

UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLAS DE HIDALGO

FACULTAD DE QUIMICO FARMACOBIOLOGIA



**“Tipificación molecular de *Escherichia coli* Enterotoxigénica,
Enterohemorrágica y Enteroagregativa en Michoacán”**

Tesis profesional que en cumplimiento para obtener el título de Licenciatura en
Químico Farmacobiología presenta.

Aldo Rafael Silva Gamiño

Asesores

Biol. Juan Luis Jaime Sánchez.

D.C. Irvin Eduardo Jácome Galarza.

Febrero 2011



1 ÍNDICE

1	ÍNDICE	1
2	ÍNDICE DE TABLAS	4
3	ÍNDICE DE FIGURAS	5
4	ABREVIACIONES	7
5	RESUMEN	8
6	INTRODUCCIÓN	9
6.1	ETIOLOGÍA DE LA DIARREA	11
6.2	ESCHERICHIA COLI	12
6.3	EL GENOMA BACTERIANO	13
6.4	INMUNIDAD INTESTINAL	14
6.4.1	MECANISMOS INTESTINALES DE PROTECCIÓN NO ESPECÍFICA	14
6.4.2	MECANISMOS INTESTINALES DE PROTECCIÓN ESPECÍFICA (INMUNIDAD INTESTINAL)	16
6.5	<i>E. COLI</i> COMO AGENTE PATÓGENO	18
6.6	<i>ESCHERICHIA COLI</i> ENTEROTOXIGÉNICA (ETEC)	20
6.6.1	TOXINA TERMOLÁBIL (LT)	21
6.6.2	TOXINA TERMOESTABLE (ST).	23
6.6.3	EPIDEMIOLOGIA	27
6.7	<i>ESCHERICHIA COLI</i> ENTEROHEMORRÁGICA (EHEC)	28
6.7.1	PATOGENICIDAD	29
6.7.2	HISTOPATOLOGÍA	29
6.7.3	TOXINAS SHIGA (STX)	32
6.7.4	TOXINA EAST1	32
6.7.5	ENTEROHEMOLISINA	32
6.7.6	FACTORES DE ADHERENCIA INTESTINAL	33
6.7.7	PLÁSMIDO PO157.	33
6.7.8	TRANSPORTADOR DE HIERRO.	34
6.7.9	SEROTIPOS NO O157:H7.	34
6.7.10	EPIDEMIOLOGIA	35
6.8	<i>ESCHERICHIA COLI</i> ENTEROAGREGATIVA (EAEC)	36
6.8.1	PATOGENIA	38
6.8.2	HISTOPATOLOGÍA	39
6.8.3	ADHERENCIA	40
6.8.4	CITOTOXINAS	41
6.8.5	MODELO DE LA PATOGENIA DE EAEC.	41
6.8.6	EPIDEMIOLOGIA	42
6.9	CARACTERIZACIÓN DE BACTERIAS.	42
6.9.1	COPROCULTIVO.	42
6.9.2	PRUEBAS BIOQUÍMICAS.	43
6.9.3	TINCIÓN.	43
6.9.4	TÉCNICAS SEROLÓGICAS.	43
6.9.5	ANÁLISIS FENOTÍPICOS.	44
6.10	TÉCNICAS MOLECULARES.	45



6.10.1	COLONY BLOT Y STOOL BLOT.	45
6.10.2	PCR (REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA).	46
6.10.3	CONDICIONES PARA LA AMPLIFICACIÓN.	47
6.10.4	PCR EN TIEMPO REAL.	49
6.11	MANEJO DE LAS DIARREAS.	52
6.11.1	LOS ANTIBIÓTICOS NO DEBEN EMPLEARSE DE MANERA RUTINARIA DEBIDO A LAS SIGUIENTES CONSIDERACIONES. ¹²⁴	54
6.11.2	LOS ANTIBIÓTICOS SOLO ESTÁN INDICADOS EN:	56
6.11.3	TRATAMIENTO Y PREVENCIÓN DE LAS DIARREAS.	56
7	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.	63
8	JUSTIFICACIÓN.	64
9	HIPOTESIS.	65
10	OBJETIVOS	66
10.1	OBJETIVO GENERAL:	66
10.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS:	66
11	IDENTIFICACIÓN DEL ESTUDIO.	67
12	MATERIALES Y MÉTODOS	69
12.1	DIAGRAMA DE ACTIVIDADES:	69
12.2	CARACTERIZACIÓN DE LAS MUESTRAS.	70
12.2.1	SELECCIÓN DE MUESTRAS	70
12.2.2	TOMA DE MUESTRA.	70
12.2.3	PROCEDIMIENTO.	70
12.2.4	REGISTRO DE DATOS.	71
12.2.5	TRANSPORTE DE LA MUESTRA.	71
12.3	IDENTIFICACIÓN BIOQUÍMICA	71
12.3.1	COPROCULTIVO.	71
12.3.2	IDENTIFICACIÓN BIOQUÍMICA.	72
12.4	ANÁLISIS Y MANIPULACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEÍCOS.	72
12.4.1	EXTRACCIÓN DE DNA POR PERLAS MAGNÉTICAS.	72
12.5	REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA	74
12.6	CORRIMIENTO ELECTROFORETICO DE LA PCR.	77
12.7	ANÁLISIS DE RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS	77
12.8	MANUAL DE REFERENCIA DE CLSI.	78
13	RESULTADOS.	80
13.1	CARACTERIZACIÓN DE LAS MUESTRAS	80
13.2	ANÁLISIS Y MANIPULACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEÍCOS	82
13.3	CUADRO CLÍNICO	89
13.4	ANÁLISIS DE RESISTENCIA A LOS ANTIBIÓTICOS.	89
14	DISCUSIÓN DE RESULTADOS	95



15	<u>PERSPECTIVAS.</u>	100
16	<u>CONCLUSIONES.</u>	101
17	<u>ANEXOS.</u>	102
17.1	TOMA DE MUESTRA Y REGISTRO DE DATOS.	102
17.2	COPROCULTIVO.	106
17.3	PRUEBAS BIOQUÍMICAS.	107
17.4	SUSCEPTIBILIDAD A ANTIMICROBIANOS	108
17.5	PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN DE DNA POR PERLAS MAGNÉTICAS.	109
17.5.1	MATERIAL:	109
17.5.2	EXTRACCIÓN AUTOMÁTICA DE ÁCIDOS NUCLEICOS TOTALES	110
17.5.3	PROCEDIMIENTO DE EXTRACCIÓN EN EL ROBOT MAGNA PURE LC:	114
17.6	PCR EN TIEMPO REAL	120
17.7	PREPARACIÓN Y CARGA DE UN GEL DE AGAROSA	120
18	<u>BIBLIOGRAFÍA.</u>	121



2 ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Características de los grupos de <i>Escherichia coli</i> causantes de diarrea.....	19
Tabla 2. Clasificación de los Antibióticos'	57
Tabla 3. Antibióticos utilizados en el tratamiento de las principales causas bacterianas de diarrea aguda.....	59
Tabla 4. Datos de los iniciadores utilizados en este estudio.	74
Tabla 5. Mezcla de Reacción de PCR en Tiempo Real.	75
Tabla 6. Programa para el Termociclador en Tiempo Real LigthCycler 480.....	76
Tabla 7. Antibióticos utilizados y su referencia para determinación de sensibilidades.....	78
Tabla 8. Contenido del Kit de Extracción MagNA Pure Total Nucleic Acid Isolation	110
Tabla 9. Accesorios utilizados en el Robot de Extracción Magna Pure LC.....	113



3 ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Producción de anticuerpos por parte del sistema inmune intestinal.....	17
Figura 2. Representación grafica de los mecanismos clásicos de acción de las toxinas de ETEC.	21
Figura 3. Esquema del mecanismo de patogenicidad de EHEC.....	29
Figura 4. Los genes involucrados en la patogénesis de EHEC.....	31
Figura 5. Esquema representativo de la formación de biofilm e internalización de la toxina EAST1 de EAEC en el enterocito.....	38
Figura 6. Ejemplo de una amplificación y la localización de los valores de Ct.....	50
Figura 7. Ejemplo de una curva melting.....	51
Figura 8. Manejo de Diarreas.....	53
Figura 9. Manejo de Diarreas en Niños con Sangre en Heces.....	56
Figura 10. Placa excavada donde se corrió la PCR.....	76
Figura 11. Porcentaje de cepas que se lograron aislar a partir de las muestras fecales.....	80
Figura 12. Distribución de las muestras diarreicas por edades.....	81
Figura 13. Distribución de muestras diarreicas según el género.....	81
Figura 14. Jurisdicciones sanitarias del estado de Michoacán de donde provienen las muestras.....	82
Figura 15. Amplificaciones de los genes eae, stx, elt, est, Aggr, AspU, CVD432 e IpaH en el equipo LightCycler 480.....	83
Figura 16. Amplificaciones en tiempo real de los genes Aggr, AspU y CVD432.....	83
Figura 17. Curvas Melting de los controles positivos.....	84
Figura 18. Curva Melting del gen Est. de ETEC (Tm 84.22°C).....	84
Figura 19. Electroforesis en un gel de agarosa de los productos de PCR en tiempo real.....	85
Figura 20. Gel de electroforesis de agarosa al 2.5% para Muestras positivas a EAEC y ETEC.....	85
Figura 21. Resultados de la patotipificación molecular del total de muestras que entraron al estudio.....	86
Figura 22. Distribución de los patotipos obtenidos de las muestras positivas.....	86
Figura 23. Porcentaje de las toxinas encontradas en ETEC.....	87
Figura 24. Distribución por género de las muestras positivas.....	87
Figura 25. Distribución etaria de las muestras positivas.....	88
Figura 26. Distribución de los patotipos por meses.....	88
Figura 27. Resistencia de otros antibióticos a los que se les realizaron pruebas de resistencia con fines de investigación.....	90
Figura 28. Resistencia de ETEC a los antimicrobianos de primera elección.....	90
Figura 29. Resistencia de ETEC a otros antimicrobianos.....	91
Figura 30. Resistencia de EAEC a los antimicrobianos de primera elección.....	91
Figura 31. Resistencia de EAEC a otros antimicrobianos.....	92
Figura 32. Comparación de resistencia a antimicrobianos de primera elección entre E. coli patógenas y no patógenas en diarreas.....	93
Figura 33. Comparación de resistencia antimicrobioanos entre E. coli patógenas y no patógenas en diarreas.....	94
Figura 34. Hisopado Rectal.....	102
Figura 35. Medio de transporte Cary-Blair.....	103
Figura 36. Encuesta Epidemiología para estudio de Colera.....	104
Figura 37. Encuesta Epidemiológica de Diarreas por Rotavirus.....	105
Figura 38. Medios de cultivo diferenciales para Enterobacterias.....	106
Figura 39. Estriado en placa con medio EMB.....	106
Figura 40. Crecimiento de E. coli en medios EMB (arriba) y MacConkey (Abajo).....	107
Figura 41. Batería bioquímica típica de E. coli.....	107
Figura 42. Proceso de medición de halo de resistencia.....	108
Figura 43. Preparación de la Muestra para Extracción de Ácidos Nucleicos.....	114
Figura 44. Colocación de los Consumibles en el Robot Magna Pure LC.....	115
Figura 45. Orden de colocación de los Reactivos en la Charola del Robot Magna Pure LC.....	115



Figura 46. Accesorios para Desecho de Reactivos.	116
Figura 47. Introducción de muestras y protocolo en el Software del Robot Magna Pure LC	117
Figura 48. Programación del Software MagnaPure LC	118
Figura 49. Monitoreo de Extracción de ácidos nucleicos en el Robot Magna Pure LC	119
Figura 50. Termociclador <i>LightCycler</i> ® 480 Real-Time PCR.	120
Figura 51. Preparación y carga de un gel de agarosa con los productos de PCR para corrimiento electroforético.	120



4 ABREVIACIONES

A/E	Adherencia y eliminación.
CDC	Centro para el Control y Prevención de Enfermedades
Célula M	Célula membranosa
CH	Colitis hemorrágica
DAEC	<i>Escherichia coli</i> de adherencia difusa
DNA	Ácido desoxirribonucleico.
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EAEC	<i>Escherichia coli</i> enteroadherente.
EAF	Factor de adherencia de <i>Escherichia coli</i> .
EHEC	<i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica.
EIEC	<i>Escherichia coli</i> enteroinvasiva.
EPEC	<i>Escherichia coli</i> enteropatógena.
Esp	Proteínas de secreción de <i>Escherichia coli</i> .
ETEC	<i>Escherichia coli</i> 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.
LT	Termolábil
MDa	Megadaltons.
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa.
PO157	Plásmido O157
RNA	Ácido ribonucleico.
SUH	Síndrome urémico hemolítico
ST	Termo estable
UFC	Unidad formadora de colonia.
VIP	Péptido vasoactivo intestinal



5 RESUMEN

Las infecciones intestinales son la principal causa de muerte en niños de edad preescolar en México¹¹¹, siendo *Escherichia coli* patógena el principal agente bacteriano causante de infecciones diarreicas. Sin embargo un alto porcentaje de estas cepas patógenas pasan inadvertidas como etiología de la diarrea infantil debido a la dificultad de diferenciarlas de las cepas de biota normal. Como una solución altamente específica y sensible a este problema, los ensayos de PCR permiten la identificación rápida y confiable de los distintos patotipos. **Objetivos.** Patotipificación molecular de *Escherichia coli* enterotoxigénica, enterohemorrágica y enteroagregativa. **Materiales y Métodos.** Se realizó la identificación bioquímica y resistencia a antibióticos de cepas de *Escherichia coli*, posteriormente se extrajo material genético de 100 aislados provenientes del Hospital Infantil de Morelia Eva Sámano de López Mateos y del Laboratorio Estatal de Salud Pública del Estado de Michoacán (LESP), se realizó PCR en tiempo real de dichas muestras buscando genes que codifican para factores de patogenicidad. **Resultados.** Se logró la identificación de 44% de muestras correspondientes a algún grupo patógeno, el 50% de estas fueron *Escherichia coli* enterotoxigénica (ETEC), el 41% corresponde a *Escherichia coli* enteroagregativa EAEC, mientras que para el caso de *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC) no se encontró la presencia de ninguna cepa, el 9% restante corresponde a otros patotipos de *Escherichia coli*. También se encontró que las cepas aisladas presentan una considerable resistencia a los antibióticos de primera elección.



6 INTRODUCCIÓN

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud, la diarrea es uno de los cinco principales problemas de salud pública en el mundo. 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.

Se puede definir a la diarrea como el aumento en la frecuencia, disminución de la consistencia y aumento en el número de las evacuaciones ⁵⁵. Si el volumen es mayor a 200g, en lo que respecta a la frecuencia se considera anormal todo aumento en el número de evacuaciones en relación a lo habitual para cada paciente.²²

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, esta cifra varía de 0.8 a 10.7 casos, siendo en países desarrollados de 0.5 a 2 y en países en vías de desarrollo de 5 a 12. Constituyendo de esta manera la causa de al menos 5 millones de muertes anualmente, siendo la deshidratación la responsable de entre el 60 y 70% de las muertes.

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.^{125, 126}



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.²²

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 secretora).
- 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.

La deshidratación es la complicación más frecuente de las enfermedades diarreicas agudas por lo que hay pérdida de agua y electrolitos.^{6, 7} 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.⁹



6.1 ETIOLOGÍA DE LA DIARREA

En base al agente etiológico diversos estudios demuestran que las causas más frecuentes de infección gastrointestinal son los virus (rotavirus, adenovirus Norwalk) y toxoinfección alimentaria (toxina botulínica, toxina estafilocócica, toxinas de *E. coli*), siendo la combinación de ambas la responsable de entre el 75 y 90% de las causas. En los casos donde se identifica una bacteria como agente etiológico, predomina en casi todos los estudios *E coli* tipificable. La etiología de la diarrea tiene habitualmente un origen infeccioso, que puede ser; bacteriano, viral o parasitario.

Viral.- Los rotavirus y virus norwalk son sin duda de entre los virus, los agentes más frecuentes. Otros tipos como adenovirus, astrovirus, enterovirus, coronavirus y calicivirus, también pueden producir gastroenteritis. Generalmente el padecimiento es de comienzo brusco, con vómitos y fiebre que preceden en varias horas al comienzo de la diarrea. Los rotavirus son la causa más común especialmente en lactantes y niños pequeños, lesionan las células epiteliales del intestino delgado, produciendo tumefacción, vacuolización y necrosis a causa de sus enterotoxinas. Produce cambios en la microcirculación alterando la absorción de nutrientes y líquidos lo que ocasiona una diarrea osmótica.

Parasitaria: Transmitida por vía ano-mano-boca. *Entamoeba histolítica* puede causar diarrea mucosanguinolenta con poco compromiso del estado general. *Giardia lamblia* si bien se asocia a diarrea prolongada, puede dar episodios de diarrea aguda, y es el principal agente parasitario causante de diarrea.

Bacteriana: Los principales agentes bacterianos inductores de diarrea son cepas patógenas de *Escherichia coli* seguida por *Shigella*, *Salmonella*, *Campylobacter jejuni* y *Vibrio cholerae*. Las diarreas son acuosas con moco y pueden contener sangre. La diarrea se produce por 3 mecanismos. 1). Liberación de enterotoxinas, 2) Enteroinvasión y 3) Proliferación intracelular.^{2, 27}



En un estudio que fue patrocinado por la OMS publicado en 1991 y que fue realizado en el hospital infantil de México en niños de 0 a 35 meses. Se reporto que el agente más aislado fue *E. coli* enterotoxigénica, seguida por Rotavirus, *Campylobacter*, *Shigella* y virus de Norwalk, en menor proporción Adenovirus y *Entamoeba histolytica*.⁶¹

6.2 ESCHERICHIA COLI

Escherichia coli pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*, tribu *Escherichia*; el cual comprende cinco especies: *Escherichia blattae*, *Escherichia coli*, *Escherichia fergusonii*, *Escherichia harmannii* y *Escherichia vulneris*. De las especies anteriores solo *Escherichia coli* es considerada como bacteria de importancia clínica. Fue 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.⁵

E. coli es un bacilo gram negativo de tamaño intermedio (de 1X3 a 6µm), generalmente móvil con flagelos peritricos y no forma esporas. Fermentan la glucosa, reducen los nitratos a nitritos, son catalasa positiva y oxidasa negativos. La clasificación bacteriana se realiza en base al lipopolisacárido O el cual es muy variable aún entre bacterias de la misma especie y el antígeno flagelar H. Para determinar el grupo patógeno al que pertenecen Kauffman desarrolló un 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.^{47, 100}



Se considera que el colon de los animales de sangre caliente es el habitat "normal" de *E. coli*.¹⁰² Su localización en el suelo o el agua se asociaba a contaminación fecal pues se consideraba que no podía reproducirse en el medio exterior. 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.⁵⁸ Aunque se consideraba que no podía reproducirse en el medio exterior, se describe que la variedad genética encontrada en estos nichos ambientales es mayor e incluso diferente a las cepas de los posibles hospederos.

En el colon humano encontramos una densidad aproximada de 1 a 10 millones de células por gramo de colon, lo que hace de *E. coli* un componente menor de la flora bacteriana de esta parte del intestino, donde hay una densidad de 1×10^{10} células por gramo de colon³⁴. *E. coli* es una de las primeras bacterias 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.⁴⁷

6.3 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 conocida¹⁰³. Entre estos genes se destacan las llamadas "islas de patogenicidad" (regiones donde se encuentran los genes que confieren capacidades patógenas a una bacteria)¹⁰⁴.



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^{105,106}. 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 transformación.^{107,108}

La información contenida en estos elementos extracromosomales es variable, ya que en ellos se puede encontrar información para asimilar azúcares raros, para producir sustancias 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.¹⁰⁷

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.¹⁰⁸

6.4 INMUNIDAD INTESTINAL

6.4.1 MECANISMOS INTESTINALES DE PROTECCIÓN NO ESPECÍFICA

Producción de mucopolisacáridos: Una gran cantidad de células caliciformes 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.²⁷



Biota bacteriana: La presencia constante de bacterias predominantes anaeróbicas en el colon, interfiere con los sitios disponibles para otras bacterias o parásitos. Así mismo, los lipopolisacáridos bacterianos estimulan la proliferación y localización de células linfoides del intestino. La administración de antibióticos puede alterar a los componentes de la microbiota y por lo tanto interferir con este mecanismo de protección.²⁷

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 su 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 (polipeptido intestinal vasoactivo), además de linfocitos B, que secretan anticuerpos producidos por exposiciones anteriores al patógeno.²⁷



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.²⁷

6.4.2 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.²⁷

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 inmunoprophilaxis. Aunque existen anticuerpos preformados que pueden ser de una anterior exposición al antígeno, o presentar una reacción cruzada con el mismo.

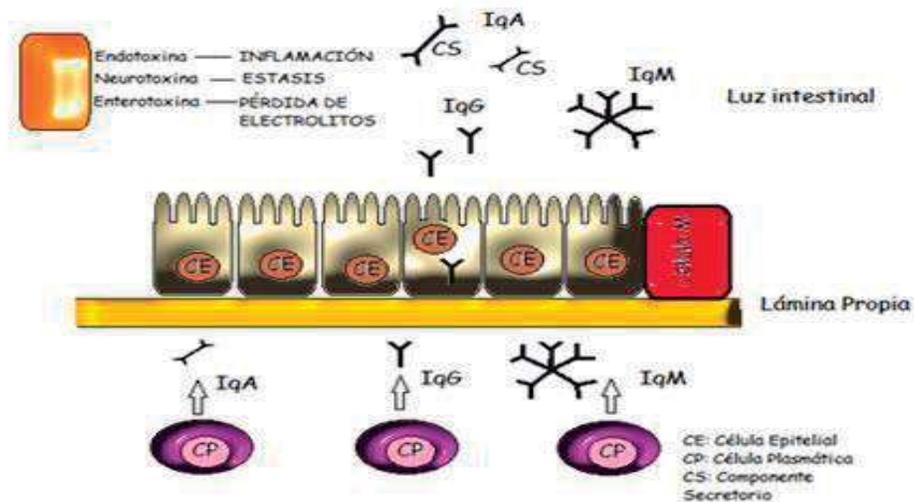


Figura 1. Producción de anticuerpos por parte del sistema inmune intestinal.

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.
- Neutralización de enterotoxinas.



6.5 *E. COLI* COMO AGENTE PATÓGENO

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.⁴⁷

Escherichia coli coloniza el intestino del hombre pocas horas después del nacimiento y se le considera como biota normal, sin embargo, 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 1)

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.⁷³



Tabla. 1 CARACTERÍSTICAS 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 1. Características de los grupos de *Escherichia coli* causantes de diarrea
Adaptado de Guadalupe A. 2002.¹¹²



6.6 *ESCHERICHIA COLI* ENTEROTOXIGÉNICA (ETEC)

Las cepas de ETEC causan frecuentemente diarrea severa en lactantes de países en vías de desarrollo,^{12, 61} también provoca la denominada diarrea del viajero. Estudios realizados por Cravioto y cols en el estado de Morelos indican que ETEC es la bacteria aislada con mayor frecuencia de los intestinos de niños menores de 2 años.^{12, 28} La enfermedad por *Escherichia coli* enterotoxigénica tiene un inicio con un período corto de la incubación (14 a 50 h).^{18, 74, 82}

La diarrea es acuosa, generalmente sin sangre, moco, o pus; la fiebre y el vómito están presentes en una minoría de los pacientes.^{18, 50, 74} La diarrea causada por ETEC puede ser suave, y autolimitada pero puede dar lugar a un cuadro severo similar al que da en una infección por *Vibrio cholerae*.^{52, 74} La patogenicidad de ETEC involucra factores diferentes tales como, factores de colonización, expresión de adhesinas intestinales y la producción de enterotoxinas.

ETEC se caracteriza por tener cepas de *E. coli* capaces de producir por lo menos un miembro de dos tipos distintos de enterotoxinas; la enterotoxina termolábil (LT), llamada así por su labilidad al calor, ya que se inactiva a 100°C durante 10 minutos, también produce la enterotoxina denominada termoestable (ST) a la cual se le dio este nombre porque contiene múltiples residuos de cisteína que le confiere estabilidad a las temperaturas altas, cuyos mecanismos se describen más adelante. (Figura 2) ETEC también incluye la expresión de múltiples fimbrias de adhesión que le permiten colonizar la mucosa intestinal y que se asocian con resistencia a los antibióticos.

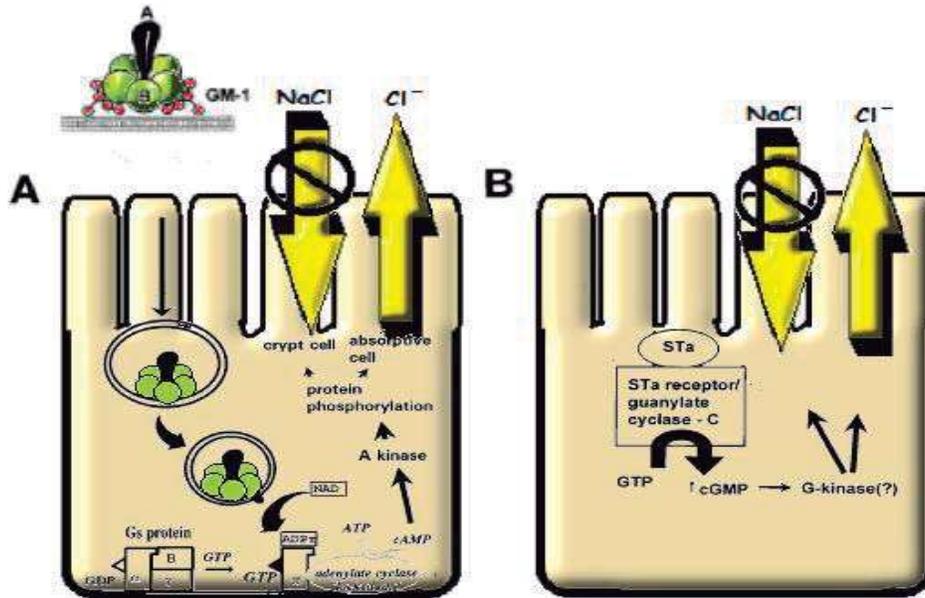


Figura 2. Representación grafica de los mecanismos clásicos de acción de las toxinas de ETEC.

A. Mecanismo clásico de acción de la toxina la toxina termolábil (LT-I).

B. Mecanismo clásico de acción de la toxina termoestable (STa). Nataro y Kaper 1998.

6.6.1 TOXINA TERMOLÁBIL (LT)

La enterotoxina termolábil de *E. coli* es similar en estructural y función a la enterotoxina colérica (CT) producida por cepas de *Vibrio cholerae*.⁸⁷ Las toxinas LT y CT comparten muchas de sus estructuras, incluyendo la estructura de la halotoxina, la secuencia proteica (hasta en un 80%), el receptor primario de identidad, la actividad enzimática y la actividad en ensayos de cultivos en células animales.⁶¹ Existen principalmente dos serogrupos de toxina termolábil, la toxina LTI y la LTII en las que no se ha observado reacción inmunológica cruzada. La toxina LTI se expresa por cepas de *E. coli* que son capaces de producir enfermedad tanto en animales como en humanos. El serogrupo LTII se encuentra principalmente en los animales y rara vez suele aislarse en humanos, pero no se le ha asociado a enfermedad ni en animales ni en humanos.



La toxina termolábil (LT) es una toxina oligomérica de aproximadamente 86KDa compuesta por una subunidad A de 28KDa y 5 subunidades B idénticas de 11.5KDa.⁹⁰ La subunidad B está organizada en forma de anillo que se une fuertemente al gangliósido GM1 y débilmente al GD1b y a algunas glicoproteínas intestinales. La subunidad A es responsable de la actividad enzimática, formada por dos fracciones; la A1 y A2 que se unen por puentes disulfuro.

Dos variantes de la toxina LTI han sido descritas con una relativa reactividad antigénica cruzada. A estas variantes se les ha llamado LTp (LTp-1), de “pig”, haciendo referencia a los cerdos donde se aislaron por primera vez y LTh (LTh-1) para humanos donde se aislaron por primera vez. Los genes que codifican para la enterotoxina LT (elt o etx) se encuentran en plásmidos que también pueden codificar para las toxinas ST y/o factores de colonización antigénicos (CFAs), además de mecanismos de resistencia a antimicrobianos.

Después de que la bacteria realiza la unión a la membrana de la célula huésped, la toxina es introducida por endocitosis y transportada hacia el Golgi por medio de vesículas de transporte.⁵⁴ El blanco de la LT es el adenilato ciclasa localizado sobre la membrana vasolateral de células epiteliales intestinales polarizadas. El péptido A1 tiene actividad ADP-ribosiltransferasa, y actúa transfiriendo la mitad de ADP-ribosil de NAD a la subunidad alfa de la proteína GTP-ligando y proteínas fimbriales (GS), que estimula la actividad del adenilato ciclasa. La ribosilación del ADP de la subunidad GS causa la activación permanente del adenilato ciclasa, conduciendo a niveles aumentados de AMP cíclico (cAMP).

La proteína cinasa dependiente de cAMP se activa conduciendo a la fosforilación supranormal de canales de cloro localizados en el epitelio apical de la membrana celular. El canal de cloro principal es activado por LT. El resultado neto de esto es la secreción de cloruro por las células secretoras de la cripta y la inhibición de la absorción de NaCl por las vellosidades intestinales. El contenido iónico aumentado



conduce el agua directamente por el sendero paracelular, causando la diarrea osmótica. Aunque la estimulación del cloro como resultado de los elevados niveles intracelulares de cAMP es la clásica explicación del mecanismo por el cual las toxinas LT causan diarrea.

Un mecanismo alternativo por el cual estas toxinas podrían actuar implica a las prostaglandinas del grupo E (PGE1 y PGE2) y factor activador plaquetario (PAF). La síntesis y liberación del ácido araquidónico y sus metabolitos como prostaglandinas y leucotrienos puede estimular el transporte de electrolitos y la motilidad intestinal. Un segundo mecanismo alternativo implica el sistema nervioso entérico (SNE) que regula la motilidad intestinal y la secreción iónica.

La serotonina y el polipéptido vasoactivo intestinal pueden estimular la secreción de células epiteliales intestinales por la vía SNE.^{20, 61} Un tercer mecanismo potencial podría implicar una suave respuesta inflamatoria intestinal debido LT.^{58, 62} Variantes in vivo e in vitro y uno o varios de los mecanismos citados podrían actuar en conjunto con el mecanismo de acción clásico implicando al cAMP como causa de diarrea por LT.

6.6.2 TOXINA TERMOESTABLE (ST).

En contraste con la grande estructura oligomérica de LT, la toxina ST es una pequeña toxina monomérica que contiene múltiples residuos de cisteína cuyos puentes disulfuro le confieren gran estabilidad al calor, por lo cual se le denominó termoestable. Existen dos clases no relacionadas de toxinas ST que difieren en estructura y mecanismos de acción; la STa y la STb. Los genes que codifican para ambas clases se encuentran principalmente en los plásmidos, y algunos genes para ST se han encontrado en trasposones. La toxina STa (también llamada ST-1) es producida por ETEC y otras bacterias gram-negativas como *Yersinia enterocolitica* y *Vibrio cholerae* no O1. STa tiene un 50% de concordancia con las proteínas de EAST1 y ST de EAEC.⁶¹



La toxina STa:

Madura es un péptido de 18 a 19 aminoácidos con una masa molecular de aprox. 2kDa. Existen dos variantes designadas STp (ST porcina o ST1a) y STh (ST humana o ST1b) después de su descubrimiento inicial en cepas aisladas de cerdos y humanos respectivamente. Ambas variantes pueden ser encontradas en cepas de ETEC aisladas en humanos, las dos variantes son casi idénticas en los 13 residuos necesarios para la actividad enterotóxica, de esos 13 residuos 6 son cisteínas que forman tres puentes disulfuro intramoleculares. STa es inicialmente producido como un precursor preformado de 72 aminoácidos que es unido por una peptidasa de 53 aminoácidos.⁷¹

Esta forma es transportada al periplasma donde los puentes disulfuro son formados por la proteína cromosómicamente codificada DsbA.¹⁰¹ Un proceso proteico indefinido da lugar a la toxina madura de 18 o 19 residuos que es liberada por difusión a través de la membrana externa. El principal receptor de STa es una enzima presente en la membrana llamada guanilato ciclasa-c (GC-C) que se localiza en la membrana apical en células del epitelio intestinal, unidas a ligandos de dominio extracelular, este dominio estimula la actividad enzimática extracelular. Una hormona llamada guanilina es el agonista endógeno para GC-C.⁹

La guanilina es un péptido de 15 aminoácidos que contiene 4 cisteínas y es menos potente que STa para la activación de GC-C, la guanilina se presume que juega un rol importante en la homeostasis del intestino y el GC-C es usado de forma oportunista por STa para producir diarrea, la unión de STa con GC-C estimula la actividad GC, conduciendo niveles de cGMP intracelular aumentados.^{12, 16, 101}



Esta actividad conduce en última instancia a la secreción de cloruro y/o inhibición de la absorción de cloruro de sodio dando un resultado neto de la secreción de fluidos intestinales. Se han descrito algunos mecanismos alternativos en donde interviene el calcio, fosfatidil inositol, entre otros. Pero no se ha demostrado que dichos mecanismos sean correctos.

La toxina STb:

A diferencia de STa, STb produce daño en el epitelio intestinal, que consiste en pérdida en atrofia de vellosidades intestinales, el receptor para STb es desconocido, pero esta toxina no es considerada de importancia, ya que no se ha demostrado patogenicidad en humanos.⁶¹

Factores de colonización

El mecanismo por el cual las cepas de ETEC se adhieren y colonizan la mucosa intestinal han sido el objeto de estudio de intensivas investigaciones.^{10, 16, 27, 99} Para causar diarrea, ETEC primero debe adherirse al enterocito del intestino delgado un acontecimiento mediado por las fimbrias superficiales (también llamadas pilis), las imágenes de ETEC por medio de microscopía electrónica de barrido revelan gran cantidad de fimbrias peritricas distribuidas alrededor de la bacteria, a menudo pueden observarse múltiples morfologías fimbriales en la misma bacteria.⁵⁴ Un gran número de antígenos fimbriales han sido caracterizados, aunque las fimbrias de algunas cepas de ETEC no han sido identificadas aún, claramente la existencia de una gran heterogenicidad antigénica producida por la gran cantidad de fimbrias es un obstáculo para producir una vacuna eficaz.



Las cepas de ETEC patógenas para los humanos son capaces de expresar sus propias fimbrias de colonización, las CFAs.¹⁵ La terminología de las CFAs es confusa e inconsistente, sin embargo, han propuesto un esquema uniforme que enumera cada CFA acorde con el año de su descripción inicial,²⁷ el número es precedido por las iniciales CS, por los antígenos de superficie de *E. coli*.

El CFA puede subdividirse basándose en su morfología. Existen tres variedades morfológicas principales: barras rígidas, barras flexibles que forman manojos y estructuras delgadas flexibles y nervudas. La fimbria CFA/I es el prototipo de fimbria en forma de barra rígida, se compone de una sola proteína con una apretada conformación helicoidal.⁶¹ Las CFA/II y CFA/IV son fimbrias compuestas por múltiples estructuras de fimbrias distintas, las productoras de CFA/II expresan la estructura flexible CS3 ya sea sola o en asociación con la barra CS10 CS2.^{54, 88}

Las productoras de CFA/IV expresan CS6 en conjunto con CS4 o CS5.^{10, 45} Un gran número de otras adhesinas menos comunes se ha encontrado en cepas de ETEC,¹⁵ estudios epidemiológicos sugieren que CFA/I, CFA/II o CFA/IV son expresados por aproximadamente el 75% de las cepas de ETEC provenientes de humanos de todo el mundo.⁹⁸

Una fimbria recientemente descrita ha sido llamada “Longus”, ha sido encontrada en una alta proporción de ETEC aisladas en humanos. Los genes de CFA son codificados usualmente por plásmidos que típicamente también expresan las enterotoxinas ST y LT.¹⁵ los típicos genes fimbriales consisten una serie de genes aglomerados que codifican la proteína de la subunidad primaria fimbrial y las proteínas accesorias que requieren para sus procesos, secreción y ensamblaje de la estructura fimbrial.^{15, 37, 42, 48} La pilina es la unidad estructural y usualmente el inmunógeno predominante.



6.6.3 EPIDEMIOLOGIA

E. coli enterotoxigénica está asociada principalmente a dos síndromes clínicos: la diarrea del destete, en niños de países en vías de desarrollo, y la diarrea del viajero. El modelo epidemiológico de la diarrea por ETEC está determinado en gran medida por diversos factores como: 1). La inmunidad creada en la mucosa intestinal por ETEC en exposiciones individuales. 2). Individuos aún inmunes y asintomáticos pueden deshacerse de una gran cantidad de microorganismos virulentos de ETEC en las heces. 3). Las infecciones requieren una cantidad relativamente grande de inóculo.

Estos tres factores crean una situación en la cual la contaminación del ambiente por ETEC en áreas endémicas provoca infecciones en extremo frecuentes, la mayor parte en infantes de tales áreas en el periodo del destete. En un estudio hecho en Morelia, México en 2006 por Sánchez Cruz, donde se asocia la prevalencia de *E. coli* con Rotavirus se demostró que ETEC representa el 44% del total de cepas de *E coli* aisladas.⁷⁴

El porcentaje de casos de diarrea esporádica infantil que se debe a ETEC, por lo general varía de 10 a 30%.^{2, 26, 31, 51, 55, 85, 93} Los niños en edad escolar y adultos tienen una incidencia típicamente baja de infecciones sintomáticas por ETEC. Existen investigaciones epidemiológicas para ETEC que relacionan como principales fuentes de contagio a comida y agua contaminadas que posteriormente son ingeridos con una cantidad suficiente de microorganismos como para causar una infección.



6.7 *ESCHERICHIA COLI* ENTEROHEMORRÁGICA (EHEC)

Escherichia coli enterohemorrágica resulta ser de gran importancia no solo como agente causal de diarrea en todo el mundo, sino también por jugar un importante papel en la prevención de todo tipo de enfermedades diarreicas, ya que a partir de algunas epidemias de esta bacteria, específicamente el serotipo O157:H7 en hamburguesas de una importante cadena de comida rápida y en jugo de manzana no pasteurizado que le costaron al gobierno estadounidense varios millones de dólares y produjo centenas de enfermos se reformo la ley para aumentar la temperatura de cocción de las hamburguesas, además se implemento la aplicación del sistema HACCP (análisis de peligros y puntos críticos de control).

El reconocimiento de EHEC como una clase distinta de *E. coli* patógena es el resultado de dos investigaciones epidemiológicas.⁶² La primera fue en 1983 por Riley y cols.⁷² Que investigo dos brotes gastrointestinales distintivos caracterizados por severo dolor abdominal con retorcijones, diarrea acuosa, seguida de diarrea con sangre macroscópica, y poca o ninguna fiebre. A esta enfermedad se le designo “Colitis hemorrágica” (CH), misma que se asocio con la ingesta de hamburguesas mal cocidas en una cadena de comida rápida. Los cultivos de heces de esos pacientes produjeron aislados rara vez encontrados anteriormente de *E. coli* serotipo O157:H7.

La segunda clave fue la observación de Karmali y cols.⁴⁴, también en 1983 que reporto la asociación de casos esporádicos de “Síndrome Urémico Hemolítico” (HUS o SHU) con citotoxinas producidas por *E. coli* en heces fecales. El SHU (está definido por la triada de falla renal aguda, trombocitopenia y anemia microangiopática hemolítica) que como era conocido son precedidos por enfermedades diarreicas sin sangre distinguible (Colitis Hemorrágica). Estas dos observaciones clínicas microbiológicas que se basan en un serotipo raro de *E. coli* y otro basado en la producción específica de toxinas, dieron lugar al descubrimiento de este patotipo causante de enfermedad intestinal y renal.

6.7.1 PATOGENICIDAD

La mayoría de los trabajos sobre los factores de patogenicidad de EHEC se han centrado en la toxina Shiga (STX) que están codificados en un bacteriófago insertado en el cromosoma tal como se observa en la

Figura 3. Factores adicionales de virulencia potencial están codificados en el cromosoma y en un plásmido de aproximadamente 60-MDa encontrado en EHEC.

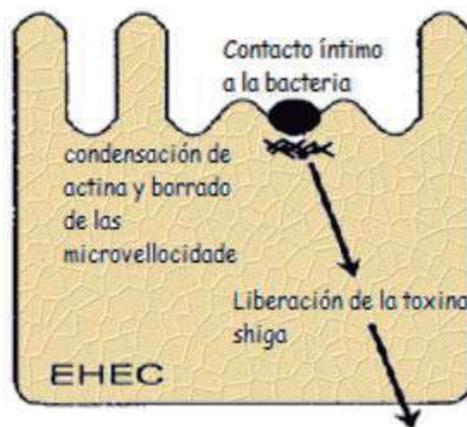


Figura 3. Esquema del mecanismo de patogenicidad de EHEC.
Nataro y Kaper 1998.

6.7.2 HISTOPATOLOGÍA

La característica clásica histopatológica intestinal de EHEC incluye hemorragia y edema en la lámina propia, el edema y la hemorragia submucosa en el colon ascendente y transversal se puede manifestar como una "impresión" patrón en radiografías con enema de bario.^{7, 30, 72} Muestras de biopsia colónica de muchos



pacientes muestran necrosis focal y la infiltración de neutrófilos. El patrón general se asemeja a una combinación de isquemia y lesiones infecciosas descritas en *Clostridium difficile* medida por toxinas y asociado a colitis.²⁹

La respuesta celular que conduce a la histopatología por EHEC no se ha estudiado tan a fondo como en el caso de EPEC. Las grandes concentraciones de actina polimerizada que se ha visto en las lesiones de la mucosa por EHEC, y el aumento de los niveles de calcio intracelular y el IP3 (inositol trifosfato) pueden ser observados claramente.^{35, 46} Sin embargo, en contraste con las cepas de EPEC, las cepas de EHEC difieren en la inducción de la fosforilación de tirosina por las proteínas del epitelio intestinal.³⁵

Es interesante que cepas de EHEC eae-negativas que supuestamente carecían de locus de borramiento del enterocito (LEE) eran capaces de seguir aumentando el calcio intracelular, sin embargo las lesiones tipo A/E (adherencia y eliminación) no fueron observadas. Esto sugiere que existen algunas diferencias en las respuestas celulares a la EPEC y la respuesta a EHEC.³⁵

Como se ha descrito para EPEC, el LEE de 35-kb que le confiere fenotípicamente el tipo de lesión A/E para EPEC se presenta en *E. coli* enterohemorrágica. El LEE de EHEC contiene genes que codifican para la intimina, las proteínas secretadas EspA y EspB, y un tipo de vías de secreción tipo III.^{38, 57} (Figura 4)

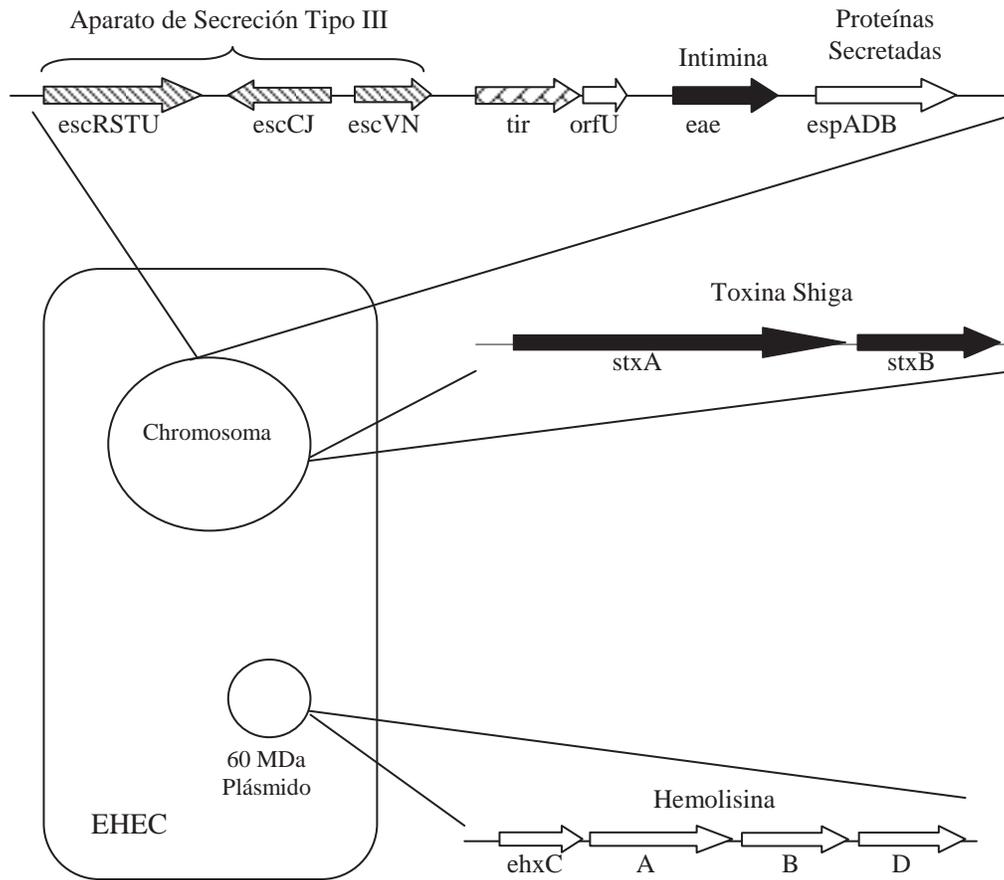


Figura 4. Los genes involucrados en la patogénesis de EHEC

Son similares a los implicados en la de EPEC, excepto por la presencia de la fago Stx codificado en el cromosoma de EHEC y la presencia característica del plásmido de 60-MDa de EHEC en lugar del plásmido EEP de EPEC. El plásmido de EHEC se sabe que codifican para la enterohemolisina (ehx), así como un antígeno fimbrial potencialmente implicado en la colonización.(Nataro y Kaper 1998)



6.7.3 TOXINAS SHIGA (STX)

El principal factor de virulencia y una definición característica de EHEC, es la presencia de la enterotoxina Stx. Esta es una potente toxina que conduce a la muerte y muchos otros síntomas en los pacientes infectados con EHEC.^{67, 68, 86, 91} A esta toxina también se le conoce como verotoxina por la capacidad de que posee para producir lesiones en las células VERO.

6.7.4 TOXINA EAST1

Se describió por primera vez en EAEC pero también se encuentra en muchas cepas de EHEC. La importancia de EAST1 en la patogénesis de la enfermedad producida por EHEC es desconocido, pero probablemente podría explicar algunos síntomas de la diarrea sin sangre presente en la infección con EHEC.⁶¹

6.7.5 ENTEROHEMOLISINA

El plásmido de 60MDa que se encuentra comúnmente en EHEC contiene genes que codifican para una hemolisina (enterohemolisina).⁸⁴ La enterohemolisina se encuentra en casi todos los miembros del serotipo O157:H7 y está ampliamente distribuido entre los serotipos de *E coli* no-O157 productoras de Stx. El papel de la hemolisina sigue siendo objeto de especulación, podría ser la lisis de eritrocitos y liberación de hemoglobina y hemo, pudiendo servir como fuente de hierro para *E. coli*.



6.7.6 FACTORES DE ADHERENCIA INTESTINAL

El único factor de adherencia potencial de EHEC que ha demostrado jugar un papel en la colonización del epitelio intestinal in vivo en modelos animales es la proteína de membrana externa; intimina de 94 a 97KDa, codificada por el gen eae. Que produce extensas lesiones A/E en el intestino grueso, con una íntima adherencia de la bacteria con el tejido epitelial. Por el contrario, cepas de EHEC con mutaciones específicas del gen eae no producen lesiones del tipo A/E, de hecho no parecen colonizar el intestino.^{17, 58, 96}

La existencia de factores de adherencia diferentes a intimina es sugerida por la existencia de cepas de *E. coli* productoras de Stx diferentes a O157:H7 que no tienen el gen eae pero aun están relacionadas con diarrea sanguinolenta o SUH en humanos.

6.7.7 PLÁSMIDO PO157.

Todas las cepas de *E. coli* O157:H7 poseen un gran plásmido conservado, designado pO157, que varía en tamaño entre 96.6 a 104kb.^{82, 83} Este plásmido también se encuentra presente en otros serotipos distintos a el O157:H7, por ejemplo; casi todos los miembros del serotipo O26:H11, pero no lo presentan todos los productores de Stx aislados de humanos.^{5, 53} Un fragmento de este plásmido de 3 o 4kb codifica para una enterohemolisina.⁸⁴ Además de la enterohemolisina y los posibles factores de adherencia descritos anteriormente, el plásmido codifica una peroxidasa. Los reportes del papel que juega el plásmido en la adhesión celular son muchos, pero todos ellos contradictorios.



6.7.8 TRANSPORTADOR DE HIERRO.

EHEC contiene un sistema de transporte para hierro sumamente especializado que le permite a este microorganismo utilizar hemo o hemoglobina de los eritrocitos como fuente de hierro.⁹⁵ Una proteína de membrana externa de 69KDa codificada por el gen *chuA* (*E. coli* heme utilization o utilización de hemo por *E. coli*), que se expresa por condiciones donde se encuentra limitada la cantidad del hierro. La simple presencia de esta proteína es suficiente para que EHEC utilice el grupo hemo como fuente de hierro.⁹⁵

6.7.9 SEROTIPOS NO O157:H7.

La mayoría de los brotes de infección por EHEC han sido causados por O157:H7, lo que sugiere que este serotipo es más virulento o se transmite más que otros. Sin embargo, otros serotipos productores de Stx se han implicado tanto en enfermedad esporádica como en brotes, y la incidencia de enfermedad por otros serotipos se considera en aumento.³⁹

El cuadro clínico causado por las cepas no-O157 se caracteriza por diarrea acuosa con dolor abdominal y colitis hemorrágica. Las cepas no-O157 son capaces de causar brotes o casos aislados de diarrea y en ocasiones no se logra establecer la fuente de contaminación, aunque se sabe que se pueden aislar de los mismos alimentos que las cepas de serotipo O157:H7.^{75, 76}

Los mecanismos de patogenicidad de las cepas EHEC no-O157:H7 incluyen la presencia de la toxina Stx, también tienen el fenómeno de A/E expresado por el gen *eae* y la presencia del plásmido pO157.



6.7.10 EPIDEMIOLOGIA

Escherichia coli enterohemorrágica como cualquier otro organismo patógeno emergente hace que los investigadores se planteen si es un organismo que acaba de surgir recientemente o siempre ha existido y todo el tiempo paso desapercibido. *E. coli* serotipo O157:H7 fue reconocido como causante de colitis hemorrágica, el CDC (Centro para el Control y Prevención de Enfermedades) hizo una revisión de 3000 cepas de *E. coli* entre 1973 y 1983, identificando solo un aislado del serotipo O157:H7.⁷²

El laboratorio de Salud Pública del Reino Unido también identificó solo un aislado de este serotipo en 15000 cepas aisladas de CH entre 1978 y 1982, y el Laboratorio para el Control de Enfermedades en Canadá encontró 6 cepas del serotipo O157:H7 entre 2000 aislados de pacientes con diarrea entre los años 1978 y 1982.^{29, 41} Lo que nos indica que la presencia de estas cepas se ha incrementado con el transcurso de los años.

Entre los primeros brotes más conocidos se encuentra el producido por el consumo de hamburguesas poco cocidas en una cadena de comidas rápidas en los E.U., en 1993. Este brote produjo 700 enfermos, 4 muertos y tuvo un costo de 110 millones de dólares. En Argentina los hallazgos en carne picada son de 3.8 % sobre muestras tomadas en carnicerías.⁷³ En México existe poca información acerca de brotes causados por cepas de *E. coli* enterohemorrágica, la mayoría de la información es de aislados de alimentos, principalmente en carnes, que no deja de ser importantes como posible causa de enfermedad.



6.8 *ESCHERICHIA COLI* ENTEROAGREGATIVA (EAEC)

Escherichia coli enteroagregativa se le reconoce cada vez con mayor frecuencia como causa de diarrea en niños. El método de referencia para su identificación es la comprobación del patrón típico agregativo en el ensayo de adherencia en cultivos de células HEp-2. El fenotipo agregativo está asociado con factores de virulencia fimbriales (AAF/I y AAF/II) y citotoxinas (EAST1 y citotoxina codificada en el plásmido ó “Pet”). A las cepas de EAEC se les reconoce por poseer un patrón agregativo que asemeja “ladrillos apilados” en cultivos de células epiteliales.

La patogénesis de la enfermedad causada por EAEC no se ha entendido del todo aún. Las alteraciones celulares en ensayos *in vitro* y modelos animales sugieren que el daño en la mucosa intestinal está relacionado con la adherencia mediada por adhesinas y la producción de toxinas.⁹⁷ Además, diferentes observaciones indican que durante la infección producida por EAEC se presenta la liberación de mediadores inflamatorios, su presencia en heces sugiere que pudieran contribuir por un lado al daño del tejido y por consecuencia a la enfermedad intestinal. Como parte de los factores de virulencia de las cepas de EAEC, se ha señalado la existencia de una isla de patogenicidad que le fue transferida por el grupo evolutivo de *Yersinia pestis*.

Entre los genes que presenta dicha isla, se encuentran algunos genes que se relacionan con sistemas de captación y transporte de hierro. El uso de métodos moleculares para la detección de genes codificadores de adhesinas y/o toxinas presentes en el plásmido o cromosoma, han sido de utilidad para la caracterización y la realización de estudios epidemiológicos de EAEC. La observación de Cravioto.¹³ de la adherencia de EPEC por Hep-2 fue importante no solo para EPEC, sino que sirvió como base también para el descubrimiento de por lo menos otras dos categorías de *E. coli* diarreagénicas, entre ellas EAEC.



Scarletsky y Nataro.^{65, 81} examinaron las colecciones de *E. coli* a partir de estudios de diarrea en países en vías de desarrollo, y similar a lo observado por Cravioto, la mayoría de las cepas de EPEC se adherían a las células Hep-2. Sin embargo, estos investigadores además pudieron demostrar que muchas cepas de *E. coli* que no fueron de los serogrupos de EPEC también fueron capaces de adherirse a células Hep-2, además de que esta adhesión se diferencia fenotípicamente de la adhesión característica de EPEC.

Los serotipos de cepas de *E. coli* no –EPEC no se adherían en este patrón de microcolonias característico, en vez de eso presenta un fenotipo descrito inicialmente como adherencia difusa (DA). Estas cepas de *E. coli* fueron negativas con la prueba EAF para EPEC. Tomando en cuenta estas observaciones, Nataro y cols.⁶⁶ examinó las propiedades de adhesión de la Hep-2 de las cepas de *E. coli* aisladas de las heces de 154 niños con diarrea y 66 controles de pacientes sanos en Santiago de Chile.

En el curso de este estudio, estos investigadores fueron capaces de subdividir la adherencia “difusa” en dos nuevas categorías fenotípicas diferentes: agregativa y difusa. La adherencia agregativa (AA), fue distinguida por autoaglutinación prominente de las células bacterianas, uniéndose las unas a las otras, lo que a menudo se produce en la superficie de las células, así como sobre el cubreobjetos libres de células Hep-2, sin embargo, la principal característica fue la estratificación de las bacterias descrito como una configuración de ladrillos apilados.

Posteriormente se propuso una nueva categoría de cepas diarreagénicas de *E. coli*, los autores acuñaron el término *E. coli* enteroadherente-agregativa más tarde abreviado a *E. coli* enteroagregativa (EAEC) para describir las cepas que expresan AA. Las cepas de EAEC también se pueden definir como cepas de *E. coli* que no producen o secretan enterotoxinas del tipo LT o ST y que se adhieren

a células y laminillas libres de células Hep-2 en un patrón de AA. Es probable que esta definición abarque ambos clones, patógenos y no patógenos que comparten factores que les confiere un fenotipo común.⁶⁴

6.8.1 PATOGENIA

La patogénesis de la infección por EAEC no se entiende bien aun. Sin embargo, una lesión histopatológica característica y varios factores de virulencia se han descrito como candidatos de la patogenicidad de dicha bacteria. En el mecanismo de patogenicidad de EAEC están implicadas la bacteria y diversas moléculas que ella produce; también se sabe que las cepas EAEC tienen la capacidad de incrementar en la mucosa intestinal la producción y secreción de moco que atrapa a las bacterias que se autoaglutinan en una fina película en el epitelio intestinal (biofilm). La producción de moco puede estar relacionada con la capacidad de EAEC para colonizar persistentemente el intestino y causar diarrea, en la Figura 5 se muestra un mecanismo de patogenicidad propuesto para EAEC. En el plásmido de 60 MDa de EAEC también se encuentran los genes que codifican para la toxina EAST1.^{75, 76}

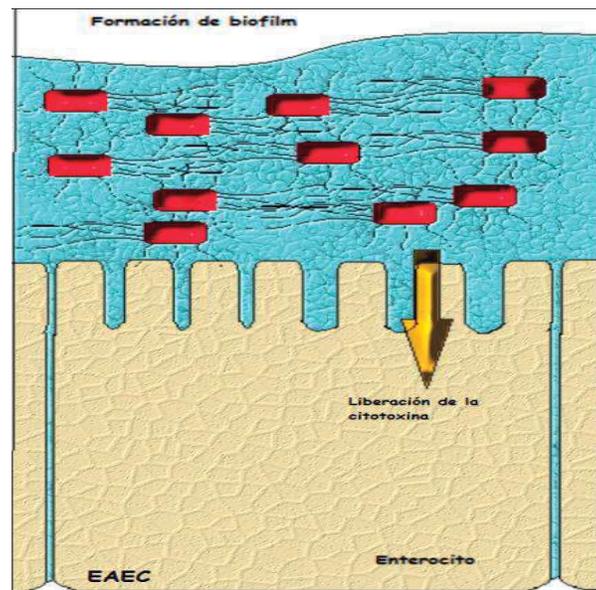


Figura 5. Esquema representativo de la formación de biofilm e internalización de la toxina EAST1 de EAEC en el enterocito. Nataro y Kaper 1998.



6.8.2 HISTOPATOLOGÍA

Las cepas EAEC característicamente inducen la secreción excesiva de moco por la mucosa intestinal, con la captura de las bacterias en un biofilm bacteria-moco en algunos modelos animales.^{95, 96} Extensos estudios develaron la presencia de un gran número de bacterias en una densa agregación dentro del biofilm, además, el epitelio intestinal muestra picaduras en células caliciformes, lo que sugiere la estimulación de la mucosa que conlleva a una hipersecreción de moco.

La capacidad de EAEC para unirse al moco ha sido demostrada in vitro en estudios realizados en voluntarios que fueron alimentados con cepas de EAEC presentando por consecuencia un cuadro de diarrea que es principalmente mucoso. La función de la producción en exceso de este moco en la patogénesis de la EAEC no es clara, sin embargo, puede ser relacionado con la diarreogenicidad del organismo y tal vez tenga que ver con la capacidad del microorganismo para la colonización del epitelio intestinal y la participación en la diarrea persistente.⁶¹

Adicionalmente a la producción del característico biofilm mucoide producido por este patotipo, existe evidencia experimental que sugiere que las infecciones causadas por EAEC se acompañan por un efecto citotóxico causado a la mucosa intestinal. Vial et al. Fue el primero en mostrar este tipo de lesiones causadas por EAEC en modelos animales como ratas y conejos dando como resultado un destructivo daño que es demostrable con microscopia óptica. La lesión se caracteriza por el acortamiento de las vellosidades, necrosis hemorrágica de las puntas de las vellosidades y una respuesta inflamatoria leve con edema e infiltración mononuclear de la submucosa.



6.8.3 ADHERENCIA

El fenotipo AA de las cepas EAEC se ha estudiado a detalle. Se ha identificado una estructura flexible ó paquetes de formación fimbriales de 2 a 3nm de diámetro, designadas fimbrias de adherencia agregativa I (AAF/I). Las AAF/I median la adherencia a HEP-2 y la hemoaglutinación de eritrocitos humanos por la cepa 17-2. Los genes de la AAF/I se organizan como dos grupos de genes por separado en el plásmido de 60-MDa de la cepa 17-2.^{62, 63, 80}

La región 1 contiene un conjunto de genes necesarios para la síntesis y ensamblaje de las fimbrias, incluyendo la subunidad estructural de la fimbria. Así mismo el análisis de la secuencia de nucleótidos de la región 1 sugiere que AAF / I es un miembro de la familia D.R. de adhesinas, llamado así por que median la adhesión al antígeno del grupo sanguíneo D.R.⁸⁰ La región 2 codifica un activador transcripcional de la expresión de AAF/I que muestra homología con los miembros de la familia de proteínas AraC de unión al ADN.⁶³

Los genes que codifican AAF/II también se organizan como dos regiones completamente independientes. Este último grupo cuenta con la organización típica de la familia del antígeno D.R. es probable que existan todavía más adhesinas AA presentes en este patotipo, pero esto no está demostrado todavía.

Toxina EAST1.

Mientras estudiaba el plásmido de la cepa 17-2, Savarino. identificó un marco de lectura abierto que codifica para un producto de 4100-Da homólogo a la toxina ST.^{77, 78} El producto de este gen, EAST1, es una proteína 38-aminoácidos que cuenta con cuatro residuos de cisteína, a diferencia de las seis características de los residuos de *E. coli* ST. EAST1 se ha encontrado en aprox. 40% de las cepas EAEC.⁷⁹



6.8.4 CITOTOXINAS

Los efectos tóxicos observados en modelos animales, células intestinales humanas y en las células T84 no van acompañados por la internalización de la bacteria o por adherencia íntima. Por lo tanto, varios grupos han intentado identificar citotoxinas secretadas en cepas de EAEC. Eslava y cols. identificó una citotoxina de 108-kDa que provoca lesiones destructivas en ratas.²³ Esta proteína fue reconocida por el suero de pacientes infectados con EAEC en un brote producido en México.

Los datos recientes sugieren que esta proteína es un miembro de la familia de proteínas de autotransporte.⁴² Esta proteína presenta actividad enterotóxica en la cámara de Ussing.⁶³ Y puede producir aumentos en los niveles de calcio intracelular en células HEp-2.⁴ Un papel para el calcio como segundo mensajero de una toxina de EAEC se apoya en el modelo celular T84, en la que las microvellosidades se pierden a través de la vesiculación de membrana.^{56, 66}

6.8.5 MODELO DE LA PATOGENIA DE EAEC.

Se ha propuesto un modelo in vitro basado en tres etapas y en datos obtenidos en animales. Etapa I; consiste en la adhesión inicial a la mucosa intestinal y / o la capa de moco. AAF/I y AAF/II, que son los principales candidatos como factores que pueden facilitar la colonización inicial. La etapa II implica una mayor producción de mucosidad, al parecer, llevaba al depósito de una gruesa capa de moco que contiene un biofilm conteniendo a las bacterias EAEC. Tal vez la capa de moco puede funcionar como promotora de la colonización persistente y mala absorción de nutrientes. La etapa III, sugerida desde ensayos histopatológicos y moleculares, incluye la producción de una citotoxina, lo que resulta en daño a las células intestinales.⁶³



6.8.6 EPIDEMIOLOGIA

Escherichia coli enteroagregativa (EAEC) es un patógeno emergente. Un gran número de estudios realizados con cepas de EAEC, indican que puede causar hasta el 66% de este tipo de diarreas en Brasil.^{23, 25} Nuevos estudios han mostrado que estas bacterias pueden, además, ocasionar diarrea aguda, brotes de diarrea tanto en comunidades, así como de tipo nosocomial en diferentes partes del mundo, incluidos países industrializados.

También han sido asociadas como agentes causantes de diarrea en individuos adultos infectados por el virus de la inmunodeficiencia humana. Eslava y cols. han descrito dos brotes de EAEC en diarrea persistente en niños desnutridos en las salas de un hospital de la ciudad de México.²³ A niños que murieron en este brote se les encontraron lesiones necróticas en la mucosa ileal.⁸⁹

6.9 CARACTERIZACIÓN DE BACTERIAS.

6.9.1 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.⁶¹



6.9.2 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, peroxidasa, 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.¹¹⁷

6.9.3 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.¹¹⁸

6.9.4 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, inmunofluorescentes o aglutinantes.⁶¹



En el estudio de los serotipos de *E. coli* actualmente se reconocen 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 prefiere identificar las cepas en base a sus características fenotípicas que evidencien 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 cepa 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.⁶¹

6.9.5 ANÁLISIS FENOTÍPICOS.

ETEC

- Asa ligada de conejo para LT
- Efecto citopático en células CHO, VERO y Y1 para LT

EHEC

- Efecto citopático en células Vero, HeLa causado por STX.

EAEC

- Adherencia agregativa en células Hep-2 y HeLa.



6.10 TÉCNICAS MOLECULARES.

6.10.1 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.

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.⁶¹



6.10.2 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), MgCl₂, 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 ADN 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 $2^1+2^2+\dots+2^{34}+2^{35}=2^{36}$ nuevos fragmentos de los cuales 70 serán fragmentos largos.

6.10.3 CONDICIONES PARA LA AMPLIFICACIÓN.

6.10.3.1 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 5) y a partir de los resultados obtenidos se pueden realizar ajustes.



6.10.3.2 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 fragmentos 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 T_m (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:



6.10.3.3 *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 principio de la electroforesis es 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.¹¹⁸

6.10.4 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 C_t) que se define como el ciclo a partir del cual la fluorescencia es significativa por encima del ruido de fondo (Figura 6) 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).²³

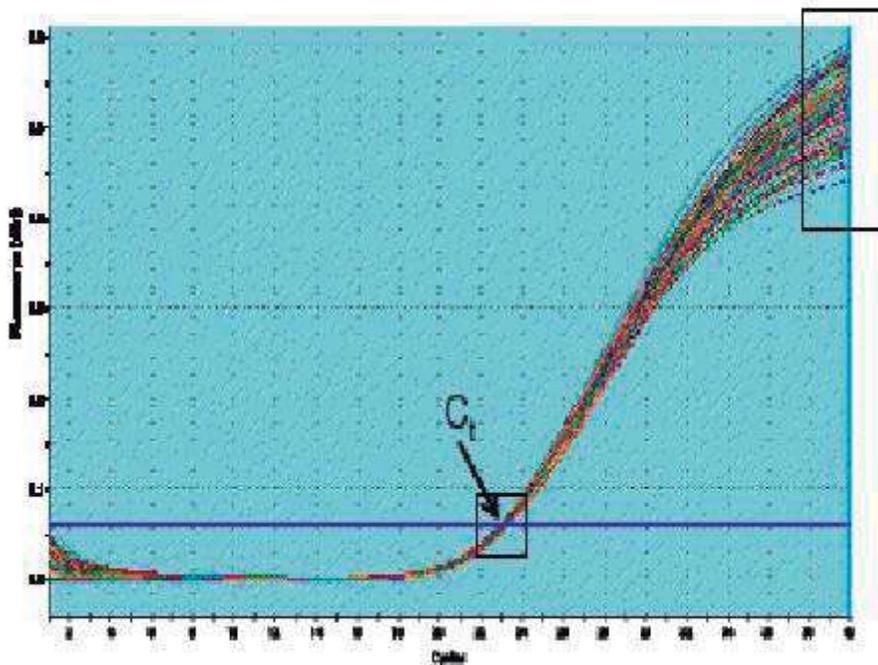


Figura 6. Ejemplo de una amplificación y la localización de los valores de C_t .²³



6.10.4.1 *Mecanismo de acción de los fluoróforos.*

A. 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 (Figura 7). 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 (—).

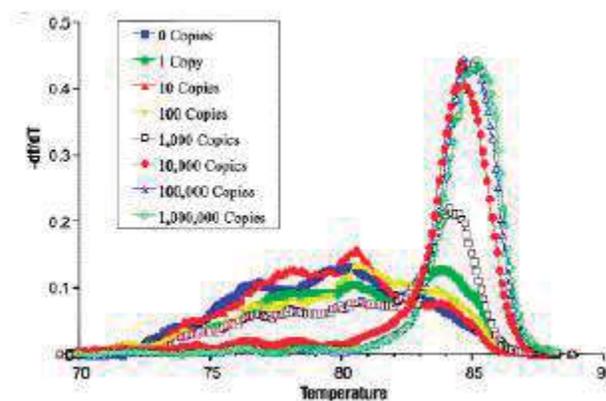


Figura 7. Ejemplo de una curva melting.²³



B. 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 fluoróforo queda libre de la acción supresora del quencher y emite la fluorescencia.²³

6.11 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 8).¹²⁴

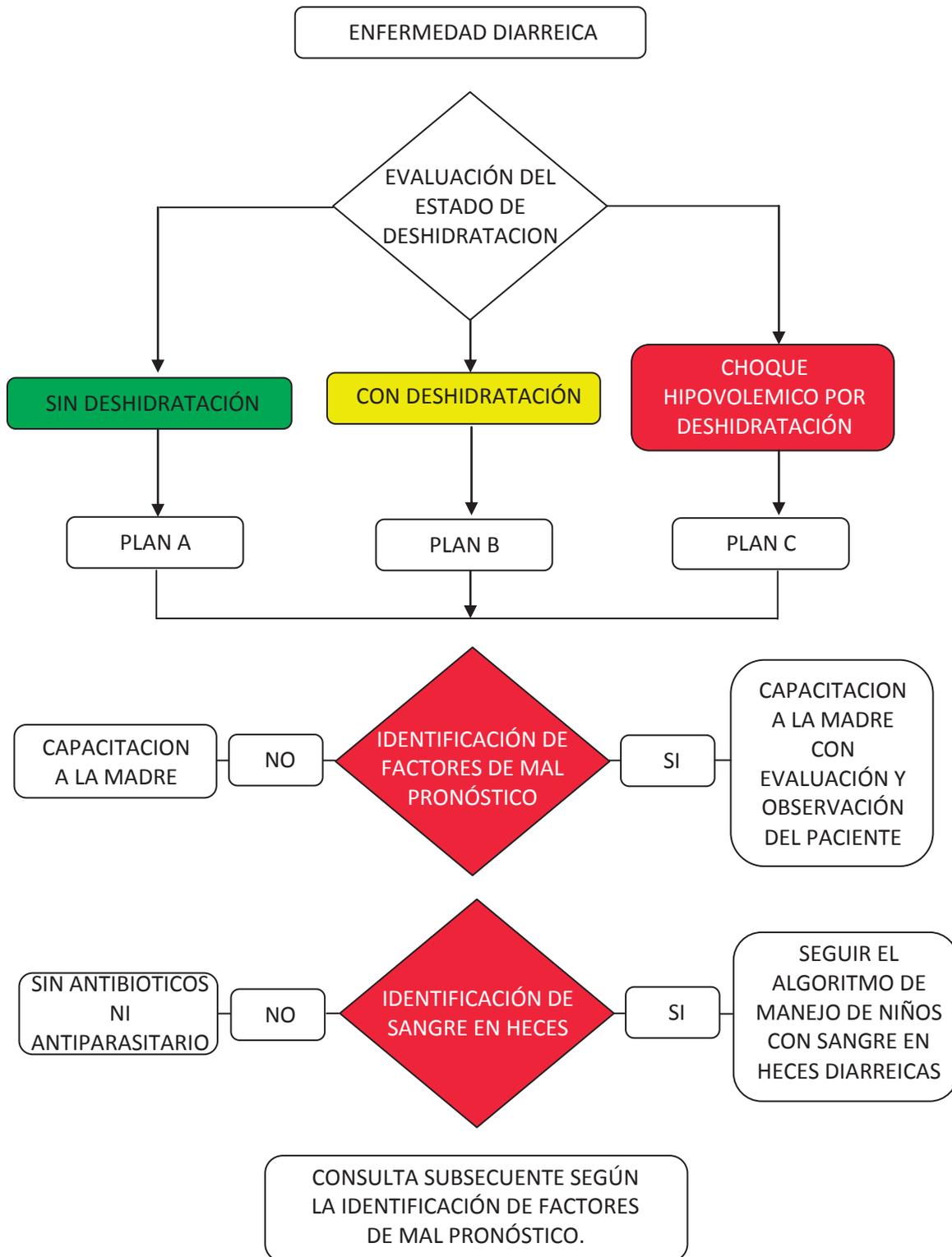


Figura 8. Manejo de Diarreas.¹²⁴



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 9):

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.¹¹⁴ Por lo tanto solo debe manejarse la terapia con antibióticos en caso de ser necesario.

6.11.1 LOS ANTIBIÓTICOS NO DEBEN EMPLEARSE DE MANERA RUTINARIA DEBIDO A LAS SIGUIENTES CONSIDERACIONES.¹²⁴

- 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).

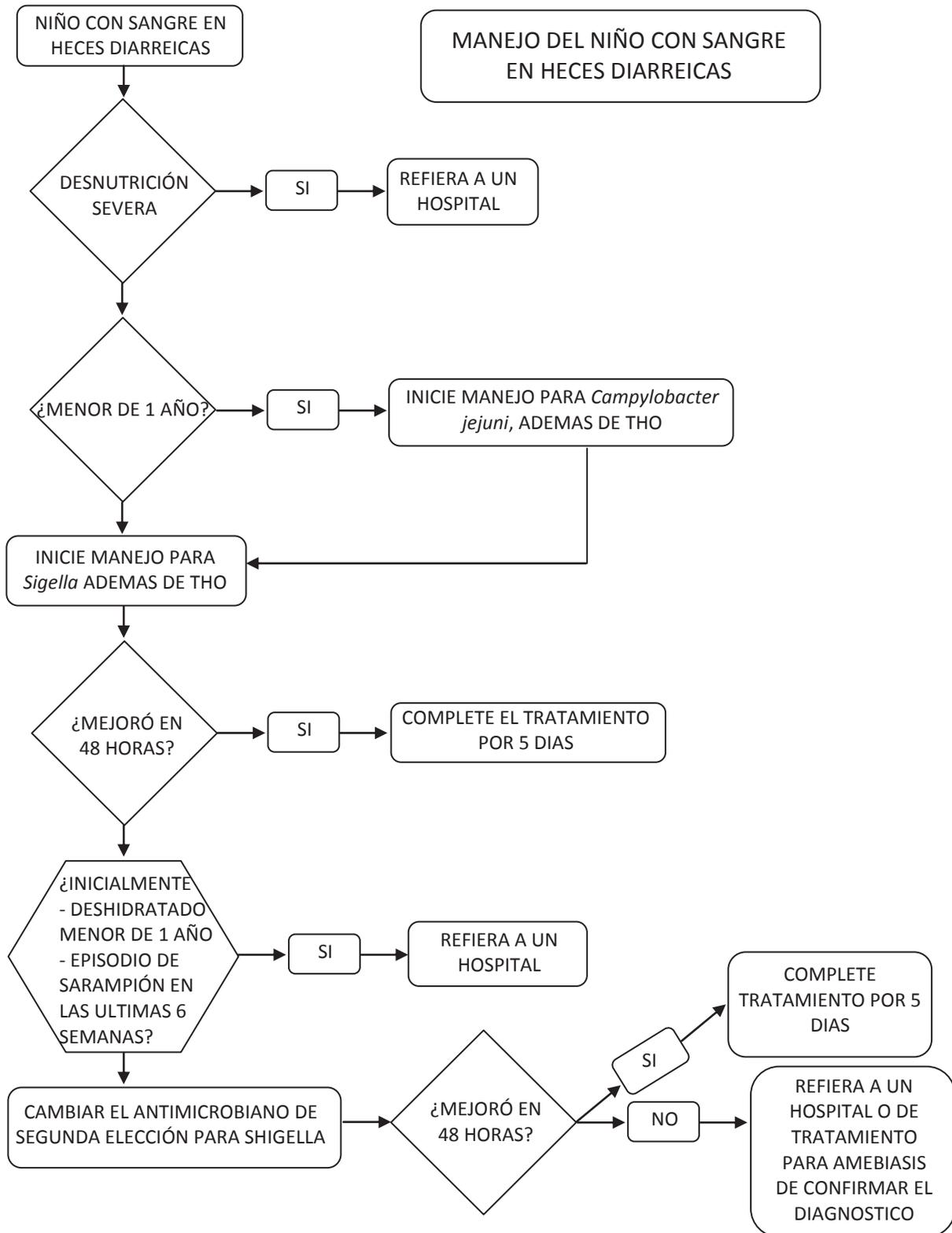




Figura 9. Manejo de Diarreas en Niños con Sangre en Heces.¹²⁴

6.11.2 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.

Tomando en cuenta lo anterior, existen casos en los que no es suficiente la terapia de rehidratación oral, en estos casos es necesario administrar antibióticos para eliminar la bacteria causante del padecimiento diarreico.

6.11.3 TRATAMIENTO Y PREVENCIÓN DE LAS DIARREAS.

Los antibióticos son moléculas con actividad antimicrobiana, que incluyen una gran cantidad de compuestos pertenecientes a diferentes familias químicas mostradas en la Tabla 2.



Los principales antibióticos indicados en las diarreas son (Tabla 3), el Trimetroprim con sulfametoxazol, Ampicilina, Amoxicilina, pero actualmente se buscan alternativas para los tratamientos diarreicos, algunas alternativas para el tratamiento antimicrobiano son; Cefexime, Ceftibutem y Fosfomicina.

Clasificación de Antibióticos			
Estructura Química	Betalactámicos Aminoglucósidos Glicopéptidos Rifamicinas Nitroimidazoles Estreptograminas	Macrólidos Kétolidos Polipéptidos Tetraciclinas Nitrofuranos Oxazolidinonas	Quinolonas Licosamidas Cloramfenicol Sulfamidas Trimetroprim
Mecanismo de acción	<ul style="list-style-type: none"> ● Inhibidores de la Síntesis de Ácidos Nucleicos Nitroimidazoles, Nitrofuranos, Quinolonas y Rifamicinas ● Interfieren en la síntesis de proteínas Mupiricina, Aminoglucósidos, Tetraciclinas, Cloramfenicol, Macrólidos, Kétolidos, Lincosamidas, Estreptograminas, Ácido fusídico, Oxazolidinonas. ● Alteran la función de la membrana citoplasmática Polipéptidos y Poliénicos ● Inhibidores de la síntesis de peptidoglicano Fosfomicina, Glicopéptidos, Betalactámicos, mureidomicinas. ● Inhibidores de la síntesis de cofactores de metabólicos Sulfonamidas y Trimetroprim ● Inhibidores de enzimas inactivadoras de antibióticos Inhibidores de las betalactamasas (Ácido clavulánico, Sulbactam, Tazobactam. 		

Tabla 2. Clasificación de los Antibióticos.^{116.}

6.11.3.1 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 dihidrofólico, que convierte el ácido dihidrofólico a ácido tetrahidrofólico un paso clave en la síntesis de purinas.



Antibióticos utilizados en el tratamiento de las principales causas bacterianas de diarrea aguda. ¹²⁴			
Microorganismo	Antibiótico 1 ^o elección	Antibiótico 2 ^o 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, pero el 50% de las cepas es resistente. 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)
	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		Sólo se indica su uso en diarrea moderada a severa o persistente
E. coli enteropatógena	TMP-SMX 10 mg/kg/día, en 2 dosis x 5 días, VO		
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 TMP/SMX, 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 días, 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 3. Antibióticos utilizados en el tratamiento de las principales causas bacterianas de diarrea aguda.¹²⁴

6.11.3.2 **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-acetilmurámico, 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 -lactámicos 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.

6.11.3.3 **Cefexime y Cefitibutem.**

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.⁴⁶

6.11.3.4 **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.¹¹⁵



Otra alternativa para el tratamiento, pero sobre todo para la prevención de las diarreas es la administración de medicamentos o alimentos que en su formulación presentan bacterias que son beneficiosas para el tracto digestivo del ser humano, dichas bacterias son denominadas como probióticos.

6.11.3.5 **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.¹²⁰



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.

6.11.3.6 **Rececadotrilio**

El racecadotrilio 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 racecadotrilio es un promedicamento que se hidroliza rápidamente y se transforma en su metabolito activo (tiorfano), cuyo efecto inhibitor de la encefalinasa prolonga la acción fisiológica de las encefalinas endógenas y, como consecuencia, reduce la secreción de agua y electrolitos 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.^{121, 122}

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



6.11.3.7 **Suplementos de zinc.**

El zinc es un micronutriente 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.¹²⁴

6.11.3.8 **Vacunas**

En los últimos años se ha trabajado en el diseño de una vacuna que actúe en para los serotipos más comunes de *Escherichia coli*, en la actualidad existen 2 vacunas, la primera dirigida a los factores de adhesión CFA/I y a la subunidad B de la toxina colérica, esta vacuna por tanto actuara protegiendo de la mayoría de los serotipos de ETEC, la otra vacuna está dirigida solo hacia el serotipo O157:H7 de EHEC.



7 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, siendo *Escherichia coli* la principal causa del padecimiento, por lo que su búsqueda, identificación y patotipificación molecular son imprescindibles para su identificación como patógeno.



8 JUSTIFICACIÓN.

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

Aunque la mortalidad de la enfermedad diarreica ha disminuido no ha sido así con la morbilidad ya que se estima que en México un niño presenta de 2 a 4 episodios de diarrea por año.

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 de \$289.00 USD, los cuidados de hospitalización y seguimiento ambulatorio para un paciente con diarrea resulta en un costo aproximado de 2 billones de dólares per cápita al año.¹¹¹

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). 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 histolítica*, *Vibrio sp.* y *Giardia lamblia* por lo que la infección por *Escherichia coli* solo sería tratada con terapia de rehidratación.¹¹¹



9 HIPOTESIS.

El patotipo de *Escherichia coli* más frecuentemente asociado a enfermedad diarreica en el estado de Michoacán es *E. coli* enterotoxigénica.



10 OBJETIVOS

10.1 OBJETIVO GENERAL:

Patotipificación molecular de *Escherichia coli* enterotoxigénica, enterohemorrágica y enteroagregativa de pacientes con síndrome diarreico.

10.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Identificación bioquímica de *Escherichia coli* aislada de pacientes con síndrome diarreico
- Identificar la prevalencia en la población de *Escherichia coli* enterotoxigénica, enterohemorrágica y enteroagregativa
- Relacionar la presencia de los patotipos con el cuadro clínico
- Realizar un análisis de resistencia a los antibióticos por medio de pruebas de susceptibilidad.
- Implementar un protocolo de detección de patotipos de *E. coli* en el LESP del estado de Michoacán.



11 IDENTIFICACIÓN DEL ESTUDIO.

El presente es un estudio longitudinal, experimental y ambispectivo que fue realizado en la ciudad de Morelia Michoacán, el universo de trabajo fueron 184 aislados clínicos muestreados en el periodo comprendido entre Octubre del 2009 y Abril del 2010.

Los criterios de inclusión fueron: Muestras provenientes de pacientes ambulatorios, menores de 5 años con síndrome diarreico, sin otra enfermedad asociada y con todos los datos de identificación.

Los criterio de exclusión fueron: Muestras de pacientes mayores de 5 años, hospitalizados, con otra enfermedad.

Los criterios de eliminación fueron: Muestras provenientes de pacientes ambulatorios, menores de 5 años con síndrome diarreico, sin otra enfermedad asociada, pero sin los datos de identificación.

Las variables presentes en este estudio fueron:

A. Bacteria.

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

B. Pacientes

- Edad: Cuantitativa discontinua.
- Sexo: Cualitativa
- Procedencia: Cualitativa



Las fuentes de Información utilizadas fueron:

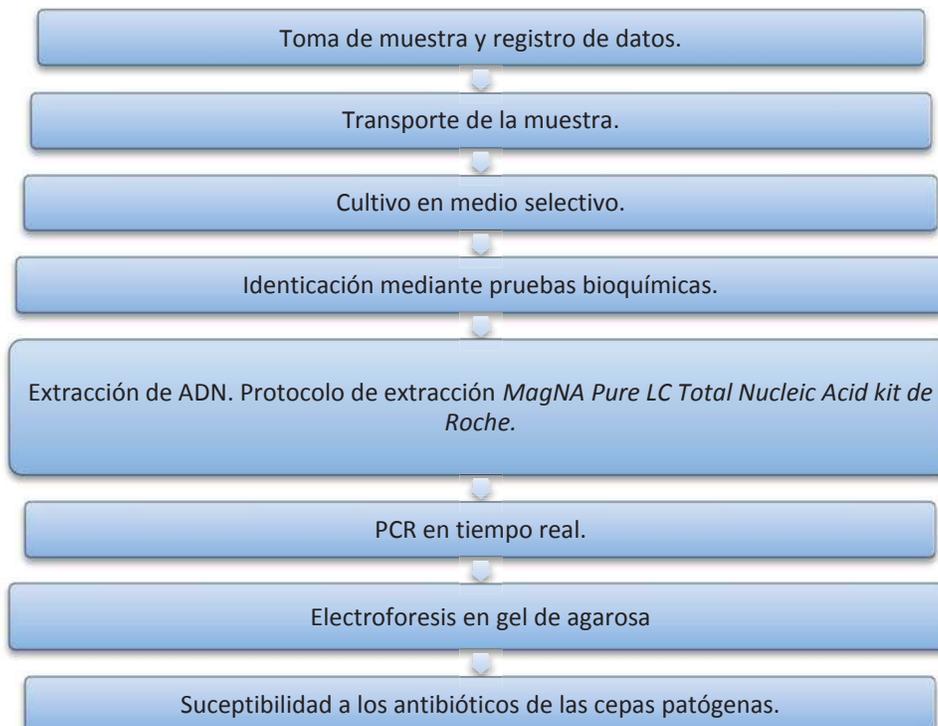
- Bitácora de información del laboratorio de microbiología del Hospital Infantil de Morelia Eva Sámano de López Mateos.
- Bitácora de información del área de bacteriología del Laboratorio Estatal de Salud Pública del estado de Michoacán.
- Bitácora de información del laboratorio de Biología molecular del LESP Michoacán.



12 MATERIALES Y MÉTODOS

Para realizar este estudio se tomaron muestras provenientes del Hospital Infantil de Morelia “Eva Sámano de López Mateos”, y el Laboratorio Estatal de Salud Publica. Se aislaron 184 cepas de *E. coli*, de las cepas aisladas sólo se realizó la extracción de ADN de 100 de ellas, que serían el total de cepas que se patotipificarían por PCR.

12.1 DIAGRAMA DE ACTIVIDADES:





12.2 CARACTERIZACIÓN DE LAS MUESTRAS.

12.2.1 SELECCIÓN DE MUESTRAS

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

12.2.2 TOMA DE MUESTRA.

Las muestras se recolectaron de 2 maneras:

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

12.2.3 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 34).
- Se introduce el hisopo dentro del tubo con el medio de transporte Cary-Blair y se rotula con los datos del paciente.



12.2.4 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.

12.2.5 TRANSPORTE DE LA MUESTRA.

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

12.3 IDENTIFICACIÓN BIOQUÍMICA

12.3.1 COPROCULTIVO.

Se cultivó en medios selectivos agar MacConkey y agar EMB. Se seleccionó 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.

12.3.1.1 Materiales

- Placas de agar EMB
- Placas de agar Mac Conkey
- Asa microbiológica
- Mechero de Bunsen



12.3.1.2 Procedimiento

- Se rotularon las placas con el número de la muestra y las fechas
- Se realizó la descarga de la muestra en los medios de cultivo con un hisopo de algodón en la orilla de cada placa.
- Se realizó el estriado de la muestra por cuadrantes utilizando un asa bacteriológica a no más de 30cm del mechero.
- Las placas se incubaron a 37°C durante 24hrs.
- Después de 24hrs se seleccionaron las colonias características de *E. coli* en cada medio.

12.3.2 IDENTIFICACIÓN BIOQUÍMICA.

Las cepas se identificaron por medio del metabolismo bacteriano de sustratos empleando medios: Hierro triple azúcar, Lisina-Hierro, Citrato, Movilidad-Indol Ornitina, Malonato y Urea, tal como se muestra en el anexo.

12.4 ANÁLISIS Y MANIPULACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEÍCOS.

12.4.1 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 nucleicos 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 está dado por el uso de 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 nucleicos 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 nucleicos 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 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 nucleicos purificados son eludidos de las perlas magnéticas en los pozos de elución mientras que las perlas magnéticas son retenidas y descargadas.

El material genético se extrajo haciendo una dilución del pool de colonias en un tubo con solución salina y ajustando el mismo a una concentración igual al tubo 1 del Nefelómetro de MacFarland (3×10^8 células/mL). Se tomaron 200 μ L de esta dilución y se traspasó a un tubo con caldo Luria Bertani estéril y sin antibiótico, incubándose el mismo durante toda la noche a 37°C en Shaker y teniendo cuidado de dejar las tapas de cada tubo flojas para mejorar las condiciones de aireación.

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 200 μ L de buffer de elución, se procedió a realizar la lisis externa adicionando 200 μ L de buffer de lisis y se tomaron 350 μ L de la solución para cada muestra colocándose en una placa de extracción para posteriormente introducirla en el robot.



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.

12.5 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA

La tipificación de patotipos se llevo a cabo por medio de la amplificación de los genes utilizando la técnica de reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real, SYBR Green I fue utilizado como agente fluorescente intercalante, en el equipo LightCycler 480. Los iniciadores fueron dirigidos hacia los siguientes genes (Tabla 4).¹⁰

Tabla 4. Datos de los primers usados para este estudio			
Designación	Secuencias 5' a 3'	Gen	Tamaño del amplicon (pb)
SK1	CCCGAATTCGGCACAAGCATAAGC	eae	881
SK2	CCCGGATCCGTCTCGCCAGTATTCG		
VTcom-u	GAGCGAAATAATTTATATGTG	stx	518
VTcom-d	TGATGATGGCAATTCAGTAT		
AL65	TTAATAGCACCCGGTACAAGCAGG	est	147
AL125	CCTGACTCTTCAAAGAGAAAATTAC		
LT1	TCTCTATGTGCATACGGAGC	elt	322
LT2	CCATACTGATTGCCGCAAT		
IpaIII	GTTCCCTTGACCGCCTTTCCGATACCGTC	ipaH	619
IpaV	GCCGGTCAGCCACCCTCTGAGAGTAC		
aggRsk1	GTATACACAAAAGAAGGAAGC	aggR	254
aggRsk2	ACAGAATCGTCAGCATCAGC		
Eaggfp	AGACTCTGGCGAAAGACTGTATC	CVDR432	194
Eaggbp	ATGGCTGTCTGTAATAGATGAGAAC		
aspU-3	GCCTTTGCGGGTGGTAGCGG	aspU	282
aspU-2	AACCCATTCGGTTAGAGCAC		

Tabla 4. Datos de los iniciadores utilizados en este estudio.¹⁰



El protocolo para la PCR se llevó a cabo en una reacción de 20 μ L conteniendo 2mM de MgCl₂, Mezcla de DNTPs a una concentración de 0.2mM, primers forward y reverse para cada uno de los genes, a una concentración de 0.2 μ M, LightCycler® FastStart DNA MasterPLUS SYBR Green I de Roche 1.25U y 5 ul de DNA para obtener una concentración final entre 10-100ng. Los controles positivos fueron donados por el PhD. Adrián Canizales Román del Laboratorio Estatal de Salud Pública del Estado de Sinaloa.

Para realizar la configuración de la placa de PCR se realizo una master mix utilizando los reactivos y concentraciones descritas en la Tabla 5. Se agregaron 15 μ L de la mezcla de reacción (conteniendo en cada fila el primer F y R para cada gen) a cada pocillo, finalmente se adicionaron 5 μ L de DNA correspondiente a cada muestra que se analizaría en cada columna (del 1 al 12), tal como se muestra en la Figura 10, para dar un volumen total de 20 μ L por cada reacción.

Tabla 5. Mezcla de Reacción de PCR en Tiempo Real.		
Reactivo	Volumen para 1 Rx(μ L)	Volumen para 96 Rx(μ L)
10X PCR	2	192
DNTp Mix (10mM)	0.4	38.4
Top Taq(5U/ μ L)	0.1	9.6
Sybr Green 5X	5	480
H2O	7.1	681.6
Primer F c/gen (10 uM)	0.2	19.2
Primer R c/gen(10 uM)	0.2	19.2
volumen final	15.0	1440

Tabla 5. Mezcla de Reacción de PCR en Tiempo Real.

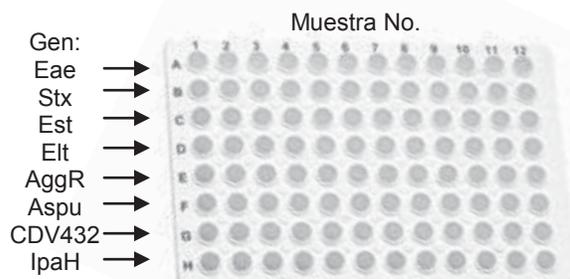


Figura 10. Placa excavada donde se corrió la PCR.
De la fila A-H se muestra la disposición de la mezcla de reacción para cada uno de los genes, mientras que en las columnas 1 – 12, se observa el montaje por numero de muestra.

Posterior a esto se colocó la placa en el termociclador y se procedió a dar marcha al programa de PCR en el termociclador *LightCycler*® 480 Real-Time PCR System como se muestra en la

Tabla 6.

Programa para el termociclador <i>LightCycler</i> ® 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	95° C	95° C	52° C	72° C	95° C	40° C	85° C	40° 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 6. Programa para el Termociclador en Tiempo Real *LightCycler* 480



12.6 CORRIMIENTO ELECTROFORETICO DE LA PCR.

Una vez terminada la PCR se prosiguió corroborar el peso del producto de amplificación mediante una electroforesis en gel de agarosa al 2.5 % utilizando TBE (Tris ácido bórico EDTA) 0.5X como buffer y teñido con bromuro de etidio. Se montó el gel usando 2µL de buffer de carga 5X y 8 µL del producto de PCR, se utilizó una corriente eléctrica de 150 voltios durante 35 minutos para la separación de las bandas y tras este periodo de tiempo se analizó mediante luz UV con un fotodocumentador modelo Gel Doc XR de la marca BIO-RAD.

12.7 ANÁLISIS DE RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS

Las pruebas de susceptibilidad a antibióticos. Se realizaron siguiendo los estándares del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) como se describe en el anexo.¹¹³

Se decidió hacer la determinación de la resistencia antimicrobiana a los antibióticos de primera y segunda elección, incluidos otros antimicrobianos que no son de uso contra infecciones diarreicas pero solo con fines de investigación, los antibióticos utilizados se presentan en la Tabla 7.



Tabla 7. Antibióticos utilizados y su referencia para determinación de sensibilidades.

Antibiótico	Concentración (µg)	Parámetros de referencia en mm		
		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
AMOXICILINA/CLAVULANATO (AMC)	20/10.	≥20	-	≤28
TRIMETROPRIM CON 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 7. Antibióticos utilizados y su referencia para determinación de sensibilidades.^{113.}

12.8 MANUAL DE REFERENCIA DE CLSI.

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 aparición 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 del anexo. 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 incubó 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 del anexo) y se clasificó como sensible, intermedio o resistente. Los antibióticos utilizados en este estudio fueron:

Placa 1	Placa 2
Cefotaxima (CTX)	Trimetroprim/Sulfametoxazol (SXT)
Ceftriaxona (CRO)	Ampicilina (AM)
Ceftazidime (CAZ)	Cloranfenicol (C)
Cefepime (FEP)	Amikacina (NA)
Meropenem (MEM)	Gentamicina (GM)
Imipenem (IPM)	Fosfomicina (FOX)
Amoxicilina/Clavulanato (AMC)	



13 RESULTADOS.

13.1 CARACTERIZACIÓN DE LAS MUESTRAS

Se obtuvieron en total 190 muestras 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 11. Del total de muestras se procesaron 100 de acuerdo con los criterios de inclusión. Del total de muestras que se procesaron 40 provenían del hospital infantil de Morelia “Eva Samano de López Mateos” y 60 del Laboratorio Estatal de Salud Pública del Estado de Michoacán.

Porcentaje de aislamiento.



Figura 11. Porcentaje de cepas que se lograron aislar a partir de las muestras fecales.
Bitácora muestras del LESP Michoacán.

En la Figura 12 se puede observar que los niños menores de un año representan el sector de la población más afectada por el síndrome diarreico.

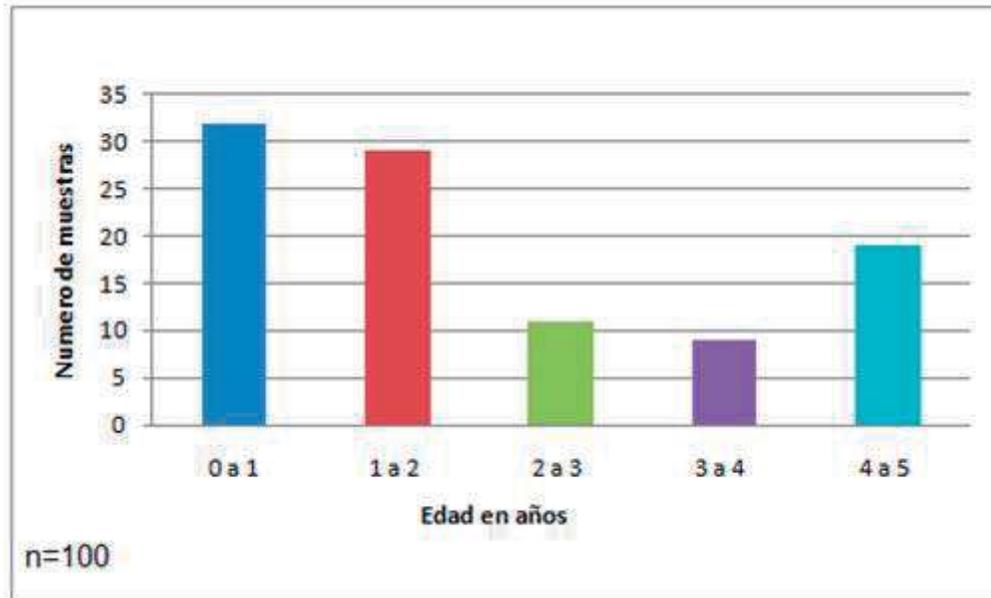


Figura 12. Distribución de las muestras diarreicas por edades.
Fuente: Bitacoras del Hospital Infantil y del LESP

En la Figura 13 observa una desviación en la presencia de aislados hacia el género masculino.

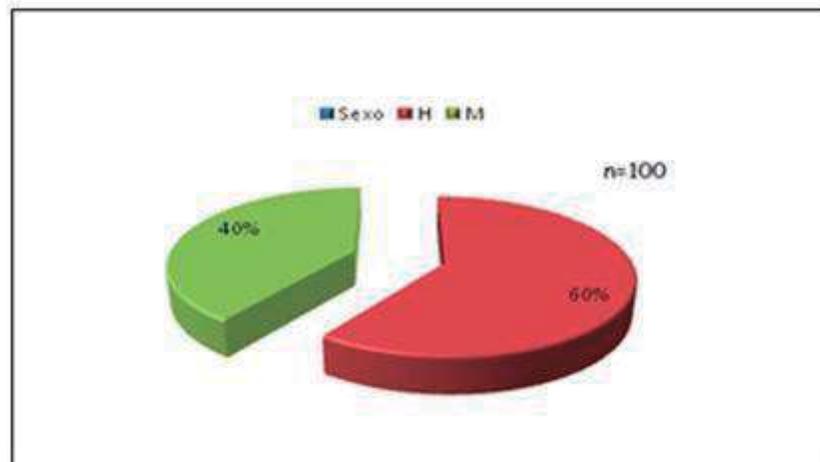


Figura 13. Distribución de muestras diarreicas según el género.



Las muestras que se procesaron pertenecían a las diferentes jurisdicciones sanitarias del estado de Michoacán. En la Figura 14 se muestran las procedencias por jurisdicciones.



Figura 14. Jurisdicciones sanitarias del estado de Michoacán de donde provienen las muestras. Las jurisdicciones sanitarias son: 1. Morelia, 2. Zamora, 3. Zitácuaro, 4. Pátzcuaro, 5. Uruapan, 6. La Piedad, 7. Apatzingán y 8. Lázaro Cárdenas.

13.2 ANÁLISIS Y MANIPULACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEÍCOS

De las 100 cepas a las cuales se les realizó la patotipificación por PCR, el 44% resultaron positivas para algún grupo patógeno, amplificando uno o más genes de patogenicidad. Mismos que fueron puestos de manifiesto por las curvas de amplificación obtenidas en el termociclador *LightCycler*® 480 Real-Time PCR System, curvas que pueden observarse en las Figura 15 y Figura 16.

En el mismo equipo se obtuvieron las curvas y picos Melting específicos para cada gen que fue amplificado, tal como se observan en las Figura 17 y Figura 18.

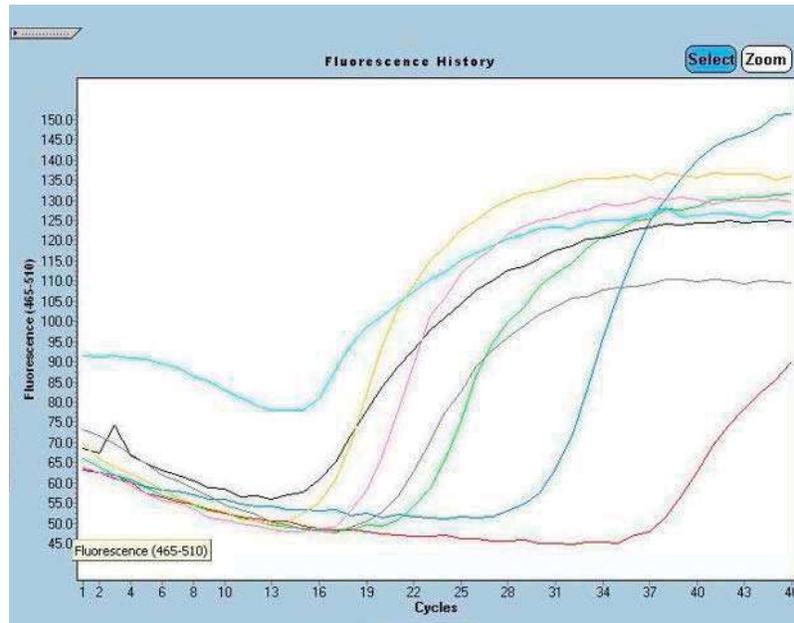


Figura 15. Amplificaciones de los genes eae, stx, elt, est, Aggr, AspU, CVD432 e IpaH en el equipo LightCycler 480. Se observan las amplificaciones en tiempo real de las cepas control utilizadas.

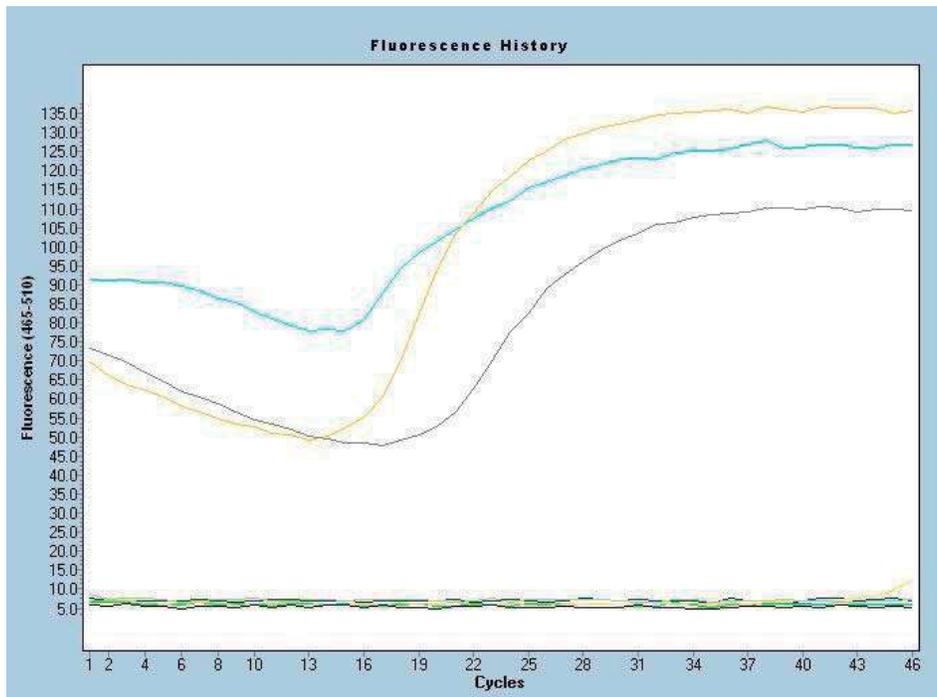


Figura 16. Amplificaciones en tiempo real de los genes Aggr, AspU y CVD432 Muestra positiva para el patotipo EAEC.

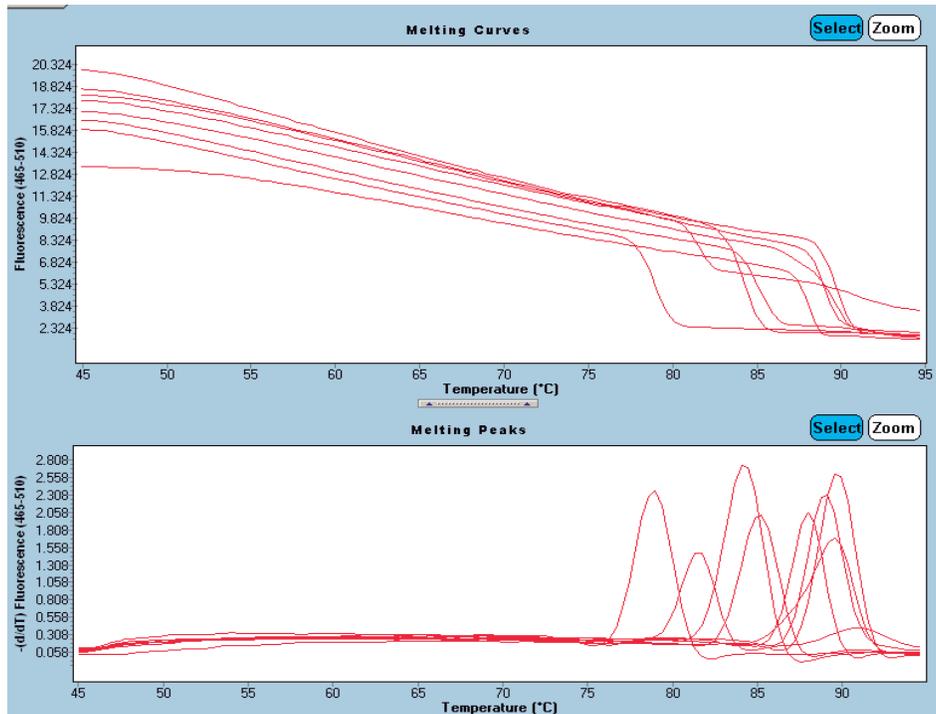


Figura 17. Curvas Melting de los controles positivos. Se observan las curvas que correspondientes a cada gen amplificado

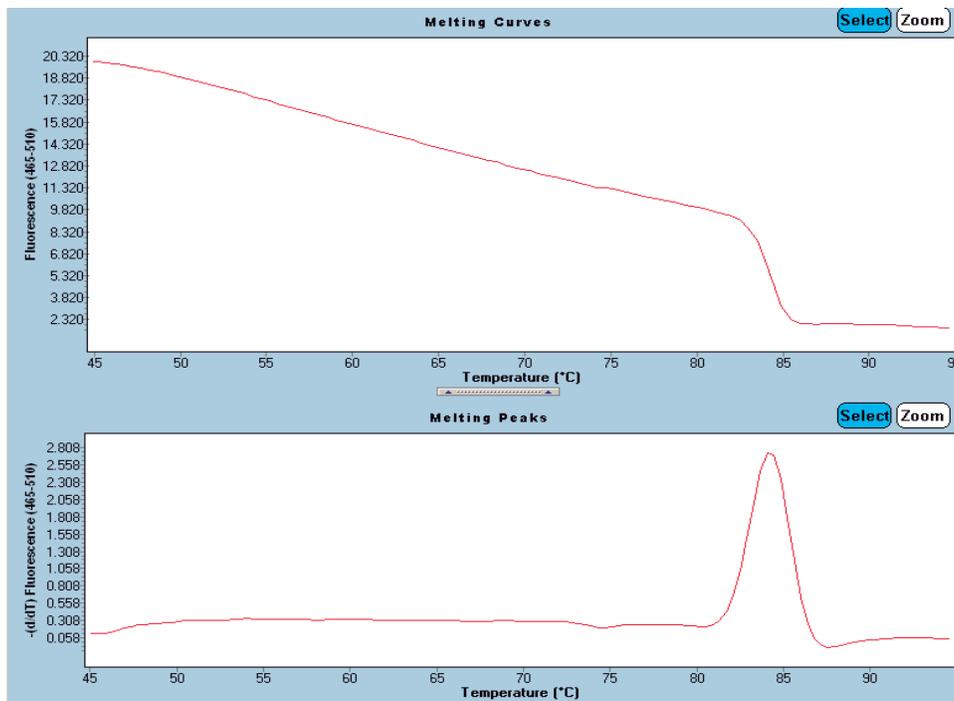


Figura 18. Curva Melting del gen Est. de ETEC (Tm 84.22°C)

Los productos de PCR obtenidos por tiempo real fueron corroborados por sus pesos moleculares por medio de electroforesis en geles de agarosa al 2.5%, donde se corrieron los controles (Figura 19) y las muestras (Figura 20).

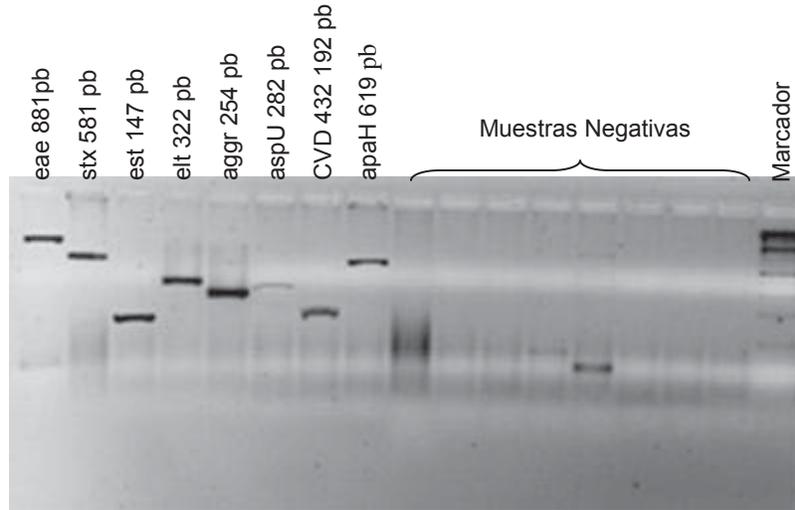


Figura 19. Electroforesis en un gel de agarosa de los productos de PCR en tiempo real. Los genes identificados corresponden eae de EPEC, stx de EHEC, est toxina termoestable de ETEC, elt toxina termolábil de ETEC, aggr, aspU, CVD432 de EAEC e IpaH de EIEC.

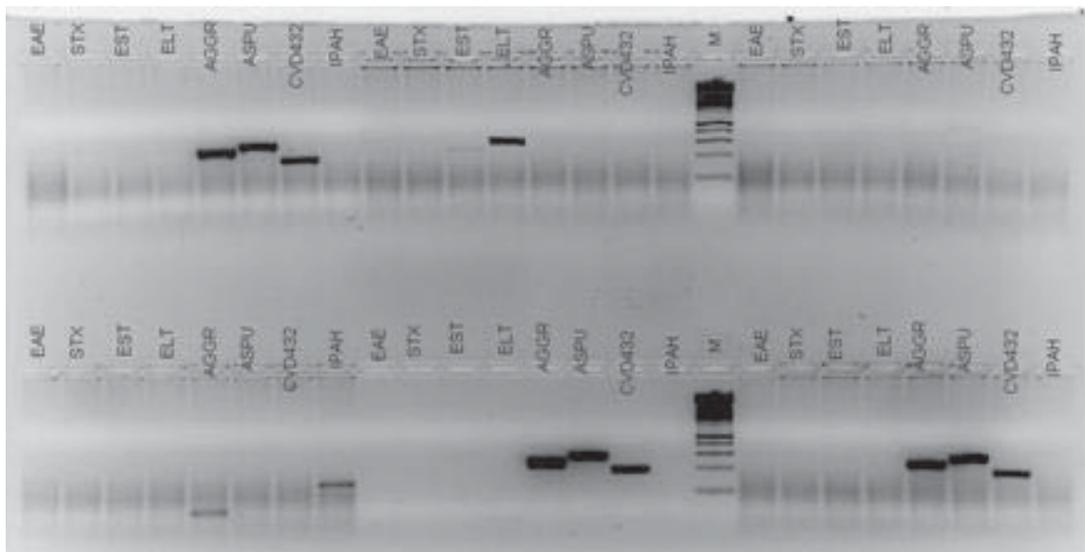


Figura 20. Gel de electroforesis de agarosa al 2.5% para Muestras positivas a EAEC y ETEC. EAEC (aggr, aspU y CVDR432), ETEC (elt)



Del total de muestras a las que se les realizó PCR, 44 de fueron positivas para algún patotipo, encontrando ETEC, EAEC y EPEC, el resto de los patotipos no se encontraron en este estudio. Las 66 muestras restantes corresponden a muestras negativas, es decir, que no expresaron ningún gen de patogenicidad como lo muestra la Figura 21.

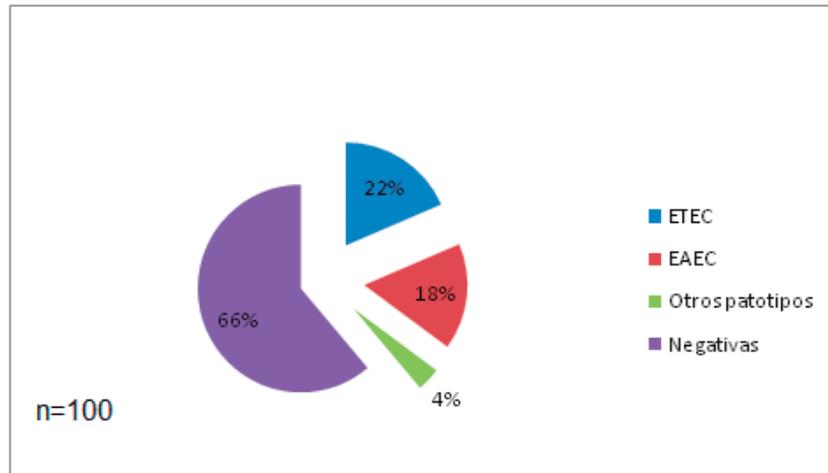


Figura 21. Resultados de la patotipificación molecular del total de muestras que entraron al estudio.

De todas las muestras que fueron positivas, el 50% corresponde a el patotipo ETEC, en segundo lugar se encontró el patotipo EAEC con un 41%, mientras que del resto de los patotipos solo se encontró un 9%, tal como lo muestra la Figura 22.

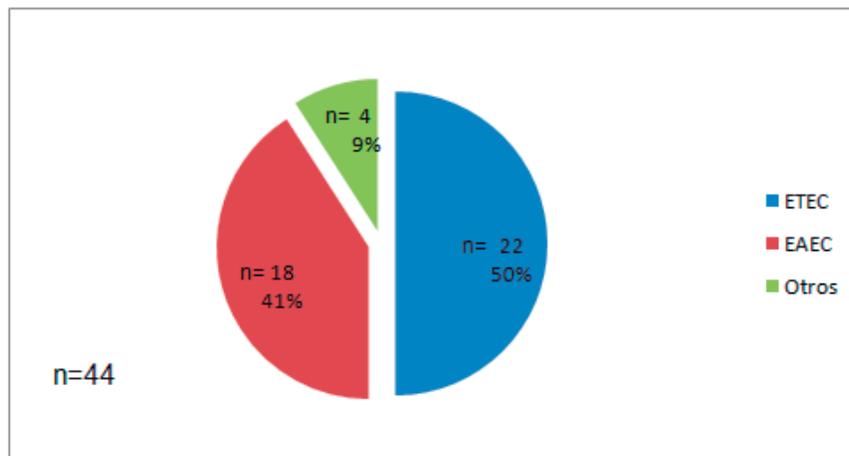


Figura 22. Distribución de los patotipos obtenidos de las muestras positivas.

Se obtuvo que de las cepas ETEC positivas tuvieron una mayor prevalencia las que presentan la toxina termolabil, con un 91%, tal como lo muestra la Figura 23.

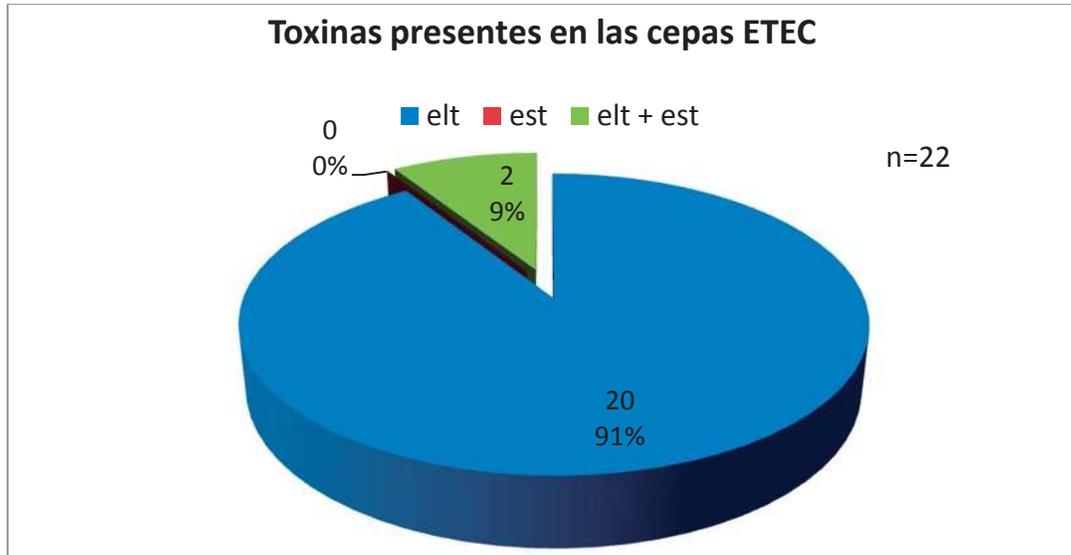


Figura 23. Porcentaje de las toxinas encontradas en ETEC.

Dentro de este estudio se encontró que las muestras que resultaron positivas tienen una tendencia hacia el género masculino. Figura 24.

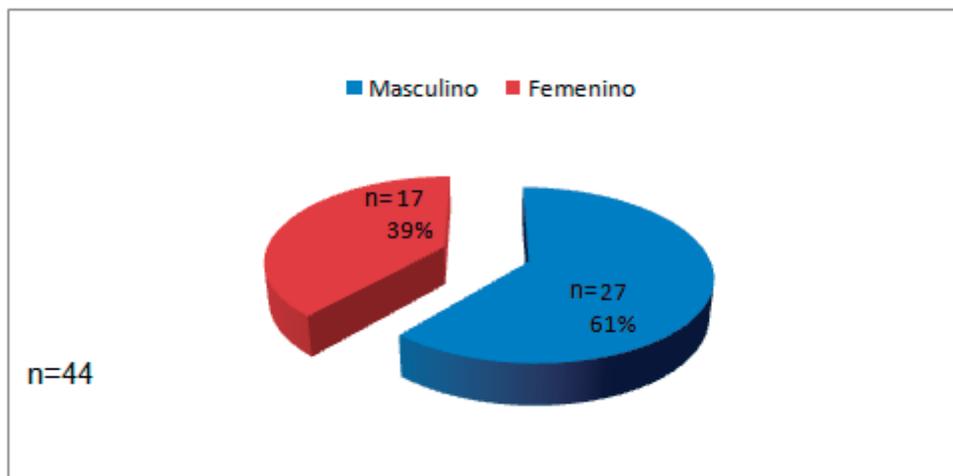


Figura 24. Distribución por género de las muestras positivas.
Fuente: Bitácoras del Hospital Infantil de Morelia y del LESP.



En la Figura 25 se puede observar que la fracción de la población más afectada por cuadros diarreicos causados por *E. coli* patógenas son los menores de 1 año.

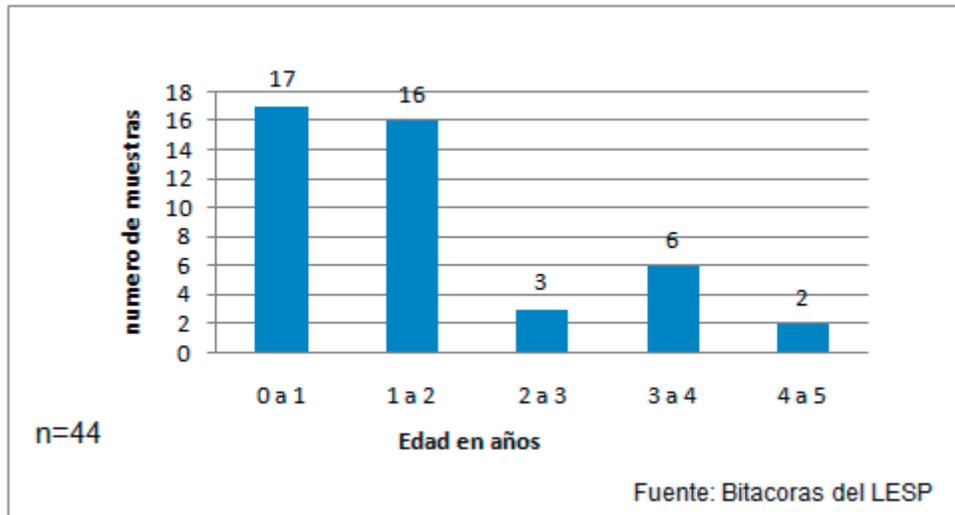


Figura 25. Distribución etaria de las muestras positivas.
Fuente: Bitácoras del Hospital Infantil de Morelia y del LESP.

En la Figura 26 se observa que la mayor cantidad de muestras positivas corresponden al mes de febrero, y que entre este mes y el de marzo se encontraron otros patotipos diferentes a ETEC y EAEC.

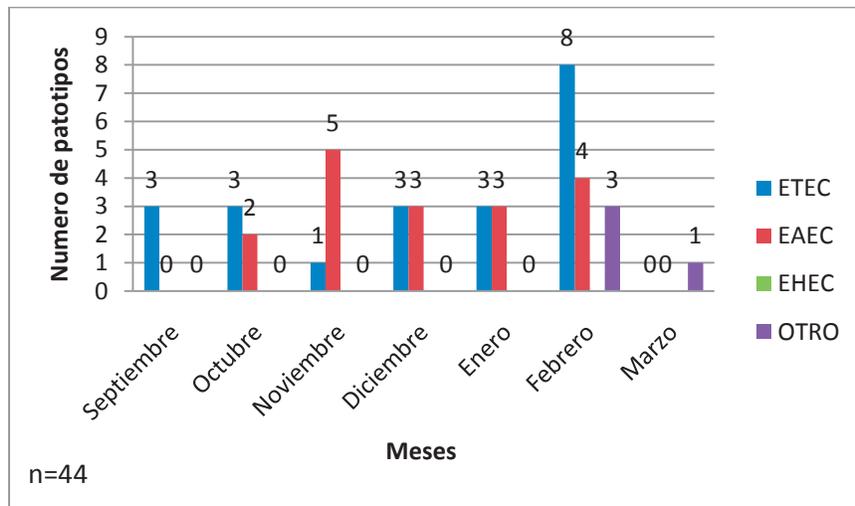


Figura 26. Distribución de los patotipos por meses.
Fuente: Bitácoras del Hospital Infantil de Morelia y del LESP.



13.3 CUADRO CLÍNICO

Se encontró que en las muestras que corresponden al patotipo EAEC la presencia de diarrea acuosa con moco, además de una gran cantidad de leucocitos polimorfonucleares. Para las muestras pertenecientes al patotipo ETEC, se encontró que se trataba de muestras de diarrea acuosa, sin moco y sin la presencia de leucocitos.

13.4 ANÁLISIS DE RESISTENCIA A LOS 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 y los controles negativos y finalmente una comparación entre patotipos y una última entre grupos patógeno y control.

En las pruebas de susceptibilidad a los antibióticos se encontraron que las resistencias más altas a los antibióticos las presentan los de primera elección, como son Trimetoprim con Sulfametoxazol y Ampicilina. También se encontró que el antibiótico con una menor resistencia es la Fosfomicina. Figura 26.

En la figura 27 se puede observar que la Amoxicilina con Ácido clavulánico presenta un índice de resistencia del 96%, mientras los carbapenems del 2%.

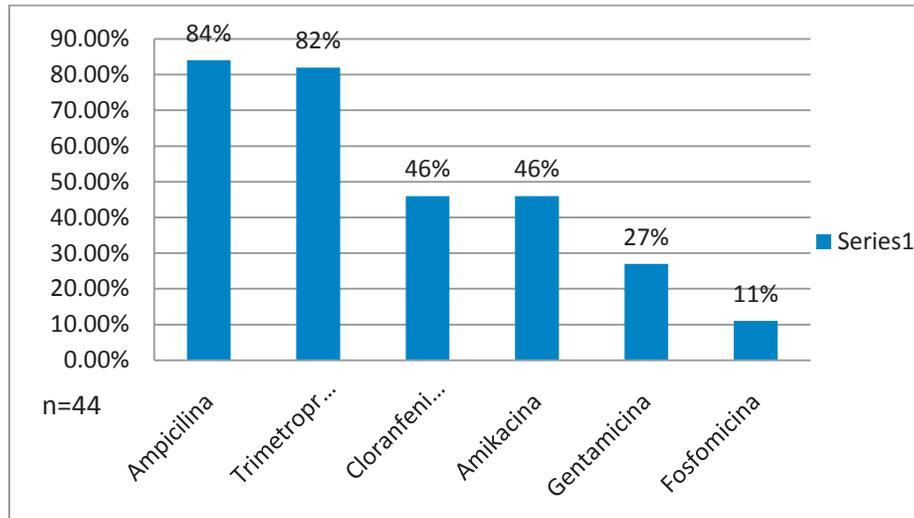


Figura 27. Resistencia de otros antibióticos a los que se les realizaron pruebas de resistencia con fines de investigación.
Fuente: Bitácoras del LESP.

En la Figura 28 se pueden observar los porcentajes de resistencia que presentó el patotipo ETEC a los antibióticos de primera elección. Siendo Trimetroprim con Sulfametoxazol y Ampicilina los que presentan una mayor resistencia.

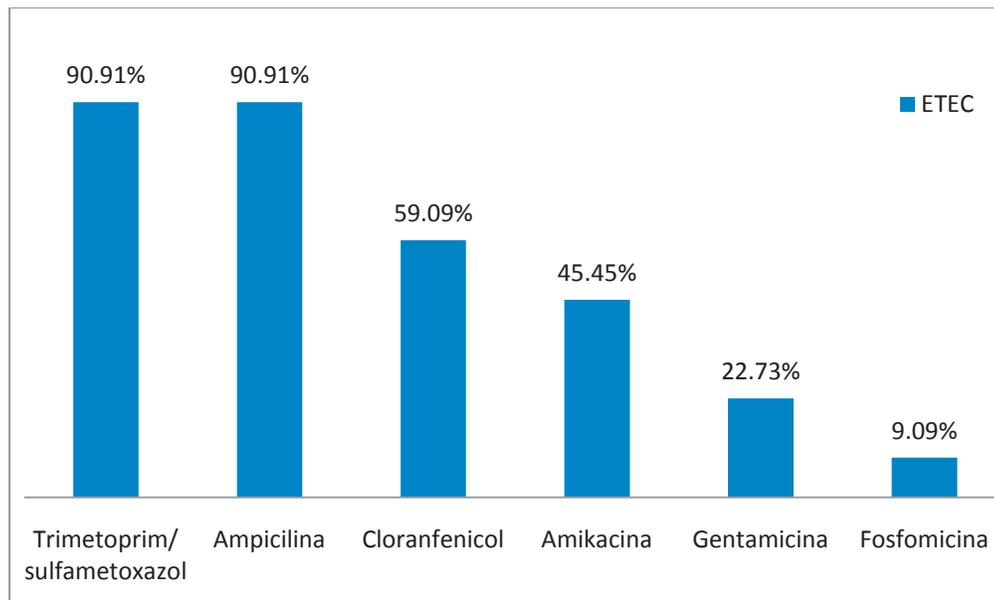


Figura 28. Resistencia de ETEC a los antimicrobianos de primera elección.
Fuente: Bitácoras del LESP.



En la Figura 29 se ilustran las resistencias de ETEC a antibióticos no indicados como tratamiento para diarreas, se puede ver que todas las cepas ETEC presentan resistencia a la Amoxicilina con Ácido Clavulánico.

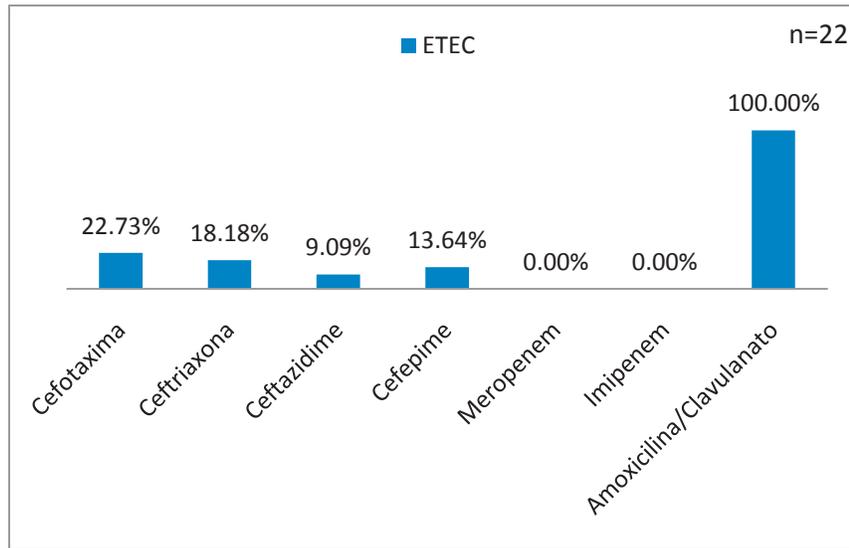


Figura 29. Resistencia de ETEC a otros antimicrobianos.
Fuente: Bitácoras del LESP.

Para EAEC se obtuvieron resistencias similares a las que presentó ETEC, en la Figura 30 se presentan los porcentajes de resistencia a los antibióticos que presentó el patotipo EAEC a los antibióticos de primera elección.

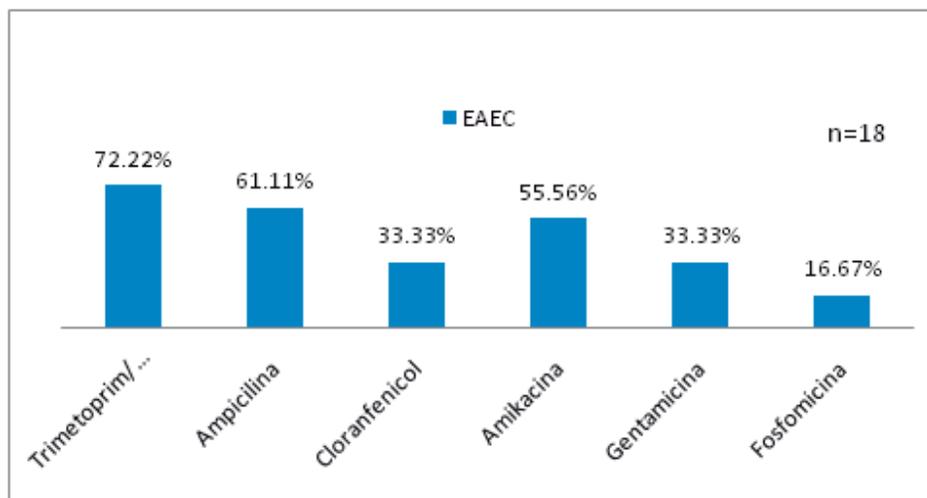


Figura 30. Resistencia de EAEC a los antimicrobianos de primera elección.
Fuente: Bitácoras del LESP.



En la Figura 31 se ilustra la resistencia del patotipo EAEC a los antibióticos no indicados en diarreas, donde se observa que al igual que lo que sucede con ETEC la Amoxicilina con Ácido Clavulánico es el antibiótico con un mayor índice de resistencia.

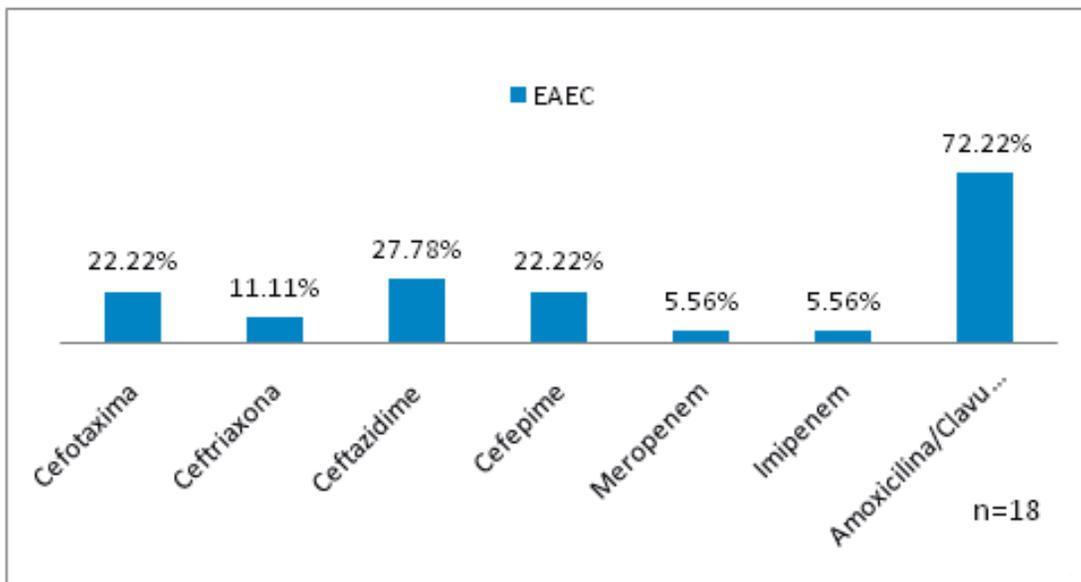


Figura 31. Resistencia de EAEC a otros antimicrobianos.
Fuente: Bitácoras del LESP.

Se realizó una comparación de resistencia entre el grupo control y patógeno en la Figura 32 y Figura 33 se puede observar que el grupo control presenta una mayor resistencia que el grupo patógeno

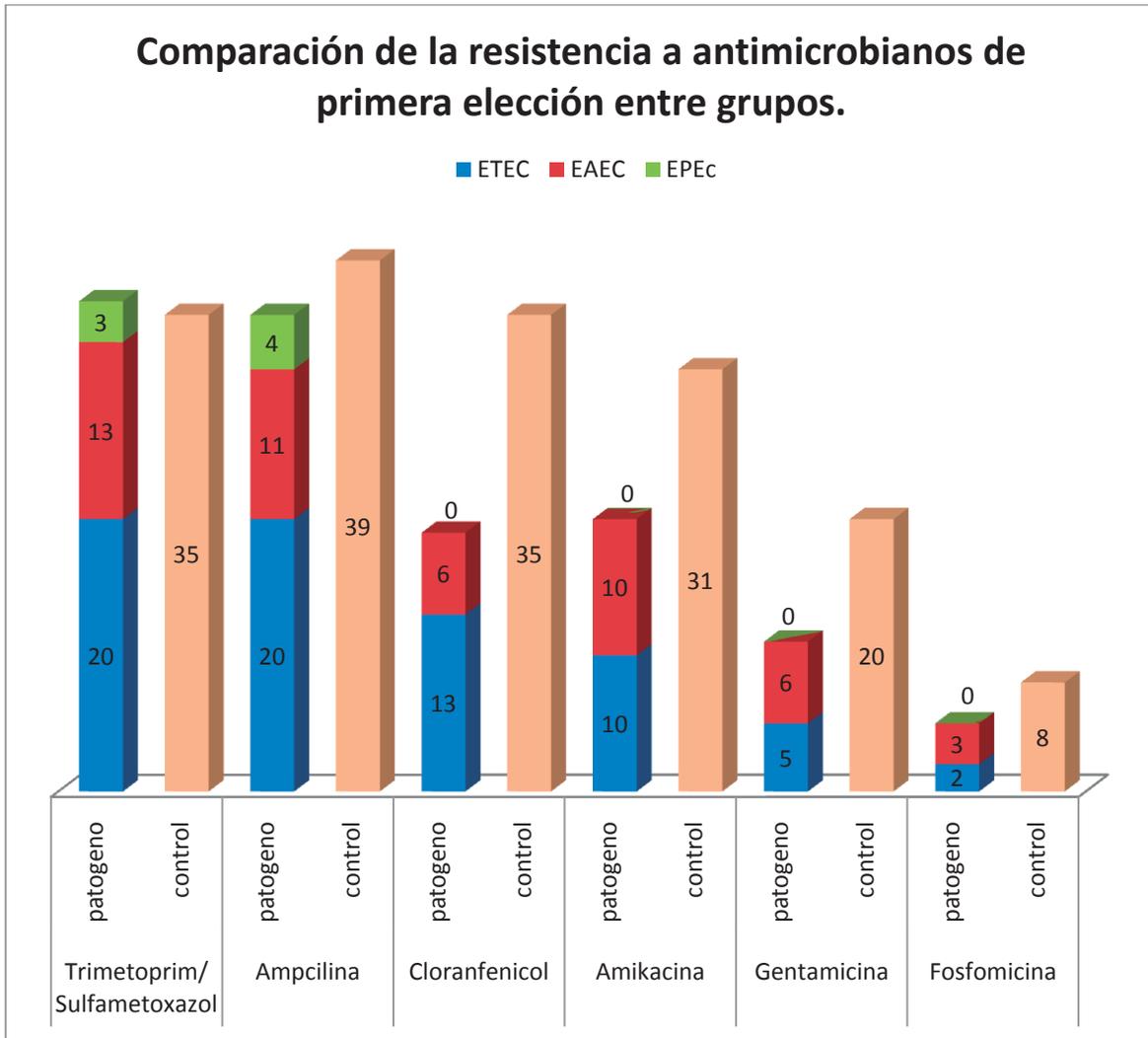


Figura 32. Comparación de resistencia a antimicrobianos de primera elección entre E. coli patógenas y no patógenas en diarreas

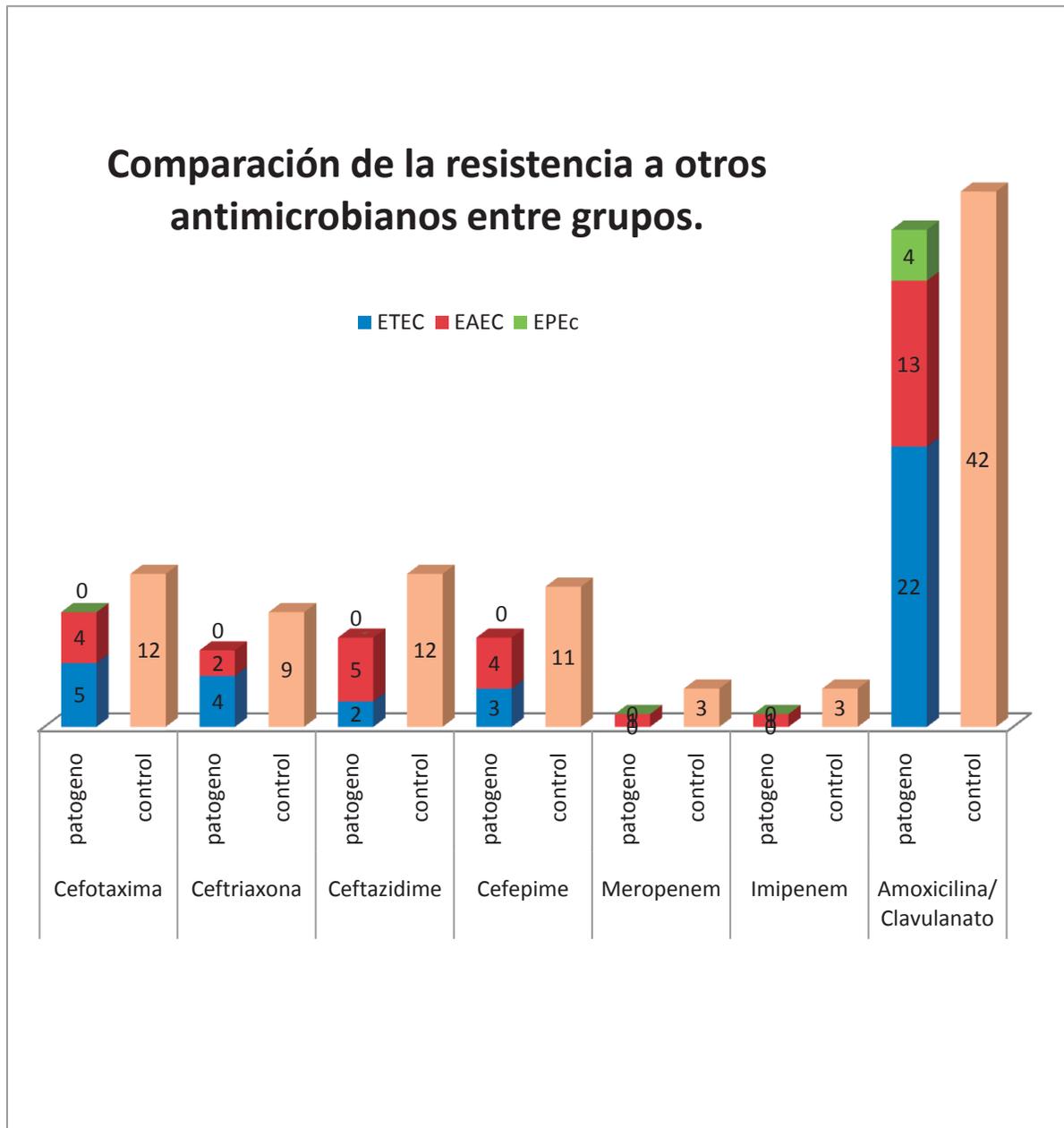


Figura 33. Comparación de resistencia antimicrobiana entre E. coli patógenas y no patógenas en diarreas



14 DISCUSIÓN DE RESULTADOS

De acuerdo al Sistema Nacional de Información en Salud, en el 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. Los niños menores de 5 años representan la fracción de la población que se encuentra con mayor riesgo de sufrir un cuadro diarreico tal como lo indica Levine y cols.⁵⁰

En este estudio se encontraron una gran cantidad de niños menores de 5 años con síndrome diarreico a los cuales se les logro aislar *Escherichia coli*. También encontramos que dentro de este rango de edad, los pacientes con mayor prevalencia de diarreas son menores de un año, lo que indica que son el sector de la población más vulnerable. 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.

Se realizo la técnica de PCR multiplex propuesto por Claudia Toma y cols.¹⁰ tomando en cuenta los primers y las concentraciones de reacción descritas en su estudio, se obtuvieron amplificaciones de productos inespecíficos que fueron corroboradas por electroforesis, lo que se puede inferir de esto es que los primer se conjugaron entre sí. Sin embargo, los primers fueron efectivos en reacciones de PCR individuales.



Del total de muestras que se tipificaron el 44% expreso factores de patogenicidad, lo que es un indicativo de que casi la mitad de las cepas de *E. coli* aisladas tienen la capacidad de provocar enfermedad diarreica y son tomadas como biota normal aun siendo cultivos puros de esta bacteria, este problema se presenta por la dificultad de diferenciar una cepa patógena por medio pruebas bioquímicas convencionales o por el uso de antisueros, además de que se requiere de una gran variedad de ellos y no brindan un resultado claro 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* tipificables, es por esto que se pretende fomentar la implementación de estas técnicas para poder obtener un diagnóstico más certero de la etiología diarreagénica.

El 50% de las cepas identificadas como patógenas corresponden al grupo patógeno de *E. coli* ETEC, es decir, es el patotipo de *Escherichia coli* que causa con mayor frecuencia síndrome diarreico, tal como está reportado en la literatura y también es lo que se esperaba encontrar en este estudio. Cortez A. y cols. reportan que ETEC representa el 66% de los patotipos que se identificaron en su estudio hecho en el Valle de Chalco. El 41% de los patotipos identificados corresponde a EAEC, este resultado fue inesperado, ya que en la literatura no se reporta con frecuencia. El patotipo de *Escherichia coli* EHEC no fue identificado en este estudio, lo que era de esperarse, ya que en nuestro país no se reportan casos de diarrea por esta bacteria. También se realizó la identificación de otros patotipos en una investigación en conjunto con Silva G. y cols.²⁷ donde se reporta que el patotipo EPEC representa el 9% de los patotipos identificados, encontrándose en tercer lugar de frecuencia.¹²⁷



De los patotipos encontrados se realizó la búsqueda de datos clínicos de las muestras para correlacionar dichos datos con el mecanismo de patogenicidad de cada patotipo encontrado, en esta búsqueda se encontró que los patotipos ETEC, provienen de materia fecal acuosa o líquida, sin moco ni sangre, tampoco se encontró la presencia de leucocitos. Lo que concuerda con el mecanismo clásico de patogenicidad de ETEC y la producción de una diarrea secretora descrita por Nataro y cols.⁶¹

Para el caso del patotipo EAEC se encontró que provienen de muestras de diarreas líquidas con una gran cantidad de moco, sin sangre, y con incontables leucocitos polimorfonucleares. Características propias de este patotipo, que indican un proceso inflamatorio y la producción de gran cantidad de mucina. Estas características clínicas además de reforzar los resultados de la patotipificación, dan la pauta para proponer un nuevo esquema de manejo para las diarreas cuando se sospecha que es causada por EAEC, ya que dicho patotipo provoca diarrea de tipo prolongado, misma que debe manejarse con tratamiento antimicrobiano, sin dejar de utilizar como primera elección la hidratación oral.

La importancia de determinar la causa de una enfermedad como lo es la diarrea es de vital importancia y ésta radica en la selección de un esquema adecuado de tratamiento. En base a las encuestas epidemiológicas 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.



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 de resistencia bacteriana, 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.

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 con 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 cada vez más como tratamiento para erradicar las infecciones intra y extraintestinales ocasionadas por *E. coli*, 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 presenta el efecto lateral de su toxicidad.



Como alternativas de tratamiento, como primera medida se 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 cefixima solo en presentación oral, para los casos de diarrea que no respondan a la terapia de rehidratación oral y que presente resistencia a Trimetoprim/sulfametoxazol.

Además de el uso de probióticos y suplementos de zinc como medida de control y prevención de las diarreas, así como el antidiarreico resecaotrilio que actúa inhibiendo la secreción de líquidos sin actuar en la motilidad intestinal.



15 PERSPECTIVAS.

- Se pretende la implementación de este protocolo de búsqueda de grupos patógenos de *Escherichia coli* como un programa centinela en el Laboratorio Estatal de Salud Pública, enviando a este laboratorio un porcentaje de las cepas de *E. coli* aisladas de diarreas.
- Fomentar el uso de la hidratación oral como primera elección en el manejo de las diarreas de acuerdo al esquema de manejo que propone la Secretaría de Salud.
- También se propone el uso limitado 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.
- En caso de presentarse una diarrea con moco, sin sangre, con una gran cantidad de leucocitos polimorfonucleares, además de tratarse de una diarrea de tipo prolongada se debe sospechar de EAEC y debe considerarse el uso del tratamiento antimicrobiano.



16 CONCLUSIONES.

1. Se logro la identificación de grupos patógenos de Escherichia coli en un 44% de las muestras.
2. El patotipo ETEC es el de mayor prevalencia, dentro de este estudio representa el 50% de los patotipos.
3. El patotipo EAEC se encuentra con mayor frecuencia de lo que se esperaba como causante de diarreas, ya que representa el 41% de los patotipos.
4. Se ha sugerido a partir de lo observado en este estudio la implementación de tratamiento antimicrobiano para las cepas EAEC
5. Se encontro un alto índice de resistencia para los patotipos ETEC y EAEC.
6. Se encontró un alto índice de resistencia a los antibióticos de primera elección.
7. No se logro la identificación de ninguna cepa que perteneciera al patotipo EHEC



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 35)
- Hojas de registro epidemiológicas. (Figura 36, Figura 37)

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 34)
- Se introduce el hisopo dentro del tubo con el medio de transporte Cary-Blair y se rotula con los datos del paciente.

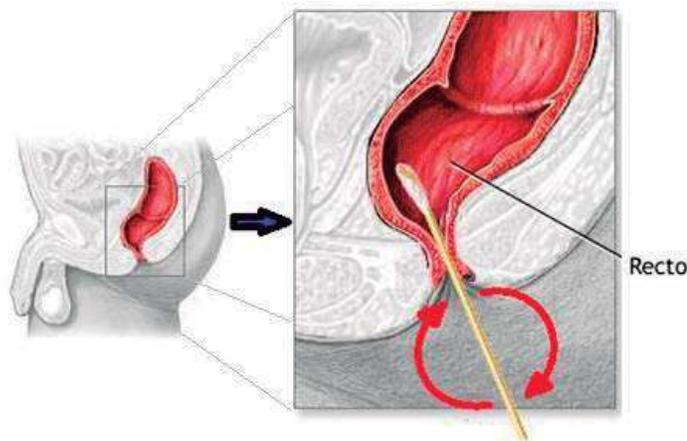


Figura 34. Hisopado Rectal.



Figura 35. Medio de transporte Cary-Blair.



Tipificación Molecular de Escherichia coli Enterotoxigénica,
Enterohemorrágica y Enteroagregativa en Michoacán



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: Día 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 clínicas: Fecha de inicio: Día Mes Año

Diarrea Vómito Deshidratación Choque

Antibióticoterapia (Especificar)

Insuficiencia renal Hidratación parenteral Hospitalización Defunción

MUESTRA

Tipo de muestra para cultivo: Materia fecal Vómito Hisopo rectal
Fecha de toma Otro (especifique)

Fecha de envío al INDRE: Día Mes Año

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

Tomar con dos semanas de diferencia y enviar juntas (la primera en la etapa aguda)
Fecha de envío al INDRE: Día Mes Año

ANÁLISIS LABORATORIO

Hora de siembra en agua peptonada

Hora resiembra a TCBS Morfología colonial

Color amarillo de la colonia { } si { } no

Pruebas bioquímicas: 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 { } Desaminación { } H₂S { } Gas

Otras: Identificación preliminar

Sitio de proc. inicial: Laboratorio Ciudad Estado

Fecha de envío al INDRE: Día Mes Año

Figura 36. Encuesta Epidemiología 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: <input type="checkbox"/> M <input type="checkbox"/> F	FECHA DE NACIMIENTO <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>	EDAD <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>
	<small>DIA MES AÑO</small>	<small>AÑOS MESES DIAS</small>
DOMICILIO ACTUAL: _____		
Calle y número.	Colonia y/o localidad.	Municipio y Estado
INSTITUCIÓN: <input type="checkbox"/> SSA <input type="checkbox"/> IMSS <input type="checkbox"/> ISSTE <input type="checkbox"/> OTROS	NOMBRE DEL HOSPITAL: _____	
<p>II. NOTIFICACION.</p> <p>A.- Fecha de notificación</p> <p><input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/></p> <p style="text-align: center;"><small>DIA MES AÑO</small></p> <p>B.- Fuente de Información. <input type="checkbox"/></p> <p>1. Registro Hospitalario. 2. Vig. Epid. Activa 3. Cert. De defunción</p> <p>III. ANTECEDENTES <input type="checkbox"/></p> <p>A.- ¿ Se alimente de pecho materno?</p> <p>1. SI 2. NO</p> <p>B. Edad de inicio: <input type="checkbox"/></p> <p>1. Menor de 1 mes 2. De 1 a 3 meses 3. Mas de 3 meses</p> <p>C. Edad de término <input type="checkbox"/></p> <p>IV. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS</p> <p>A. Fecha de inicio</p> <p><input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/></p> <p style="text-align: center;"><small>DIA MES AÑO</small></p> <p>B. Evacuaciones <input type="checkbox"/></p> <p>a) Consistencia</p> <p>1. Líquida 2. Pastosa 3. Formada</p>	<p>b) Número máximo en 24 hrs</p> <p><input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/></p> <p style="text-align: center;"><small>DIA MES AÑO</small></p> <p>c) Número de días con diarrea</p> <p>C. Vómito <input type="checkbox"/></p> <p>a) Número en 24 hrs <input type="checkbox"/></p> <p>b) Número de días con vómito <input type="checkbox"/></p> <p>D. Temperatura máxima en grados Celsius <input type="checkbox"/></p> <p>E) Estado de deshidratación <input type="checkbox"/></p> <p>1. Sin deshidratación. 2. Con deshidratación. 3. Choque hipovolémico.</p> <p>V. ATENCIÓN MÉDICA EN EL HOSPITAL</p> <p>A. Fecha de inicio de la atención médica.</p> <p><input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/></p> <p style="text-align: center;"><small>DIA MES AÑO</small></p> <p>C. Tratamiento(s) recibido(s):</p> <p>1. Plan A. <input type="checkbox"/> 2. Plan B. <input type="checkbox"/> 3. Plan C. <input type="checkbox"/></p> <p>D. Servicio(s) de atención:</p> <p>1. Consulta externa <input type="checkbox"/> 2. Hidratación oral <input type="checkbox"/> 3. Urgencias <input type="checkbox"/> 4. Hospitalización <input type="checkbox"/></p>	<p>VI. TÉRMINO DE LA ATENCIÓN MÉDICA</p> <p>A. Motivo <input type="checkbox"/></p> <p>1. Mejoría 2. Alta voluntaria 3. Defunción</p> <p>B. Fecha de término de la atención médica</p> <p><input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/></p> <p style="text-align: center;"><small>DIA MES AÑO</small></p> <p>VII. LABORATORIO</p> <p>A. Fecha de toma de muestra</p> <p><input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/></p> <p style="text-align: center;"><small>DIA MES AÑO</small></p> <p>B. Lugar de procesamiento <input type="checkbox"/></p> <p>1. Local 2. Lab. Estatal 3. INDRE 4. Otros</p> <p>C. Fecha de procesamiento de la muestra</p> <p><input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/></p> <p style="text-align: center;"><small>DIA MES AÑO</small></p> <p>D. Técnica empleada <input type="checkbox"/></p> <p>1. Rotavirus 2. Elisa 3. Otros</p> <p>E. Resultado <input type="checkbox"/></p> <p>1. Positivo 2. Negativo</p>

Figura 37. Encuesta Epidemiológica de Diarreas por Rotavirus.



17.2 COPROCULTIVO.

- El coprocultivo se realizó en medios selectivos MacConkey y EMB



Figura 38. Medios de cultivo diferenciales para Enterobacterias
1. MacConkey, 2. Agar EMB.

- Se realizó el estriado de la muestra por cuadrantes utilizando un asa bacteriológica en condiciones de esterilidad.



Figura 39. 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 40. 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: Agar Hierro triple Azúcar (TSI): K/A o A/A con producción de gas variable, Agar Lisina Hierro (LIA): K/A o A/A, Movilidad Indol Ornitina (MIO): Movilidad variable Indol (+) y K/A o A/A, Citrato (-), Malonato (-) y Urea (-). A continuación se observa una fotografía con una bioquímica típica de *Escherichia coli*. (Figura 41).



Figura 41. Batería bioquímica típica de *E. coli*.

17.4 SUSCEPTIBILIDAD A ANTIMICROBIANOS

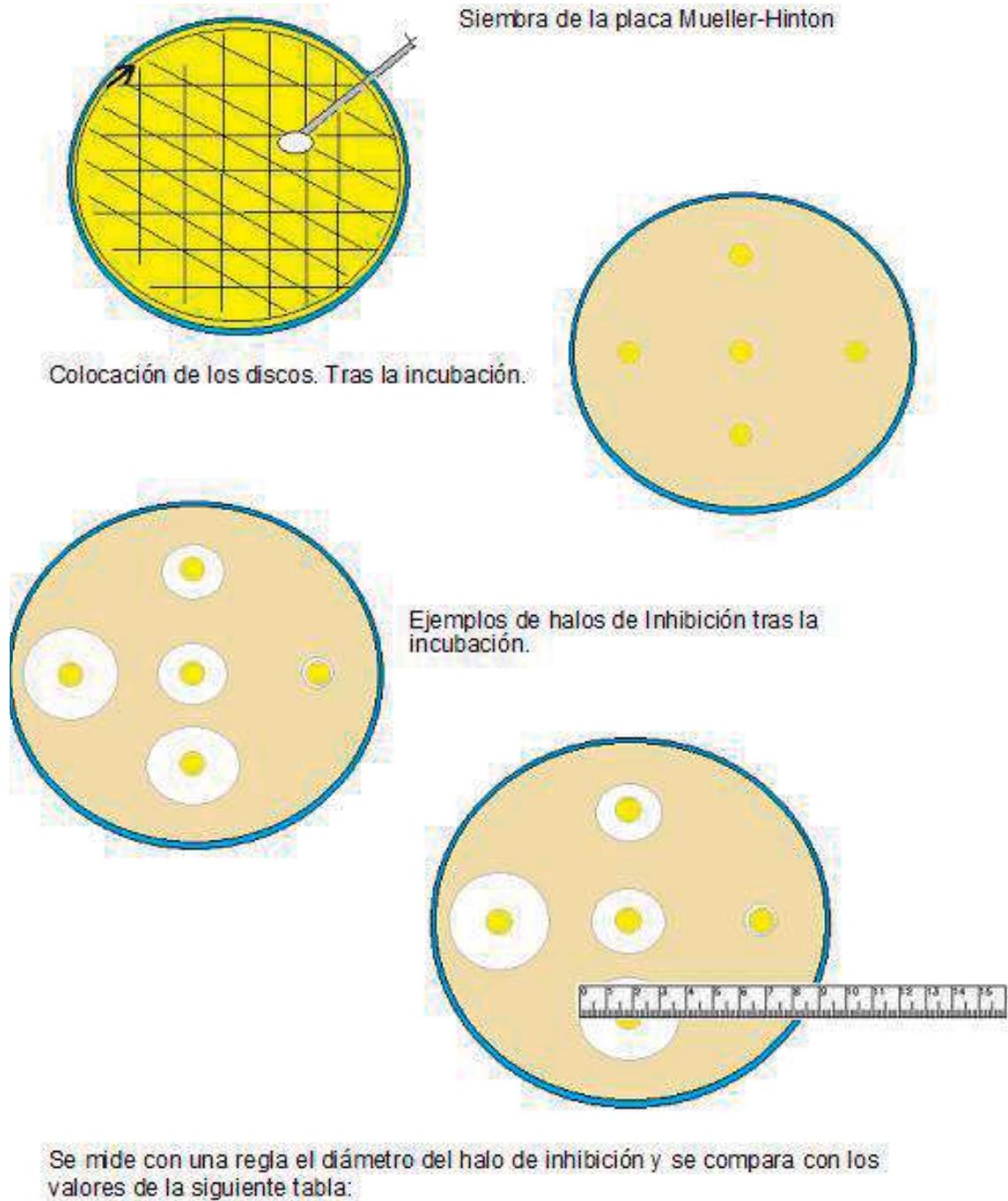


Figura 42. Proceso de medición de halo de resistencia



17.5 PROTOCOLO DE 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 nucleicos 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 está dado por el uso de 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 proteínasa K digiere las proteínas.

Los ácidos nucleicos 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 nucleicos 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 nucleicos purificados son eludidos de las perlas magnéticas en los pozos de elución mientras que las perlas magnéticas son retenidas y descargadas.

17.5.1 MATERIAL:

Para el recuento bacteriano.

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



17.5.2 EXTRACCIÓN AUTOMÁTICA 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	<ul style="list-style-type: none"> ❖ 2 botes de 100 ml cada uno ❖ Para remover inhibidores de PCR
Frasco tapa color azul Número 2	Buffer de lavado II	<ul style="list-style-type: none"> ❖ 1 bote de 100ml ❖ Para remover sales, proteínas, etc.
Frasco con tapa color roja Número 3	Buffer de lavado III	<ul style="list-style-type: none"> ❖ 2 botes de 100 ml cada uno ❖ Para remover sales
Frasco con tapa color verde Número 4	Buffer de lisis y unión	<ul style="list-style-type: none"> ❖ 1 bote, 100 ml ❖ Para la lisis celular y la unión de los ácidos nucleicos totales
Frasco con tapa color rosa Número 5	Proteinasa K	<ul style="list-style-type: none"> ❖ 6 Frascos liofilizados ❖ Para digestión de proteínas
Frasco con tapa color caramelo Número 6	Partículas Magnéticas (MGPs)	<ul style="list-style-type: none"> ❖ 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	<ul style="list-style-type: none"> ❖ 1 frasco de 100ml ❖ Para la elución de los ácidos nucleicos totales ❖ Para la dilución (opcional) ❖ Para la reconstitución de la proteinasa K

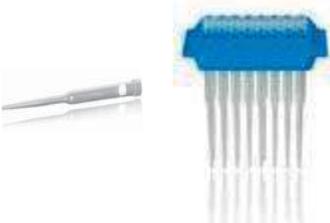
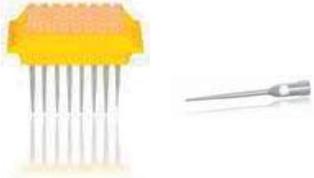
Tabla 8. Contenido del Kit de Extracción MagNA Pure Total Nucleic Acid Isolation



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

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



	<p>Processing Cartridge</p> <p>Es aquí donde el robot coloca los reactivos requeridos en los diferentes pasos del proceso.</p>
	<p>Reaction Tips (Large)</p> <p>Se usan para dispensar los reactivos, transferir la muestra y separación de perlas magnéticas.</p>
	<p>Reaction Tips (Small)</p> <p>Se usan para transferir el material genético en la Post Elution.</p>
	<p>Tip Stand</p> <p>Son depósitos temporales de las puntas en cada paso del proceso.</p>
	<p>Waste Bottle</p> <p>Depósito de desechos líquidos del robot.</p> <p>Colocarlo en la posición indicada en la foto del robot.</p>
	<p>Reagent Reservoir Rack</p> <p>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.</p>
	<p>Cooling Block, Reaction Tubes</p> <p>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.</p>



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

Tabla 9. Accesorios utilizados en el Robot de Extracción Magna Pure LC



17.5.3 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 inóculo 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:

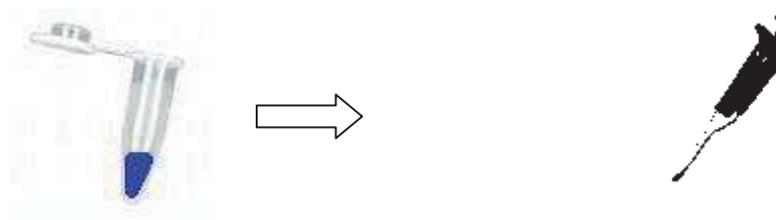


Figura 43. Preparación de la Muestra para Extracción de Ácidos Nucleicos

Colocación de los consumibles en el Robot Magna Pure LC

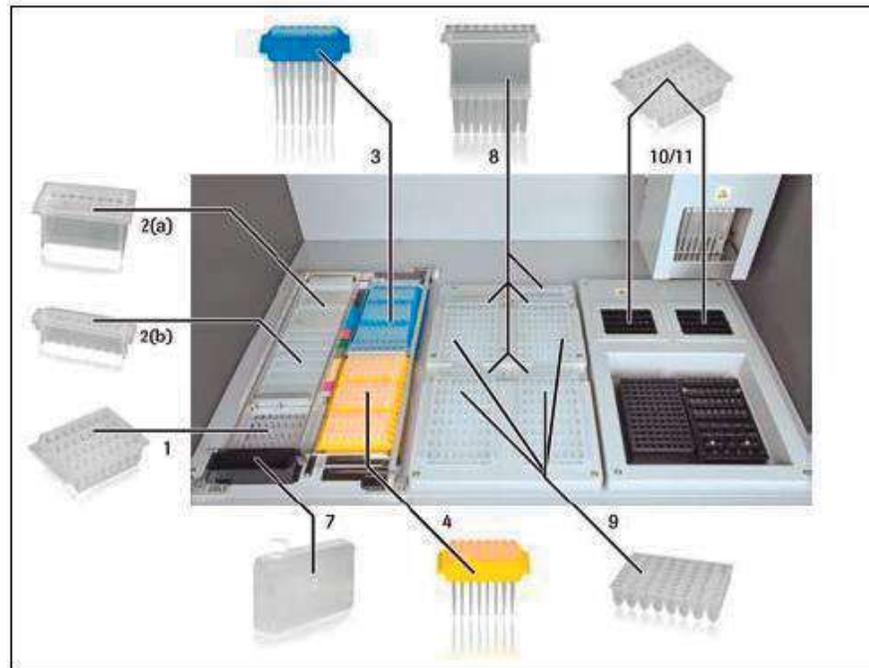


Figura 44. Colocación de los Consumibles en el Robot Magna Pure LC

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

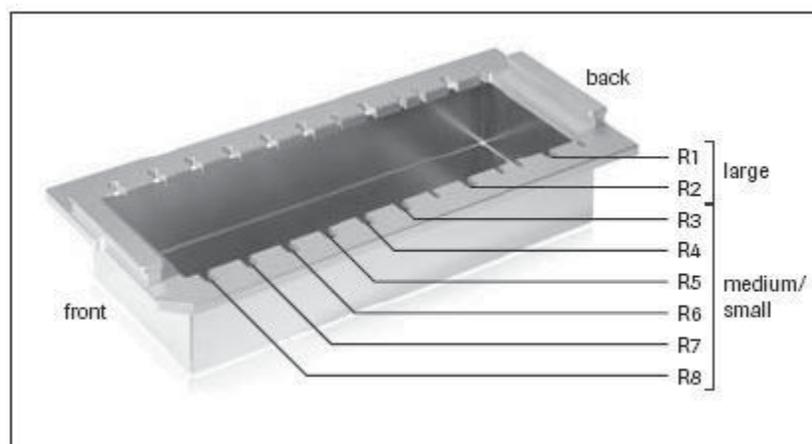


Figura 45. Orden de colocación de los Reactivos en la Charola del Robot Magna Pure LC



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 46. 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 46.

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

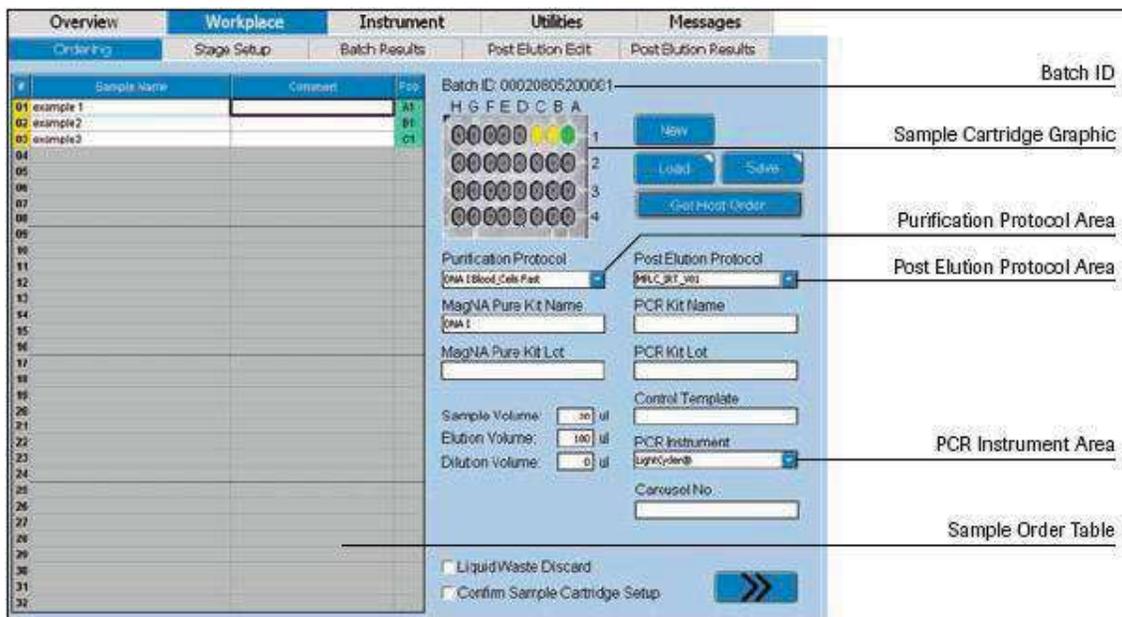


Figura 47. Introducción de muestras y protocolo en el Software del Robot Magna Pure LC

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*.

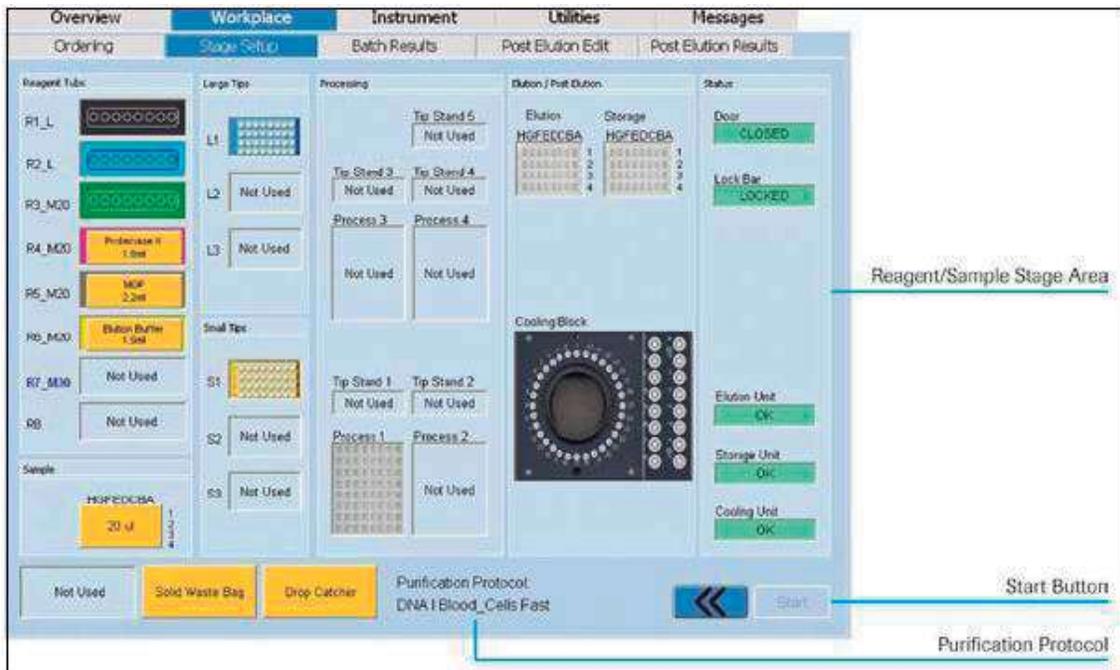


Figura 48. Programación del Software MagnaPure LC



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.

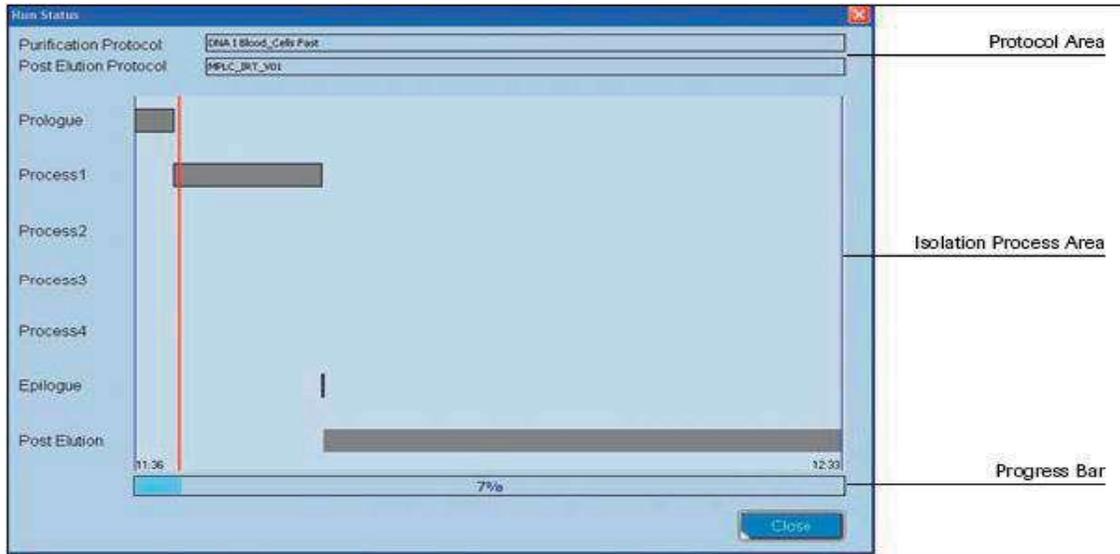


Figura 49. Monitoreo de Extracción de ácidos nucleicos en el Robot Magna Pure LC

Envasado del material genético purificado

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



17.6 PCR EN TIEMPO REAL



Figura 50. Termociclador *LightCycler*® 480 Real-Time PCR.

17.7 PREPARACIÓN Y CARGA DE UN GEL DE AGAROSA



Figura 51. Preparación y carga de un gel de agarosa con los productos de PCR para corrimiento electroforético.



18 BIBLIOGRAFÍA.

1. Albert, M. J., S. M. Faruque, A. S. Faruque, P. K. Neogi, M. Ansaruzzaman, N. A. Bhuiyan, K. Alam, and M. S. Akbar. 1995. Controlled study of Escherichia coli diarrheal infections in Bangladeshi children. *J. Clin. Microbiol.* 33:973–977.
2. Arturo M. Terrés Speziale. Enfermedad diarreica e intolerancia a la lactosa en México. *Mex.* 2002.
3. Baldwin, T. J., S. Knutton, L. Sellers, H. A. M. Hernandez, A. Aitken, and P. H. Williams. 1992. Enteroaggregative Escherichia coli strains secrete a heat-labile toxin antigenically related to E. coli hemolysin. *Infect. Immun.* 60:2092–2095.
4. Beutin, L., S. Aleksic, S. Zimmermann, and K. Gleier. 1994. Virulence factors and phenotypic traits of verotoxigenic strains of Escherichia coli isolated from human patients in Germany. *Med. Microbiol. Immunol. (Berlin)* 183:13–21.
5. 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.
6. Boyce, T. G., D. L. Swerdlow, and P. M. Griffin. 1995. Current concepts: Escherichia coli O157:H7 and the hemolytic-uremic syndrome. *N. Engl. J. Med.* 333:364–368.
7. Calderwood, S. B., D. W. K. Acheson, G. T. Keusch, T. J. Barrett, P. M. Griffin, N. A. Strockbine, B. Swaminathan, J. B. Kaper, M. M. Levine, B. S. Kaplan, H. Karch, A. D. O'Brien, T. G. Obrig, Y. Takeda, P. I. Tarr, and I. K. Wachsmuth. 1996. Proposed new nomenclature for SLT (VT) family. *ASM News* 62:118–119.
8. Carpick, B. W., and J. Gariepy. 1993. The Escherichia coli heat-stable enterotoxin is a long-lived superagonist of guanylin. *Infect. Immun.* 61: 4710–4715.
9. Cassels FJ, Wolf MK, Colonization factors of diarrheagenic E.coli and their intestinal receptors. *J Ind Microbiol* 1995;15.214-226
10. Claudia Toma, Yan Lu, Naomi Higa, Noboru Nakasone, Isabel Chinen, Ariela Baschkier, Marta Rivas, and Masaaki Iwanaga. Multiplex PCR Assay for Identification of Human Diarrheagenic
11. Crane, J. K., M. S. Wehner, E. J. Bolen, J. J. Sando, J. Linden, R. L. 188 NATARO AND KAPER *CLIN. MICROBIOL. REV.* Guerrant, and C. L. Sears. 1992. Regulation of intestinal guanylate cyclase by the heat-stable enterotoxin of Escherichia coli(STa) and protein kinase C. *Infect. Immun.* 60:5004–5012.
12. Cravioto, A., R. J. Gross, S. M. Scotland, and B. Rowe. 1979. An adhesive factor found in strains of Escherichia coli belonging to the traditional infantile enteropathogenic serotypes. *Curr. Microbiol.* 3:95–99.
13. Day, N. P., S. M. Scotland, T. Cheasty, and B. Rowe. 1983. Escherichia coli O157:H7 associated with human infections in the United Kingdom. *Lancet*:825.
14. de Graaf, F. K., and W. Gaastra. 1994. Fimbriae of enterotoxigenic Escherichia coli, p. 58–83. In P. Klemm (ed.), *Fimbriae: adhesion, genetics, biogenesis, and vaccines*. CRC Press, Inc., Boca Raton, Fla.
15. Debroy, C., J. Yealy, R. A. Wilson, M. K. Bhan, and R. Kumar. 1995. Antibodies raised against the



- outer membrane protein interrupt adherence of enteroaggregative *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 63:2873–2879.
16. Donnenberg, M. S., S. Tzipori, M. L. McKee, A. D. O'Brien, J. Alroy, and J. B. Kaper. 1993. The role of the *eae* gene of enterohemorrhagic *Escherichia coli* in intimate attachment in vitro and in a porcine model. *J. Clin. Invest.* 92:1418–501424.
 17. DuPont, H. L., S. B. Formal, R. B. Hornick, M. J. Snyder, J. P. Libonati, D. G. Sheahan, E. H. LaBrec, and J. P. Kalas. 1971. Pathogenesis of *Escherichia coli* diarrhea. *N. Engl. J. Med.* 285:1-9[Medline].
 18. Duran, C.T. 2007. Diarrea aguda en niños. *Rev. Paceaña de medicina familiar*
 19. Eklund, S., I. Brunsson, M. Jodal, and O. Lundgren. 1987. Changes in cyclic 3959-adenosine monophosphate tissue concentration and net fluid transport in the cat's small intestine elicited by cholera toxin, arachidonic acid, vasoactive intestinal polypeptide, and 5-hydroxytryptamine. *Acta Physiol. Scand.* 29:115–125.
 20. Elsinghorst, E. A., and D. J. Kopecko. 1992. Molecular cloning of epithelial VOL. 11, 1998 DIARRHEAGENIC *E. COLI* 189 cell invasion determinants from enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 60:2409–2417.
 21. Elsinghorst, E. A., and J. A. Weitz. 1994. Epithelial cell invasion and adherence directed by the enterotoxigenic *Escherichia coli* *tib* locus is associated with a 104-kilodalton outer membrane protein. *Infect. Immun.* 62:3463–3471.
 22. *Escherichia coli*. *Journal of Clinical Microbiology*, June 2003, p. 2669–2671
 23. Eslava, C., J. Villaseca, R. Morales, A. Navarro, and A. Cravioto. 1993. Identification of a protein with toxigenic activity produced by enteroaggregative *Escherichia coli*, abstr. B-105, p. 44. In Abstracts of the 93rd General Meeting of the American Society for Microbiology 1993. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
 24. Fang, G. D., A. A. M. Lima, C. V. Martins, J. P. Nataro, and R. L. Guerrant. 1995. Etiology and epidemiology of persistent diarrhea in northeastern Brazil: a hospital-based, prospective, case-control study. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 21:137–144..
 25. Flores-Abuxapqui, J. J., G. J. Suarez-Itoil, M. R. Heredia-Navarrete, M. A. Puc-Franco, and J. Franco-Monsreal. 1994. Frequency of enterotoxigénica *Escherichia coli* in infants during the first three months of life. *Arch. Med. Res.* 25:303–307.
 26. Gaastra, W., and A.-M. Svennerholm. 1996. Colonization factors of human enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC). *Trends Microbiol.* 4:444–452.
 27. Giono S, Escobar A, Valdespino JL. Diagnostico de Laboratorio de infecciones gastrointestinales. Secretaria de Salud, Instituto Nacional de Diagnostico y Referencia Epidemiologicos. México 1994.
 28. Griffin, P. M., and R. V. Tauxe. 1991. The epidemiology of infections caused by *Escherichia coli* O157:H7, other enterohemorrhagic *E. coli*, and the associated hemolytic uremic syndrome. *Epidemiol. Rev.* 13:60–98.
 29. Guth, B. E., E. M. Twiddy, L. R. Trabulsi, and R. K. Holmes. 1997. Variation in chemical properties and antigenic determinants among type II heat-labile nterotoxins of *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 64:529–536.



30. Hirayama, T. 1995. Heat-stable enterotoxin of *Escherichia coli*, p. 281–296. In J. Moss, B. Iglewski, M. Vaughan, and A. T. Tu (ed.), *Bacterial toxins and virulence factors in disease*. Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y.
31. Hol, W. G. J., T. K. Sixma, and E. A. Merritt. 1995. Structure and function of *E. coli* heat-labile enterotoxin and cholera toxin B pentamer, p. 185–223. In J. Moss, B. Iglewski, M. Vaughan, and A. T. Tu (ed.), *Bacterial toxins and virulence factors in disease*. Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y.
32. Hoque, S. S., A. S. Faruque, D. Mahalanabis, and A. Hasnat. 1994. Infectious agents causing acute watery diarrhoea in infants and young children in Bangladesh and their public health implications. *J. Trop. Pediatr.* 40:351–354.
33. Hromockyj, A. E., S. C. Tucker, and A. T. Maurelli. 1992. Temperature regulation of *Shigella* virulence: identification of the repressor gene *virR*, an analogue of *hns*, and partial complementation by tyrosyl transfer RNA (tRNA^{Tyr}). *Mol. Microbiol.* 6:2113–2124.
34. Ismaili, A., D. J. Philpott, M. T. Dytoc, and P. M. Sherman. 1995. Signal transduction responses following adhesion of verocytotoxin-producing *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 63:3316–3326.
35. Jackson, M. P., R. J. Neill, A. D. O'Brien, R. K. Holmes, and J. W. Newland. 1987. Nucleotide sequence analysis and comparison of the structural genes for Shiga-like toxin I and Shiga-like toxin II encoded by bacteriophages from *Escherichia coli* 933. *FEMS Microbiol. Lett.* 44:109–114.
36. Jann, K., and H. Hoshchutsky. 1991. Nature and organization of adhesins. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 151:55–85.
37. Jarvis, K. G., and J. B. Kaper. 1996. Secretion of extracellular proteins by enterohemorrhagic *Escherichia coli* via a putative type III secretion system. *Infect. Immun.* 64:4826–4829.
38. 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.
39. Johnson, R. P., R. C. Clarke, J. B. Wilson, S. C. Read, K. Rahn, S. A. Renwick, K. A. Sandhu, D. Alves, M. A. Karmali, H. Lior, S. A. McEwen, J. S. Spika, and C. L. Gyles. 1996. Growing concerns and recent outbreaks involving non-O157:H7 serotypes of verotoxigenic *Escherichia coli*. *J. Food Prot.* 59:1112–1122.
40. Johnson, W. M., H. Lior, and G. S. Bezanson. 1983. Cytotoxic *Escherichia coli* O157:H7 associated with haemorrhagic colitis in Canada. *Lancet* i:76. (Letter.)
41. Jones, C. H., K. Dodson, and S. J. Hultgren. 1996. Structure, function, and assembly of adhesive P pili, p. 175–219. In H. L. T. Mobley and J. W. Warren (ed.), *Urinary tract infections: molecular pathogenesis and clinical management*. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
42. Jose, J., F. Jahnig, and T. F. Meyer. 1995. Common structural features of IgA1 protease-like outer membrane protein autotransporters. *Mol. Microbiol.* 18:377–382.
43. Keene, W. E., J. M. McAnulty, F. C. Hoesly, L. P. Williams, K. Hedberg, G. L. Oxman, T. J. Barrett, M. A. Pfaller, and D. W. Fleming. 1994. A swimming-associated outbreak of hemorrhagic colitis caused by *Escherichia coli* O157:H7 and *Shigella sonnei*. *N. Engl. J. Med.* 331:579–584.
44. Knutton, S., M. M. McConnell, B. Rowe, and A. S. McNeish. 1989. Adhesion and ultrastructural properties of human enterotoxigenic *Escherichia coli* producing colonization factor antigens III and



- IV. *Infect. Immun.* 57:3364–3371.
45. Knutton, S., T. Baldwin, P. H. Williams, and A. S. McNeish. 1989. Actin accumulation at sites of bacterial adhesion to tissue culture cells: basis of a new diagnostic test for enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 57:1290–1298
 46. Katzung B. G., *Farmacología Basica y Clínica*, 10^ª ed. Editorial Manual Moderno. 2008, pp 751-753, 863.
 47. Koneman, W.E.;Allen, D.S.;Janda, M.W.;Schreckenberger, P.C.;Winn (h), C.W.Diagnóstico microbiológico.Texto y Atlas color.6ta ed. Médica Panamericana.2008.
 48. Kusters, J. G., and W. Gastra. 1994. Fimbrial operons and evolution, p. 179–196. In P. Klemm (ed.), *Fimbriae: adhesion, genetics, biogenesis and vaccines*. CRC Press, Inc., Boca Raton, Fla.
 49. Law, D., and J. Kelly. 1995. Use of heme and hemoglobin by *Escherichia coli* O157 and other Shiga-like-toxin-producing *E. coli* serogroups. *Infect. V*
 50. Levine, M. M. 1987. *Escherichia coli* that cause diarrhea: enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic, and enteroadherent. *J. Infect. Dis.* 155:377-389[Medline].
 51. Levine, M. M., C. Ferreccio, V. Prado, M. Cayazzo, P. Abrego, J. Martinez, L. Maggi, M. M. Baldini, W. Martin, D. Maneval, B. Kay, L. Guers, H. Lior, S. S. Wasserman, and J. P. Nataro. 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.
 52. Levine, M. M., E. S. Caplan, D. Watermann, R. A. Cash, R. B. Hornick, and M. J. Snyder. 1977. Diarrhea caused by *Escherichia coli* that produce only heat-stable enterotoxin. *Infect. Immun.* 17:78–82.
 53. Levine, M. M., J. Xu, J. B. Kaper, H. Lior, V. Prado, B. Tall, J. Nataro, H. Karch, and K. Wachsmuth. 1987. A DNA probe to identify enterohemorrhagic *Escherichia coli* of O157:H7 and other serotypes that cause hemorrhagic colitis and hemolytic uremic syndrome. *J. Infect. Dis.* 156:175–182.
 54. Levine, M. M., P. Ristaino, G. Marley, C. Smyth, S. Knutton, E. Boedeker, R. Black, C. Young, M. L. Clements, C. Cheney, and R. Patnaik. 1984. Coli surface antigens 1 and 3 of colonization factor antigen II-positive enterotoxigénica *Escherichia coli*: morphology, purification, and immune responses in humans. *Infect. Immun.* 44:409–420.
 55. Mangia, A. H., A. N. Duarte, R. Duarte, L. A. Silva, V. L. Bravo, and M. C. Leal. 1993. Aetiology of acute diarrhoea in hospitalized children in Rio de Janeiro City, Brazil. *J. Trop. Pediatr.* 39:365–367.
 56. Matsudaira, P., and P. Jammey. 1988. Pieces in the actin-severing puzzle. *Cell* 54:139–140.
 57. McDaniel, T. K., K. G. Jarvis, M. S. Donnenberg, and J. B. Kaper. 1995. A genetic locus of enterocyte effacement conserved among diverse enterobacterial pathogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:1664–1668.
 58. McGee, D. W., C. O. Elson, and J. R. McGhee. 1993. Enhancing effect of cholera toxin on interleukin-6 intestinal epithelial cells: mode of action and augmenting effect of inflammatory cytokines. *Infect. Immun.* 61:4637–4644.
 59. Mezzoff, A. G., R. A. Giannella, M. N. Eade, and M. B. Cohen. 1992. *Escherichia coli* enterotoxin (STa) binds to receptors, stimulates guanyl cyclase, and impairs absorption in rat colon. *Gastroenterology* 102:816–822.



60. Mills, M., and S. M. Payne. 1995. Genetics and regulation of heme iron transport in *Shigella dysenteriae* and detection of an analogous system in *Escherichia coli* O157:H7. *J. Bacteriol.* 177:3004–3009.
61. Nataro JP, Kaper JB. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev* 1998;11(1):142-201.
62. Nataro JP, Kaper JB. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev* 1998;11(1):142-201. (Med Line)
63. Nataro, J. P., D. Yikang, D. Yingkang, and K. Walker. 1994. AggR, a transcriptional activator of aggregative adherence fimbria I expression in enteroaggregative *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 176:4691–4699.
64. Nataro, J. P., D. Yikang, S. Cookson, A. Cravioto, S. J. Savarino, L. D. Guers, M. M. Levine, and C. O. Tacket. 1995. Heterogeneity of enteroaggregative *Escherichia coli* virulence demonstrated in volunteers. *J. Infect. Dis.* 171:465–468.
65. Nataro, J. P., I. C. Scaletsky, J. B. Kaper, M. M. Levine, and L. R. Trabulsi. 1985. Plasmid-mediated factors conferring diffuse and localized adherence of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 48:378–383.
66. Nataro, J. P., S. Hicks, A. D. Phillips, P. A. Vial, and C. L. Sears. 1996. T84 cells in culture as a model for enteroaggregative *Escherichia coli* pathogenesis. *Infect. Immun.* 64:4761–4768.
67. O'Brien, A. D., and R. K. Holmes. 1987. Shiga and Shiga-like toxins. *Microbiol. Rev.* 51:206–220.
68. O'Brien, A. D., and R. K. Holmes. 1996. Protein toxins of *Escherichia coli* and *Salmonella*, p. 2788–2802. In F. C. Neidhardt, R. Curtiss III, J. L. Ingraham, E. C. C. Lin, K. B. Low, B. Magasanik, W. S. Reznikoff, M. Riley, M. Schaechter, and H. E. Umbarger (ed.), *Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular biology, 2nd ed. ASM Press, Washington, D.C.
69. Pickett, C. L., E. M. Twiddy, C. Coker, and R. K. Holmes. 1989. Cloning, nucleotide sequence, and hybridization studies of the type IIb heat-labile enterotoxin gene of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 171:4945–4952.
70. Pierard, D., L. Huyghens, S. Lauwers, and H. Lior. 1991. Diarrhoeae associated with *Escherichia coli* producing porcine oedema disease verotoxin. *Lancet* 338:762.
71. Rasheed, J. K., L.-M. Guzman-Versezco, and Y. M. Kupersztuch. 1990. Two precursors of the heat-stable enterotoxin of *Escherichia coli*: evidence of extracellular processing. *Mol. Microbiol.* 4:265–273.
72. Riley, L. W., R. S. Remis, S. D. Helgerson, H. B. McGee, J. G. Wells, B. R. Davis, R. J. Hebert, E. S. Olcott, L. M. Johnson, N. T. Hargrett, P. A. Blake, and M. L. Cohen. 1983. Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. *N. Engl. J. Med.* 308:681–685.
73. Rodriguez G. Diagnosis and main characteristics of *Escherichia coli* pathogenic groups. *Salud Publica Mex* 44:464-475, 2002
74. Sánchez, C. M. L. Asociación de Rotavirus con *Escherichia coli* patógena causante de diarrea aguda en lactantes del Hospital Infantil de Morelia Michoacán de Enero del 2004 a Abril del 2006.
75. Savarino SJ, Fasano A, Robertson DC, Levine MM. Enteroaggregative *Escherichia coli* elaborate a heat-stable enterotoxin demonstrable in an in vitro intestinal model. *J Clin Invest* 1991;87:1450-1455.



76. Savarino SJ, McVeigh A, Watson J, Molina J, Cravioto A, Echeverria P et al. Enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin is not restricted to enteroaggregative *E. coli*. *J Infect Dis* 1996;173:1019-1022.
77. Savarino, S. J., A. Fasano, D. C. Robertson, and M. M. Levine. 1991. Enteroaggregative *Escherichia coli* elaborate a heat-stable enterotoxin demonstrable in an in vitro rabbit intestinal model. *J. Clin. Invest.* 87:1450–1455.
78. Savarino, S. J., A. Fasano, J. Watson, B. M. Martin, M. M. Levine, S. Guandalini, and P. Guerry. 1993. Enteroaggregative *Escherichia coli* heatstable enterotoxin 1 represents another subfamily of *E. coli* heat-stable toxin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:3093–3097.
79. Savarino, S. J., A. McVeigh, J. Watson, J. Molina, A. Cravioto, P. Echeverria, M. K. Bhan, M. M. Levine, and A. Fasano. 1996. Enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin is not restricted to enteroaggregative *Escherichia coli*. *J. Infect. Dis.* 173:1019–1022.
80. Savarino, S. J., P. Fox, D. Yikang, and J. P. Nataro. 1994. Identification and characterization of a gene cluster mediating enteroaggregative *Escherichia coli* aggregative adherence fimbria I biogenesis. *J. Bacteriol.* 176:4949–4957.
81. Scaletsky, I. C. A., M. L. M. Silva, and L. R. Trabulsi. 1984. Distinctive patterns of adherence of enteropathogenic *Escherichia coli* to HeLa cells. *Infect. Immun.* 45:534–536.
82. 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.
83. Schmidt, H., C. Kernbach, and H. Karch. 1996. Analysis of the EHEC hly operon and its location in the physical map of the large plasmid of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Microbiology* 142:907–914.
84. Schmidt, H., L. Beutin, and H. Karch. 1995. Molecular analysis of the plasmid-encoded hemolysin of *Escherichia coli* O157:H7 strain EDL 933. *Infect. Immun.* 63:1055–1061.
85. Schultsz, C. 1994. Detection of enterotoxigenic *Escherichia coli* in stool samples by using nonradioactively labeled oligonucleotide DNA probes and PCR. *J. Clin. Microbiol.* 1994:2393–2397.
86. Sears, C. L., and J. B. Kaper. 1996. Enteric bacterial toxins: mechanisms of action and linkage to intestinal secretion. *Microbiol. Rev.* 60:167–215.
87. Sixma, T. K., K. H. Kalk, B. A. van Zanten, Z. Dauter, J. Kingma, B. Witholt, and W. G. Hol. 1993. Refined structure of *Escherichia coli* heatlabile enterotoxin, a close relative of cholera toxin. *J. Mol. Biol.* 230:890–918.
88. Sjoberg, P. O., M. Lindahl, J. Porath, and T. Wadstrom. 1988. Purification and characterization of CS2, a sialic acid-specific haemagglutinin of enterotoxigénica *Escherichia coli*. *Biochem. J.* 255:105–111.
89. Smith, H. R., S. M. Scotland, G. A. Willshaw, B. Rowe, A. Cravioto, and C. Eslava. 1994. Isolates of *Escherichia coli* O44:H18 of diverse origin are enteroaggregative. *J. Infect. Dis.* 170:1610–1613.
90. Streatfield, S. J., M. Sandkvist, T. K. Sixma, M. Bagdasarian, W. G. J. Hol, and T. R. Hirst. 1992. Intermolecular interactions between the A and B subunits of heat-labile enterotoxin from *Escherichia coli* promote holotoxin assembly and stability in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:12140–12144.
91. Tesh, V. L., and A. D. O'Brien. 1991. The pathogenic mechanisms of Shiga toxin and the Shiga-like



- toxins. *Mol. Microbiol.* 5:1817–1822.
92. Thomas, A., T. Cheasty, H. Chart, and B. Rowe. 1994. Isolation of vero cytotoxin-producing *Escherichia coli* serotypes O9ab:H- and O101:H-carrying VT2 variant gene sequences from a patient with haemolytic uraemic syndrome. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 13:1074–1076.
 93. Tornieporth, N. G., J. John, K. Salgado, P. de Jesus, E. Latham, M. C. Melo, S. T. Gunzburg, and L. W. Riley. 1995. Differentiation of pathogenic *Escherichia coli* strains in Brazilian children by PCR. *J. Clin. Microbiol.* 33:1371–1374.
 94. Tórrés AG, Zhou X, Kaper JB. Adherence of diarrheagenic *Escherichia coli* strains to epithelial cells. *Infect Immun* 2005;73(1):18-29.
 95. Torres, A. G., and S. M. Payne. 1997. Haem iron-transport system in enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Mol. Microbiol.* 23:825–833.
 96. Tzipori, S., and J. P. Nataro. 1997.
 97. Villaseca JM, Hernández U, Sainz-Espuñes TR, Rosario C, Eslava C. Enteroagregative *Escherichia coli* an emergent pathogen with different virulence properties. *Revista Latinoamericana de Microbiología* vol.47, numero 4, 5. 2005.
 98. Winsor, D. K., Jr., S. Ashkenazi, R. Chiovetti, and T. G. Cleary. 1992. Adherence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* strains to a human colonic epithelial cell line (T84). *Infect. Immun.* 60:1613–1617.
 99. Wolf, M. K. 1997. Occurrence, distribution, and association of O and H serogroups, colonization factor antigens, and toxins of enterotoxigénica *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol. Rev.* 10:569–584.
 100. Wood, L. V., L. E. Ferguson, P. Hogan, D. Thurman, D. Morgan, H. L. DuPont, and C. D. Ericsson. 1983. Incidence of bacterial enteropathogens in foods from Mexico. *Appl. Environ. Microbiol.* 46:328–332.
 101. Yamanaka, H., M. Kameyama, T. Baba, Y. Fujii, and K. Okamoto. 1994. Maturation pathway of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin I. Requirement of DsbA for disulfide bond formation. *J. Bacteriol.* 176:2906–2913.
 102. Cerritos, 1999, Parveen et al, 1999; Cruz, 2000
 103. Lawrence y Ochman, 1998.
 104. Ochman, 1999
 105. Boyd, 1996.
 106. Hirschhorn N. the treatment of acute diarrhea in children. An historical and physiological perspective. *Am J Clin Nutr* 1999; 33:637-663
 107. Lewin H, *Polymers for Advanced Technologies.* 1998
 108. Madigan, Martinko, Parker. 2000. *Biology of Microorganisms*, 9 edition. Prentice Hall, Upper Saddle River, NJ.
 109. Snyder, J. D., J. G. Wells, J. Yashuk, N. Puh, and P. A. Blake. 1984. Outbreak of invasive *Escherichia coli* gastroenteritis on a cruise ship. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 33:281-284
 110. Valdespiro JL; Garcia 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
 111. Sistema Nacional de información en Salud (SINAIS), 2008.



112. Guadalupe A. 2002. Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de Escherichia coli. *salud pública de México*.44(5). 464:475.
113. CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Test; Approved Standard- Ninth Edition. 2006.
114. Dirección de Medicamentos y Farmacoepidemiología del Seguro Social de Costa Rica, Tratamiento de diarrea aguda en niños y adultos. 2005.
115. Vademecum 2008
116. Gobantes C. Manual Normon. Octava Edición. España 2006. 1119.
117. 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.
118. Espinoza L. Herramientas molecular. Manual práctico de PCR. 17: 517-537
119. 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.
120. Contardo M. V., Bustamante G., Rodríguez J. Probióticos en niños con diarrea aguda. Santiago de Chile. *Revista pediátrica en línea*. Vol 2, N° 3, 2005.
121. Racecadotril para el tratamiento de la diarrea aguda. *Rev Panam Salud Publica/Pan Am J Public Health* 14(1), 2003.
122. Gonzalez Gero M, Muñiz Gabilán A. Resecadotrilio, un nuevo antidiarreico. Hoja de evaluación de medicamentos de Castilla La Mancha. 2003.
123. Kumate J, Gutiérrez G, Muñoz O, Santos JI. Manual de Infectología Clínica, México 1994, p66
124. Manual de enfermedades diarreicas agudas, prevención control y tratamiento. Secretaría de Salud 2009.
125. Dirección General de Estadística, Informática y Evaluación. Mortalidad 1992. Distrito Federal, México: Secretaría de Salud; 1992
126. Dirección General de Estadística, Informática y Evaluación. Mortalidad 1993. Distrito Federal, México: Secretaría de Salud; 1993.
127. Cortés Ortiz IA, Rodríguez Angeles G, Moreno Escobar EA, Tenorio Lara JM, Torres Mazadiego BP, Montiel Vázquez E. Brote causado por Escherichia coli en Chalco, México *Salud Publica Mex* 2002;44:297-302.