se une a esta. El más utilizado es el SYBR Green I que se excita a 497nm y emite 520nm.

  Para deducir si las curvas de amplificación positivas corresponden a productos específicos, se suele realizar una curva de desnaturalización ("melting curve") al final de la reacción. Este proceso consiste en calentar la muestra lentamente de 50 a 95°C monitorizando la fluorescencia, la temperatura a la cual el DNA se desnaturaliza se observa como una drástica caída de la fluorescencia debido a la disociación del SYBR Green I (que se une solo a la cadena doble de ADN). Los productos de PCR de diferente longitud y diferentes secuencias se desnaturalizan a temperaturas diferentes, observándose picos cuando se representa la derivada de la fluorescencia con respecto a la temperatura (-—). (Figura 9).

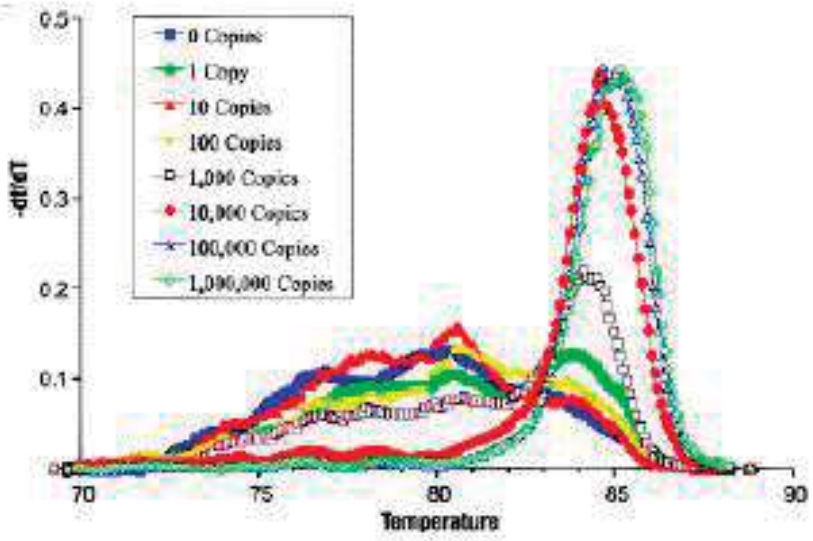


Figura 9. Ejemplo de una Curva Melting. [23]

- **Específicos.** Estos sistemas de detección son capaces de distinguir entre la secuencia de interés y los dímeros de primers o las amplificaciones inespecíficas. Todos ellos se basan en la utilización de quenchers y sondas marcadas con un amplio rango de fluoróforos con diferentes espectros de excitación y emisión. Un fluoróforo es una molécula que absorbe energía y pasa a un estado excitado; posteriormente, al volver al estado inicial emite el exceso de energía en forma de fluorescencia.

  Los quenchers son moléculas que aceptan la energía de un fluoróforo y la disipan en forma de calor o fluorescencia, es decir que mientras se encuentre el fluoróforo unido o cercano al quencher, no se observa la fluorescencia, y es hasta que la actividad 5' exonucleasa de la enzima polimerasa rompe la sonda, y el fluoroforo queda libre de la acción supresora del quencher y emite la fluoresencia.[23]

5.6 TRATAMIENTO DE LA DIARREA.

Manejo de las diarreas.

Los antibióticos solo están indicados en: Diarrea con sangre, sospecha de cólera, infección por *Giardia lamblia* o *Entamoeba histolytica* comprobada por laboratorio y clínica, si existe una infección extraintestinal concomitante, infección con *Salmonella no typhi* en pacientes menores de 3 meses, enfermedad o uso de inmunosupresores, enfermedad gastrointestinal crónica, colitis severa o cardiopatía congénita, Infección por *E. coli* enteropatógena, para prevenir colitis enteronecrosante o diarrea persistente como es el caso de EAEC, en desnutrición grave e inmunosupresión. Por lo tanto se debe realizar el manejo de las diarreas como lo indica el siguiente diagrama de flujo. (Figura 10).

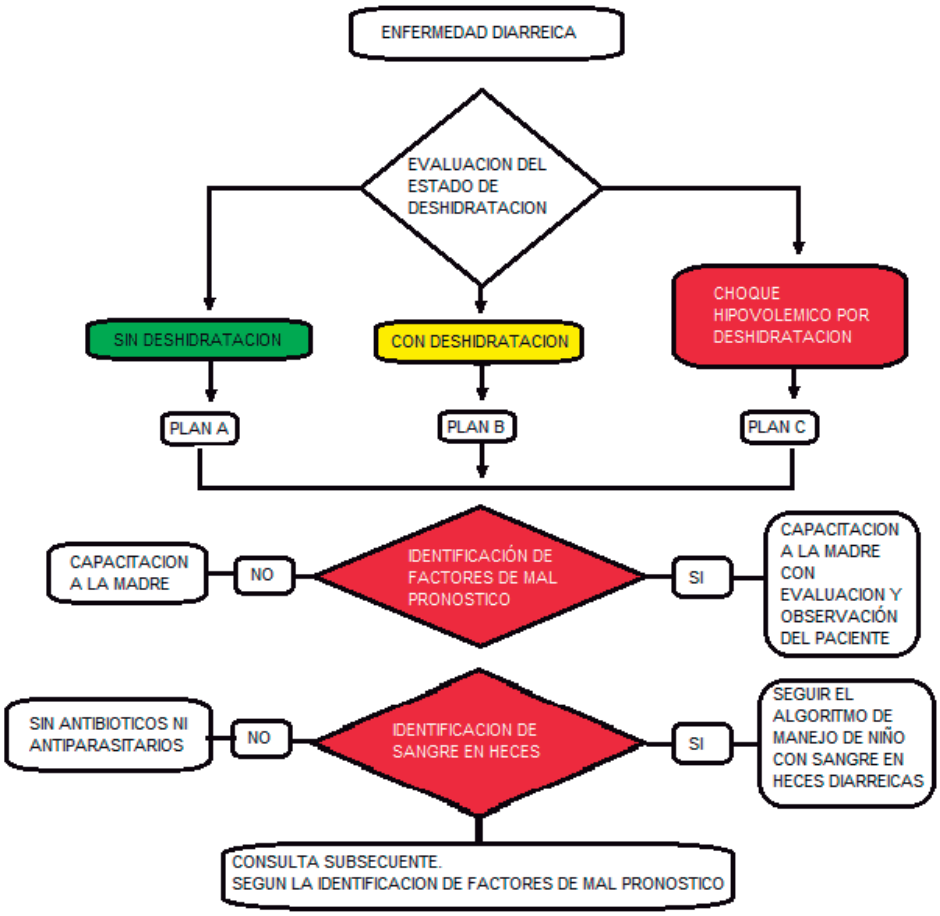


Figura 10. Esquema propuesto para el manejo de la diarrea.

En caso de presentarse diarrea con sangre se debe sospechar de *Shigella, Campylobacter jejuni, Escherichia coli EHEC, o Entamoeba histolytica* y se le debe dar el manejo siguiente: (Figura 11)

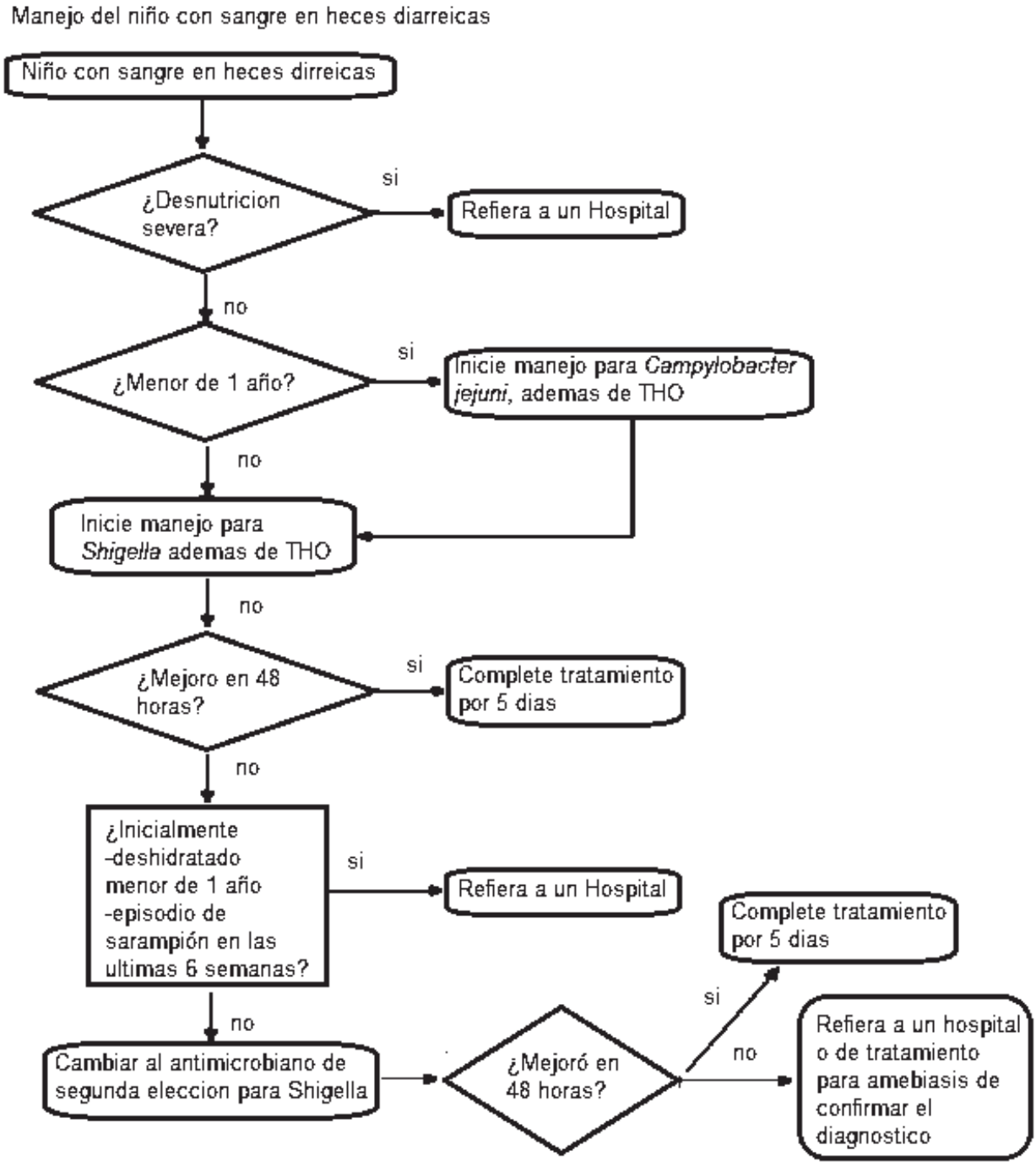


Figura 11. Manejo de la diarrea tipo Disenteriforme.

Se ha encontrado evidencia que muestra que los antibióticos de manera general son inefectivos en la mayoría de los episodios agudos de diarrea en niños pequeños. Como recordatorio, la efectividad de los antibióticos varía de acuerdo al agente específico y en algunos casos solo es efectivo si se inician en etapas tempranas de la enfermedad. Para algunas bacterias como Shigella o E. coli, la susceptibilidad a los antibióticos varía ampliamente, haciendo difícil el indicar un antibiótico específico. Por estas razones, la indicación de antibióticos de manera rutinaria a los pacientes con diarrea es usualmente inefectiva [104].Por lo tanto solo debe manejarse la terapia con antibióticos en caso de ser necesario.

Los antibióticos no deben emplearse de manera rutinaria debido a las siguientes consideraciones[35].

- La mayoría de las diarreas son de etiología viral (90%).
- En la mayoría de los casos se trata de un proceso autolimitado.
- Interfiere con la síntesis de vitamina K.
- Pueden producir reacciones alérgicas.
- Pueden incrementar el riesgo de padecer síndrome urémico hemolítico.
- Aumenta la resistencia bacteriana.
- Destruye la flora intestinal.
- Prolonga la enfermedad (diarrea secundaria a antibióticos, sobre todo los empleados por vía inyectable pues estos no pueden llegar a la luz intestinal, por lo que lo más indicado es administrarlos por vía oral).

Los antibióticos solo están indicados en:

- Diarrea con sangre.
- Sospecha de cólera.
- Infección por *Giardia lamblia* o *Entamoeba histolytica* comprobada por laboratorio y clínica.
- Si existe una infección extraintestinal concomitante.

- Infección con *Salmonella no typhi* en pacientes menores de 3 meses, enfermedad o uso de inmunosupresores, enfermedad gastrointestinal crónica, colitis severa o cardiopatía congénita.
- Infección por *E. coli* enteropatógena, para prevenir colitis enteronecrosante o diarrea persistente.
- Desnutrición grave.
- Con inmunosupresión.

5.6.1 TRATAMIENTO DE LA DIARREA CON ANTIBIÓTICO.

Los antibióticos son moléculas con actividad antimicrobiana, que incluyen una gran cantidad de compuestos pertenecientes a diferentes familias químicas mostradas en la Tabla 7.

Tabla VII Clasificación de los antibióticos.			
Estructura Química	Betalactámicos	Macrólidos	Quinolonas
	Aminoglucósidos	Ketólidos	Lincosamidas
	Glicopéptidos	Polipéptidos	Cloranfenicol
	Rifamicinas	Tetraciclinas	Sulfamidas
	Nitrofurantoínas	Nitrofuranos	Trimetroprim
	Estreptograminas	Oxazolidonas	
Mecanismo de acción	**Inhibidores de la síntesis de ácidos nucleicos** Nitroimidazoles, Nitrofuranos, Quinolonas y Rifamicinas **Interfieren en la síntesis de proteínas.** Mupiricinas, Aminoglucósidos, Tetraciclinas, Cloranfenicol, Macrólidos, Ketólidos, Lincosamidas, Estreptograminas, Ácidos fusídico, Oxazolidonas. **Alteran la función de la membrana citoplasmática.** Polipéptidos y Poliénicos **Inhibidores de la síntesis de peptidoglicano.** Fosfomicina, Glicopéptidos, Betalactámicos, Muriedomicinas. **Inhibidores de la síntesis de cofactores metabólicos** Sulfonamidas y Trimetroprim **Inhibidores de enzimas inactivadoras de antibióticos** Inhibidores de las betalactamasas (Ácido clavulánico, Sulbactam, Tazobactam).		

Tabla 7. Clasificación de los antibióticos

Adaptado de Adaptación de; Gobantes C. Manual Normon. Octava Edición. España 2006. 1119

Los antibióticos indicados en las diarreas son:

Los principales antibióticos indicados en las diarreas son, el Trimetroprim con sulfametoxazol, Ampicilina, Amoxicilina, pero actualmente se buscan alternativas para los tratamientos diarreicos, algunas alternativas para el tratamiento antimicrobino son; Cefexime, Ceftibutem y Fosfomicina.

Trimetroprim con sulfametoxazol.

Que inhibe la síntesis de folatos que son esenciales para la síntesis de purinas, y por lo tanto de ácidos nucleicos. El trimetroprim con sulfametoxazol inhibe competitivamente la síntesis de ácido fólico, es decir inhibe de forma selectiva la reductasa del ácido dihidrofolico, que convierte el ácido dihidrofólico a ácido tetrahidrofólico un paso clave en la síntesis de purinas.

Tabla **8**.

Ampicilina y Amoxicilina.

Inhiben el crecimiento bacteriano por interferir con un paso específico en la síntesis de la pared celular. Un péptido de 5 aminoácidos se une al ácido N-acetilmuramico, este peptidotermina en D-alanil-D-alanina. Las proteínas fijadoras de penicilina (PFP) remueven la terminal alanina para formar un enlace cruzado con un péptido contiguo, el cual proporciona a la célula su estructura rígida. Los β-lactamicos son análogos al D-Ala-D-Ala que se unen covalentemente a las PFP en el sitio activo, esto inhibe la reacción de transpeptidación, la síntesis de péptido glucano se bloquea y la célula muere.

Otros antibióticos que pueden utilizarse como terapia contra las bacterias causantes de diarrea son:

Tabla 8. Antibióticos utilizados en el tratamiento de las principales causas bacterianas de diarrea aguda[101]

Microorganismo	Antibiótico 1□ elección	Antibiótico 2□ elección	Observaciones
Shigella	TMP-SMX 10 mg/kg/día, en 2 dosis x 5 días, VO	Ceftriaxone 40-50 mg/kg/día en 1-2 dosis x 5 días, máx 1.5 g/día, IM	Si la cepa es sensible, el antibiótico de elección es el TMP-SMX, excepto en las infecciones graves. Si se desconoce la sensibilidad o hay resistencia a TMP-SMX puede usarse a fluoroquinolona (como la ciprofloxacina) o una cefalosporina de 3a generación. En áreas con escasos recursos otra alternativa es el ácido nalidíxico (60mg/kg/día en 4 dosis x 5 , VO) 50% de cepas de *Shigella sp.* resistente a TMP-SMX.
	Ciprofloxacina 30 mg/kg/día en 2 dosis x 2 días, máx. 500mg/dosis, VO	Cefixime 8 mg/kg/día en 1 ó 2 dosis x 5 días, VO	
E. coli enteroinvasora	TMP-SMX 10 mg/kg/día, en 2 dosis x 5 días, VO		
E. coli enteropatógena	TMP-SMX 10 mg/kg/día, en 2 dosis x 5 días, VO		Sólo se indica su uso en diarrea moderada a severa o persistente
E. coli enterohemorrágica	Contraindicados	Contraindicados	No deben usarse antibióticos si se sospecha o confirma infección por E. coli enterohemorrágica, ya que su uso se ha asociado con el desarrollo del síndrome urémico hemolítico.
Salmonella no typhi	TMP-SMX 10 mg/kg/día, en 2 dosis x 5 días, VO	Cefotaxime 100-200 mg/kg/día en 3- 4 dosis x 5 días, IM	El uso de antibióticos sólo se recomienda en pacientes con alto riesgo de desarrollar enfermedad invasiva, como en los menores de 3 meses de edad, niños con anemias hemolíticas, con enfermedades o tratamientos inmunosupresores, con enfermedad intestinal crónica o colitis severa.
	Ampicilina 50-100 mg/kg/día en 4 dosis x 5 días ,VO	Ceftriaxone 50-75 mg/kg/día en 1-2 dosis x 5 días, IM	
	Amoxicilina 20-40 mg/kg/día en 3 dosis x 5 días, VO	Ciprofloxacina 20-30 mg/kg/día en 2 dosis x 2 días, VO	
V. cholerae	Doxiciclina en >8 años 6 mg/kg/dosis única máx. 300mg, VO	TMP-SMX en <8 años 10 mg/kg/día en 2 dosis x 3 días, VO	La base del tratamiento de la infección por V. cholerae es la terapia de hidratación oral; el uso de antibióticos debe considerarse en pacientes con deshidratación moderada a severa. Si hay resistencia a los antibióticos de primera elección, se recomienda el uso de TMPSMX, eritromicina o ciprofloxacina.
	Tetraciclina en >8 años 50 mg/kg/día, 4 dosis x 3 días, máx. 2 g/día, VO	ritromicina, estolato 30-50mg/kg/día en 3-4 dosis x 3 días, VO	
	Furazolidona 5mg/kg/día en 4 dosis x 3 dias, VO	Ciprofloxacina 20-30mg/kg/día, dosis única, VO	
Campylobacter jejuni	Eritromicina, estolato 30-50 mg/kg/día en 3-4 dosis x 5-7 días, VO	Furazolidona 5mg/kg/día en 4 dosis x 5-7 días, VO	Debe considerarse el uso de antibiótico en pacientes con diarrea con sangre, fiebre, evolución tórpida, evacuaciones abundantes y en pacientes inmunosuprimidos.

Tabla 8. Antibióticos utilizados en el tratamiento de las principales causas bacterianas de diarrea aguda[101.]

Cefexime y Ceftibutem.

Igual que otros antibióticos betalactámicos, las cefalosporinas ejercen su principal efecto antimicrobiano bactericida interfiriendo la síntesis del peptidoglicano, que es el componente estructural principal de la pared bacteriana, y activando enzimas autolíticas de la misma.[104]

Fosfomicina.

La fosfomicina inhibe uno de los primeros pasos de la síntesis de los peptidoglicanos, al inactivar de forma irreversible la enzima bacteriana enolpiruvato-transferasa ocupando el lugar del fosfoenolpiruvato. De esta manera no puede tener lugar la reacción de la uridindifosfato-N-acetilglucosamina con el fosfoenolpiruvato, reacción que constituye el primer paso de la síntesis de la pared celular bacteriana. Aunque la fosfomicina se une a otras enzimas dependientes del fosfoenolpiruvato, no lo hace de forma irreversible. La inhibición de la síntesis de peptidoglicanos origina una acumulación de los nucleótidos precursores con la correspondiente inactivación de la bacteria.[104]

Rececadotrilio

El racecadotrilo es un inhibidor selectivo de la encefalinasa, enzima responsable de la degradación de las encefalinas, cuyo uso ha sido autorizado recientemente para el tratamiento sintomático complementario de las diarreas agudas en lactantes (mayores de 3 meses) y en niños cuando la rehidratación oral y las medidas de apoyo habituales resulten insuficientes para controlar el cuadro clínico.

El racecadotrilo es un promedicamento que se hidroliza rápidamente y se transforma en su metabolito activo (tiorfano), cuyo efecto inhibidor de la encefalinasa prolonga la acción fisiológica de las encefalinas endógenas y, como consecuencia, reduce la secreción de agua y electrólitos a la luz intestinal. Este

mecanismo antisecretor parece ser diferente del que ejerce la loperamida, consistente en la disminución de la velocidad del tránsito intestinal.[122]

Otra medida que se puede adoptar es la alimentacion con productos adicionados con zinc, ya que este ayuda a combatir la diarrea y los efectos adversos de la misma.

5.6.2 PREVENCIÓN

Suplemetos de zinc.

El zinc es un micronutrimento importante para la salud general y el desarrollo de un niño. Se pierden grandes cantidades de zinc durante la diarrea. La eficiencia de zinc en humanos y animales está asociada con atrofia del tejido linfoide, reducción de la actividad de linfocitos T, de las disacaridasas intestinales, e incremento de la actividad secretora de la mucosa. Se ha observado que la carencia de zinc es común en países en desarrollo, y es el caso de la mayor parte de América Latina, África, Medio Oriente y Asia Meridional El uso de zinc para tratar la diarrea aguda mejora la función inmunitaria, la estructura intestinal o su función, y el proceso de recuperación epitelial durante la diarrea. Diversos estudios demuestran que la administración de suplementos de zinc, en dosis diarias de 10 mg en menores de 6 meses de edad y 20 mg en mayores de 6 meses durante el episodio y por 10 a 14 días más después del episodio de diarrea aguda, disminuye su duración y gravedad y reduce la incidencia de la diarrea en los dos a tres meses siguientes.[104]

Probióticos

Los probióticos componen una alternativa emergente y atractiva para el manejo de las enfermedades gastrointestinales. Se define como probiótico a un microorganismo vivo que, administrado en cantidades adecuadas, tienen un efecto benéfico en la salud del huésped y tienen las siguientes características: origen microbiano, propiedades no patogénicas, resistencia a productos tecnológicos y viabilidad en productos comerciales, estabilidad en secreciones gástricas y biliares, adherencia al epitelio intestinal, habilidad para persistir dentro del tracto

gastrointestinal, producción de sustancias antimicrobianas, habilidad para modular el sistema inmune y para influenciar actividades metabólicas.

Los microorganismos más comúnmente utilizados pertenecen a los géneros *Lactobacillus, Bifidobacterium, Enterococcus, Lactococcus, Streptococcus, Bacillus y Saccharomyces,* los cuales ejercen su función de una manera directa o indirecta a través de la modificación de la biota entérica endógena, o bien realizando un efecto inmunomodulador.[123]

Existen productos comerciales que contienen probióticos, principalmente productos lácteos como (leches, quesos, yogurt), también productos cárnicos o medicamentos formados por aislados de algunas de las especies de probióticos.
Cuando la administración de productos adicionados con probióticos no es suficiente para prevenir o disminuir la diarrea se puede dar tratamiento con algún antidiarreico, que no inhiba la motilidad intestinal, ya que este tipo de antidiarreicos inhibidores del movimiento del intestino solo suelen agravar el padecimiento diarreico.

Vacunas.

Existen varias vacunas utilizadas para la prevención de la infección por *E. coli,* una de ellas es la vacuna dirigida contra el lipopolisacárido O específico del serotipo O157:H7 desarrollada en 2006 y que combina una porción del LPS de la bacteria con una recombinación de la exotoxina A de *Pseudomona aeruginosa* para aumentar su poder antigénico. Esta vacuna a mostrado protección en animales experimentales y niños frente a la infección por *E. coli* O157:H7, aunque aún se encuentra en fase experimental pero se ha sacado a la luz comercial una versión de la vacuna empleada para inmunizar animales de granja.[120]

Otra vacuna es la dirigida a ETEC que utiliza la subunidad B de la toxina colérica como inductor inmune y brinda protección cruzada contra las toxinas termolábiles de *E. coli* . Además existe una versión de la vacuna específica contra las fimbrias

de adhesión CFAI, pero son mas utilizadas en las infecciones del tracto urinario y el campo veterinario mas que para prevención de las EDAs.[45]

Extractos de plantas.

Finalmente estudios recientes sugieren que el uso de extractos de planatas como *Vaccinium mirtillus* y de plantas del género *Eucalyptus*, pueden reducir la adhesión de las fimbrias K88 y K99 a sus receptores específicos por interferencia de los sitios de unión en residuos gal-gal y por la inhibición en la expresión de los genes que codifican dichas fimbrias.[33]

6 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

En México, la diarrea es la segunda causa de morbilidad en la población general y la principal causa de demanda de consulta externa y hospitalaria en los niños menores de cinco años, quienes representan el grupo más vulnerable y con mayor riesgo de evolución grave. Durante 1990, en las instituciones públicas de salud se registraron 2,389,365 casos de diarrea aguda en niños menores de cinco años, con un total de 14,011 defunciones para una tasa de mortalidad de 146.3 por 100 mil niños; 71.6 % de estas muertes ocurrió en el hogar, aunque 67 % había recibido atención médica. En 1990 se informaron 47.3 defunciones por 100 mil niños; 42 % falleció en su domicilio y 80 % había recibido atención médica antes de su defunción.

El Sistema nacional de información en salud (SINAIS) en 2008 declara que las infecciones intestinales son la primer causa de muerte en niños de edad preescolar (1-4 años) y la tercer causa de muerte en infantes (de hasta 1 año) en México. Esto comprueba la necesidad de conocer el agente etiológico de la diarrea para poder de esa manera administrar el mejor tratamiento, pues algunos autores señalan que la terapia antibiótica solo debería aplicarse a la infección por *Shigella sp., Salmonella sp., Entamoeba hystolítica, Vibrio sp. y Giardia lamblia* por lo que la infección por *E. coli* solo sería tratada con terapia de rehidratación, pues la diarrea tiende a ser autolimitada, en el caso especial de *E. coli* enterohemorrágica también se recomienda la terapia antibiótica pero este biotipo no se encuentra en México.

Ante esta necesidad caemos en el problema de cómo identificar a *E. coli* patógena si el procedimiento tradicional de rutina que se realiza mediante identificación bioquímica no brinda resultados, pues es sumamente difícil diferenciar a la *E. coli* patógena de la de flora normal. Además la identificación por serología tampoco resulta viable pues se requiere una gran variedad de antisueros y estos tienden a producir reacciones cruzadas.

Se ha demostrado por varios autores que *E. coli* patógena en nuestro medio es el principal agente bacteriano inductor de síndrome diarreico e incluso en algunas regiones ocupa el primer lugar como microorganismo diarreagénico, aún por encima de rotavirus, *Salmonella sp y Shigella sp*. El resultado de estas variantes es que en la mayoría de hospitales y laboratorios no se llega a establecer con certeza una importante cantidad de diagnósticos en la etiología bacteriana pues *E. coli* patógena pasa inadvertidamente.

Como respuesta ante tal problema las pruebas de biología molecular han demostrado ser una herramienta sumamente útil, pues su especificidad y sensibilidad son muy altas.

7 JUSTIFICACIÓN.

Las infecciones intestinales son la principal causa de muerta en niños de edad preescolar en México y *Escherichia coli* tipificable es el principal agente bacteriano inductor de diarrea en nuestro medio. Esto es muy importante pues la enfermedad diarreica ocasiona grandes pérdidas económicas y se estima que el costo de un episodio de diarrea tanto médico y no médico es elevado, los cuidados de hospitalización y seguimiento ambulatorio para un paciente con diarrea resulta en un costo aproximado de 2 billones de dólares percápita al año. Aunado a esto la creciente resistencia bacteriana a los antibióticos resalta la necesidad de hacer uso de terapias alternativas que ayuden a reducir esta tendencia identificando al patógeno infeccioso plenamente para que el tratamiento sea instalado lo antes posible y que la terapia antibiótica no sea el tratamiento de primera elección.

8 HIPOTESIS.

Escherichia coli enteropatógena, enteroinvasiva y de adherencia difusa son los principales patotipos de *E. coli* inductores de síndrome diarreico en niños menores de 5 años del estado de Michoacán y presentan una elevada resistencia a los antibióticos utilizados para tratamiento de la diarrea.

9 OBJETIVOS

9.1 OBJETIVO GENERAL:

Genotipificar *Escherichia coli* enteropatógena, enteroinvasiva y de adherencia difusa proveniente de pacientes con síndrome diarreico en Michoacán.

9.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS:

1. Conocer la prevalencia de *Escherichia coli* enteropatógena, enteroinvasiva y de adherencia difusa como agente diarreagénico.
2. Describir el patotipo de *Escherichia coli* predominante en la población.
3. Revelar el nivel de resistencia a antibióticos de las cepas aisladas.
4. Montar protocolo de detección de patotipos de *E. coli* en el LESP del estado de Michoacán.

10 IDENTIFICACIÓN DEL ESTUDIO.

Identificación de Estudio:

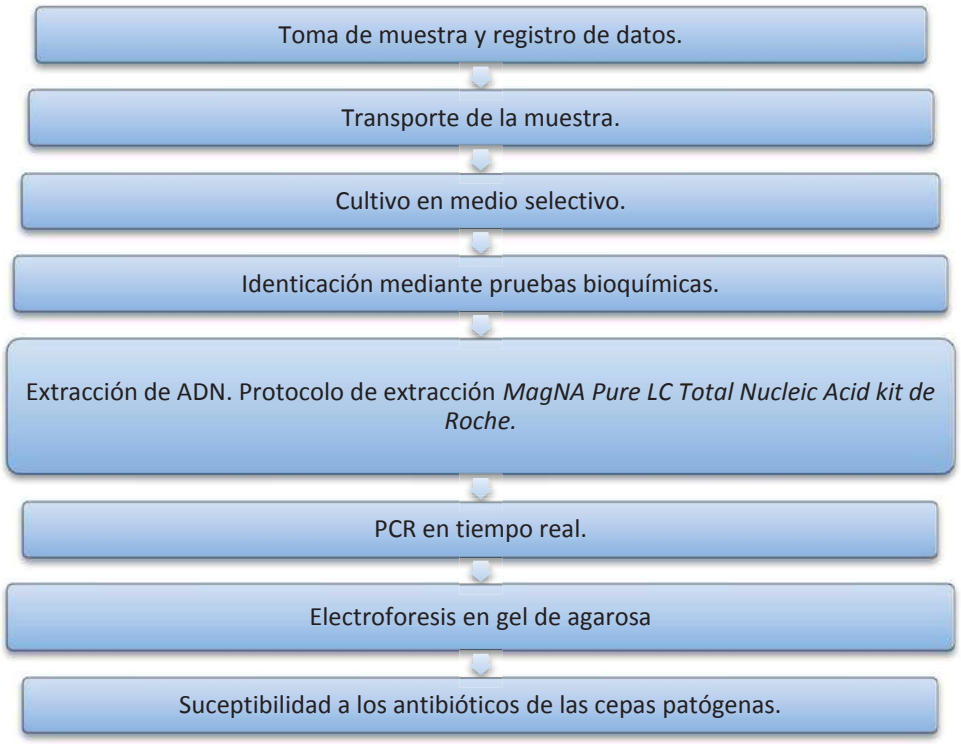
1. **Tipo de estudio: Ambipectivo, retrospectivo y transversal.**
   - **Universo de trabajo:** 184 muestras provenientes de pacientes menores de 5 años diagnosticados con diarrea aguda del estado de Michoacán en el periodo comprendido de octubre 2009-abril 2010.
   - **Criterio de inclusión:** Muestras provenientes de pacientes residentes del estado de Michoacán, México que sean menores de 5 años y que presenten síndrome diarreico.
   - **Criterio de exclusión:** Pacientes en los que se aisle un enteropatógeno diferente a *Escherichia coli*, en los que no se demuestre la presencia de esta bacteria, o que no cuenten con la información suficiente.
2. **Variables.**

   Bacteria.
   - Presencia o ausencia de de *E. coli*: Cualitativa.
   - Detección de *E. coli* patógena: Cualitativa

   Pacientes
   - Edad: Cuantitativa discontinua.
   - Sexo: Cualitativa
   - Procedencia: Cualitativa
3. **Fuentes de Información.**
   - Bitácora de información del laboratorio de bacteriología del hospital infantil de Morelia Eva Sámano de López Mateos.
   - Bitácora de información del área de bacteriología del Laboratorio Estatal de Salud Pública del estado de Michoacán.
   - Bitácora de información del laboratorio de Biología molecular del LESP Michoacán.

11 MATERIALES Y MÉTODOS

11.1 DIAGRAMA DE ACTIVIDADES:



11.2 CARACTERIZACIÓN DE LAS MUESTRAS.

Las muestras procesadas provenían de muestras diarreicas obtenidas de pacientes del hospital infantil de Morelia “Eva Sámano de López Mateos” y del programa de vigilancia epidemiológica de *Vibrio cholerae* y enterobacterias del Laboratorio Estatal de Salud Pública del estado de Michoacán.

11.2.1 TOMA DE MUESTRA.

Las muestras se recolectaron de 2 maneras:

- Muestra de heces diarreicas obtenidas directamente del paciente en un frásco estéril.
- Hisopado rectal con hisopo estéril de algodón.

11.2.2 REGISTRO DE DATOS.

Se tomaron los datos de las encuestas epidemiológicas recabando nombre, edad, sexo, procedencia, sintomatología y características clínicas del paciente y de la muestra. (ver anexo para ejemplo de encuestas epidemiológicas).

11.2.3 TRANSPORTE DE LA MUESTRA.

Se transportaron en medio Cary Blair a temperatura ambiente y en recipiente hermético al laboratorio de bacteriología del LESP Michoacán.

11.3 IDENTIFICACIÓN BIOQUÍMICA.

11.3.1 COPROCULTIVO.

Se cultivaron en medios selectivos agar MacConkey y agar EMB apartir del medio de transporte y se incubaron a 37°C durante 16 a 20 hrs. Se seleccionaron 5 colonias sugestivas morfológicamente de ser *Escherichia coli* y en los cultivos con presencia de colonias lactosa negativas se seleccionó 1 para búsqueda de *Escherichia coli* enteroinvasiva.

11.3.2 PRUEBAS BIOQUÍMICAS.

Las cepas se identificaron por medio del metabolismo bacteriano siguiendo la metodología establecida por el INDRE empleando medios: Hierro triple azúcar (TSI), Lisina-Hierro (LIA), Citrato, Movilidad-Indol Ornitina (MIO), Malonato y Urea.

11.3.3 CONTROL DE CEPAS POSITIVO Y NEGATIVO.

Las cepas utilizadas como controles en este estudio fueron donadas por el DC Adrián Canizales Roman del LESP de Sinaloa y correspondían a cada uno de los grupos patógenos de *E. coli* mas una cepa ATCC 11105 que no codifica para factores de virulencia como control negativo.

11.4 ANÁLISIS Y MANIPULACIÓN DE ACIDOS NUCLEICOS.

11.4.1 PREPARACIÓN DE LA MUESTRA PARA EXTRACCIÓN.

Se realizó un pool de las cepas que correspondían a la identificación bioquímica de *E. coli* tomando una asada del medio LIA y se inoculó en un tubo con 4mL de caldo Luria Bertani incubándose a 37°C toda la noche en shaker. Para conservar una custodia de las muestras viables, se tomaron 500µL del caldo del paso anterior y se agregó 500µL de glicerol al 40%, congelándose a -72°C. Los 3.5 mL de caldo restantes se emplearon para la extracción de ácidos nucleicos.

11.4.2 EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS TOTALES.

El material genético se extrajo a partir del caldo restante del paso anterior (3.5mL). Pasado el tiempo de incubación los tubos se centrifugaron a 3500 RPM durante 5 minutos con la intención de concentrar el paquete celular, se decantó la muestra y se resuspendió la pastilla formada en 200µL de buffer de elución, para la preparación de la muestra se empleó un MagNA Pure LC Total Nucleic Acid Isolation Kit de Roche y se procedió a realizar la lisis externa adicionando 200µL de buffer de lisis, se tomaron 350µL de la solución para cada muestra colocándose

en una placa de extracción para posteriormente introducirla en el robot de extracción MagNA Pure LC 2.0, se procedió a la extracción según las instrucciones del fabricante (Protocolo de extracción *MagNA Pure LC Total Nucleic Acid kit de Roche*). En el anexo se describe a detalle el proceso. Obteniéndose al final del proceso 50µL de ADN. A continuación se describe el principio de la extracción.

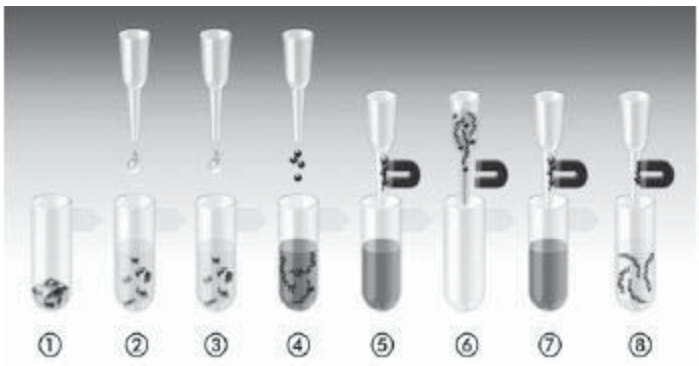


Figura 12. Extracción de Ácidos Nucleicos Totales utilizando la técnica de Perlas Magnéticas

Los pasos de la Figura 12 son descritos a continuación:

1. La muestra es colocada en los pozos del cartucho para muestras.
2. Se añade buffer de lisis/unión a la muestra, lisando las células y liberando los ácidos nucleicos, las endonucleasas son desnaturalizadas.
3. Digestión de las proteínas con proteínasa K.
4. Los ácidos nucleicos se unen a la superficie de las partículas magnéticas de vidrio, debido a las condiciones caotrópicas de sales, isopropanol y la alta fuerza iónica del buffer de lisis/unión.
5. Las partículas con los ácidos nucleicos adheridos son separadas magnéticamente del residuo de la muestra lisada.
6. Las partículas magnéticas con los ácidos nucleicos adheridos son lavadas varias veces con buffer de lavado para remover sustancias que no se hayan unido (proteínas) y para reducir la concentración de sales.

7. Las partículas magnéticas con los ácidos nucleicos adheridos son separadas magnéticamente del buffer de lavado que contiene los residuos de lavado.
8. Los ácidos nucleicos son separados de las partículas magnéticas por el buffer de elución en las paredes del cartucho, donde quedan adheridas a las paredes y son descartadas.[133]

11.4.3 CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS.

La calidad del ADN obtenido se cuantificó con un equipo Gene Quant 100 para corroborar la cantidad presente de ácidos nucleicos y su pureza. Se determinó absorbancia y la relación $A_{260/280}$ para la pureza. Como regle se establece que para ADN [ADN]= A_{260}(50µg/mL)

11.4.4 PCR EN TIEMPO REAL.

Se buscó amplificación de los genes "eae para EPEC, ipah para EIEC" por medio de Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real, utilizando SYBR® Green I como fluoróforo en el canal de 530. Utilizando los Inicadores (primers) descritos en la Tabla 9:

Tabla IX. Características de los inicadore (primers) empleadas en este estudio*

Designación del primer	Gen objetivo	Secuencia 5'a3'F/R	Tamaño del amplicon (bp)
SK1	*Eae*	CCCGAATTCGGCACAAGCATAAGC	881
SK2		CCCGGATCCGTCTCGCCAGTATTCG	
VTcom-u	*Stx*	GAGCGAAATAATTTATATGTG	518
VTcom-d		TGATGATGGCAATTCAGTAT	
AL65	Est	TTAATAGCACCCGGTACAAGCAGG	147
AL125		CCTGACTCTTCAAAAGAGAAAATTAC	
LTL	*Elt*	TCTCTATGTGCATACGGAGC	322
LTR		CCATACTGATTGCCGCAAT	
ipaIII	*ipaH*	GTTCCTTGACCGCCTTTCCGATACCGTC	619
ipaIV		GCCGGTCAGCCACCCTCTGAGAGTAC	
aggRks1	*aggR*	GTATACACAAAAGAAGGAAGC	254
aggRkas2		ACAGAATCGTCAGCATCAGC	
Eaggfp	CVD432	AGACTCTGGCGAAAGACTGTATC	194
Eaggbp		ATGGCTGTCTGTAATAGATGAGAAC	
aspU-3	*aspU*	GCCTTTGCGGGTGGTAGCGG	282
aspU-2		AACCCATTCGGTTAGAGCAC	

Tabla 9. Características de los inicadores (primers) empleados en este estudio.

Toma C y col. 2003. Multiplex PCR Assay for identification of human diarrheagenic Escherichia coli. American society of Microbiology. (6)41:2669-6671

11.4.5 PROTOCOLO DE PCR.

En una prueba preliminar realizada sobre los controles positivos determinamos que las condiciones estándar de reacción daban buenos resultados por lo que la PCR fue montada bajo condiciones estándar ajustándose a un volumen final de 20µL por reacción según la

Tabla **10**:

Tabla X. Mezcla de Reacción de PCR.		
Reactivo	**Volumen (µL)**	**Concentración Final en la Rx**
10X PCR	2	1X
DNTp Mix (10mM c/u)	0.4	200µM
Primer Forward (20µM)	0.2	1µM
Primer reverse (20µM)	0.2	1µM
Top Taq(5U/µL)	0.1	1U
DNA a investigar	5	-------
Sybr Green 5X	5	1X
H20	7.1	-------
vol final	20	-------

Tabla 10. Mezcla de reacción de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Se prepararon mezclas de reacción suficientes para 816 reacciones, debido a que se investigaron 100 muestras más los controles positivo y negativo, se determinaron 8 genes por muestra, esto es 102 reacciones por cada gen incluyendo controles positivos y negativos. Se utilizó un termociclador *LightCycler ® 480* Real-Time PCR. Tabla 11:

Tabla XI. Mezcla de Reacción de una PCR.		
	Volumen	
Reactivo	Para 1 Rx(µL)	Para 816 Rx(µL)
10X PCR	2	1632
DNTP´s Mix (10mM c/u)	0.4	326.4
Top Taq (5U/µL)	0.1	81.6
Sybr Green 5X	5	4080
H20	7.1	5793.6
volumen final	14.6	11913.6

Tabla 11. Mezcla de reacción de una PCR

Se distribuyó la mastermix total (11,913.6µL) en 8 volúmenes de 1,489.2 µL para las 102 reacciones de cada gen depositando a cada uno de estos 8 volúmenes, 1 juego de primers por cada tubo como se muestra en la
Tabla **12**:

Tabla XII. Distribución de Iniciadores (primers) para la PCR.			
Master Mix	**Primer 5' (µL)**	**Primer 3' (µL)**	**Gen objetivo**
1	163.2	163.2	Eae
2	163.2	163.2	Stx
3	163.2	163.2	Est
4	163.2	163.2	Elt
5	163.2	163.2	aggR
6	163.2	163.2	AspU
7	163.2	163.2	CVD432
8	163.2	163.2	ipaH

Tabla 12. Distribución de Iniciadores Primers para la PCR

El termociclador *LightCycler ® 480* Real-Time PCR utiliza placas de 96 pocillos cada una con 8 filas y 12 columnas:

- Las placas se prepararon colocando 15µL de master mix a cada pocillo, de la siguiente manera: fila 1 Master mix eae, fila 2 Master mix stx, fila 3 Master mix est, fila 4 Master mix elt, fila 5 Master mix aggR, fila 6 Master mix AspU, fila 7 Master mix CVD432, fila 8 Master mix ipaH.

- Y a cada una de las columnas de la 1 a la 12 correspondían las muestras agregando 5µL del mismo ADN a todos los pocillos de una columna. En el caso de los controles solo se depositó a cada pocillo el ADN que correspondía al patotipo que presenta cada gen. Se procedió al corrimiento en el termociclador *LightCycler ® 480* Real-Time PCR System como se muestra en la Tabla 13.

Programa para el termociclador *LightCycler ® 480* Real-Time PCR System								
Programa:	Desnat.	Ciclos			Melting			Enfriam.
Análisis	-	Cuantificación			Curva Melting			-
Ciclos	1	40			1			1
Segmento	1	1	2	3	1	2	3	1
Objetivo	95º C	95º C	52º C	72º C	95º C	40º C	85º C	40º C
T. espera (hh:mm:ss)	00:10:00	00:00:30	00:01:00	00:01:00	00:00:30	00:00:30	00:00:00	00:00:30
Rampas	4.4	4.4	2.2	4.4	4.4	2.2	0.2	4.4
Aquisición	-	-	Sencilla	-	-	-	Continua	-

Tabla 13. Programa para el Termociclador en Tiempo Real LigthCycler 480

11.5 VISUALIZACIÓN DE LA PCR.

11.5.1 CURVAS MELTING.

La PCR en tiempo real nos permite monitorear el proceso de amplificación de los genes en las muestras, en la figuras 20 y 21 se muestra un ejemplo, para corroborar que las curvas de amplificación correspondieran a los genes esperados y no a productos inespecíficos o dímeros de primers se obtuvieron las curvas melting de los productos de amplificación (Figura 20) y se asociaron al peso del producto que se observó con electroforesis en geles de agarosa.

11.5.2 ELECTROFORESIS.

Preparación del buffer de corrida. Para preparar una solución 5X, se pesó 54 g de tris-base y 27.5 g de acido borico. Se disolvió en 800 ml de agua desionizada y se añadió 20 ml de EDTA 0.5M pH8. Se aforó a 1 litro, la solución final presentó un pH de 8.3. La solución de trabajo se diluye a 1X con agua desionizada tanto para la preparación de los geles como para la corrida.

Preparación de los geles. Se prepararon geles para 50 pocillos, al 2.5% de concentración de agarosa con las siguientes cantidades: agarosa: 1gr. Buffer de corrida: 40mL. La agarosa se disolvió en el buffer de carga y se calentó en un horno de microondas hasta ebullición para disolver bien el polvo, al disolverse, se le agregó 3µL de bromuro de Etidio (10mg/mL). Se enfrió (aprox. 60°C) para colocarse de una sola vez en el contenedor de geles colocando el peine para formar los pozos y posteriormente se colocó dentro de la cámara electroforética.

Agregamos el buffer necesario hasta cubrir el gel (850mL aprox.)y se retiró el peine con cuidado para no romper el fondo de los pozos. Carga del gel. Se virtió 15µL del producto de PCR a cada pozo, mezclando previamente con 3.5 µL de colorante de corrida. Corrimiento del gel. El gel se sometió a una carga de 150 voltios por un periodo de 35 minutos.

Visualización del gel. El gel se analizó con un equipo Gel Doc XR de la marca BIO-RAD y se almacenaron las imágenes digitales para su análisis.

11.6 SUCEPTIBILIDAD A LOS ANTIBIÓTICOS.

Se decidió hacer la determinación de la resistencia antimicrobiana a los antibióticos de primera elección según el protocolo del de CLSI (Clinical and Laboratory Standars Institute). Incluidos otros antimicrobianos que no son de uso contra infecciones diarreicas (solo con fines de investigación), los antibióticos utilizados se presentan en la Tabla 14.

Tabla XIV. Antibióticos utilizados en este estudio y su referencia para determinación de sensibilidades.				
Antibiótico		Parámetros de referencia en mm		
	Concentración (μg)	Sensible	Intermedio	Resistente
CEFOTAXIMA (CTX)	30	≥23	15-22	≤14
CEFTRIAXONA (CRO)	30	≥21	14-20	≤13
CEFTAZIDIME (CAZ)	30	≥18	15-17	≤14
CEFEPIME (FEP)	30	≥18	15-17	≤14
MEROPENEM (MEM)	10	≥16	14-15	≤13
IMIPENEM (IPM)	10	≥16	14-15	≤13
AMOXICICILINA/CLAVULANATO (AMC)	20/10.	≥20	-	≤28
TRIMETROPRIM MAS SULFA (SXT)	1.25/23.75	≥16	11-15.	≤10
AMPICILINA (AM)	10	≥29	-	≤28
CLORANFENICOL "C"	30	≥21	-	≥20
AMIKACINA (NA)	30	≥17	15-16	≤14
GENTAMICINA (GM)	10	≥15	13-14	≤12
FOSFOMICINA (FOX)	200	≥16	13-15	≤12

Tabla 14. Antibióticos utilizados en este estudio y su referencia para determinación de Sensibilidades

A partir de un aislado puro de las muestras que resultaron ser positivas para algún patotipo de *E. coli* se realizó un cultivo en caldo Mueller-Hinton, incubamos de 2 a 5hrs hasta la aparición de turbidez. Ajustamos al tubo 0.5 del nefelómetro de Macfarland, sembramos este cultivo en una placa de agar Mueller-Hinton y procedemos a colocar los antibióticos de la tabla XIII en 2 placas, en la primer placa colocamos los primeros 7 sensidiscos y en la segunda los 6 restantes. Se incubó durante 24 hrs para poder leer los halos de inhibición con una regla y se comparan los resultados obtenidos con los valores de la (Tabla 14), clasificándose así como sensible, intermedio o resistente.

12 RESULTADOS.

12.1 CARACTERIZACIÓN DE LAS MUESTRAS.

Durante el periodo de muestreo, que abarcó de octubre de 2009 a Abril de 2010, se obtuvieron en total 190 muestras diarreicas para procesar, de las cuales se excluyeron 3 por que en el cultivo además de *E. coli* se aislaron colonias de *Shigella sp*., también se descarto 1 muestra por que se aisló *Salmonella sp.* , por otro lado, se excluyeron 2 muestras más de las cuales no se obtuvo crecimiento alguno en los medios de cultivo. Dando un total de 184 cepas de *E. coli* aisladas, como se muestra en la (Figura 13). De acuerdo a los criterios de inclusión se procesaron 100 de estas 184 muestras, las cuales se sometieron a extracción de ácidos nucleicos. (Figura 14).

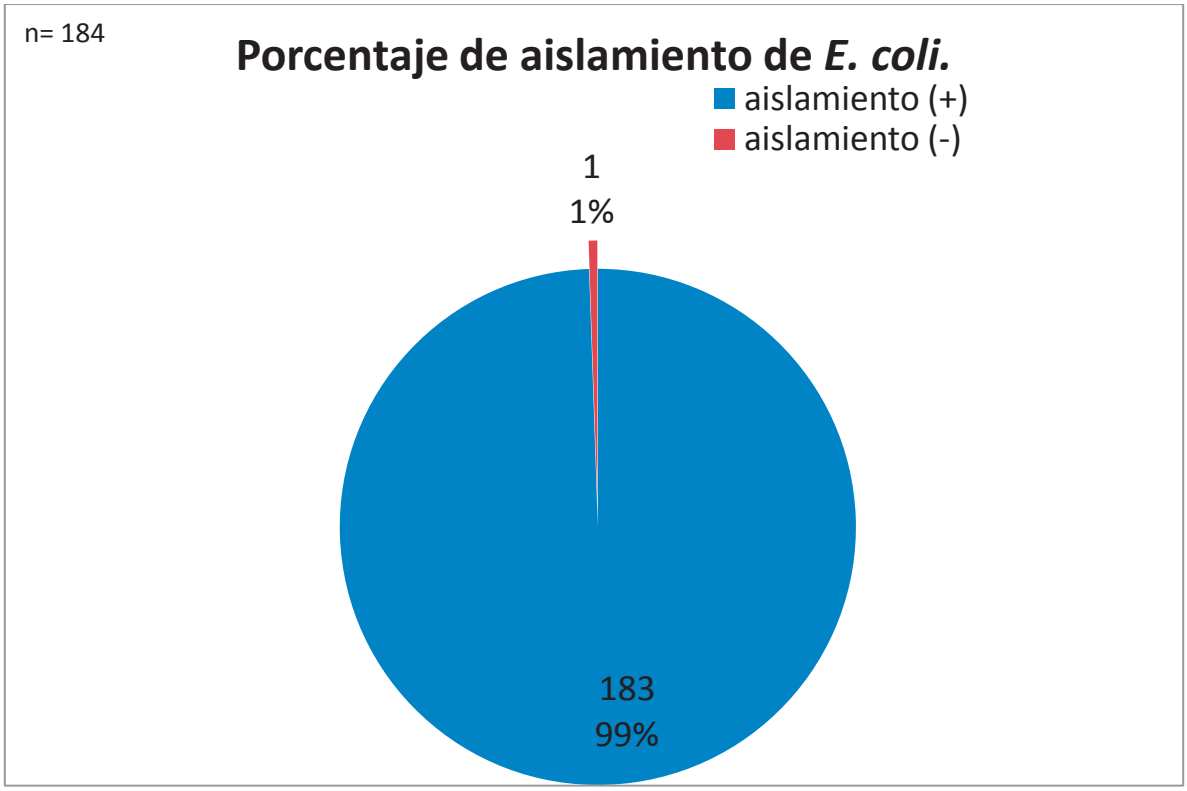


Figura 13. Porcentaje de muestras con cultivos de *E. coli* positivos.
Fuente: Bitácora de custodia de muestras laboratorio de biología molecular del LESP Michoacán.

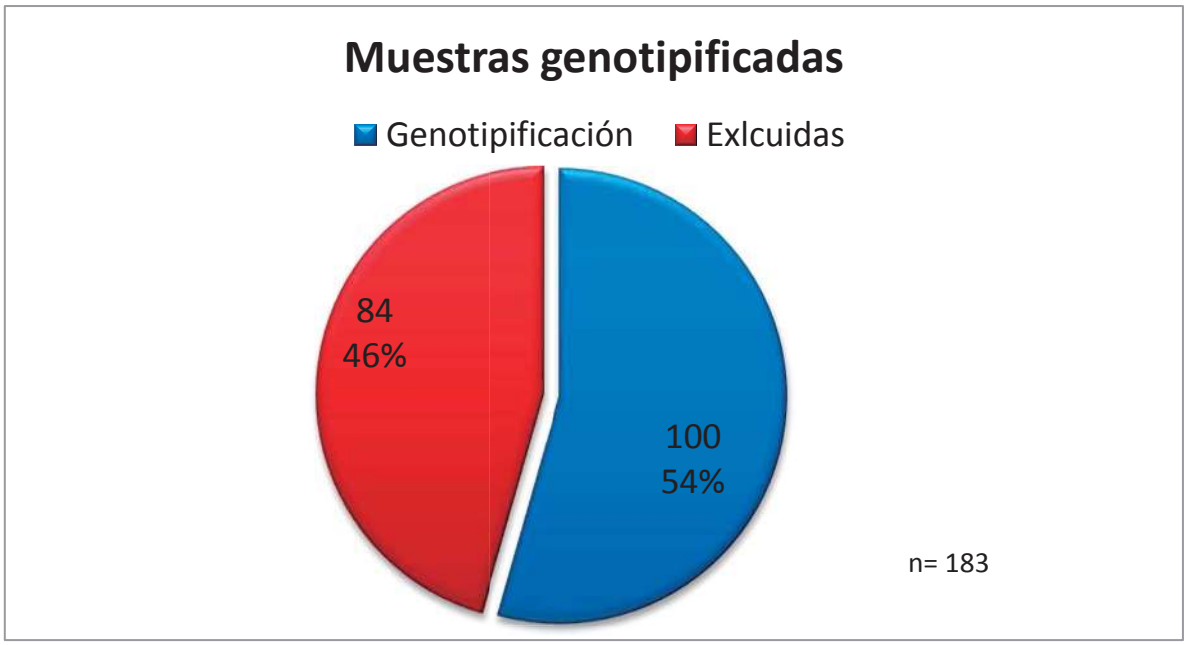


Figura 14.Porcentaje de muestras procesadas para extracción de ADN.
Fuente bitácoras Hospital infantil y LESP Michoacán.

El muestreo se llevó a cabo en el hospital infantil de Morelia y el LESP Michoacán con la finalidad de recabar todas las muestras posibles y que estas procedieran de las diferentes áreas jurisdiccionales del estado, sin embargo hubo una mayor cantidad de muestras que provenían del LESP Michoacán como se observa en la (Figura 15), esto en parte porque dentro del periodo de muestreo se presentó una epidemia de diarrea en los municipios de Tuxpan, Angangueo, Jungapeo y Ocampo, que pertenecen a la jurisdicción sanitaria 3 (Zitácuaro) de ahí la prevalencia, la prevalencia en la jurisdicción sanitaria 1 (Morelia) se atribuye al muestreo realizado en el hospital infantil de la localidad. (Figura 16).

Figura 15. Procedencia de las muestras según la unidad de muestreo.
Fuente bitácoras Hospital infantil y LESP Michoacán.

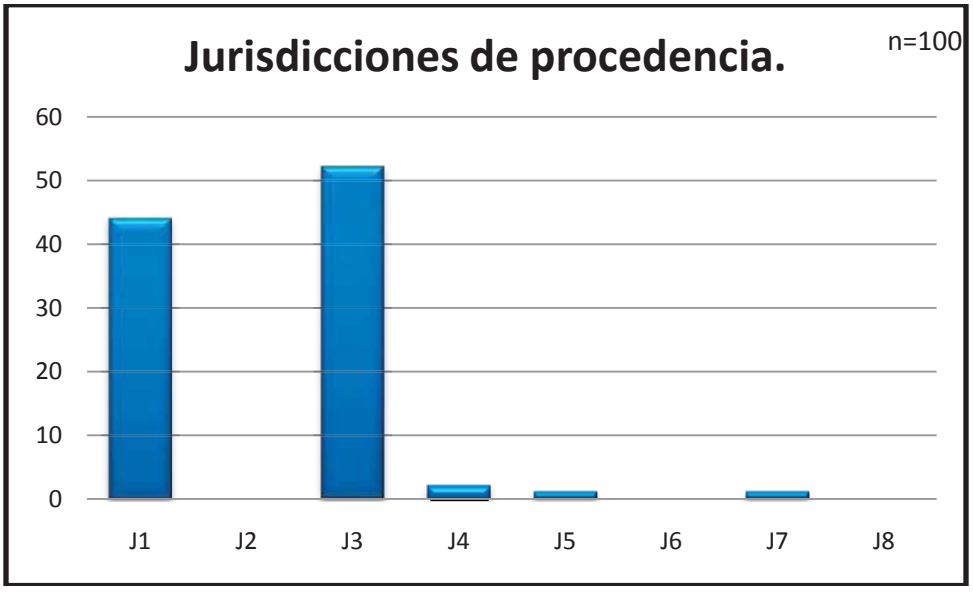


Figura 16. Jurisdicciones de procedencia de las muestras procesadas.
J1: Morelia. J2: Zamora, J3:Zitácuaro. J4: Pátzcuaro. J5: Uruapan.
J6: La Piedad. J7: Apatzingán. J8: Lázaro Cárdenas.
Fuente bitácoras Hospital infantil y LESP Michoacán.

La distribución por sexo de los pacientes que presentaron diarrea muestra que los varones son el grupo más afectado (Figura 17), esto corrobora lo mencionado por otros autores[34]. Además el grupo de edad en el que más prevalece la presencia de diarrea fue en los niños menores de 1 año, seguidos de los menores de 2 años, ya que ambos grupos representan el 61% de las muestras (Figura 18).

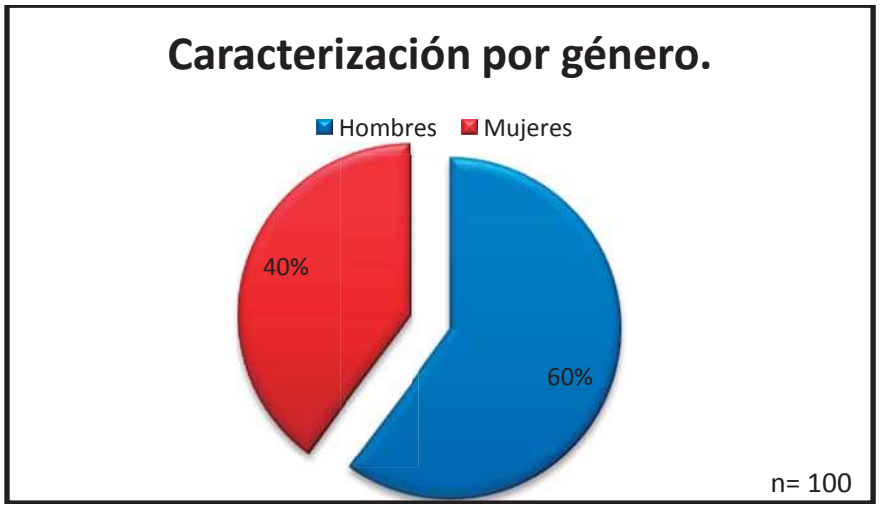


Figura 17. Se muestra la incidencia de género de los pacientes.
Fuente bitácoras Hospital infantil y LESP Michoacán.

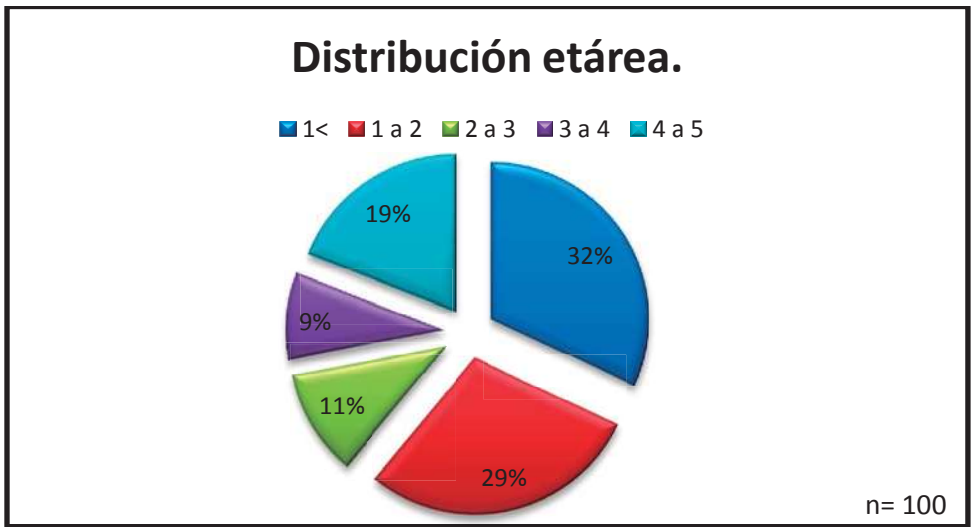


Figura 18.Distribución etaria de los pacientes.
Fuente bitácoras Hospital infantil y LESP Michoacán.

Con base en estos resultados podemos mencionar que los niños varones menores de 2 años son quienes representan el grupo más afectado en cuanto a la presencia de diarrea y que la epidemia de diarrea de febrero de 2009 ocurrida en el estado contribuyó a que la jurisdicción 3 (Zitácuaro) apareciera como una fuente importante de pacientes con síndrome diarreico.

12.2 IDENTIFICACIÓN BIOQUÍMICA.

Escherichia coli es una bacteria versátil en cuanto al empleo de sustratos como fuente de energía. En la siguiente tabla se reporta el porcentaje de cepas que resultaron positivas en este estudio para la determinación de la presencia de las enzimas que degradan cada sustrato (Tabla 15).

Tabla 15. Identificación bioquímica de *E. coli*.
N = 190

Medio	Prueba	% de positividad
TSI	Fermentación de Glucosa	100
	Fermentación de Lactosa	95
	Gas	95
LIA	Lisina Descarboxilasa	95
MIO	Movilidad	95
	Producción de Indol	100
	Ornitina Descarboxilasa	65
Citrato de Simmons	metabolismo de citrato	0
Caldo Malonato	metabolismo de malonato	0
Urea de Christensen	Urea dihidrolaza	0

Tabla 15. Identificación Bioquímica de E. coli

12.3 TIPIFICACIÓN MOLECULAR.

Se obtuvieron muestras de 50µL de ADN y la cuantificación de ácidos nucleicos arrojó resultados de entre 1 a 5 ng/mL y con una pureza de entre 1.7 a 2.0. Para garantizar la efectividad de los resultados se corrieron simultáneamente pruebas de PCR para cepas control de cada uno de los genotipos patógenos de *E. coli*, la amplificación positiva de un gen se observa en la gráfica de PCR como la aparición de una curva con crecimiento exponencial que refleja el aumento de la fluorescencia de la muestra resultado de la unión del reactivo SYBR Green al ADN, mediante estos pasos corroboramos que las cepas utilizadas como controles poseían los genes de interés y que las concentraciones de reactivos empleadas para la PCR eran correctas (Figura 19 y Figura 20). También se obtuvieron los valores de las curvas melting de los genes objetivos mostrados en la (Tabla 16).

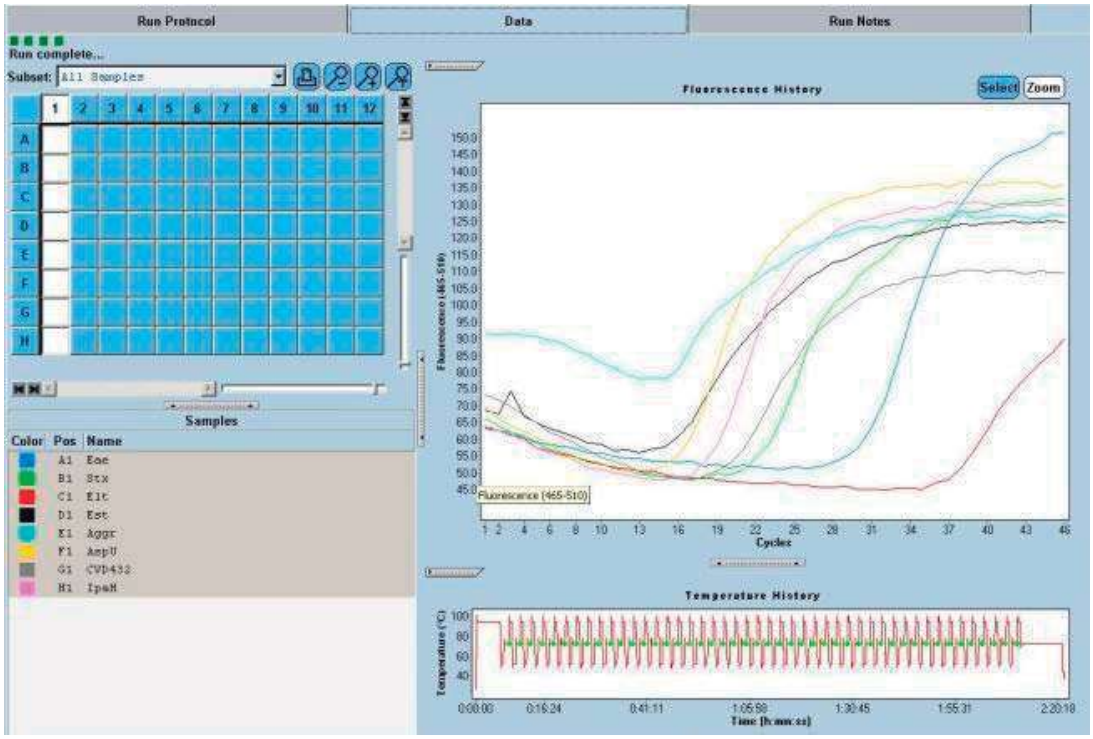


Figura 19. PCR en tiempo real de las Cepas utilizadas como Controles Positivos.
Imagen Obtenida del software del equipo LightCycler Real Time PCR 480®.

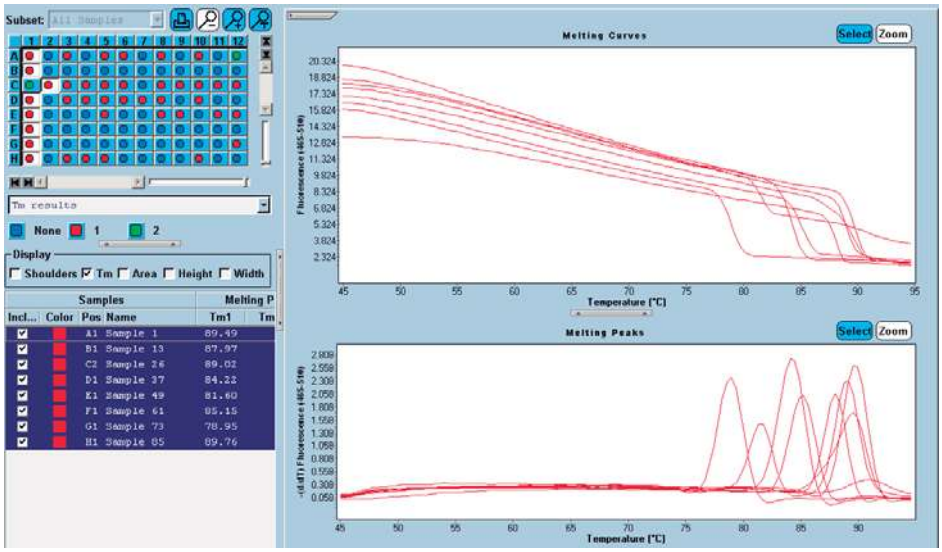


Figura 20. Curvas Melting obtenidas de los Controles Positivos.
Imagen Obtenida del software del equipo LightCycler Real Time PCR 480®.

Tabla 16. Valores de las Curvas Melting de los Productos de PCR obtenidas a partir de los controles positivos	
Gen objetivo	Temperature melting (°C)
Eae	89.49
Stx	87.97
Elt	89.02
Est	84.22
AspU	81.6
Aggr	85.15
CVDR 432	78.95
IpaH	89.76

Tabla 16. Valor de las Curvas Melting de los Productos de PCR obtenidas a partir de los Controles Positivos

Posterior a la PCR en tiempo real se montó una electroforesis para corroborar que las curvas de amplificación coincidieran con los pesos de los fragmento reportados en la literatura[114] de la Tabla 9. Corroborando de esta manera que la curva de amplificación observada pertenece al producto esperado y no a productos inespecíficos, asociando además la curva melting a dicha amplificación (Figura 21).

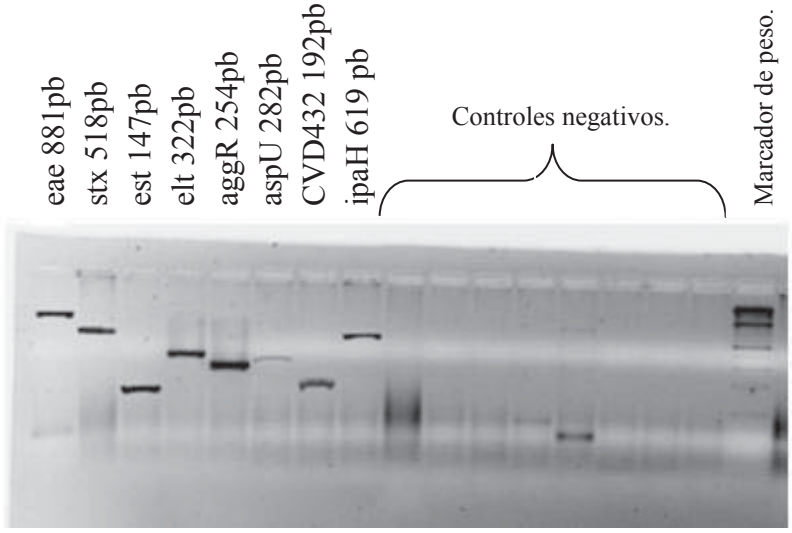


Figura 21. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR en tiempo real de los controles positivos y negativos.
Los genes identificados corresponden eae de EPEC, stx de EHEC, est toxina termoestable de ETEC, elt toxina termolábil de ETEC, aggr-aspU y CVD432 de EAEC,
DAEC no tiene descrito un juego de primers para su identificación.

Una vez determinado que la concentración de reactivos en la PCR era correcta y la asociación de las curvas melting a los pesos de los productos de PCR, se procedió a la tipificación de las muestras.

A continuación se muestra un ejemplo gráfico para la identificación de una cepas de *Escherichia coli* enteropatógena con esta metodología. En la (Figura 22) se observa la gráfica donde se puede observar la aparición de la curva de crecimiento exponencial. En la (

Figura **23**) se observa una electroforesis que muestra en el carril 1 de las muestras 80 y 81 la aparición de una banda de peso cercano a las 881pb del gen objetivo eae. En la (Figura 24) se observa el gráfico para la obtención de la temperatura melting del gen eae, la cual se determinó es de 89.49°C

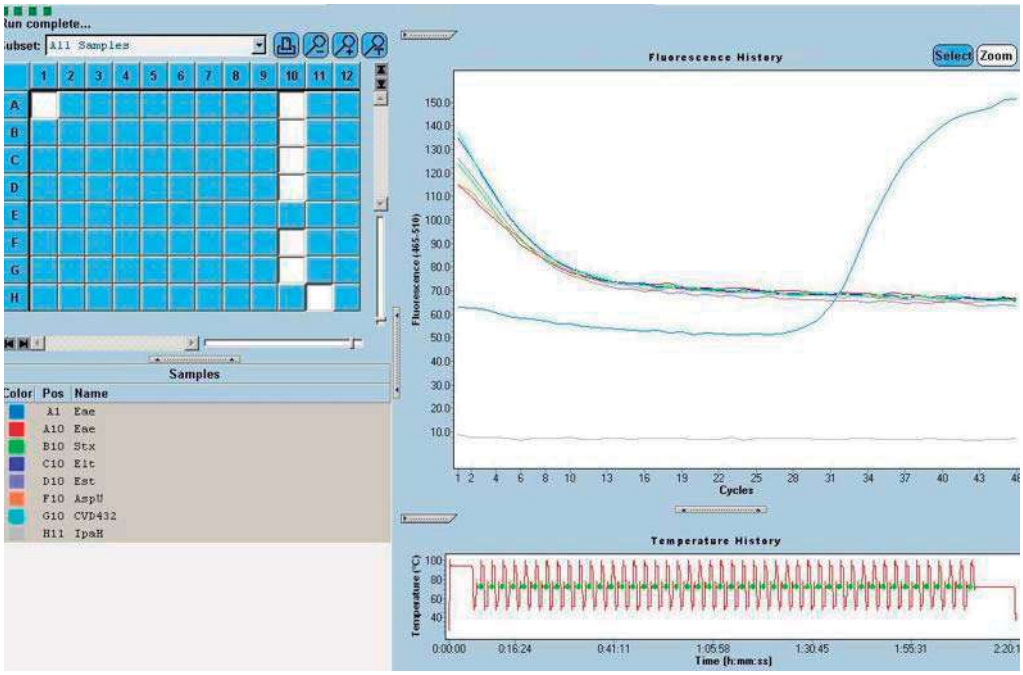


Figura 22. PCR en tiempo real de la muestra 80.
Imagen Obtenida del software del equipo LightCycler Real Time PCR 480®.

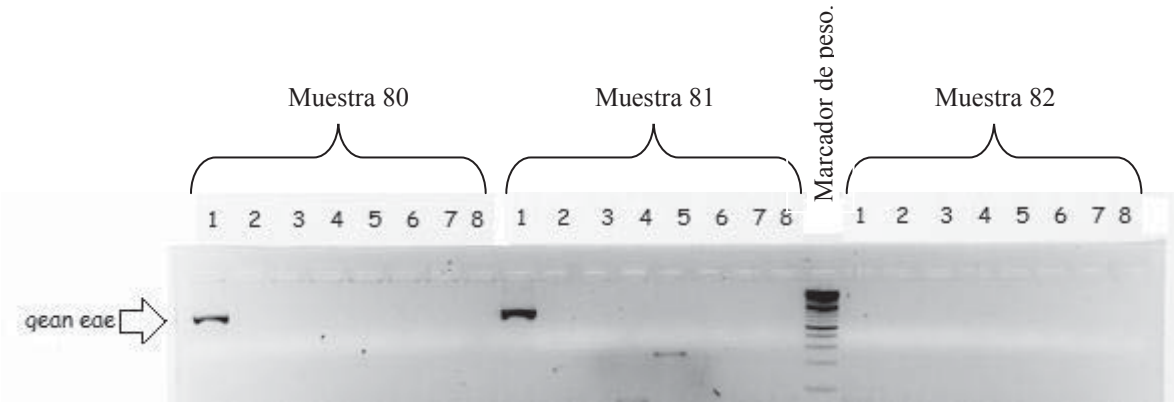


Figura 23. Identificación en gel de Agarosa de una Muestra Positiva del Gen EAE.
Muestras 80 y 81 Positivas al gen EAE, en contraste la muestra 82 no presenta amplificación del gen EAE
La banda que se observa en el carril 5 corresponde a un producto inespecífico .Los carriles corresponden:
1 eae, 2 stx, 3 est, 4 elt, 5 aggR, 6 aspU, 7 CVD432, 8 ipaH. M.W.= marcador de peso.

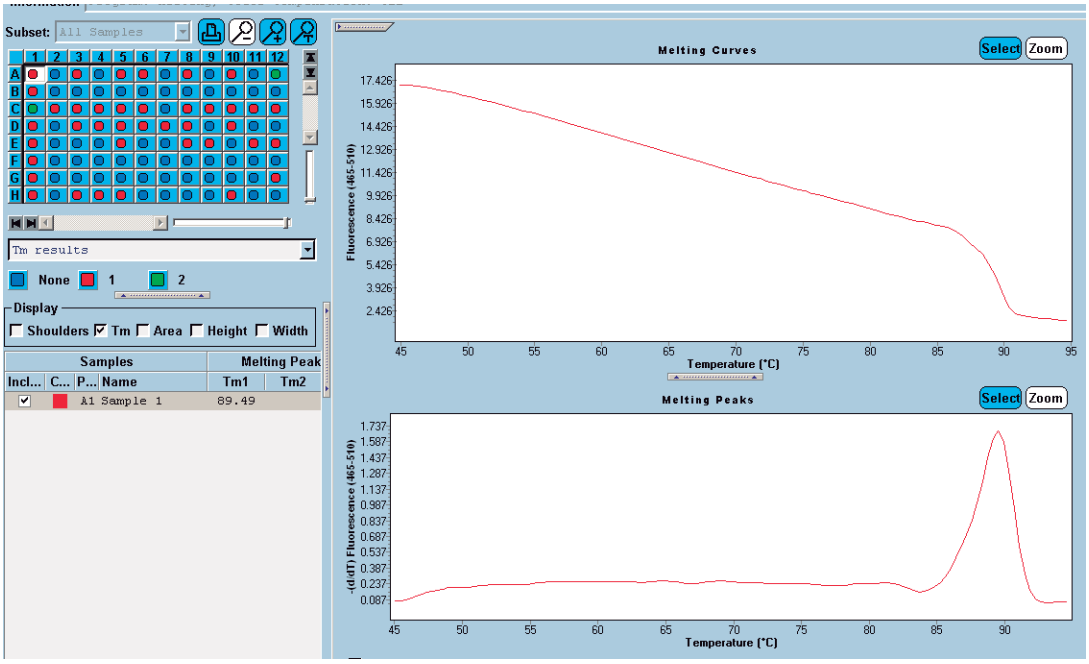


Figura 24. Curva Melting del Control Positivo para el gen EAE.
Imagen Obtenida del software del equipo LightCycler Real Time PCR 480®.

Finalmente se tipificaron 44 muestras, correspondiendo a 3 grupos patógenos 50% de las muestras (22/44) resultó ser del grupo ETEC, 41% de las muestras (18/44) resultó ser EAEC y 9% (4/44) resultó ser del grupo EPEC. En este estudio se determinó que ETEC es el principal grupo patógeno detectado seguido de

EAEC y EPEC, EIEC y DAEC no pudieron asociarse como productores de diarrea en niños del estado de Michoacán (Figura 25). (Estos resultados se obtuvieron por duplicado).

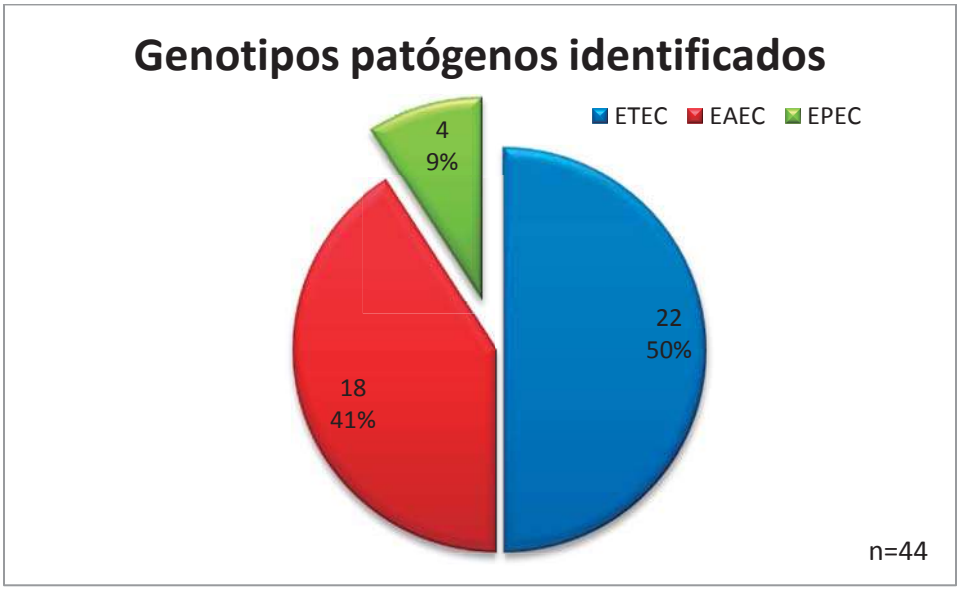


Figura 25. Distribución de los patotipos encontrados en las muestras positivas Mediante PCR en tiempo real.
Fuente: Bitácora Laboratorio de biología molecular LESP Michoacán.

En la (Tabla 17) se resumen los casos clínicos de los pacientes que presentaron cuadro diarreico ocasionado por EPEC, observándose que tiene a producir una diarrea acuosa, sin sangre, sin vómito ni fiebre con un rango de entre 6 y 8 evacuaciones por día. Todas las muestras provenían del LESP Michoacán y pertenecen a la jurisdicción sanitaria 3 (Zitácuaro) que son resultado de la epidemia de diarreas de Febrero de 2009 en Michoacán.

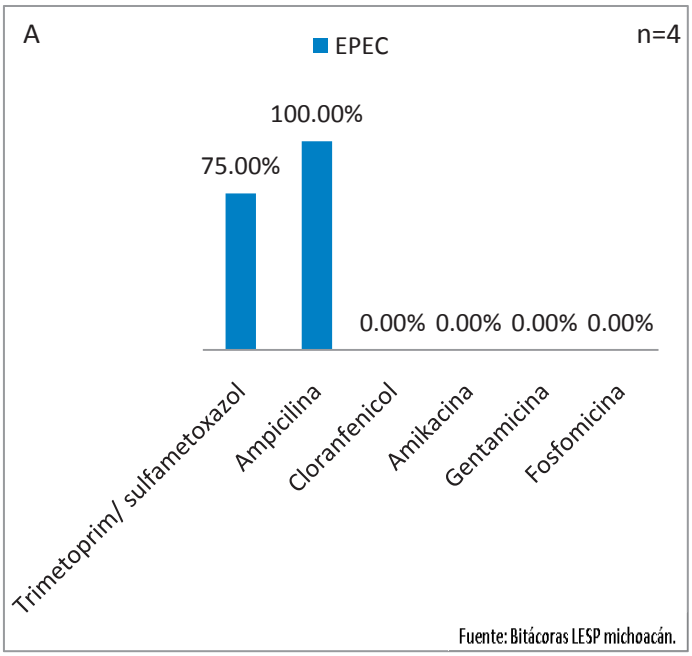
Tabla 17. Características de los casos de EPEC

Patotipo	Procedencia de la muestra	Procedencia del paciente	Edad del paciente	Fisiología de la diarrea
EPEC	LESP	Ocampo	3 años	Diarrea acuosa, sin vómito, ni fiebre
EPEC	LESP	Angangueo	4 años	Diarrea líquida, sin vómito ni fiebre
EPEC	LESP	Angangueo	6 meses	Diarrea líquida 6 evacuaciones en 24hrs, sin vómito ni fiebre
EPEC	LESP	Tuxpan	4 años	Diarrea líquida 8 evacuaciones en 24 hrs, sin vómito ni fiebre

Tabla 17. Características de los casos de E. coli patotipo EPEC
Fuente bitácoras Hospital infantil y LESP Michoacán.

12.4 RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS.

La resistencia a antimicrobianos se llevó a cabo en 2 grupos principales, un grupo patógeno y un grupo control de los cuales fueron empleadas 44 muestras de cada grupo debido a que fue el número de cepas patógenas que se aislaron. A continuación se presentan las gráficas representativas de cada patotipo (incluidos ETEC y EAEC, aunque no forman parte de los objetivos) y los controles negativos, finalmente una comparación entre patotipos y una última entre grupos patógeno y control. La intención de utilizar una grupo patógeno y uno control era ver si el grupo de bacterias patógenas presentaba un patrón de resistencia diferente al grupo control, de esta maner se descubrió que los 3 grupos patógenos muestran una clara resistencia preferencial a los antibióticos utilizados como primera elección, es decir, Trimetroprim/Sulfametoxazol, Ampicilina y Amoxicilina (utilizado en infecciones respiratorias). (Figura 26, Figura **27**, Figura **28**, Figura **29**, Figura **30**, Figura 31).



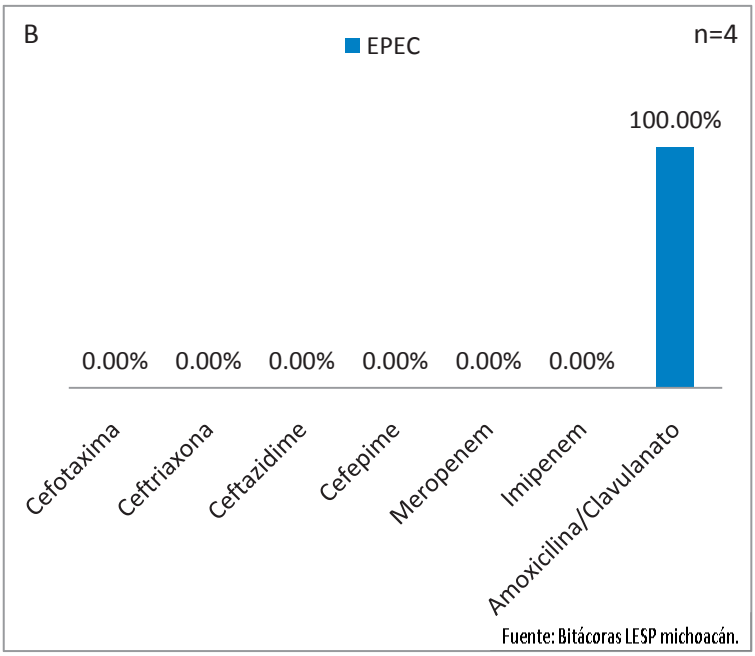
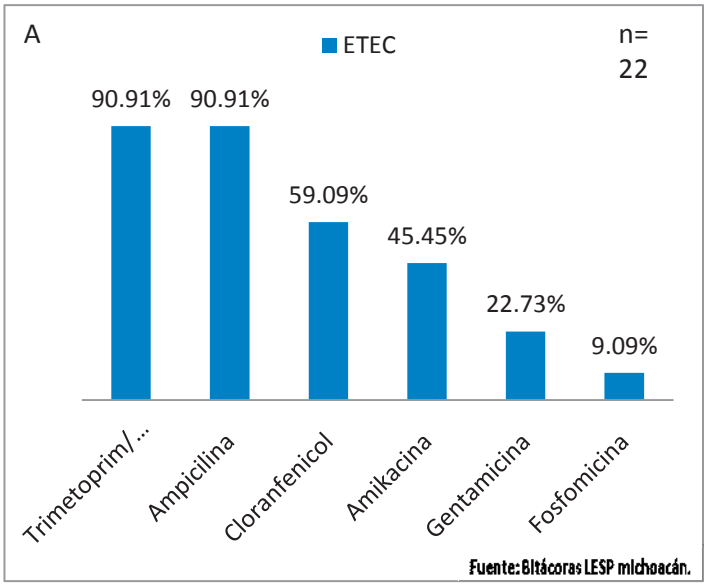


Figura 26. Resistencia de EPEC a los Antibióticos.
A. Se observa la resistencia a los antibióticos de primera elección
B. Se probaron antibióticos de otros grupos, esto solo con fines de investigación.



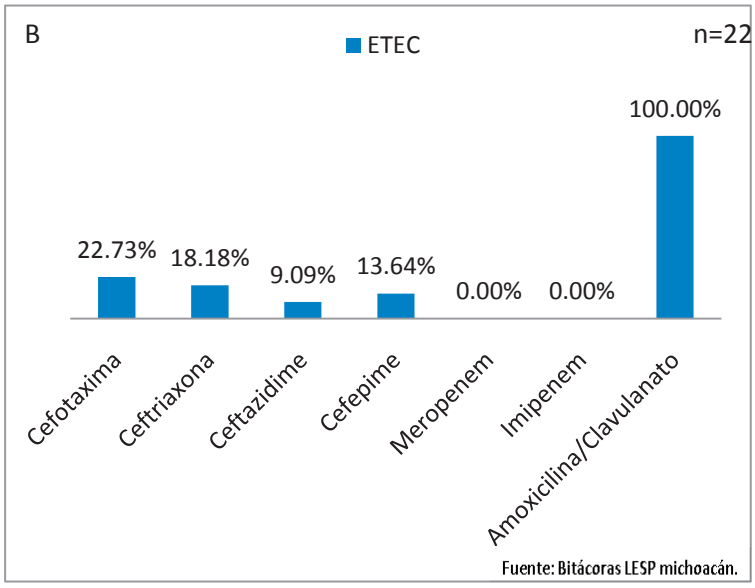
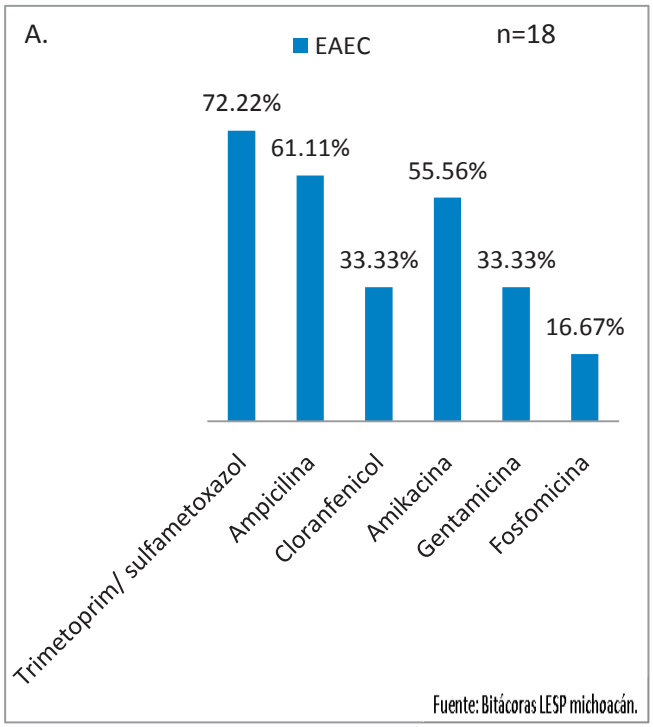


Figura 27. Resistencia de E. coli ETEC a los antimicrobianos.
A. Se observa la resistencia a los antibióticos de primera elección
B. Se probaron antibióticos de otros grupos, esto solo con fines de investigación.



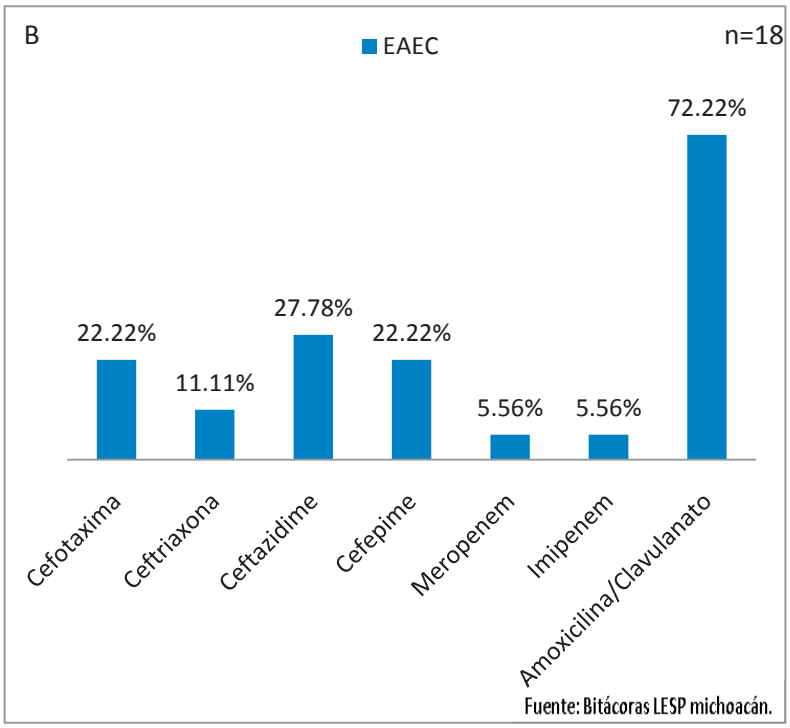
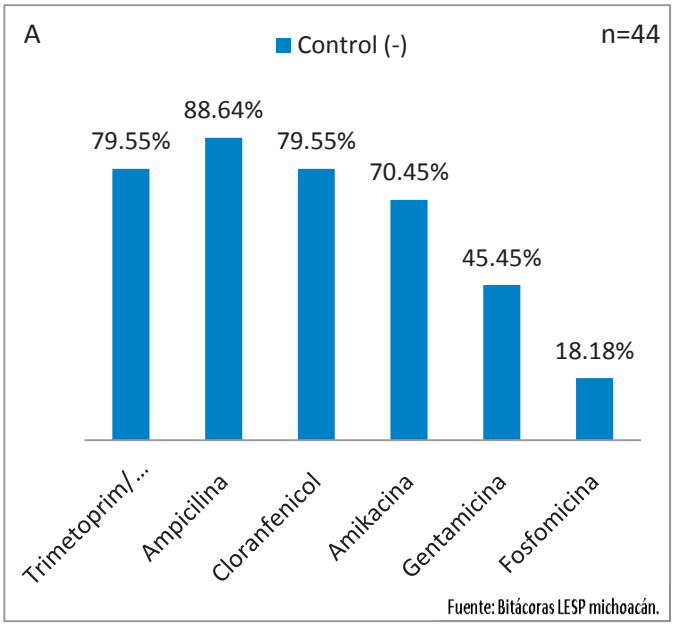


Figura 28.Resistencia de EAEC a los antimicrobianos.
A. Se observa la resistencia a los antibióticos de primera elección
B. Se probaron antibióticos de otros grupos, esto solo con fines de investigación.



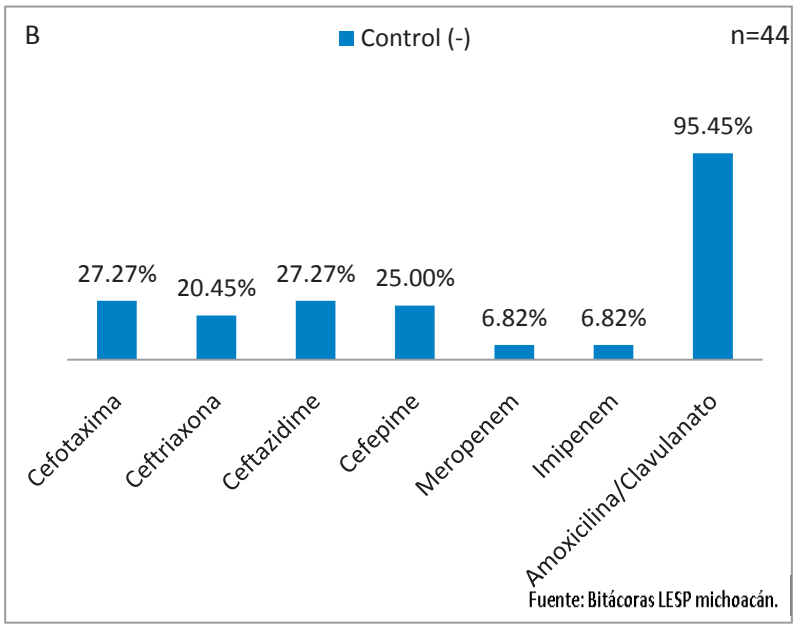
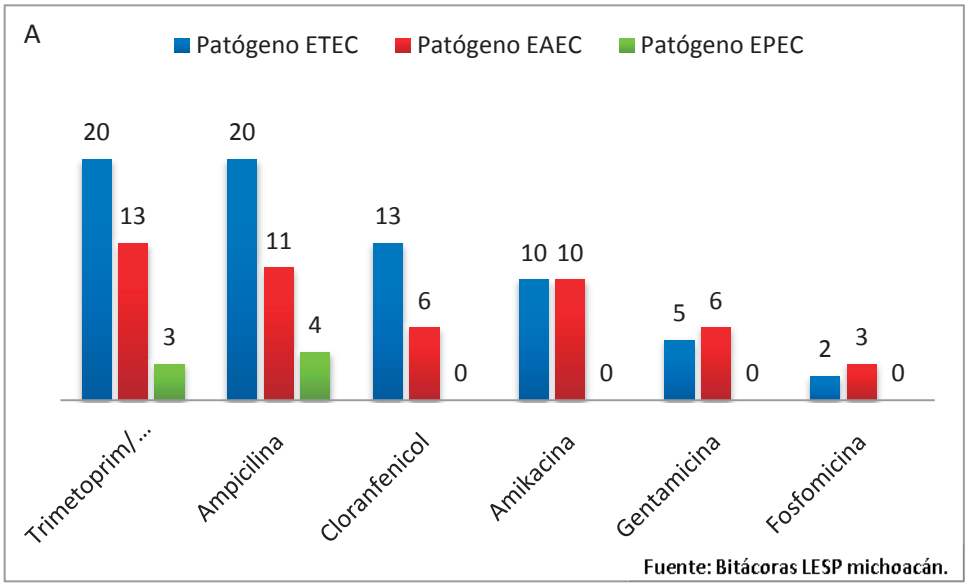


Figura 29. Resistencia de las cepas de *E. coli* que no resultaron negativas para algún patotipo.
A. Se observa la resistencia a los antibióticos de primera elección
B. Se probaron antibióticos de otros grupos, esto solo con fines de investigación.



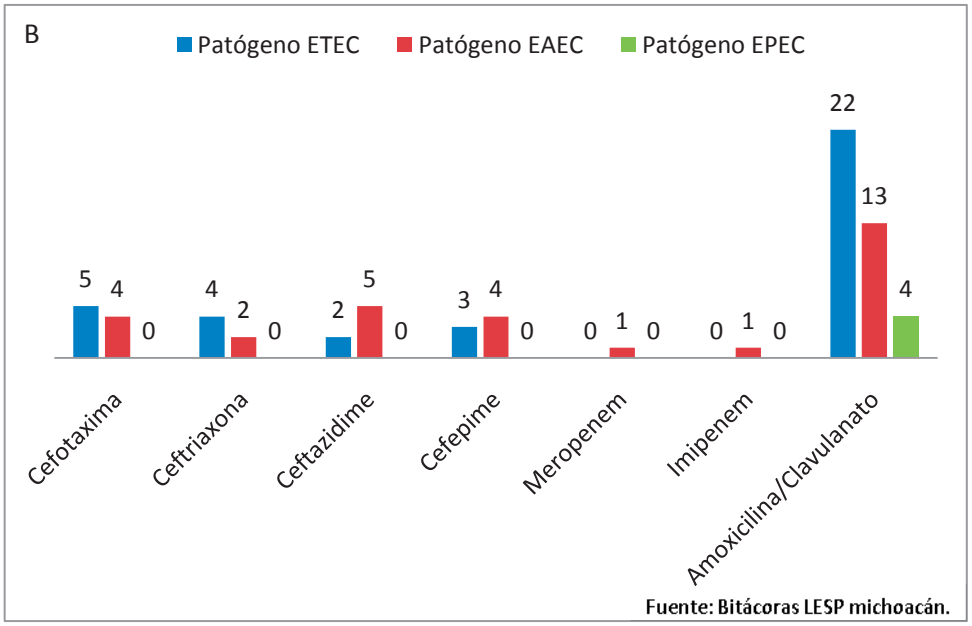


Figura 30. Comparación de la resistencia entre patotipos a antimicrobianos
A. Se observa la resistencia a los antibióticos de primera elección
B. Se probaron antibióticos de otros grupos, esto solo con fines de investigación.

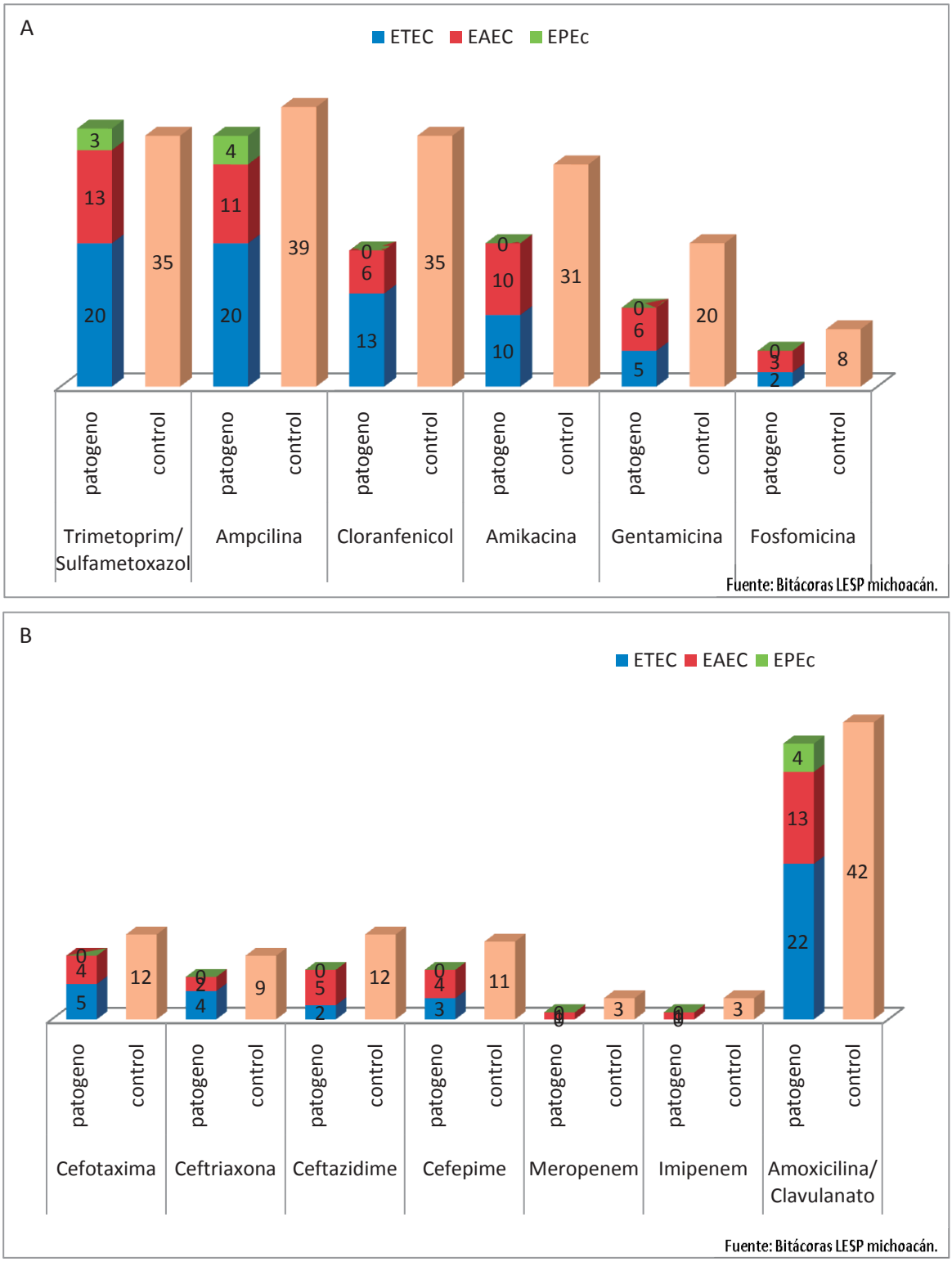


Figura 31. Comparación de la resistencia a antimicrobianos por grupos, patógenos y no patógenos.
A. Se observa la resistencia a los antibióticos de primera elección
B. Se probaron antibióticos de otros grupos, esto solo con fines de investigación.

13 DISCUSIÓN DE RESULTADOS

El presente trabajo tuvo como objetivo la identificación de 3 patotipos de *Escherichia coli* que se han asociado a la producción de síndrome diarreico en niños menores de 5 años. Estos patotipos son *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC), enteroinvasiva (EIEC) y de adherencia difusa (DAEC).

La razón que justifica el estudio es el poder brindar una visión de la problemática que representan estos agentes patógenos como inductores de síndrome diarreico, pues en la experiencia con la que cursamos a lo largo de nuestra investigación, en ningún hospital o laboratorio de diagnóstico se lleva a cabo la búsqueda de los patotipos de *Escherichia coli* como agentes causales de diarrea, como métodos rutinarios

13.1 CARACTERIZACIÓN DE LAS MUESTRAS.

Durante nuestro periodo de muestreo que abarcó de Octubre de 2009 a abril de 2010 observamos que la incidencia de casos de diarrea permaneció baja comparada con años anteriores, sin embargo a partir de una inundación que se presentó sorpresivamente en el mes de febrero de 2010 en los municipios de Tuxpan, Jungapeo, Angangueo y Ocampo (pertenecientes a la jurisdicción sanitaria 3 del estado), la incidencia de casos de diarrea aumentó en un 521% respecto al mes anterior.

Con base en los resultados obtenidos la zona del estado que mas casos de diarrea presentó fue la zona 3 por la razón antes mencionada, seguida de la zona 1 a la cual pertenence el municipio de Morelia y en el cual se encuentra el hospital infantil donde se llevó a cabo el muestreo.

En cuanto al sexo de los pacientes se observó una ligera prevalencia en cuanto a que el sexo masculino es el más afectado y en los grupos de edades se encontró que el grupo mas afectados eran los menores de 1 año, seguido por los niños menores de 2 años, esto coincide con lo reportado con otros autores en que los niños menores de 2 años son el grupo más vulnerable para el padecimiento de síndrome diarreico.

13.2 PRUEBAS BIOQUÍMICAS.

En los cultivos de las muestras diarreicas se recuperó *E. coli* en 99.5% de los aislados, en el 0.5% que no se logró se descubrió que el paciente se encontraba bajo tratamiento con inmunosupresores y fuertes cantidades de antibiótico, de hecho en la placa de cultivo lo único que se pudo recuperar fueron colonias de levaduras y ninguna de bacterias. En 3 muestras procesadas se encontró la presencia de *Shigella boydi* la cual se caracterizó con antisueros y en otra muestras se encontró la presencia de *Salmonella sp.*

Como conclusión creemos que la caracterización bioquímica es útil en su aplicación para la caracterización de enterobacterias hasta el nivel de especie, y en algunos casos para la determinación de variedades, pero no permite la identificación de factores de virulencia, pues estos no están tan estrechamente relacionados con la presencia o no de proteínas que actúan sobre ciertos sustratos para su metabolismo.

13.3 ANÁLISIS Y MANIPULACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS.

Ante todo, los métodos empleados en este estudio, no habían sido utilizados para la caracterización de grupos patógenos de *E. coli*, por lo que consideramos que en este aspecto el estudio es innovador.

En cuanto a la extracción de ácidos nucleicos, se logró la extracción de ADN de todas las muestras con buena concentración (1 a 5ng/mL) y alta pureza $A_{260/280}$(1.7-2.0), datos obtenidos a partir de su cuantificación con un equipo GeneQuant 100, esto permitió un análisis de PCR sin contratiempos a causa de la calidad del ADN que utilizamos, todas las muestras se extrajeron por duplicado para su posterior análisis.

Como primera medida para el montaje del protocolo adecuado, montamos reacciones bajo condiciones estándar (tabla XI) para establecer si tales concentraciones eran adecuadas para las reacciones que se llevaron a cabo, encontrando de esta manera que se logró la amplificación de los genes objetivos presentes en las cepas control de *E. coli* de cada uno de los grupos patógenos. De esta manera se procedió entonces a elaborar 2 master mix para 816 reacciones cada una con las concentraciones de reactivo antes mencionadas.

Con ayuda de la PCR en tiempo real y el SYBR Green, se logró determinar el valor de las temperature melting de los productos de PCR de los oligos empleados (tabla XV) y con un posterior análisis de electroforesis confirmamos y relacionamos que el peso de los productos de las reacciones correspondían a los productos esperados, asociando de esta manera el valor de las temperature melting al peso de los productos y confirmando que pertenecían a la amplificación esperada y no ha productos inespecíficos.

Adicionalmente se montó una reacción PCR múltiplex para la determinación de los 5 grupos patógenos de *E. coli* pero encontramos que las concentraciones de reactivo interferían con la amplificación de algunos genes, actualmente se encuentra en proceso el montaje de dicho protocolo. Esto significaría un gran ahorro de tiempo y reactivo pues se puede obtener no solo la confirmación de la presencia de un patotipo de *E. coli* sino que se puede hacer en poco tiempo e incluso se puede trabajar directamente son la muestra diarreica.

En la prueba de PCR no se consideró necesaria la presencia de un gen como control de reacción, pues considerando que partimos de la extracción de ADN procedente de bacterias identificadas como *E. coli* y que se realizó cuantificación de ADN mostrando buenas concentraciones y alta pureza, además de que el proceso se llevó a cabo por duplicado para todas las muestras y que el master mix empleado logró la amplificación de los genes de las cepas control, además de que los procesos de extracción y amplificación son automatizados, lo que reduce el riesgo de error humano y la contaminación.

Bajo este esquema de trabajo se logró la tipificación molecular de 44% de las muestras amplificó para al menos 1 gen de patogenicidad siendo 22% correspondiente a ETEC, 18% correspondiente a EAEC y 4 % a EPEC.

Estos datos coinciden con lo reportado por otros autores en que ETEC es el patotipo *E. coli* mas prevalente, pero difiere en el hecho de que EAEC se encontró en un elevado porcentaje (casi igual que ETEC) como causa de diarrea. Por otro lado se encontró que la prevalencia de EPEC fue baja, pues estudios realizados en el INDRE en 1996 lo reportan como el 19% de causa de diarrea.

El método de tipificación molecular de *Escherichia coli* por PCR en tiempo real se preparó y quedó listo para su uso como herramienta de diagnóstico en el LESP del estado de Michoacán.

13.4 ANÁLISIS DE LA RESISTENCIA A ANTIBIÓTICO.

La importancia de determinar la causa de una enfermedad como lo es la diarrea es de vital importancia y esta radica en la selección de un esquema adecuado de tratamiento. Comprobamos que en hasta el 95% de los casos, el médico como primera opción de tratamiento hace uso de antibióticos, y de acuerdo con la Asociación Nacional Mexicana de Urgencias / Emergencias Pediátricas A. C.

solamente en los casos que se demuestre la presencia de bacterias como los son *Shigella sp., Salmonella sp., Vibrio cholerae y* trofozoitos de *Entamoeba histolytica* o *Girdia lamblia* se justifica su empleo. Adicionalmente se plantéa el esquema propuesto por la secretaría de salud.

El tratamiento con antibióticos tiene como finalidad la erradicación del agente lesivo, sin embargo, el antibiótico no funciona selectivamente atacando solo a un tipo específico de bacterias sino que ataca por igual a todas aquellas bacterias que sean susceptibles a su acción, esto nos conduce a la inducción y selección de bacterias multirresistentes no solo de las bacterias patógenas sino también de aquellas que en algún momento no representan ningún riesgo pero que pueden llegar a ocasionar infecciones oportunistas o inclusive, las bacterias de flora normal que pueden servir como un "almacén" de casetes de resistencia y transferir esa resistencia a bacterias patógenas.

Un ejemplo claro de la infección de bacterias oportunistas se está viendo actualmente con los pacientes VIH positivos, que presentan constantes cuadros diarreicos a causa de bacterias oportunistas como *E. coli*. Otro ejemplo son los tratamientos inmunosupresores, en el que se induce una inmunosupresión con fármacos, produciendo diarrea en el paciente por la incapacidad de su sistema inmune de contener la infección.

En este trabajo se revisaron una variedad de antibióticos representativos de cada grupo, incluso los que no se utilizan como elección para el tratamiento de las diarreas pero esto es solo con fines de investigación, pues los antibióticos utilizados como primera elección son: Trimetroprim/Sulfametoxazol, Ampicilina, Cloranfenicol, Amikacina, Gentamicina y Cefixime como alternativa.

Cabe resaltar que los antibióticos que no son utilizados como tratamiento contra la diarrea, presentan ya una elevada tasa de resistencia, quizás derivada de la ingesta incontrolada de antibiótico como tratamiento para otros padecimientos, pues como la mayoría de ellos son ingeridos por vía oral, la flora bacteriana está en continuo ataque por parte de estas fármacos y la presencia de la resistencia es un reflejo de ello. Otro punto importante es el hecho de que la Fosfomicina en últimos años está siendo considerada como tratamiento alternativo para erradicar las infecciones intra y extraintestinales ocasionadas por E. colli, siendo que la resistencia que presenta esta bacteria a esta antibiótico no es tan elevada como la que presenta contra los antibióticos de primera elección, aunque se debe usar con precaución debido a que presenta el efecto lateral de su toxicidad.

Como este trabajo lo demuestra, las bacterias patógenas y en particular el caso de EPEC en el que se encontró una marcada tendencia a la resistencia de la acción de los antibióticos empleados como primera opción para tratamiento, se sugiere proceder a una alternancia en el uso de los antimicrobianos, para tratar de frenar la tendencia a la producción de bacterias multirresistentes, es por esto que como alternativas de tratamiento la primera medida debe prevenir o controlar la deshidratación del paciente y monitorear su evolución, procurando en todo momento evitar el uso de tratamiento empírico con antimicrobianos, excepto en los casos que lo ameriten.

Los antibióticos de elección alternativa serían por tanto: Ceftibutem, Fosfomicina, Nitrofurantoína, Ciprofloxacino y Cefixime para los casos de diarrea que no respondan a la terapia de rehidratación oral y que presente resistencia a Trimetoprim/sulfametoxazol o Ampicilina.

En el experimento encontramos que los grupos patógenos tienen una tendencia mas marcada a la resistencia de los antibióticos Trimetoprim/sulfametoxazol, Ampicilina y Amoxicilina, en contraste aun cuando el grupo control también tiene resistencia elevada a estos, este grupo presenta una resistencia mas homogénea a los demás antibióticos, lo que explica el hecho de que las bacterias tienen preferencia por evadir los mecanismos de acción de antibióticos a los que se someten de manera mas frecuente.

Se debe hacer notar que de manera común se pueden aislar EPEC y DAEC en un porcentaje de la población de nuestro medio, entonces ¿Por qué no presentan diarrea? la respuesta es sencilla, pues al estar la población en constante contacto con estas bacterias, se desarrolla inmunidad adaptativa ante las mismas y es que como se discute en la introducción, la diarrea inducida por estas bacterias no depende directamente de las lesiones que producen a las células en el proceso de infección con excepción de EIEC, siendo en los otros patotipos que la diarrea es producida por la producción de una proteína específica con actividad citotóxica, o en el caso de DAEC en la cual la diarrea se produce por la fuerte reacción inflamatoria que induce esta bacteria en el colon.

Un ejemplo claro de lo anterior lo constituye la diarrea del viajero, y es que en los países industrializados que poseen estrictos estándares de sanitización alimentaria, los casos de diarrea atribuibles a contaminación alimentaria bacteriana son muy focalizados y relativamente pocos; cuando las personas de países desarrollados viajan a países en desarrollo con deficientes sistemas de sanitización alimentaria, aumenta la probabilidad de que desarrollen un cuadro diarreico como resultado de la ingesta de alimentos contaminados ante la escasa respuesta inmune adaptativa que presentan estas personas contra estos agentes patógenos y sus toxinas.

De lo anterior también se desprende el hecho de haber escogido a los niños de edad menores de 5 años como los pacientes a monitorear en este estudio, pues son los pacientes de más alto riego a presentar diarrea por contaminación alimentaria y de acuerdo al Sistema Nacional de Información en Salud, en 2008 las enfermedades infecciosas intestinales ocuparon el 4° lugar en infantes y el 2° lugar en preescolares como causa de muerte en Michoacán, destacando la importancia de conocer a fondo la etiología de la diarrea.

Basta con imaginar el hecho de que los infantes aún no presentan un sistema inmune plenamente desarrollado, aunado a la infección pasiva por parte de adultos que portan de manera asintomática los patotipos de *E. coli* y a la creciente cultura de alimentación de los infantes con fórmula láctea y no con leche materna, este problema se vuelve persistente, y como lo pudimos constatar aunque no fue parte de nuestro estudio, la causa principal de la diarrea en estos pacientes se puede atribuir a *E. coli* tipificable inclusive por encima de rotavirus, *Shigella sp. o salmonella sp.*

Durante el monitoreo de los pacientes que duró desde principios de octubre de 2009 y hasta Abril de 2010 que es el periodo de tiempo en el que predomina la presencia de rotavirus, en un hospital centinela como lo es el Hospital Infantil de Morelia Eva Sámano de López Mateos, solo se encontraron 7 casos de rotavirus, el primero reportado el 5 de marzo de 2010, comparado a los 22 casos de *E. coli* tipificable.

De esto surgen varias hipótesis al respecto de rotavirus: está adaptándose a cambios ambientales, o es que la vacuna contra rotavirus Rotarix® implementada por el gobierno federal en 2007 ha conducido a la disminución de la incidencia de rotavirus como agente diarreagénico.

Se debe profundizar en el estudio de estas hipótesis para poder demostrarlo y en palabras de la Q.F.B. Guadalupe Martinez Bolañoz encargada del programa de monitoreo de Rotavirus del hospital infantil de Morelia y colaboradores, en el 2010 la incidencia de rotavirus serotipo G1 (el mas común)se vio completamente abatida (dato no disponible) comparada a años anteriores, pero se observó que la presencia de los serotipos G2 (el mas patógeno), G3 y G9 ocupó el total de los casos registrados, esto en parte quizás atribuible a la vacuna Rotarix® que previene la infección del serotipo G1 pero no de los demás serotipos, por lo que en años próximos esperamos ver una acrecentada prevalencia de rotavirus G2,G3 y G9.

14 DISCUSIÓN GENERAL

Es pues que con este trabajo demostramos que la identificación de patotipos de *E. coli* es de suma importancia pues además de brindar información epidemiológica, brindan al médico la información que le permita brindar al paciente el mejor tratamiento posible sin fomentar la resistencia bacteriana que como lo indica este trabajo se encuentra fuera de control. Consideramos entonces que el tratamiento de primera elección para este tipo de diarreas es la rehidratación según los esquemas señalados por el Instituto Nacional de Pediatría y solo en el caso de encontrar diarrea persistente o tipo disentería, se justifica el uso de antibióticos.

Sin embargo, ante los beneficios que representa la identificación de las *E. coli* patógenas, se presenta el problema de cómo diferenciarlas de las *E. coli* de flora normal si mediante la bioquímica convencional son indiferenciables y el uso de antisueros además de que se requiere de una gran variedad de ellos no brindan una repuesta clara debido a las reacciones cruzadas.

Las técnicas de biología molecular surgen como respuesta ante estos problemas pues en los últimos años, la diversidad de técnicas y el abaratamiento progresivo de las mismas aunado a su alta especificidad y sensibilidad permiten distinguir entre bacterias aún de la misma especie si es que son portadoras de genes que les confieran patogenicidad como en los casos de las *E. coli* patógenas, es por esto que es nuestro deseo el poder fomentar la implementación de estas técnicas para poder obtener un diagnóstico más certero de la etiología de la diarrea.

Aunque aún estamos en épocas tempranas en el desarrollo de estas metodologías y se considera que el precio de este tipo de estudios es elevado, consideramos que en un futuro cercano se podrán emplear cada vez mas como métodos de diagnóstico pues las ventajas que brindan superan por mucho el precio que en ocasiones llegan a presentar.

La PCR en tiempo real empleada es tecnología de punta y tiene muchas ventajas respecto a los métodos tradicionales de identificación bacteriana pues requiere menos tiempo, es mas precisa, tiene mayor resolución, permite cuantificar la carga del patógeno (aunque no fue objetivo de la tesis), el proceso puede automatizarse, no requiere análisis posteriores (comparado a la PCR convencional), no presenta reacciones cruzadas como las pruebas inmunológicas, permite trabajar directamente con la muestra diarreica lo que aumenta su sensibilidad y permite la adaptación de técnicas múltiplex, que consisten en la identificación de todos los patotipos de *E. coli* en una sola reacción de PCR a través de la comparación de los picos melting.

15 PERSPECTIVAS.

Pretendemos que el uso de las técnicas moleculares sea cada vez mas difundido, pues todas las ventajas que presenta como herramientas de diagnóstico supera ampliamente su costo, aunque aún no se empleen como técnicas de diagnóstico rutinario, estamos seguros que en pocos años cada vez mas y mas laboratorios tendrán acceso a esta tecnologías brindando diagnósticos mas precisos siempre teniendo como objetivo la preservación y restauración de la salud de la población. La adaptación de la técnica como método multiplex permitirá la diversificación de patógenos que puedan investigarse utilizando una sola reacción de PCR, lo que esperamos que resulte en un abaratamiento progresivo de las técnicas moleculares que permitan su mayor uso.

Como herramienta de diagnóstico para las diarreas bacterianas no es un método de elección pues calculamos que el costo total de la prueba desde el cultivo, el aislamiento, extracción de ADN y PCR costaría alrededor de 500 pesos, y no es necesario para el médico saber a que patotipo de *E. coli* pertenece el origen de una diarrea para el tratamiento, pues como ya se ha discutido antes solo es necesaria en estos casos la terapia de rehidratación oral, el punto principal del trabajo es demostrar que el uso de los antibióticos injustificadamente ha sometido a las bacterias a la producción de mecanismo de resistencia y que esta tendencia si no es controlada llegará el momento que los antibióticos no tengan efecto en ellas y un paciente pueda morir a causa de una infección, sin importar el tratamiento que pueda recibir.

También se pretende fomentar la valoración de tratamientos alternativos al uso de antimicrobianos en padecimientos diarreicos y la variación de la terapia encaminada a antibióticos que no presentan resistencia tan elevada como si lo son los antimicrobianos de primera elección sugeridos por la secretaría de salud.

16 CONCLUSIONES.

1. Se logró la identificación de patotipos de *E. coli* en el 46% de las muestras.
2. Se identificó EPEC en 4% de los casos.
3. Se estandarizó el método PCR múltiplex en tiempo real con High resolution melting para la detección de patotipos de *E. coli* en el LESP del estado de Michoacán.
4. Se reveló el grado de resistencia a antibióticos que presentan las cepas de *E. coli* aisladas de pacientes menores de 5 años. Encontrándose una tendencia a la resistencia a SXT y Amp.
5. Se encontró el grado de resistencia de EPEC a los antimicrobianos.
6. Se ha establecido que *E. coli* tipificable variedad ETEC fue el principal agente diarreagénico bacteriano en niños menores de 5 años en Michoacán.

17 ANEXOS.

17.1 TOMA DE MUESTRA Y REGISTRO DE DATOS.

Material.

- Guantes de látex.
- Cubrebocas.
- Hisopo de algodón estériles.
- Medio de transporte Cary-Blair. (Figura 33)
- Hojas de registro epidemiológicas. (Figura 34, Figura 35)

Procedimiento.

- Ante todo se debe tener el consentimiento del paciente o sus familiares según aplique sobre el procedimiento, pues se trata de la manipulación de un esfínter humano.
- Se introduce el hisopo 2-4 cm dentro del recto del paciente y se gira varias veces. (Figura 32)
- Se introduce el hisopo dentro del tubo con el medio de transporte Cary-Blair y se rotula con los datos del paciente.

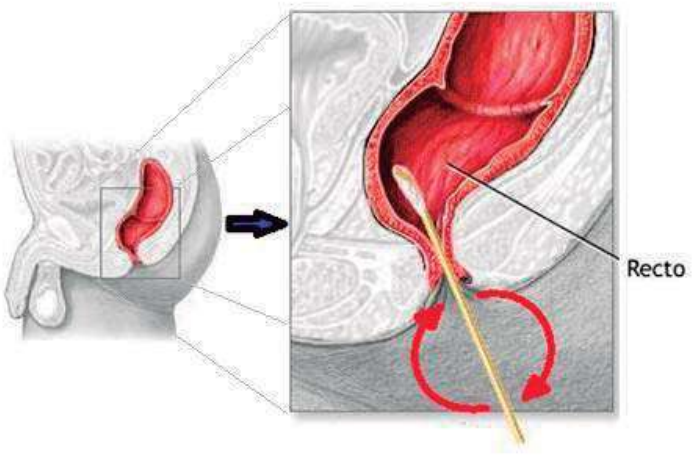
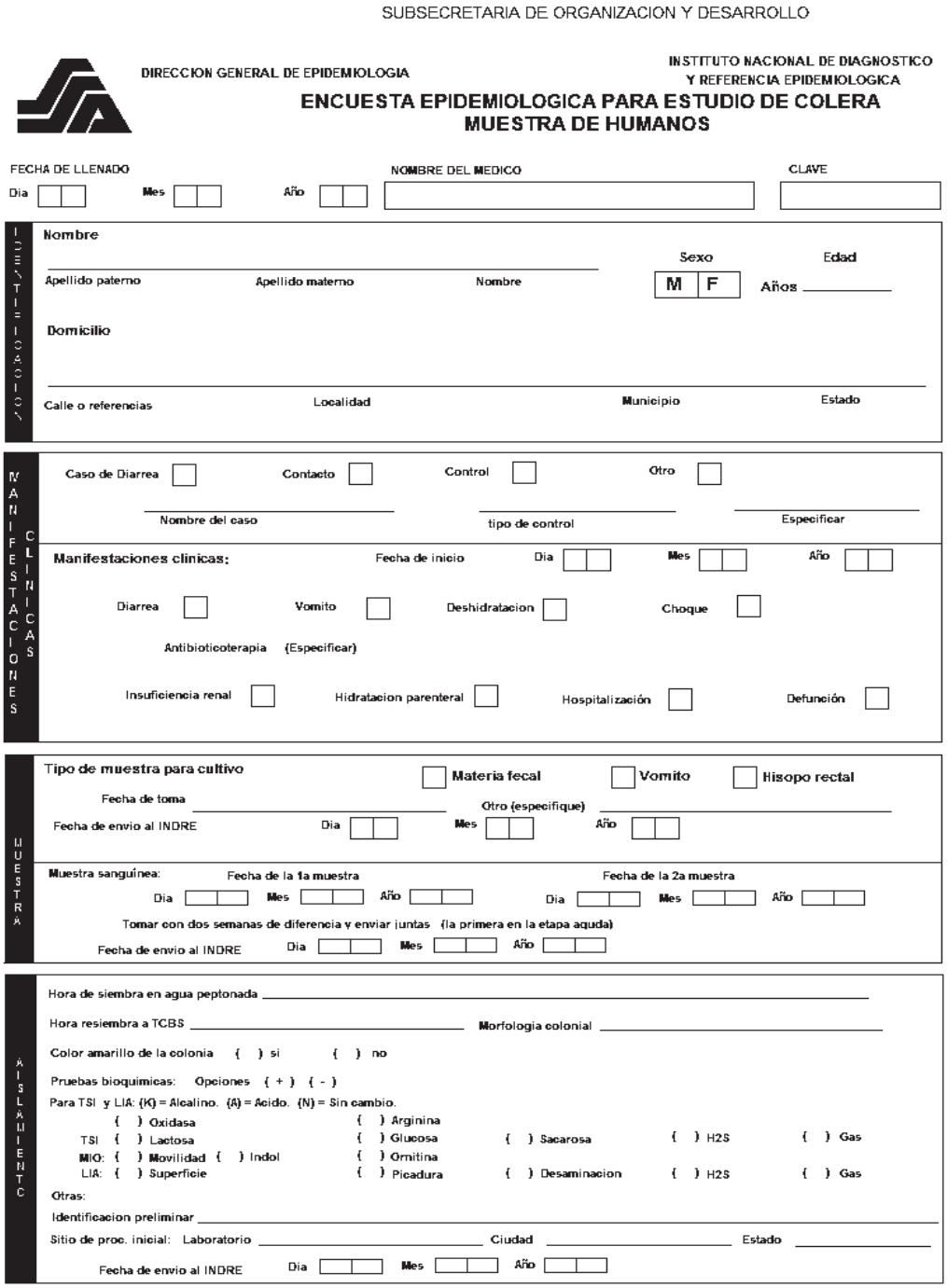


Figura 32. Hisopado Rectal.

Figura 33. Medio de transporte Cary-Blair.



SUBSECRETARIA DE ORGANIZACION Y DESARROLLO

DIRECCION GENERAL DE EPIDEMIOLOGIA

INSTITUTO NACIONAL DE DIAGNOSTICO Y REFERENCIA EPIDEMIOLOGICA

ENCUESTA EPIDEMIOLOGICA PARA ESTUDIO DE COLERA
MUESTRA DE HUMANOS

FECHA DE LLENADO Dia ☐☐ Mes ☐☐ Año ☐☐ | NOMBRE DEL MEDICO | CLAVE

IDENTIFICACION

Nombre
Apellido paterno | Apellido materno | Nombre

Sexo M F | Edad Años

Domicilio
Calle o referencias | Localidad | Municipio | Estado

MANIFESTACIONES CLINICAS

Caso de Diarrea ☐ Contacto ☐ Control ☐ Otro ☐
Nombre del caso | tipo de control | Especificar

Manifestaciones clinicas: Fecha de inicio Dia ☐☐ Mes ☐☐ Año ☐☐

Diarrea ☐ Vomito ☐ Deshidratacion ☐ Choque ☐

Antibioticoterapia (Especificar)

Insuficiencia renal ☐ Hidratacion parenteral ☐ Hospitalización ☐ Defunción ☐

MUESTRA

Tipo de muestra para cultivo ☐ Materia fecal ☐ Vomito ☐ Hisopo rectal

Fecha de toma | Otro (especifique)

Fecha de envio al INDRE Dia ☐☐ Mes ☐☐ Año ☐☐

Muestra sanguínea: Fecha de la 1a muestra Dia ☐☐ Mes ☐☐ Año ☐☐ Fecha de la 2a muestra Dia ☐☐ Mes ☐☐ Año ☐☐

Tomar con dos semanas de diferencia y enviar juntas (la primera en la etapa aguda)

Fecha de envio al INDRE Dia ☐☐ Mes ☐☐ Año ☐☐

AISLAMIENTO

Hora de siembra en agua peptonada

Hora resiembra a TCBS | Morfologia colonial

Color amarillo de la colonia ( ) si ( ) no

Pruebas bioquimicas: Opciones (+) (-)

Para TSI y LIA: (K) = Alcalino. (A) = Acido. (N) = Sin cambio.

	( ) Oxidasa	( ) Arginina				
TSI	( ) Lactosa	( ) Glucosa	( ) Sacarosa	( ) H2S	( ) Gas	
MIO:	( ) Movilidad ( ) Indol	( ) Ornitina				
LIA:	( ) Superficie	( ) Picadura	( ) Desaminacion	( ) H2S	( ) Gas	

Otras:

Identificacion preliminar

Sitio de proc. inicial: Laboratorio | Ciudad | Estado

Fecha de envio al INDRE Dia ☐☐ Mes ☐☐ Año ☐☐

Figura 34. Encuesta Epidemiologia para estudio de Colera.

SISTEMA NACIONAL DE VIGILANCIA EPIDEMIOLÓGICA
VIGILANCIA EPIDEMIOLÓGICA DE DIARREA POR ROTAVIRUS

I. IDENTIFICACION

NOMBRE_____
Apellido paterno Apellido Materno Nombre (s)

GÉNERO: M F **FECHA DE NACIMIENTO** DIA MES AÑO **EDAD** AÑOS MESES DIAS

DOMICILIO ACTUAL:_____
Calle y número. Colonia y/o localidad. Municipio y Estado

INSTITUCIÓN: SSA IMSS ISSTE OTROS

NOMBRE DEL HOSPITAL:_____

II. NOTIFICACION.

A.- Fecha de notificación

DIA MES AÑO

B.- Fuente de Información.

1. Registro Hospitalario.
2. Vig. Epid. Activa
3. Cert. De defunción

III. ANTECEDENTES

A.- ¿ Se alimente de pecho materno?
1. SI
2.NO

B. Edad de inicio:

1. Menor de 1 mes
2. De 1 a 3 meses
3. Mas de 3 meses

C. Edad de término

IV. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS

A. Fecha de inicio

DIA MES AÑO

B. Evacuaciones
a)Consistencia
1. Liquida
2. Pastosa
3. Formada

b) Número máximo en 24 hrs

DIA MES AÑO

c) Número de días con diarrea

C. Vómito

a) Número en 24 hrs

b) Número de días con vómito

D. Temperatura máxima en grados Celsius

E) Estado de deshidratación

1. Sin deshidratación.
2. Con deshidratación.
3. Choque hipovolémico.

V. ATENCIÓN MÉDICA EN EL HOSPITAL

A. Fecha de inicio de la atención médica.

DIA MES AÑO

C. Tratamiento(s) recibido(s):
1. Plan A.
2. Plan B.
3. Plan C.

D. Servicio(s) de atención:
1. Consulta externa
2. Hidratación oral
3. Urgencias
4. Hospitalización

VI. TÉRMINO DE LA ATENCIÓN MÉDICA

A. Motivo
1. Mejoria
2. Alta voluntaria
3. Defunción

B. Fecha de término de la atención médica

DIA MES AÑO

VII. LABORATORIO

A. Fecha de toma de muestra

B. Lugar de procesamiento
1. Local
2. Lab. Estatal
3. INDRE
4. Otros

C. Fecha de procesamiento de la muestra

DIA MES AÑO

D. Técnica empleada
1. Rotaforesis
2. Elisa
3. Otros

E. Resultado
1. Positivo
2. Negativo

Figura 35. Encuesta Epidemiológica de Diarreas por Rotavirus.

17.2 COPROCULTIVO.

- El coprocultivo se realizo en medios selectivos MacConkey y EMB

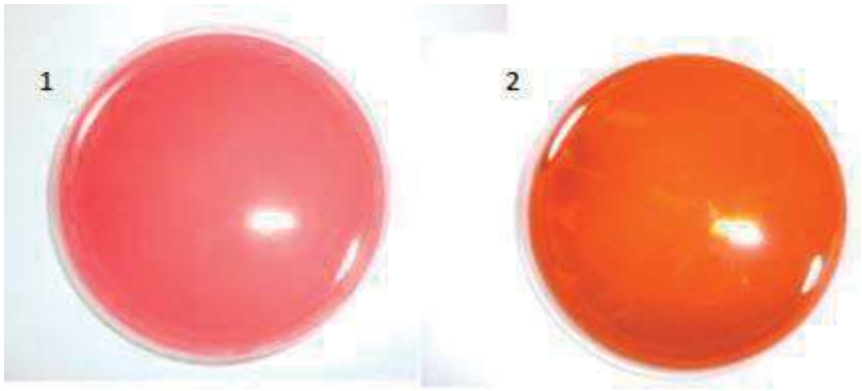


Figura 36. Medios de cultvio diferenciales para Enterobacterias
1. MacConkey, 2. Agar EMB.

- Se rotularon las placas con el numero de la muestra y las fechas
- Se realizo la descarga de la muestra en los medios de cultivo con un hisopo de algodón en la orilla de cada placa.
- Se realizo el estriado de la muestra por cuadrantes utilizando un asa bacteriológica en condiciones de esterilidad.

Figura 37. Estriado en placa con medio EMB.

- Las placas se incubaron a 37°C durante 24hrs.
- Después de 24hrs se seleccionaron las colonias características de E. coli en cada medio.

Figura 38. Crecimiento de *E. coli* en medios EMB (arriba) y MacConkey (Abajo).

17.3 PRUEBAS BIOQUÍMICAS.

Los resultados de la pruebas bioquímicas para *Escherichia coli* comúnmente son: TSI: K/A o A/A con producción de gas variable, LIA: K/A o A/A, MIO: Movilidad variable Indol (+) y K/A o A/A, Citrato (-), Malonato (-) y Urea (-). A continuación se observa en la Figura 39 con una bioquímica típica de *Escherichia coli.*

Figura 39. Batería bioquímica para Identificación de *E. coli.*

17.4 EXTRACCIÓN DE DNA POR PERLAS MAGNÉTICAS.

La tecnología MagNA Pure LC 2.0 empleada permite la extracción y purificación automatizada de DNA, RNA total y ácidos nucléicos de virus a partir de diferentes tipos de material biológico como sangre completa, suero, células sanguíneas, cultivos celulares, tejidos, bacterias, hongos, etc., de forma rápida, segura y con una adecuada calidad para su posterior utilización en procedimientos de PCR. El principio magnético de esta técnica esta dado por el uso esferas magnéticas. Las muestras son lisadas por incubación con un buffer especial que contiene sales y Proteinasa K que produce la lisis celular y permite la liberación de los ácidos nucleicos mientras que las nucleasas son desnaturalizadas y la proteinasa K digiere las proteínas.

Los ácidos nucléicos totales son adheridos a la superficie de las perlas magnéticas por fuerzas iónicas debido a las condiciones de sales e isopropanol. Las perlas magnéticas unidas a los ácidos nucléicos son magnéticamente separadas de los residuos de la muestra lisada y son posteriormente lavados repetidamente con buffer de lavado para remover las sustancias no unidas (por ejemplo proteínas (nucleasas), membrana celular, e inhibidores de PCR tales como hemoglobina o heparina y para reducir la concentración de sales. Sustancias no adheridas son removidas por varios pasos de lavado, entonces los ácidos nucléicos purificados son eludíos de las perlas magnéticas en los pozos de elución mientras que las perlas magnéticas son retenidas y descargadas.

17.4.1 MATERIAL:

Para el recimiento bacteriano.

- Caldo LB (Luria Bertani)
- Tubos Eppendorf de 15ml esteriles
- Pipetas esteriles
- Shaker
- Centrifuga

17.4.2 EXTRACCIÓN AUTOMATICA DE ÁCIDOS NUCLEICOS TOTALES

La tecnología MagNA Pure Total Nucleic Acid Isolation requiere el uso del Kit de reactivos que está especialmente diseñado para ser usado con el MagNA Pure LC Instrument LC2.0.

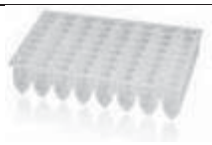
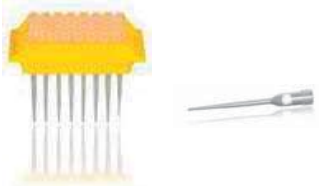
El contenido del Kit de reactivos es el siguiente:

Identificación	Nombre	Contenido y función
Frasco tapa color negro Número 1	Buffer de lavado I	❖ 2 botes de 100 ml cada uno ❖ Para remover inhibidores de PCR
Frasco tapa color azul Número 2	Buffer de lavado II	❖ 1 bote de 100ml ❖ Para remover sales, proteínas, etc.
Frasco con tapa color roja Número 3	Buffer de lavado III	❖ 2 botes de 100 ml cada uno ❖ Para remover sales
Frasco con tapa color verde Número 4	Buffer de lisis y unión	❖ 1 bote, 100 ml ❖ Para la lisis celular y la unión de los ácidos nucléicos torales
Frasco con tapa color rosa Número 5	Proteinasa K	❖ 6 Frascos liofilizados ❖ Para digestión de proteínas
Frasco con tapa color caramelo Número 6	Partículas Magnéticas (MGPs)	❖ 6 Frascos con 6 ml de suspensión cada uno ❖ Para la unión de ácidos nucleicos
Frasco con tapa color amarillo Número 7	Buffer de Elución	❖ 1 frasco de 100ml ❖ Para la elución de los ácidos nucleicos totales ❖ Para la dilución (opcional) ❖ Para la reconstitución de la proteinasa K

Tabla 18. Contenido del Kit de Extracción MagNA Pure Total Nucleic Acid Isolation

El MagNa Pure Instrument LC 2.0 requiere los siguientes accesorios y plásticos consumibles:

	Sample Cartridge Cartucho de elución y depósito de ácidos nucleicos.
	Cartridge Seal Película protectora de contaminación o evaporación de los ácidos nucleícos.
	Reagent Tub Small Recipiente de reactivos con capacidad de 3.5 ml.
	Reagent Tub Medium 20 Recipiente de reactivos con capacidad de 20 ml.
	Reagent Tub 30 Recipiente de reactivos con capacidad de 30 ml.
	Reagent Tub Large Recipiente de reactivos con capacidad de 100 ml.
	Tub Lid (Small-Medium) Tapa para los recipientes Small y Medium, evita la pérdida de volumen de los reactivos por evaporación.
	Tub Lid (Large) Tapa para el recipiente Large, evita la pérdida de volumen de los reactivos por evaporación.
	Tub Lid Seal Se usa para prevenir la contaminación de los reactivos durante el movimiento del brazo del robot, evitando el goteo de las puntas.

	Processing Cartridge Es aquí donde el robot coloca los reactivos requeridos en los diferentes pasos del proceso.
	Reaction Tips (Large) Se usan para dispensar los reactivos, transferir la muestra y separación de perlas magnéticas.
	Reaction Tips (Small) Se usan para transferir el material genético en la Post Elution.
	Tip Stand Son depósitos temporales de las puntas en cada paso del proceso.
	Waste Bottle Depósito de desechos líquidos del robot. Colocarlo en la posición indicada en la foto del robot.
	Reagent Reservoir Rack En él se colocan los recipientes de reactivos. Tiene dos posiciones para recipientes grandes y seis para recipientes pequeños, se coloca a su vez en el área de reactivos del robot.
	Cooling Block, Reaction Tubes Es adecuado para colocar 32 tubos de reacción de 1.5 mL y tapa de rosca que son llenados automáticamente usando la función de post-elución.

	Waste Box, Waste Box Lid Sostiene a la bolsa de desechos en donde las puntas de reacción son descartadas por el robot.
	Waste Bottle Tray Sostiene el depósito de desechos líquidos del robot.
	Liquid Waste Funnel Sirve para transportar los desechos líquidos dentro del bote de desechos.
	Greasing Set Estación para el engrasado automático de los anillos O.
	O-ring Exchange Tool Con esta herramienta los anillos O pueden ser colocados y retirados del instrumento.
	Touch-pen with holder Es utilizada para manejar la pantalla sensible al tacto.
	Touch-screen with Keyboard Tray and Keyboard Permiten el manejo del software del robot.

Tabla 19. Accesorios utilizados en el Robot de Extracción Magna Pure LC

17.4.3 PROCEDIMIENTO DE EXTACCIÓN EN EL ROBOT MAGNA PURE LC:

Lisis Externa

Previo a la extracción en el equipo MagNA Pure se debe hacer crecer las cepas bacterianas en caldo LB adecuado para su tratamiento de lisis.

1. Se hacen crecer las cepas en un medio LB sin antibiótico llevando el inoculo al 0.1 en la escala de McFarland bajo condiciones de esterilidad (en campana de bioseguridad).
2. Que se hacen crecer en shaker durante 8 horas a 37°C.
3. Se centrifuga la muestra a 2500rpm durante 5 minutos y el sobrenadante es decantado.
4. La pastilla se resuspende en 200µl del buffer de elución del kit de extracción descrito anteriormente
5. Se realiza la lisis externa adicionando 200µl de buffer de lisis.
6. Se toman 350µl de cada muestra y se montan en una placa de extracción.
7. Se introduce al equipo de extracción por perlas magnéticas.

Preparación de la muestra para extracción automática de Ácidos nucleicos

1. Se reciben las muestras clínicas en tubos eppendorf marcados con un número de muestra asignado previamente.
2. Se colocan las muestras en el cartucho de muestra como a continuación se ilustra:

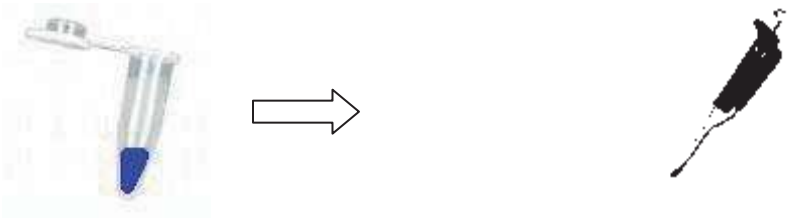


Figura 40. Preparación de la Muestra para Extracción de Ácidos Nucleicos

Colocación de los consumibles en el Robot Magna Pure LC

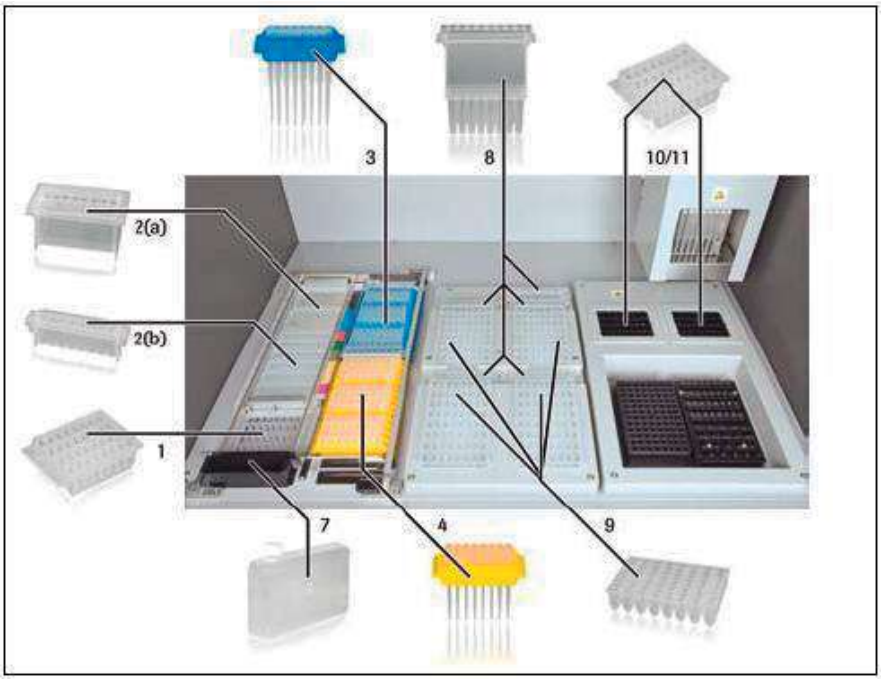


Figura 41. Colocación de los Consumibles en el Robot Magna Pure LC

Orden de colocación de los reactivos en los recipientes y posiciones:

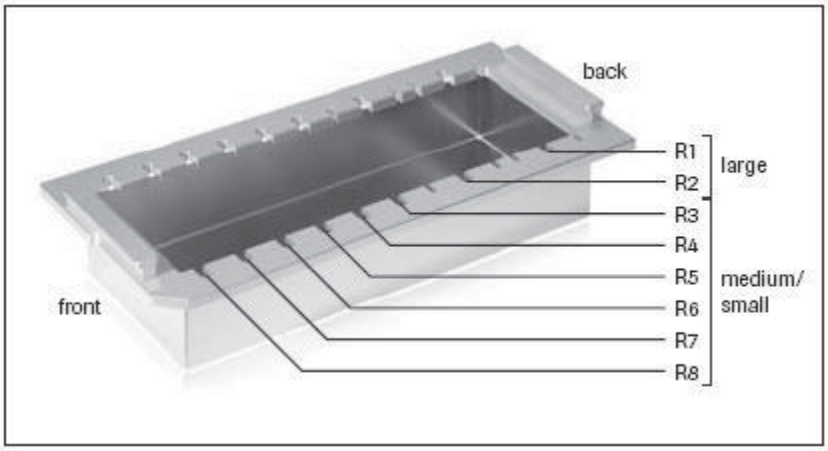


Figura 42. Orden de colocación de los Reactivos en la Charola del Robot Magna Pure LC

1. Posición R1. Recipiente grande que contiene 31.2 mL de buffer de lavado I
2. Posición R2. Recipiente grande con 32.6 mL buffer de lavado III
3. Posición R3. Permanece vacía.
4. Posición R4. Recipiente pequeño con 4.2 mL de solución de proteinasa K. (Liofilizado resuspendido en 5 mL de buffer de elución).
5. Posición R5. Recipiente pequeño con 5.8 mL de partículas magnéticas.
6. Posición R6. Recipiente pequeño con 6.6 mL de buffer de elución.
7. Posición R7. Recipiente pequeño con 15.9 mL de buffer de lavado II.
8. Posición R8 vacía.

Revisión de los accesorios para desecho de Reactivos

Figura 43. Accesorios para Desecho de Reactivos.

Siempre verificar el volumen de líquidos en el bote de desechos, el cual debe ser cambiado regularmente para evitar derrames. Asimismo verificar que la bolsa de desechos no se encuentre llena y que ésta y la tapa del contenedor se encuentren posicionadas correctamente como se indica en la Figura 43.

Introducción de información de las muestras, selección de protocolo y parámetros

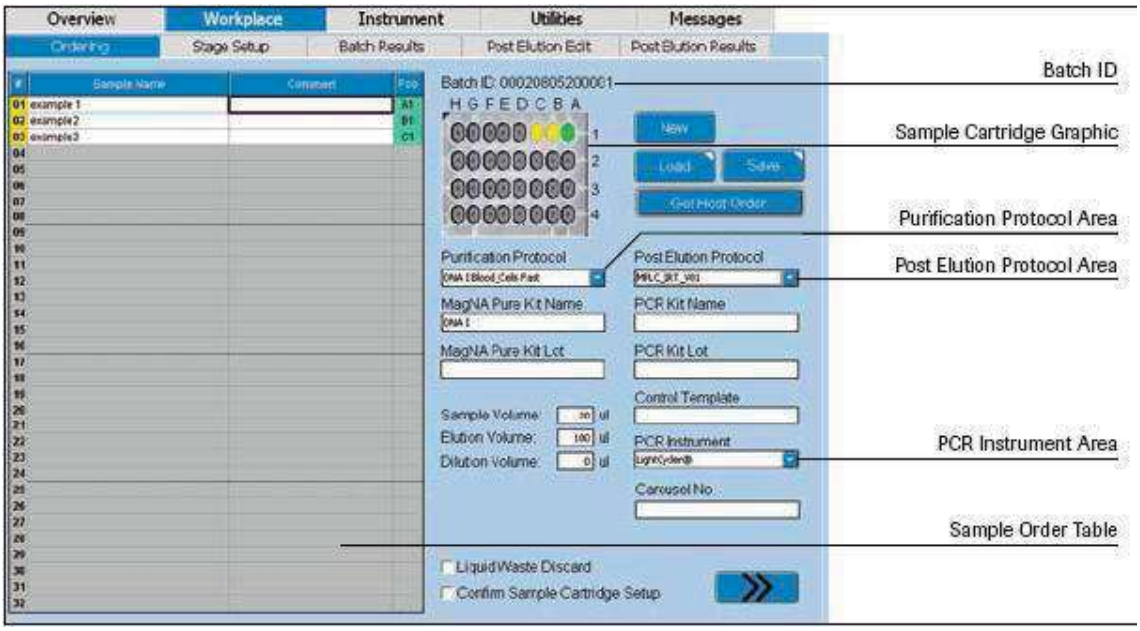


Figura 44. Introducción de muestras y protocolo en el Software del Robot Magna Pure LC

1. Abrir la opción Workplace.
2. Seleccionar Ordering, aparecerá la pantalla ilustrada arriba.
3. En la tabla introducir los números de identificación de las muestras de acuerdo a su posición.
4. Seleccionar el protocolo de purificación adecuado.
5. Indicar los volúmenes de muestra y de elución.
6. Seleccionar el protocolo de Post Elución.
7. Señalar la opción Liquid Waste Discard.
8. Ir a la siguiente pantalla presionando la flecha en la parte inferior derecha.

Inicio de la corrida

El software utiliza la información de las muestras definida en la pantalla anterior para determinar el volumen de reactivos y plásticos requeridos, y despliega esta información en la pantalla Stage Setup, (ilustrada a continuación). Aquí, seleccionar los botones que aparecen en amarillo para confirmar el correcto posicionamiento de los reactivos y plásticos. Cuando un reactivo o plástico no son requeridos aparece la leyenda *Not used*. Presionar el botón de inicio *Start*.

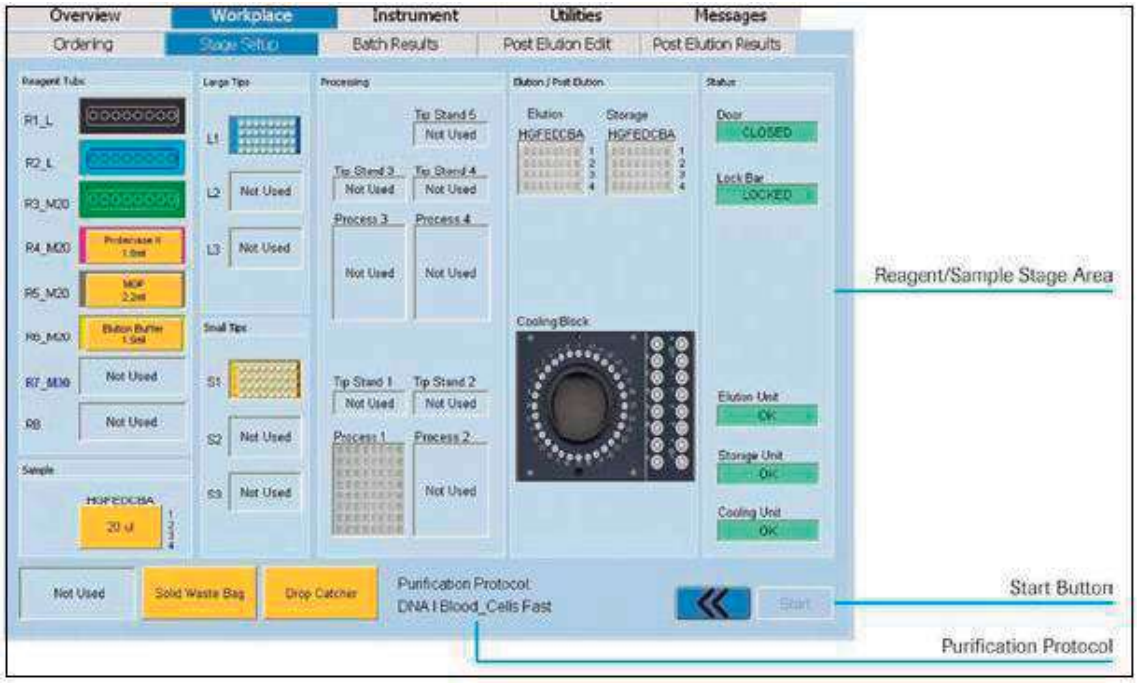


Figura 45. Programación del Software MagnaPure LC

Monitoreo del proceso de extracción de Ácidos Nucleicos

Durante el proceso de purificación el estado de la corrida es monitoreado en la ventana ilustrada a continuación.

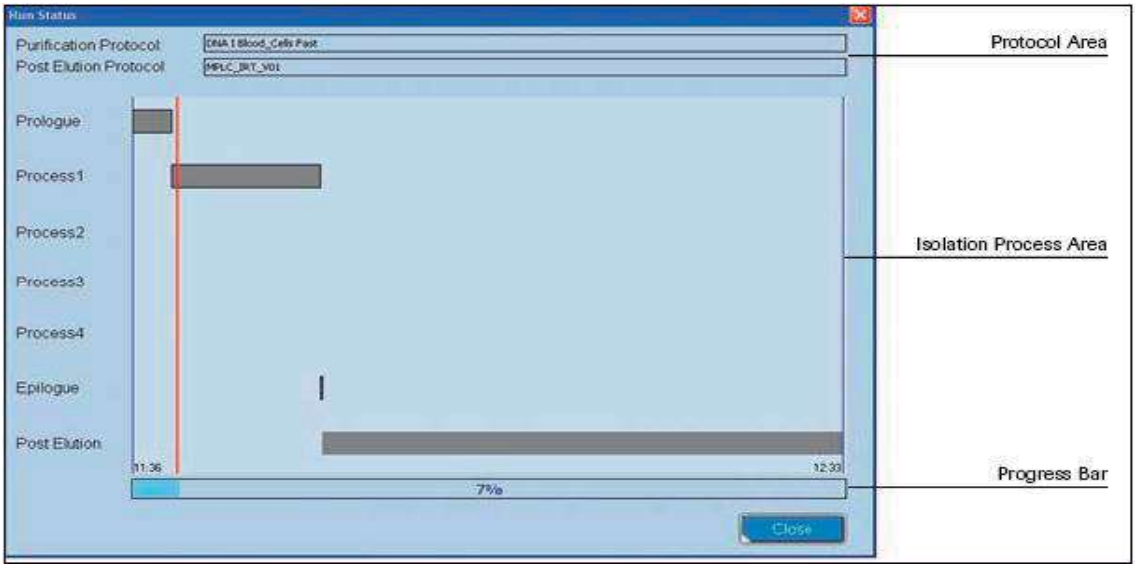


Figura 46. Monitoreo de Extracción de ácidos nucleicos en el Robot Magna Pure LC

Envasado del material genético purificado

Después del proceso mencionado anteriormente el material genético purificado es envasado en tubos Eppendorf.

17.5 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA EN TIEMPO REAL

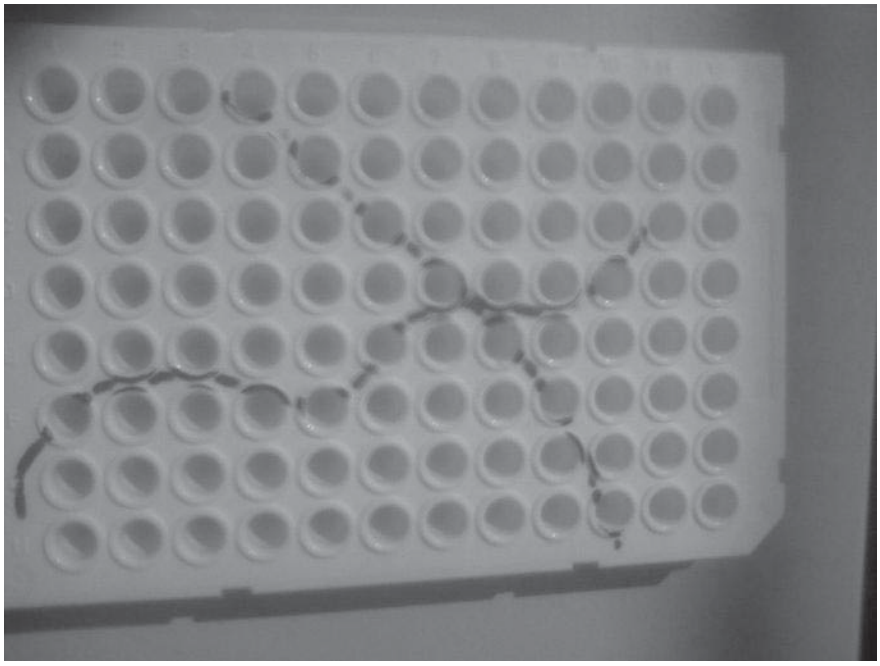


Figura 47. Placa de 96 pocillos utilizada en Termociclador *LightCycler ® 480*

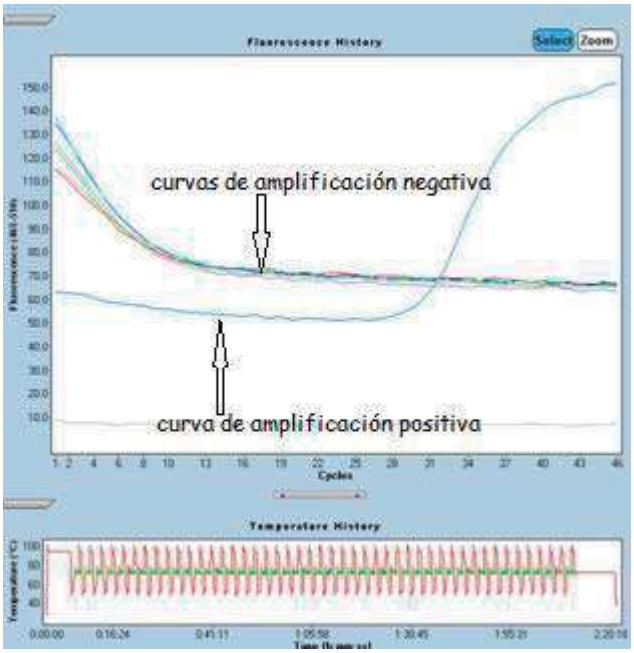


Figura 48. Curva de amplificación positiva y negativa en Termociclador *LightCycler* 480

17.6 ELABORACIÓN DE GELES DE AGAROSA PARA ELECTROFORESIS.

Sera necesario tener en el laboratorio equipo que nos permita trabajar con los geles: una camara de electroforesis, una fuente de poder, un transiluminador de luz UV y equipo de fotografia o tambien existen cámaras especiales y equipo de computo especifico para ello para guardar la imagen del gel. Para empezar hay que preparar el buffer de corrida, el cual tendra el pH requerido y los iones necesarios para que fluya la corriente y pueda migrar el ADN. Si en lugar de buffer utilizaramos agua, el ADN se quedaria inmóvil y no veriamos migracion en los geles, y si por el contrario utilizaramos un exceso de sales, el gel se calentaria tanto que al final acabaria por derretirse.

El buffer mas comun es el TBE (Tris Boratos EDTA), que por ser muy estable puede reutilizarse varias veces. Tambien se utiliza con frecuencia el buffer TAE (Tris Acetatos EDTA), que es menos estable que el TBE y tiende a ionizarse mas rapido, pero permite obtener mejor separacion de bandas, sobre todo si son de gran tamano (1 kb o mas). Las recetas para preparar estas y otras soluciones estan al final de este apartado. Dependiendo del tamano de los fragmentos que esperamos se utilizara una concentracion de agarosa mayor o menor para obtener agujeros menos o mas grandes y una mejor resolucion de nuestras bandas. Si no conocemos el tamano, se puede empezar con agarosa al 1%, pero si se conoce, se puede usar esta tabla como guia:

La agarosa se disuelve en el mismo buffer que utilizaremos para la corrida, y se calienta hasta ebullicion para disolver bien el polvo. Hay que tener cuidado 534 Las herramientas moleculares de retirarla del calor o del microondas en cuanto comienza a hervir, pues podría derramarse. Si es un gel muy importante, en el laboratorio pesamos el matraz donde se prepara el gel antes y despues de calentarlo, y le agregamos el agua que haya perdido durante el calentamiento, para asegurar que la concentración de agarosa sea la correcta. La solucion se agitara suavemente para evitar la formacion de burbujas, y cuando se enfrie un

poco (aprox. 60oC) se vierte de una sola vez en el contenedor de geles al que ya le colocamos el peine para que se formen los pozos en donde cargaremos las muestras. Si quedan algunas burbujas, rapidamente con la punta de una pipeta podemos picarlas y quitarlas; si se dejan pueden hacer que la electroforesis no migre en forma homogenea.

Cuando se enfrie y solidifique agregamos el buffer necesario hasta cubrir BIEN el gel (hemos visto que de esta forma el peine se puede quitar mas facilmente), y despues se retira el peine con cuidado para no romper el fondo de los pozos.

Cargando el gel. Con una pipeta, cada muestra se vierte en un pozo, mezclada previamente con 1 o 2 microlitros de colorante de corrida (receta al final). Generalmente los colorantes de corrida llevan alguna sustancia espesa, como glicerol o sacarosa, que permite que la muestra caiga hacia el fondo del pozo, y los colorantes (como el xilen-cianol o azul de bromofenol) nos dan una idea de como van migrando los fragmentos (en un gel de agarosa al 1%, el azul de bromofenol migra junto con los fragmentos de 300 pb, y el xilen-cianol migra igual que los fragmentos de 4 kb). No es necesario utilizar toda la muestra de PCR en una corrida, puede utilizarse del 10% al 20% de la cantidad total del PCR que hicimos (*i.e.* si en total son 50 µl, se cargaran 5 µl de muestra).

Tincion del gel

Lo mas comun es utilizar bromuro de etidio, que es una molecula con dos propiedades importantes: se intercala en las bases del ADN y brilla con luz UV a una longitud de onda determinada (264-366 nm) con lo cual podemos observar las bandas de ADN en el gel. El bromuro de etidio es un mutageno y es altamente toxico, por lo cual es necesario utilizar guantes y bata para su manejo. Es recomendable apartar un area del laboratorio y material exclusivo para su uso. Los geles con bromuro deberan juntarse y desecharse con alguna compania de desechos toxicos, asi como las puntas y guantes contaminados.

Las soluciones con bromuro pueden inactivarse. Si de derrama una pequeña cantidad, hay que absorber muy bien con toallas de papel y después con alcohol (las toallas se juntan en una bolsa para inactivar el bromuro que quede en ellas). Cuando no estamos seguros si algo esta o no contaminado con bromuro lo exponemos a la luz UV y si no hay fluorescencia es que no hay bromuro. Hay dos maneras de teñir el gel: cuando la agarosa esta a unos 60oC, antes de vertirla, se anade el bromuro de etidio directamente para que quede a una concentracion de 0.5 µg/ml en el gel. De esta forma al terminar la corrida puede verse el gel. La desventaja es que el bromuro retarda la migracion de las moleculas de ADN, y ademas la camara de electroforesis queda contaminada con el bromuro, es por esto que hay quien prefiere tenirlo despues de la corrida: el gel se sumerge en una solucion de 0.5 µg/ml de bromuro de etidio por 30 a 40 mn y asi no se contaminan las camaras y el ADN migra mas rapido, pero es un metodo mas lento. Al terminar se pone el gel en el transiluminador para verlo. La luz UV puede danar la piel y los ojos, por lo que sera necesario protegerse a traves de un acrilico especial y protectores de la cara y/o los ojos. 536 Las herramientas moleculares.

EDTA

Para preparar ambos buffer TBE y TAE es necesario tener una solucion de EDTA 0.5M pH8. Para preparar 100 ml, pesar 18.61g de EDTA y disolver en 70 ml agua. Solo se disolvera hasta que la solucion alcance un pH de 8. Ajustar primero con lunetas de sosa (unas 10), dejar que se disuelvan e ir agregando poco a poco mas lunetas hasta llegar a pH de 6 o 7, y aqui ajustar hasta 8 con gotitas de sosa 5 o 10 M, despues aforar a 100 ml.

TBE

Se prepara un stock concentrado a 5X, y para hacer el gel, se diluye y se utiliza a 1X o 0.5X. Es comun que el TBE se precipite, por eso hay que preparar cantidades que se utilicen constantemente. La receta del TBE 1X es: 0.089M tris, 0.089M acido borico y 0.002M EDTA. Para preparar una solucion 5X, pesar 54 g de tris-base y 27.5 g de acido borico. Disolver en 800 ml de agua y anadir 20 ml de

EDTA 0.5M pH8. Aforar a 1 litro. Una solucion de TBE bien preparada deberá tener un pH cercano a 8.3 sin necesidad de ajustarla.

TAE

No se precipita y es posible prepararlo muy concentrado, aqui escribiremos la receta al 50X y para la corrida se diluye al 1X. TAE 1X: 0.04M tris-acetatos, 0.002M EDTA. Para una solucion 50X: pesar 242 g de tris base y disolverlo en 500 ml de agua esteril, agregar 57.1 ml de acido acetico glacial y 100 ml de EDTA 0.5 M pH 8. Aforar a 1 litro.

Colorante de corrida

xilen–cianol al 0.02%, azul de bromofenol al 0.02 % en glicerol al 50%.

Bromuro de Etidio

La costumbre es hacerlo a 10 mg/ml, se guarda a 4oC protegido de la luz en una botella oscura, envuelta con aluminio.

17.7 RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS, LECTURA DE LOS HALOS DE INHIBICIÓN E INTERPRETACIÓN.

La identificación de resistencia bacteriana a antibiótico se llevó a cabo siguiendo los estándares de la CLSI. Primero tomamos la cepa aislada y se inoculó en un tubo con caldo Mueller-Hilton, incubamos durante 2 a 5h hasta la aparción de una turbidez. Ajustamos al tubo 0.5 del nefelómetro de Macfarland*[1] sobre un fondo blanco con líneas negras. Se siembra del caldo cultivado a una placa de agar Mueller-Hinton con hisopo de algodón estéril (15 min máximo después de ajustar)como se indica en el diagrama anterior.

La siembra se lleva a cabo extendiendo el inóculo por toda la placa girando la misma 2 veces en un ángulo de 90°, una tercera vez en un ángulo de 45° aproximadamente y por último se pasa el hisopo sobre el reborde de la placa [2]. Dejar secar de 3 a 5 minutos y colocamos los discos presionando ligeramente para que queden bien adheridos. La distancia entre los discos debe ser tal que no se superpongan los halos de inhibición.

Y que no queden muy cerca del borde de la placa. Se incuba a 37° durante 24 hrs. y se procede a medir los halos de inhibición con una regla, se interpretaron los resultados conforme a los estándares (consultar tabla 1 anexo4) y se clasificó como sensible, intermedio o resistente. Los antibióticos utilizados en este estudio fueron:

Placa 1:

- CEFOTAXIMA (CTX)
- CEFTRIAXONA (CRO)
- CEFTAZIDIME (CAZ)
- CEFEPIME (FEP)
- MEROPENEM (MEM)
- AMOXICICILINA CON
- CLAVULANATO (AMC)
- IMIPENEM (IPM)

Placa 2:

- TRIMRTROPRIM/SULFAMET. (STX)
- AMPICILINA (AM)
- CLORANFENICOL "C"
- AMIKACINA (NA)
- GENTAMICINA (GM)
- FOSFOMICINA (FOX)

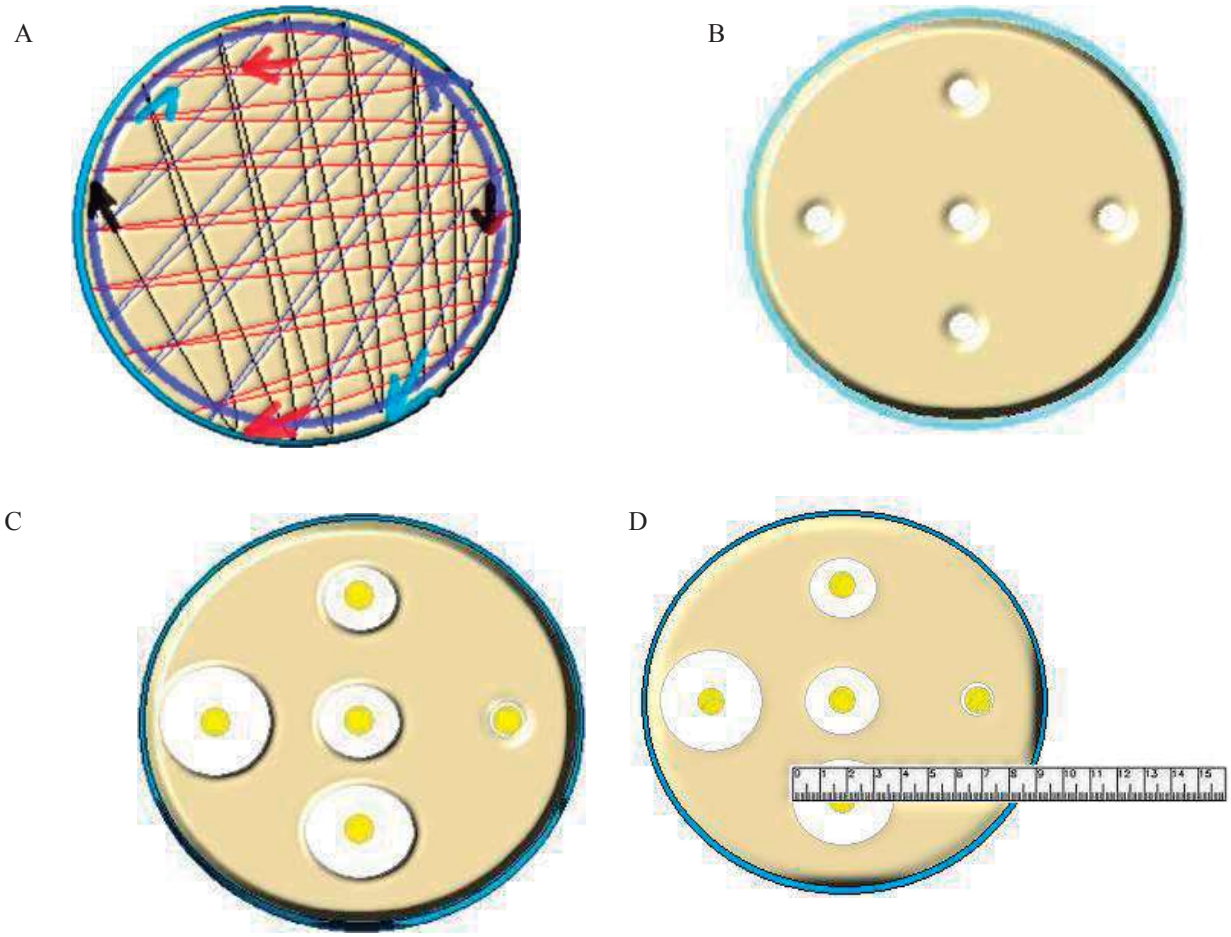


Figura 49. Siembra en placa y resistencia a antibioticos
A. Inoculación de la placa B. Colocación de los sensidiscos. C. Halos de inhibición.

18 BIBLIOGRAFÍA.

1. Albert, M. J., K. Alam, M. Islam, J. Montanaro, A. S. M. H. Rahman, K. Haider, M. A. Hossain, A. K. M. G. Kibriya, and S. Tzipori. 1991. Hafnia alvei, a probable cause of diarrhea in humans. Infect. Immun. 59:1507– 1513
2. Albert, M. J., S. M. Faruque, M. Ansaruzzaman, M. M. Islam, K. Haider, K. Alam, I. Kabir, and R. Robins-Browne. 1992. Sharing of virulenceassociated properties at the phenotypic and genetic levels between enteropathogenic Escherichia coli and Hafnia alvei. J. Med. Microbiol. 37:310– 314.
3. Amorin MB y col 2003.
4. Allaoui, A., P. J. Sansonetti, R. Me´nard, S. Barzu, J. Mounier, A. Phalipon, and C. Parsot. 1995. MxiG, a membrane protein required for secretion of Shigella spp. Ipa invasins: involvement in entry into epithelial cells and in intercellular dissemination. Mol. Microbiol. 17:461–470.
5. Andrade, J. R., V. F. Da Veiga, M. R. De Santa Rosa, and I. Suassuna. 1989. An endocytic process in HEp-2 cells induced by enteropathogenic Escherichia coli. J. Med. Microbiol. 28:49–57.
6. Arikawa K,Meraz IM, Nishikawa Y, Ogasawara J & Hase A (2005) Interleukin-8 secretion by epithelial cells infected with diffusely adherent Escherichia coli possessing Afa adhesincoding genes. Microbiol Immunol 49: 493
7. Baldini, M. M., J. B. Kaper, M. M. Levine, D. C. Candy, and H. W. Moon. 1983. Plasmid-mediated adhesion in enteropathogenic Escherichia coli. J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr. 2:534–538.
8. Bando, S. Y., G. R. F. do Valle, M. B. Martinez, L. R. Trabulsi, and C. A. Moreira-Filho. 1998. Characterization of enteroinvasive Escherichia coli and Shigella strains by RAPD analysis. FEMS Microbiol. Lett. 165:159–165.
9. Berger CN, Billker O, Meyer TF, Servin AL & Kansau I (2004) Differential recognition of members of the carcinoembryonic antigen family by Afa/Dr adhesins of diffusely adhering Escherichia coli (Afa/Dr DAEC). Mol Microbiol 52: 963–983.
10. Bernet-Camard MF, Coconnier MH, Hudault S & Servin AL (1996) Pathogenicity of the diffusely adhering strain Escherichia coli C1845:F1845 adhesin-decay accelerating factor interaction, brush border microvillus injury, and actin disassembly in cultured human intestinal epithelial cells. Infect Immun 64: 1918–1928.
11. Betis F, Brest P, Hofman V, et al. (2003b) The Afa/Dr adhesins of diffusely adhering Escherichia coli stimulate interleukin-8 secretion, activate mitogen-activated protein kinases, and promote polymorphonuclear transepithelial migration in T84 polarized epithelial cells. Infect Immun 71: 1068–1074.
12. Beutin L, Marches O, Bettelheim KA, et al. HEp-2 cell adherence, actin aggregation, and intimin types of attaching and effacing Escherichia coli strains isolated from healthy infants in Germany and Australia. Infect Immun 2003;71(7):3995-4002.
13. Bilge SS, Clausen CR, Lau W & Moseley SL (1989) Molecular characterization of a fimbrial adhesin, F1845, mediating diffuse adherence of diarrhea-associated Escherichia coli to HEp-2 cells. J Bacteriol 171:
14. BLANCO, J.E.; BLANCO, M.; BLANCO, J. Escherichia coli enterotoxigénicas, verotoxigénicas y necrotoxigénicas en alimentos y en muestras clínicas. Papel de los animales como reservorio de cepas patógenas para el hombre. Microbiología SEM II. 97-110. 1995.
15. Blanc-Potard AB, Tinsley C, Scaletsky I, et al. (2002) Representational difference analysis between Afa/Dr diffusely adhering Escherichia coli and nonpathogenic E. coli K-12. Infect Immun 70: 5503-5511
16. Brest P, Betis F, Cuburu N, et al. (2004) Increased rate of apoptosis and diminished phagocytic ability of human neutrophils infected with Afa/Dr diffusely adhering Escherichia coli strains. Infect Immun 72: 5741–5749.

17. Boyd et al., 1996.
18. Celli J, Deng W, Finlay BB. Enteropathogenic Escherichia coli (EPEC) attachment to epithelial cells: exploiting the host cell cytoskeleton from the outside. Cell Microbiol 2000;2(1):1-9.
19. Cerritos, 1999, Parveen et al, 1999; Cruz,2000
20. Cravioto A, Tello A, Navarro A, Ruiz J, Villafan H, Uribe F & Eslava C (1991) Association of Escherichia coli HEp-2 adherence patterns with type and duration of diarrhoea. Lancet 337: 262–264.
21. Cravioto A, Vasquez V. Escherichia coli: pathogenic mechanisms and enterohemorrhagic strains. Bol Med Hosp Infant Mex 1988;45(3):196-197..
22. Cultek. Protocolos y técnicas. Soluciones QPCR. 2006.
23. Crepin VF, Shaw R, Abe CM, Knutton S, Frankel G. Polarity of enteropathogenic Escherichia coli EspA filament assembly and protein secretion. J Bacteriol 2005;187(8):2881-2889.-1707.
24. DeVinney R, Knoechel DG, Finlay BB. Enteropathogenic Escherichia coli: cellular harassment. Curr Opin Microbiol 1999;2(1):83-88.
25. Dirección General de Estadística, Informática y Evaluación. Mortalidad 1992. Distrito Federal, México: Secretaría de Salud; 1992
26. Dirección General de Estadística, Informática y Evaluación. Mortalidad 1993. Distrito Federal, México: Secretaría de Salud; 1993.
27. Donnenberg, M. S., and J. B. Kaper. 1992. Enteropathogenic Escherichia coli. Infect. Immun. 60:3953–3961.
28. Elliott SJ, Hutcheson SW, Dubois MS, et al. Identification of CesT, a chaperone for the type III secretion of Tir in enteropathogenic Escherichia coli. Mol Microbiol 1999;33(6):1176-1189.
29. Elliott SJ, Krejany EO, Mellies JL, Robins-Browne RM, Sasakawa C, Kaper JB. EspG, a novel type III system-secreted protein from enteropathogenic Escherichia coli with similarities to VirA of Shigella flexneri. Infect Immun 2001;69(6):4027-4033.
30. Elliott SJ, Wainwright LA, McDaniel TK, et al. The complete sequence of the locus of enterocyte effacement (LEE) from enteropathogenic Escherichia coli E2348/69. Mol Microbiol 1998;28(1):1-4.
31. Enfermedad diarreica. Programa de atención a la salud del niño. Manual de procedimientos técnicos. 1998. Consejo Nacional de Vacunación. Secretaria de Salud
32. Espinoza L. Herramientas molecular. Manual práctico de PCR. 17: 517-537
33. Eslava C, Mateo J, Cravioto A. Cepas de Escherichia coli relacionadas con la diarrea. En: diagnóstico de laboratorio de infecciones gastrointestinales. Giono S, Escobar A, Valdespino JL. Secretaria de Salud. México, 1994: 251.
34. Estrada-García T, Cerna JF, Paheco-Gil L, et al. Drug-resistant diarrheogenic Escherichia coli, Mexico. Emerg Infect Dis 2005;11(8):1306-1308.
35. García JF y col 2003.
36. Farmer, J. J., B. R. Davis, F. W. Hickman-Brenner, A. McWhorter, G. P. Huntley-Carter, M. A. Asbury, C. Riddle, H. G. Wathen-Grady, C. Elias, G. R. Fanning, A. G. Steigerwalt, C. M. OHara, G. K. Morris, P. B. Smith, and D. J. Brenner. 1985. Biochemical identification of new species and biogroups of Enterobacteriaceae isolated from clinical specimens. J. Clin. Microbiol. 21:46–76.
37. Finlay, B. B., I. Rosenshine, M. S. Donnenberg, and J. B. Kaper. 1992. Cytoskeletal composition of attaching and effacing lesions associated with enteropathogenic Escherichia coli adherence to HeLa cells. Infect. Immun. 60:2541–2543.
38. Flisser A, Velasco-Villa A, Martínez-Campos C, et al. Infectious diseases in Mexico. A survey from 1995-2000. Arch Med Res 2002;33(4):343-350.
39. Garcia MI, Gounon P, Courcoux P, Labigne A & Le Bouguenec C (1996) The afimbrial adhesive sheath encoded by the afa-3 gene cluster of pathogenic Escherichia coli is composed of two adhesins. Mol Microbiol 19: 683–693.
40. Garmendia J, Frankel G, Crepin VF. Enteropathogenic and enterohemorrhagic

Escherichia coli infections: translocation, translocation, translocation. Infect Immun 2005;73(5):2573-2585.
41. Gauthier A, Puente JL, Finlay BB. Secretin of the enteropathogenic Escherichia coli type III secretion system requires components of the type III apparatus for assembly and (6):3310-3319localization. Infect Immun 2003;71
42. Giono CS, Escobar GA, Valdespino GJL. Diagnostico de Laboratorio de Infecciones Gastrointestinales.- Instituto Nacional y Referencia Epidemiológicos. Secretaria de Salud 1994
43. Giro´n, J. A., A. S. Y. Ho, and G. K. Schoolnik. 1991. An inducible bundleforming pilus of enteropathogenic Escherichia coli. Science 254:710–713.
44. Giron JA, Ho AS, Schoolnik GK. An inducible bundle-forming pilus of enteropathogenic Escherichia coli. Science 1991;254(5032):710-713.
45. Goldberg, M. B., and P. J. Sansonetti. 1993. Shigella subversion of the cellular cytoskeleton: a strategy for epithelial colonization. Infect. Immun. 61:4941–4946.
46. Goluszko P, Niesel D, Nowicki B, et al. (2001b) Dr operonassociated invasiveness of Escherichia coli from pregnant patients with pyelonephritis. Infect Immun 69: 4678–4680.
47. Goluszko P, Selvarangan R, Nowicki BJ, Nowicki S, Hart A, Pawelczyk E & Nguyen K (2001a) Rapid receptor-clustering assay to detect uropathogenic and diarrheal Escherichia coli isolates bearing adhesins of the Dr family. J Clin Microbiol 39: 2317–2320.–503.
48. Gunzburg ST, Chang BJ, Elliott SJ, Burke V & Gracey M (1993) Diffuse and enteroaggregative patterns of adherence of enteric Escherichia coli isolated from aboriginal children from the Kimberley region of Western Australia. J Infect Dis 167: 755–758.
49. Gutiérrez-Jiménez J, Vidal JE, Mejía-Albarrán ME, Resçendiz-Sánchez J, Pérez-Miravete A, Navarro-García F. Prevalencia de patotipos de Escherichia coli diarreogénica en niños del Hospital Infantil de Mexico. Memorias del 34o. Congreso Nacional de Microbiologia, Asociación Mexicana de Microbiología. 2004.
50. Harris, J. R., J. Mariano, J. G. Wells, B. J. Payne, H. D. Donnell, and M. Cohen. 1985. Person to person transmission in an outbreak of enteroinvasive Escherichia coli. Am. J. Epidemiol. 122:245-253.
51. Hartland EL, Daniell SJ, Delahay RM, et al. The type III protein translocation system of enteropathogenic Escherichia coli involves EspAEspB protein interactions. Mol Microbiol 2000;35(6):1483-1492.
52. Hopwood y Chater, 1989
53. Hirschhorn N. the treatment of acute diarrhea in children. An historical and physiological perspective. Am J Clin Nutr 1999; 33:637-663
54. Ishitoya S, Yamamoto S, Kanamaru S, Kurazono H, Habuchi T, Ogawa O & Terai A (2003) Distribution of afaE adhesins in Escherichia coli isolated from Japanese patients with urinary tract infection. J Urol 169: 1758–1761.
55. Jarvis KG, Giron JA, Jerse AE, McDaniel TK, Donnenberg MS, Kaper JB. Enteropathogenic Escherichia coli contains a putative type III secretion system necessary for the export of proteins involved in attaching and effacing lesion formation. Proc Natl Acad Sci USA 1995;92(17):7996-8000.
56. Jerse, A. E., J. Yu, B. D. Tall, and J. B. Kaper. 1990. 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 87:7839–7843.
57. Jouve M, Garcia MI, Courcoux P, Labigne A, Gounon P & Le Bouguenec C (1997) Adhesion to and invasion of HeLa cells by pathogenic Escherichia coli carrying the afa-3 gene cluster are mediated by the AfaE and AfaD proteins, respectively. Infect Immun 65: 4082–4089.
58. Kenny B, DeVinney R, Stein M, Reinscheid DJ, Frey EA, Finlay BB. Enteropathogenic E. coli (EPEC) transfers its receptor for intimate adherence into mammalian cells. Cell 1997;91(4):511-520.

59. Kenny B, Finlay BB. Protein secretion by enteropathogenic Escherichia coli is essential for transducing signals to epithelial cells. Proc Natl Acad Sci USA 1995;92(17):7991-7995.
60. Kenny B, Jepson M. Targeting of an enteropathogenic Escherichia coli (EPEC) effector protein to host mitochondria. Cell Microbiol 2000;2(6):579-590.
61. Knutton, S., M. M. Baldini, J. B. Kaper, and A. S. McNeish. 1987. Role of plasmid-encoded adherence factors in adhesion of enteropathogenic Escherichia coli to HEp-2 cells. Infect. Immun. 55:78–85.
62. Kumate J, Gutiérrez G, Muñoz O, Santos JI. Manual de Infectología Clínica, México 1994, p66
63. Labigne-Roussel AF, Lark D, Schoolnik G & Falkow S (1984) Cloning and expression of an afimbrial adhesin (Afa-I) responsible for P blood group-independent, mannoseresistant hemagglutination from a pyelonephritic Escherichia coli strain. Infect Immun 46: 251–259.
64. Lawrence y Ochman, 1998.
65. Le Bouguenec C, Archambaud M & Labigne A (1992) Rapid and specific detection of the pap, afa, and sfa adhesin-encoding operons in uropathogenic Escherichia coli strains by polymerase chain reaction. J Clin Microbiol 30: 1189–1193
66. Le Bouguenec C, Lalioui L, du Merle L, et al. (2001) Characterization of AfaE adhesins produced by extraintestinal and intestinal human Escherichia coli isolates: PCR assays for detection of Afa adhesins that do or do not recognize Dr blood group antigens. J Clin Microbiol 39: 1738–1745.
67. Levin, 1981; Caughant et al., 1981
68. Levine MM, Bergquist EJ, Nalin DR, et al. Escherichia coli strains that cause diarrhoea but do not produce heat-labile or heat-stable enterotoxins and are non-invasive. Lancet 1978;1(8074):1119-1122
69. Levine MM, Ferreccio C, Prado V, et al. (1993) Epidemiologic studies of Escherichia coli diarrheal infections in a low socioeconomic level peri-urban community in Santiago, Chile. Am J Epidemiol 138: 849–869.
70. Lewin,1998
71. Lommel S, Benesch S, Rohde M, Wehland J, Rottner K. Enterohaemorrhagic and enteropathogenic Escherichia coli use different mechanisms for actin pedestal formation that converge on N-WASP. Cell Microbiol 2004;6(3):243-254.
72. Madingan et al., 2000
73. Marches O, Wiles S, Dziva F, et al. Characterization of two non-locus of enterocyte effacement-encoded type III-translocated effectors, NleC and NleD, in attaching and effacing pathogens. Infect Immun 2005;73(12):8411- 8417
74. Marquart, M. E., W. L. Picking, and W. D. Picking. 1996. Soluble invasion plasmid antigen C (IpaC) from Shigella flexneri elicits epithelial cell responses related to pathogen invasion. Infect. Immun. 64:4182–4187.
75. Martinez H, Tomkins A. Nutrition management of diarrhea. Food Nutr Bull 1995; 16:349-355
76. Martorell R, Yarbrough C, Yarbrough S, Klein R. The impac of ordinary illnesses on the dietary intakes of malnourished children. Am J Clin Nutr 1980; 33:345-350
77. Mathewson JJ, Oberhelman RA, Dupont HL, Javier de la Cabada F, Garibay EV. Enteroadherent Escherichia coli as a cause of diarrhea among children in Mexico. J Clin Microbiol 1987;25(10):1917-1919.
78. Matsuzawa T, Kuwae A, Abe A. Enteropathogenic Escherichia coli type III effectors EspG and EspG2 alter epithelial paracellular permeability. Infect Immun 2005;73(10):6283-6289.
79. McDaniel, T. K., and J. B. Kaper. 1997. A cloned pathogenicity island from enteropathogenic Escherichia coli confers the attaching and effacing henotype on E. coli K-12. Mol. Microbiol. 23:399–407.
80. McNamara BP, Koutsouris A, O'Connell CB, Nougayrede JP, Donnenberg MS, Hecht G. Translocated EspF protein from enteropathogenic Escherichia coli disrupts host intestinal barrier function. J Clin Invest 2001;107(5):621-629.
81. Mellies JL, Navarro-García F, Okeke I, Frederickson J, Nataro JP, Kaper JB. espC

pathogenicity island of enteropathogenic Escherichia coli encodes an enterotoxin. Infect Immun 2001;69(1):315-324.
82. Monolov, D. G. 1959. A new type of the genus Shigella—'Shigella 13'. J. Hyg. Epidemiol. Microbiol. Immunol. 3:184–190.
83. Moon, H. W., S. C. Whipp, R. A. Argenzio, M. M. Levine, and R. A. Giannella. 1983. Attaching and effacing activities of rabbit and human enteropathogenic Escherichia coli in pig and rabbit intestines. Infect. Immun. 41:1340–1351.
84. Mota- Hernández F, deshidratación por diarrea, Bol.Med Hosp. Infant Mex 1998; 55(9): 530-38
85. Nataro JP, Kaper JB. Diarrheagenic Escherichia coli. Clin Microbiol Rev 1998;11(1):142-201.
86. Nougayrede JP, Fernandes PJ, Donnenberg MS. Adhesion of enteropathogenic Escherichia coli to host cells. Cell Microbiol 2003;5(6):359-372.
87. Nowicki B, Labigne A, Moseley S, Hull R, Hull S & Moulds J (1990) The Dr hemagglutinin, afimbrial adhesins Afa-I and Afa-III, and F1845 fimbriae of uropathogenic and diarrheaassociated Escherichia coli belong to a family of hemagglutinins with Dr receptor recognition. Infect Immun 58: 279–281.
88. Ochman et al., 1999
89. Palva, E. T. and Mákelá, P. H. Lipopolysaccharide heterogeneity in Salmonella typhimurium analyzed by sodium dodecyl sulfate/polyacrylarnide gel electrophoresis. Eur. J. Biochem. 1980; 107:137-143.
90. Parsot, C., and P. J. Sansonetti. 1996. Invasion and the pathogenesis of Shigella infections. Curr. Top. Microbiol. 209:25–42.
91. Peiffer I, Servin AL & Bernet-Camard MF (1998) Piracy of decayaccelerating factor (CD55) signal transduction by the diffusely adhering strain Escherichia coli C1845 promotes cytoskeletal F-actin rearrangements in cultured human intestinal INT407 cells. Infect Immun 66: 4036–4042.
92. Phillips N, Hayward RD, Koronakis V. Phosphorylation of the enteropathogenic E. coli receptor by the Src-family kinase c-Fyn triggers actin pedestal formation. Nat Cell Biol 2004;6(7):618-625.
93. Polotsky, Y. E., E. M. Dragunskaya, V. G. Seliverstova, T. A. Avdeeva, M. G. Chakhutinskaya, I. Ke´tyi, A. Verte´nyi, B. Ralovich, L. Emody, I. Ma´lovics, N. V. Safonova, E. S. Snigirevskaya, and E. I. Karyagina. 1977. Pathogenic effect of enterotoxigenic Escherichia coli and Escherichia coli causing infantile diarrhea. Acta Microbiol. Acad. Sci. Hung. 24:221–236.
94. Raetz, C. R. H. Structure and biosynthesis of lipid A in Escherichia coli. En Escherichia coli and Salmonella typhimurium, cellular and molecular biology, F. C. Neidhardt (Ed.). Washington, DC: ASM
95. Reyes H, Tomé P, Pérez-Cuevas R, Guiscafré H, Gutiérrez G. Factores de riesgo de mortalidad por diarrea aguda e infecciones respiratorias agudas. Gac Med Mex 1992;128:589-595.
96. Reymond, D., R. P. Johnson, M. A. Karmali, M. Petric, M. Winkler, S. Johnson, K. Rahn, S. Renwick, J. Wilson, R. C. Clarke, and J. Spika. 1996. Neutralizing antibodies to Escherichia coli vero cytotoxin 1 and antibodies to O157 lipopolysaccharide in healthy farm family members and urban residents. J. Clin. Microbiol. 34:2053–2057.
97. Rodríguez-Angeles G. Principales características y diagnostico de los grupos patógenos de Escherichia coli, Salud Pública Mex 2002,44;464-475.
98. Rothbaum, R., A. J. McAdams, R. Giannella, and J. C. Partin. 1982. A clinicopathological study of enterocyte-adherent Escherichia coli: a cause of protracted diarrhea in infants. Gastroenterology 83:441–454.
99. Rowe, B., R. J. Gross, and D. P. Woodroof. 1977. Proposal to recognize serovar 145/146 (synonyms: 147, Shigella 13, Shigella sofia, and Shigella manolovii) as a new Escherichia coli O group, O164. Int. J. Syst. Bacteriol. 27:15–18.
100. Sanger, J. M., R. Chang, F. Ashton, J. B. Kaper, and J. W. Sanger. 1996. Novel form of actin-based motility transports bacteria on the surface of infected cells. Cell Motil.

Cytoskeleton 34:279–287.
101. Secretaría de Salud. Manual de enfermedades diarreicas 2009.
102. Sansonetti, P. J. 1992. Molecular and cellular biology of Shigella flexneri invasiveness: from cell assay systems to shigellosis. Curr. Top. Microbiol. Immunol. 180:1–19.
103. Scaletsky IC, Fabbricotti SH, Carvalho RL, Nunes CR, Maranhao HS,Morais MB & Fagundes-Neto U (2002) Diffusely adherent Escherichia coli as a cause of acute diarrhea in young children in Northeast Brazil: a case–control study. J Clin Microbiol 40: 645–648.
104. Schauer, D. B., and S. Falkow. 1993. Attaching and effacing locus of a Citrobacter freundii biotype that causes transmissible murine colonic hyperplasia. Infect. Immun. 61:2486–2492.
105. Sekiya K, Ohishi M, Ogino T, Tamano K, Sasakawa C, Abe A. Supermolecular structure of the enteropathogenic Escherichia coli type III secretion system and its direct interaction with the EspA-sheath-like structure. Proc Natl Acad Sci USA 2001;98(20):11638-11643.
106. Selander et al., 1997
107. Sepúlveda J, Willet W, Muñoz A. Malnutrition and diarrhea. A longitudinal study among urban Mexican children. Am J Epidemiol 1988;127:365-376.
108. Servin AL (2005) Pathogenicity of Afa/Dr diffusely adhering Escherichia coli. Clin Microbiol Rev 18: 264–292.
109. Silva, R. M., M. R. F. Toledo, and L. R. Trabulsi. 1980. Biochemical and cultural characteristics of invasive Escherichia coli. J. Clin. Microbiol. 11: 441–444.
110. Small, P. L. C., and S. Falkow. 1988. Identification of regions on a 230- kilobase plasmid from enteroinvasive Escherichia coli that are required for entry into HEp-2 cells. Infect. Immun. 56:225–229.
111. Snyder, J. D., J. G. Wells, J. Yashuk, N. Puhr, and P. A. Blake. 1984. Outbreak of invasive Escherichia coli gastroenteritis on a cruise ship. Am. J. Trop. Med. Hyg. 33:281-284
112. So, M., and B. J. McCarthy. 1980. Nucleotide sequence of transposon Tn 1681 encoding a heat-stable toxin (ST) and its identification in enterotoxigénica Escherichia coli strains. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4011–4015
113. Soto GE & Hultgren SJ (1999) Bacterial adhesins: common themes and variations in architecture and assembly. J Bacteriol 181: 1059–1071.
114. Souza et al., 1999
115. Staley, T. E., E. W. Jones, and L. D. Corley. 1969. Attachment and penetration of Escherichia coli into intestinal epithelium of the ileum in newborn pigs. Am. J. Pathol. 56:371–392.
116. Taylor KA, O'Connell CB, Luther PW, Donnenberg MS. The EspB protein of enteropathogenic Escherichia coli is targeted to the cytoplasm of infected HeLa cells. Infect Immun 1998;66(11):5501-
117. Taylor, C. J., A. Hart, R. M. Batt, C. McDougall, and L. McLean. 1986. Ultrastructural and biochemical changes in human jejunal mucosa associated with enteropathogenic Escherichia coli (O111) infection. J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr. 5:70–73.
118. Taylor, D. N., P. Echevarria, T. Pal, 0. Sethabur, S. Saiborisuth, S. Srichamorn, B. Rowe, and J. Cross. 1986. The role of Shigella spp., enteroinvasive Escherichia coli and other enteropathogens as causes of childhood dysentery in Thailand. J. Infect. Dis. 153:1132-1138.
119. Toma C, Lu Y, Higa N, Nakasone N, Chinen I, Baschkier A, Rivas M, Iwanaga M. 2003. Multiplex PCR Assay for identification of human diarrheagenic Escherichia coli.American society of Microbiology. (6)41:2669-6671
120. Tomson FL, Viswanathan VK, Kanack KJ, et al. Enteropathogenic Escherichia coli EspG disrupts microtubules and in conjunction with Orf3 enhances perturbation of the tight junction barrier. Mol Microbiol 2005;56
121. Tórres AG, Zhou X, Kaper JB. Adherence of diarrheagenic Escherichia coli strains to epithelial cells. Infect Immun 2005;73(1):18-29.
122. Trabulsi LR, Keller R, Tardelli Gomes TA. Typical and atypical enteropathogenic

Escherichia coli. Emerg Infect Dis 2002;8(5):508-513.

123. Tulloch, E. F., K. J. Ryan, S. B. Formal, and F. A. Franklin. 1973. Invasive enteropathic Escherichia coli dysentery. Ann. Intern. Med.
124. Ulshen, M. H., and J. L. Rollo. 1980. Pathogenesis of Escherichia coli gastroenteritis in man—another mechanism. N. Engl. J. Med. 302:99–101.
125. Valdespiro JL; Garcìa ML, Del Río A, Giono S, Salcedo RA, Sepúlveda J. Epidemiología y etiología de las diarreas infecciosas. El caso de México Rev Latioam Microbiol 1994;48:65-70
126. Vidal J., Canizález A., Gutiérrez J., Navarro F. 2007. Patogénesis molecular, epidemiología y diagnóstico de Escherichia coli enteropatógena Salud Publica Mex 2007;49:376-386.).
127. Viswanathan VK, Lukic S, Koutsouris A, Miao R, Muza MM, Hecht G. Cytokeratin 18 interacts with the enteropathogenic Escherichia coli secreted protein F (EspF) and is redistributed after infection. Cell Microbiol 2004;6(10):987-997.
128. Wachter C, Beinke C, Mattes M, Schmidt MA. Insertion of EspD into epithelial target cell membranes by infecting enteropathogenic Escherichia coli. Mol Microbiol 1999;31(6):1695
129. Wolff C, Nisan I, Hanski E, Frankel G, Rosenshine I. Protein translocation into host epithelial cells by infecting enteropathogenic Escherichia coli. Mol Microbiol 1998;28(1):143-155.
130. World Health Organization. A manual for the treatment of acute diarrhoea. Ginebra:WHO/CDD/Ser/80.2, rev. 1, 1994
131. Yip CK, Kimbrough TG, Felise HB, et al. Structural characterization of the molecular platform for type III secretion system assembly. Nature 2005;435(7042): 702:707.
132. Zychlinsky, A., B. Kenny, R. Menard, M. C. Prevost, I. B. Holland, and P. J. Sansonetti. 1994. IpaB mediates macrophage apoptosis induced by Shigella flexneri. Mol. Microbiol. 11:619–627.
133. Magna pure LC 2.0 Total nucleic acid extraction kit version 2008.