



**UNIVERSIDAD MICHOCANA DE SAN
NICOLÁS DE HIDALGO**

ESCUELA DE QUIMICO FARMACOBIOLOGIA

**AISLAMIENTO DE ADN Y TIPIFICACION DE *Escherichia coli*
POR PCR EN AISLADOS BACTERIANOS Y HECES**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE :
QUÍMICO FARMACOBIOLOGO**

**PRESENTA:
YURIRIA LOPEZ SOTO**

**ASESOR :
D. EN C. MA. SOLEDAD VÁZQUEZ GARCIDUEÑAS
MORELIA,MICHOACÁN.**

JUNIO 2006

Quiero empezar agradeciéndole a **DIOS** por darme la oportunidad de terminar un ciclo de mi vida, por otorgarme la fuerza y el Espíritu para poder hoy ver unos de mis sueños hecho realidad.

Gracias Señor por todo lo que haces continuamente por mí y por los míos. Tú sabes cuales son mis anhelos, mis necesidades. Según tu infinita misericordia dame lo que sea mejor para mí.

A ustedes **PADRES**, como poder agradecer todo lo que han hecho, gracias por toda la confianza que me han depositado, todo lo que soy lo debo a ustedes y espero poder llegar a ser un día lo que esperan de mí.

A ti **PAPÁ**, gracias por el respaldo que me has dado, por todos estos años en los que has estado velando mis pasos. Siempre que he tenido alguna dificultad, me consuela voltear y verte a mi lado.

A ti mi linda **MAMITA**, el ser que más amo en este mundo, te dedico todos mis triunfos, y todo lo que soy. Eres el mejor regalo que he tenido, necesito de ti para no claudicar cuando todo parece en mi contra, necesito de ti para mejorar, para amar, para reír ante la vida, para llorar por el dolor sin que el sufrimiento me derrumbe, necesito de ti para encontrar la fuerza. Gracias porque cuando caí y pensé que ya nunca me volvería a levantar, me extendiste tus brazos con amor. Gracias porque siempre confiaste en tu CHAPARRITA.

A mis **HERMANOS** Gabriel y Arnulfo , por quererme tanto y preocuparse por mí. Gracias por todas esas risas que hemos pasado, y por que no, también por las peleas que al final terminaban uniéndonos más. Los Quiero Mucho.

A mis **ABUELOS** porque mas que su nieta me trataron como una hija. Gracias por enseñarme a actuar y a esperar; a saber en que circunstancia alzar el pecho y en cual humillar la frente.

A mis **TIOS**; Arnulfo, Hugo, Martín, Alfredo, Edith, Alis, Pati, Rocío, Cesia, Luz y Alicia, que con su ejemplo me han ayudado a ser mejor persona. Gracias por hacerme parte de una familia íntegra y valiente.

A mis **PRIMOS**; Karla, Alexis, Ricardo, Hugo, Karen, Carlos, Ilse, Kevin y recientemente Kerenia, gracias por compartir conmigo sus alegrías, por verme , respetarme y amarme como la prima mayor, pero sobre todo por llenarme de caricias y abrazos.

A ti **MISHIN**, gracias por enseñarme a creer en el amor desinteresado, aquel que no conoce ni tiempo ni distancia. Gracias por hacerme entender que a veces debemos padecer males para disfrutar luego de bienes mayores; Gracias por todo lo que haces por mí, por desvelarte en mis artículos, cuando tenías que prepararte para el Doctorado. Siempre admiraré tu Fuerza.

A la **D.C.Soledad Vazquèz Garcideñas** por todo el apoyo que me ha brindado , por la confianza que tuvo en mí , por enseñarme que la curva ascendente del progreso personal es lo que enciende la vida y mantiene el animo en la lucha. Gracias por todo lo que ha dejado en mí.

A mis **Revisores** de Tesis: D.C Gerardo Vazquèz Marrufo, D.C María Guadalupe Zavala Páram ,Q.F.B Blanca Nateras Marín, mil gracias por el esfuerzo , tiempo y dedicación que le pusieron a este proyecto. Gracias por sentarse y corregir mis tantos errores.

A todos mis **Compañeros de trabajo** los que hicieron más llevadera mi estancia en el laboratorio, D.C Robinson, a las dos Letys, Pati, Gloria, Pancho, Mario, Juan José, Vero; gracias por

su compañerismo y sus consejos. Gracias por los pasteles y comidas que compartimos juntos y por mostrarme que no todo es trabajo.

A los que fueron mas que compañeros de trabajo, y que me dieron la oportunidad de considerarlos mis **Amigos** ; A ti Nohemí por todo lo que me enseñaste, entre ello lo mas importante, el de saber luchar por mis sueños, a ti Andreí por el apoyo incondicional que siempre me has brindado, por ayudarme a reencontrar mi fuerza, gracias por tu espíritu alegre y enseñarme que dejar de luchar es fracasar. A ti Ana porque cuando te necesité siempre tuviste tiempo de escucharme y abrazarme, eres una gran persona y amiga ; A ti Iliana por ser tan incondicional, y sobretodo optimista, por hacerme creer que todo es posible; a ti César por la alegría que siempre me transmites, sabes, tu corazón es igual que tu altura GRANDE!

Y a ti mi amiga Maggy gracias por la confianza que me diste desde el primer día, hoy se que puedo contar contigo siempre. A mis grandes amigas de la Universidad ; Fanny gracias “chinita” por tu ternura, por soportar con paciencia mis locuras y por ayudarme a ser mejor persona, y a ti Anael mi “guera” y “Carnalita”, mil gracias por estar a mi lado en el momento mas difícil de mi vida ,junto con el que hoy es tu marido Jonatán. Gracias por todo lo que me dieron, por las aventuras que pasamos y las risas que compartimos juntas.

A mis **Amigos por Correspondencia**, como olvidarme de ustedes que cada vez que yo leía una de sus líneas me regalaron tantos momentos felices; Danny Sicajol (Guatemala) gracias por todos tus detalles, eres especial, único y con una voz maravillosa; Carlos (Cuba) por enseñarme a echarle ganas a todo lo que hago y jamás rendirme por difíciles que parezcan las circunstancias ; Yosvany (Cuba) por compartir conmigo tu realidad y demostrarme que en una amistad no se conocen limites; Marcos (EUA) por enseñarme que nadie es perfecto, que se pueden cometer errores, pero lo mejor es saber iniciar de nuevo; Tommy (EUA) por enseñarle a tu “amigucha” que nuestra amistad era un Don que Dios había puesto en tu corazón y en el mío; Alex y Danny (Tlaxcala), a ustedes gracias por su

optimismo, porque siempre que necesité ayuda para seguir adelante , ahí estaban ustedes ; Poncho (Tecomán) gracias por tu alegría, tu carácter noble, siempre me hiciste ver el lado positivo de las cosas; Maura(Querétaro) gracias por mostrarme que las amistades no nacen de la noche a la mañana, pero que las mejores aparecen en el momento preciso y se identifican a plenitud desde el principio ; Myrlna(D.F) porque mas que mi amiga, fuiste mi hermana mayor, y sabes no fuiste tu sino yo quien mas ganó; Nico (Huatulco) gracias por tus palabras de ¡animo!¡levanta esa cabecita!; Conviertete en gorrión y canta de alegría! Siempre me diste un espacio en tu corazón para desahogarme, pues en el alma a veces arrastramos penas y es solo en el corazón de un amigo como tú donde se puede encontrar descanso ; Ezequiel (Oaxaca) gracias por todos tus consejos, por desear que mi propósito fuera vivir en plenitud, que progresará, triunfará, pero sobre todo por hacerme ver que no bastaba soñar sino que se debe luchar por cada sueño; Cotty (B.C.S) gracias por que me demostraste que la diferencia de edad no es impedimento para establecer una amistad. Gracias por los poemas que escribiste para mi, cada uno me ayudo a ser mejor persona; Cintly (Monterrey) por que a pesar del poco tiempo que nos conocemos, eres un gran amigo te agradezco todas tus palabras. Y a ti Noé , gracias por que no hubo un día en que no dejaras de confiar en mi, Gracias por la alegría de tu sonrisa y por enseñarme a que tenia que luchar y esforzarme para cristalizar mis anhelos mas profundos.

*Una y mil gracias a todos aquellos que han dejado huella en mí.
Que Dios los bendiga!!*

El presente trabajo fue realizado en el laboratorio de Genética Microbiana de la división de estudios de Postgrado Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas “DR. IGNACIO CHÁVEZ”, perteneciente a la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, bajo la asesoría de D. en C. Ma. Soledad Vázquez Garcidueñas.

INDICE GENERAL	PAGINA
INDICE DE ABREVIATURAS.....	3
INDICE DE FIGURAS.....	5
INDICE DE TABLAS.....	7
RESUMEN.....	8
I. INTRODUCCION.....	10
I.1 Microflora normal bacteriana.....	10
I.2 Coliformes.....	11
I.2.1 Características bioquímicas.....	12
I.2.2 Factores de virulencia.....	12
I.3 <i>Escherichia coli</i>	13
I.3.1 Morbimortalidad en México.....	13
I.3.2 Clasificación de <i>Escherichia coli</i>	14
I.3.2. a) Clasificación de <i>Escherichia coli</i> no diarreagenica	14
I.3.2. b) Clasificación de <i>Escherichia coli</i> diarreagenica.....	15
I.4 Métodos empleados en la identificación de <i>Escherichia coli</i>	21
I.4.1 Diagnóstico molecular.....	21
I.4.2 Desarrollo de la técnica de PCR	22
I.4.3 Trascendencia de la técnica de PCR en el diagnóstico de enfermedades	24
I.4.4 Ventajas de la técnica de PCR.....	26
I.4.5 Aplicaciones de PCR.....	27
I.5 Técnica de extracción de ADN.....	30
I.5.1 Problemas en la obtención de ADN útil para la técnica de PCR.....	33
II. JUSTIFICACION	35
III. OBJETIVOS	35
IV. ESTRATEGIA.....	36
V. MATERIAL Y METODOS.....	37
V.1 Material biológico.....	37
V.2 Medio de cultivo.....	37
V.3 Conservación de cepas.....	37
V.4 Extracción de DNA de alto peso molecular.....	37
V.5 Visualización en geles de agarosa (electroforesis).....	38

V.6 Espectrofotometría.....	39
V.7 Amplificación del gen 16s rRNA de <i>Escherichia coli</i>	39
V.8 Determinación de patotipos de <i>Escherichia coli</i>	40
V.9 Amplificación de fragmentos por PCR “duplex”.....	41
VI. RESULTADOS.....	42
VI.1 Detalles de la población analizada.....	42
VI.2 Ensayos de evaluación de los reguladores de extracción de DNA.....	44
VI.3 Ensayos de la visualización en geles de azarosa.....	47
VI.4 Ensayos de espectrofotometría.....	47
VI.5 Ensayos de amplificación del gen 16s rRNA de <i>Escherichia coli</i>	49
VI.6 Ensayos de tipificación molecular para <i>Escherichia coli</i>	51
VII. DISCUSION.....	52
VIII. CONCLUSIONES.....	55
IX. BIBLIOGRAFIA.....	56

INDICE DE ABREVIATURAS

°C	Grado centígrado
µL	microlitro
ADEC	<i>Escherichia coli</i> de adherencia difusa
ADN	Ácido desoxiribonucleico
ARN	Acido Ribonucleico
CFA	Factor de colonización de antigénica
EAEC	<i>Escherichia coli</i> enteroagregativa
EHEC	<i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica
EIEC	<i>Escherichia coli</i> enteroinvasiva
EPEC	<i>Escherichia coli</i> enteropatógena
ETEC	<i>Escherichia coli</i> enterotoxigénica
g	gramos
HS	<i>Escherichia coli</i> comensal
ITU	Infección del Tracto Urinario
Kb	Kilobases
lb	Libras
LT	Toxina termolábil
M	Molar
ml	mililitros
mM	milimolar
NaCl	Cloruro de sodio
Nal	Yoduro de sodio
NaOH	Hidróxido de Sodio
NMEC	<i>Escherichia coli</i> causante de meningitis neonatal.
nm	nanómetros
NTEC	<i>Escherichia coli</i> necrotoxigénica
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la Polimerasa

pH	Potencial hidrogeno
pulg²	Pulgada cuadrada
rpm	Revoluciones por minuto
ST	Toxina termoestable
SUH	Síndrome Urémico Hemolítico
U	Unidades
UFC	Unidades Formadoras de Colonias
UPEC	<i>Escherichia coli</i> Uropatógena
UV	Ultravioleta
V	Volts

NDICE DE FIGURAS		PAGINA
FIGURA 1	Pasos básicos de PCR	23
FIGURA 2	Amplificación exponencial de PCR	23
FIGURA 3	Distribución de acuerdo al sexo de los pacientes	42
FIGURA 4	Distribución de acuerdo a la edad de los pacientes	42
FIGURA 5	Distribución de diagnóstico presentado por pacientes tratados.	44
FIGURA 6	Electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio que muestra el DNA obtenido con los diferentes reguladores de extracción	45
FIGURA 7	Electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio que muestra el tratamiento con RNAasa	46
FIGURA 8	Electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio que muestra los productos amplificados con oligos universales mediante PCR	46
FIGURA 9 a)	Electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio que muestra el DNA extraído de las cepas de referencia	47
FIGURA 9 b)	Electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio que muestra el DNA extraído de las muestras problema	47
FIGURA 10 a)	Electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio que muestra los productos de amplificación mediante PCR del gen 16S obtenidos de los aislados clínicos	49

FIGURA 10 b)	Electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio que muestra los productos de amplificación mediante PCR del gen 16S obtenidos de las muestras problema (heces)	49
FIGURA 11	Amplificación del gen 16S RNAr de Escherichia coli en aislados clínicos	50
FIGURA 12	Amplificación del gen 16S rRNA de Escherichia coli en muestras problema (Heces)	50
FIGURA 13	Electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio que muestra los patrones de amplificación obtenidos de los ensayos por PCR, con oligos específicos para ETEC	51
FIGURA 14	Electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio que muestra los patrones de amplificación obtenidos de los ensayos de amplificación por PCR "DUPLEX", con oligos específicos para EPEC, EIEC	51

INDICE DE TABLAS		PAGINA
Tabla I	Clasificación de coliformes	11
Tabla II	Mecanismos patogénicos de la diarrea por <i>E. coli</i>	16
Tabla III	Pruebas para evidenciar el mecanismo de patogenicidad de <i>Escherichia coli</i> causante de diarrea.	20
Tabla IV	Secuencia de oligonucleotidos específicos para <i>Escherichia coli</i> y tamaño del fragmento	39
Tabla V	Secuencia de oligonucleotidos específicos para cepas patógenas de <i>Escherichia coli</i> y tamaño del fragmento	40
Tabla VI	Diagnóstico presentado por pacientes tratados	43
Tabla VII	Absorbancias y concentraciones medidas en espectrofotómetro de muestras no tratadas con RNAasa	45
Tabla VIII	Absorbancias y concentraciones medidas en espectrofotómetro de muestras tratadas con RNAasa	46
Tabla IX	Concentración de DNA mediante espectrofotometría $\lambda = 260$	48

RESUMEN

Escherichia coli coloniza el intestino del humano pocas horas luego de su nacimiento, considerándose por ello como flora normal.

La intención del presente trabajo, es dar a conocer la importancia del análisis de *Escherichia coli* como bacteria predominante de la microflora normal así como demostrar principalmente que los ensayos moleculares por PCR constituyen una opción eficaz y segura en el establecimiento de diagnósticos rápidos comparándolos con los métodos convencionales pues por años los estudios de la composición genética de poblaciones bacterianas han estado obligados a depender de métodos basados en cultivos; por lo anterior los investigadores han explorado el uso de métodos moleculares para evitar las técnicas cultivo-dependientes, una de estas técnicas es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Las manipulaciones enzima-dependientes de ácidos nucleicos, tales como PCR, se obstaculizan por la presencia en el ADN extraído de sustancias naturales inhibitorias que no se pueden quitar por las técnicas estándares de la purificación de el ADN; y debido a que las heces son muestras clínicas muy complejas para la técnica de PCR directa, por la presencia de inhibidores inherentes que pueden ser coextraídos con el ADN bacteriano. Un tratamiento adecuado depende de la eficiencia y rapidez de la detección del agente causal.

No obstante, PCR se ha empleado para detectar *Escherichia coli*.

En este trabajo se compara la eficiencia para identificar a *Escherichia coli* mediante amplificación por PCR, utilizando el ADN extraído directamente de las muestras mediante un método que incluye xantogenato de potasio en el regulador de lisis; en este estudio se amplificó una región del gen 16S de RNAr de *Escherichia coli* directamente del ADN extraído de heces de 53 pacientes con diferentes diagnósticos médicos, así como de los aislados bacterianos obtenidos de dichas muestras y al amplificar con oligonucleótidos específicos para (gen 16S de ARN), se encontró una banda única de amplificación de aprox. 630 pb, obteniendo con satisfacción un fragmento de tamaño esperado.

El diagnóstico molecular basado en PCR fue comparado con el obtenido a partir de los aislados clínicos. La diagnosis bacteriológica en las muestras problema era concordante pues amplificaron con oligonucleotidos específicos para *Escherichia coli* en 46 casos (87%), mas 7 muestras que presentaron posible degradación de ADN (13 %), por otra parte los aislados clínicos presentaron una amplificación de 48 muestras (91%) con pérdida de 5 muestras (91%) probablemente por un mal aislado. Es importante mencionar que aquellas muestras de cultivo que no amplificaron con iniciadores específicos para *Escherichia coli*, si lo hicieron en la modalidad de heces, estos resultados indican que se puede identificar *E. coli* directamente de heces sin tener que aislar las bacterias presentes en dichas muestras, optimizando esto la identificación y confirmando que la técnica de PCR es mucho mas sensible y especifica. Posteriormente las muestras tratadas con iniciadores específicos para *E. coli* fueron sometidas a una tipificación molecular empleando iniciadores específicos para EPEC, EIEC, ETEC, ninguna de las muestras amplificó y por lo tanto concluimos *E. coli* solo estaba presente como flora normal.

Mediante el presente trabajo se divulga el uso potencial de la técnica de PCR como herramienta de diagnóstico clínico y delineamos las ventajas asociadas al uso clínico de este método. Los resultados presentados aquí se pueden utilizar como base para el desarrollo de metodologías moleculares para la identificación directa de patógenos bacterianos.

I.- INTRODUCCION

I.1 MICROFLORA NORMAL BACTERIANA

La microflora intestinal endógena humana es un órgano esencial del ser humano en el desarrollo epitelial y en la regulación de la inmunidad natural (Eckburg, 2005).

Las bacterias comienzan a colonizar la piel y la mucosa del niño recién nacido tan pronto como sale del útero estéril. La microflora pronto se establece y es difícil estudiar la influencia de una sola especie bacteriana en el desarrollo del sistema inmune en seres humanos (Evertssonzy, 2005).

En la parte distal del Intestino delgado (íleon), la micro biota comienza a poseer características similares a las del colon. En el íleon el pH se hace más alcalino. Como consecuencia, en esta zona se desarrollan bacterias Gram negativas anaerobias y miembros de la familia *Enterobacteriaceae*. El intestino grueso (colon), tiene la mayor comunidad microbiana del organismo. Recuentos microscópicos en las heces se aproximan a 10^{12} organismos por gramo de peso húmedo. Se han aislado más de 300 especies diferentes en las heces humanas. El colon puede considerarse como un gran vaso de fermentación y la micro biota consiste principalmente en bacterias Gram negativas esporulantes y no esporulantes. La gran mayoría de los microorganismos en esta región no solo son anaerobios, sino que existen en gran número muchas especies diferentes. Varios estudios han revelado que la proporción de las bacterias anaerobias con respecto a las anaerobias facultativas es de aprox. 300 a 1 (Prescott ,1999) .

Se ha postulado que más de 500 especies de bacterias están presentes en el intestino y casi 99% de ellas son anaerobios obligados (Katouli, 2000).

Una función importante de la barrera mucosa intestinal está en evitar que las bacterias que colonizan el intestino invadan órganos y tejidos finos. El desplazamiento de bacterias entéricas depende de un desequilibrio en la microflora con el crecimiento excesivo bacteriano subsiguiente, la inmunidad deteriorada del hospedero, o interrupción física de la barrera mucosa del intestino (Katouli,2000). Se ha puesto gran interés en el desplazamiento bacteriano como un mecanismo

posible detrás de infecciones después de lesiones severas y/o disfunción múltiple del órgano.

I.2 Coliformes

Los coliformes son los miembros de la flora normal del intestino que se desplazan más frecuentemente a la linfa mesentérica. La composición de la flora del intestino parece ser un factor subestimado en la fisiopatología del desplazamiento bacteriano (Nettelbladt, 2002).

Entre las diversas especies de bacterias en el intestino, los coliformes se desplazan más frecuentemente. El crecimiento excesivo bacteriano ha sido el factor dominante en discusiones y estudios referentes al papel de la flora de del intestino en el desplazamiento bacteriano.

Sin embargo se ha prestado poca atención al papel de la composición de la flora del intestino (Nettelbladt, 2002).

La denominación genérica de coliformes designa a un grupo de especies bacterianas que tienen ciertas características bioquímicas en común e importancia relevante como indicadores de contaminación del agua y los alimentos.

TABLA I. Clasificación de coliformes

REINO	Bacteria
PHYLUM	Proteobacteria
CLASE	Gamma Proteobacteria
ORDEN	Enterobacteriales
FAMILIA	Enterobacteriaceae

Boop, 1999

Del grupo «coliformes» forman parte varios géneros: *Escherichia*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Citrobacter*. Se encuentran en el intestino del hombre y de los animales, pero también otros ambientes: suelo, plantas, cáscara de huevo, etc. Aunque su especificidad como indicadores no son buenos, se suelen usar como índice de

contaminación fecal por: su frecuencia en heces, su fácil detección en el laboratorio, sus características semejantes, en algún aspecto, a las de algunos miembros patógenos de la familia *Enterobacteriaceae*.

I.2.1 CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS

El grupo coliforme agrupa a todas las bacterias entéricas que se caracterizan por tener las siguientes propiedades bioquímicas: ser aerobias o anaerobias facultativas; ser Gram negativas; no ser esporógenas; fermentar la lactosa a 35°C en 48 h , capacidad para crecer en presencia de sales biliares, facultad para producir índol en agua de peptona.

Las Enterobacterias lactosa-positivas o grupo coli-aerogenes, pertenecen a la familia *Enterobacteriaceae* y se caracterizan por su capacidad para fermentar la lactosa con producción de ácido y gas en un periodo de aproximadamente 48 horas y con una temperatura de incubación comprendida entre 30-37°C.

I.2.2 FACTORES DE VIRULENCIA

Las bacterias de una misma especie pueden, según la cepa de que se trate, ser un componente de la flora intestinal normal, o por el contrario producir distintas patologías. Esto se debe a la existencia de diversos factores de virulencia, que puede expresarse, o no, según cada caso. Por otra parte, bacterias de diferente especie, a veces dan lugar a síndromes similares, debido a que los factores de virulencia están codificados genéticamente en los cromosomas, los fagos o en los plásmidos y pueden ser transmitidos entre bacterias, tanto de la misma como de diferente especie.

Entre los principales factores de virulencia encontramos:

- Síndrome enterotoxigénico
- Pili o fimbria (antígenos F4 y F5, antes denominados K88 y K99 respectivamente)
- Producción de enterotoxinas: ST, LT.
- Síndrome enterotoxémico:
- Endotoxina (LPS).

- "EDP" (principio de la enfermedad del edame)
- Síndrome colisepticémico:
- CLT (toxina letal).
- Plásmido Col. V: El mecanismo por el cual confiere mayor virulencia no está bien esclarecido.

I.3 *Escherichia coli*

Es un bacilo Gram negativo, anaerobio facultativo de la familia *Enterobacteriaceae*, tribu *Escherichia*, con un tamaño de 1.1 a 1.5 micrómetros de ancho y de 2.0 a 6.0 micrómetros de largo (Prescott 1999). *Escherichia coli* (*E. coli*) forma parte de la flora normal del intestino del hombre y los animales de sangre caliente, constituyendo una de las especies bacterianas más abundantes en esta localización

(Tannock, 1995). Esta bacteria coloniza el intestino del hombre pocas horas después del nacimiento y se le considera un microorganismo de flora normal, pero hay cepas que pueden ser patógenas y causar daño produciendo diferentes cuadros crónicos entre ellos una diarrea (González-Ángeles 2002).

Este microorganismo es un habitante normal de nuestra flora intestinal, tiene una gran versatilidad metabólica, ya que puede utilizar muchos sustratos diferentes para crecer y adapta fácilmente su metabolismo a diferentes condiciones nutricionales y de aireación (Pettinari, 2000).

I.3.1 MORBIMORTALIDAD EN MEXICO

Se estima que las enfermedades causadas por *E. coli* se encuentran entre las primeras causas de mortalidad general a nivel nacional, ocupando el décimo sexto lugar con un total de 4,679 defunciones; mientras que entre las causas de mortalidad infantil en menores de un año, ocupa el cuarto lugar con un total de 1,493 defunciones. Para el Estado de Michoacán existe una tasa de 19,084 defunciones a nivel general correspondiendo 10,519 defunciones al sexo masculino, mientras que en el sexo femenino se presenta un total de 10,519 y 15 casos no determinados (SSA, 2002).

I.3.2 CLASIFICACION DE *Escherichia coli*

Escherichia coli (*E. coli*) es un grupo de bacterias que se encuentra en los intestinos de los animales de sangre caliente, tales como animales para consumo o seres humanos, y en el agua contaminada con la materia fecal de animales y seres humanos. Los científicos han identificado mas de 200 serotipos de *E. coli*, muchos de los cuales no son nocivos o son benignos (Yu-Cheng, 2006).

La mayoría de las cepas de *E. coli* son inofensivas y viven en los intestinos de los animales y los humanos sanos (Gentry-Weeks 2002).

Escherichia coli comensal, HS o de flora normal esta constituido por 4671 genes (<http://colibasetest.bham.ac>. 2006).

I.3.2.a) Clasificación de *Escherichia coli* no diarreagénica

Existen 3 virotipos responsables de infecciones extraintestinales:

- ❖ *Escherichia coli*. Uropatogena UPEC.
- ❖ *Escherichia coli* causante de meningitis neonatal NMEC.
- ❖ *Escherichia coli*. Necrotoxigénica NTEC.

***Escherichia coli* Uropatógena UPEC.**

Escherichia coli es el principal patógeno oportunista causante de infecciones urinarias y septicemias tanto en seres humanos como en los animales. *Escherichia coli* Uropatógena esta formada por 5379 genes.

Las infecciones del tracto urinario (ITU) son generalmente infecciones ascendentes causadas por microorganismos presentes en la flora normal intestinal (Blanco ,2001).

Las infecciones del tracto urinario (ITU) son una de las infecciones más comunes en humanos y *Escherichia coli* es el patógeno que mas frecuentemente causa ITU. Las cepas de *E. coli* uropatógenas poseen un grupo de factores de virulencia los cuales median ITU y que normalmente no están asociados con cepas comensales fecales de *E. coli*. Es importante hacer notar que de todas las cepas UPEC aisladas solo la mitad posee uno o ninguno de los factores de virulencia ya conocidos y caracterizados como tal. Por lo tanto, es razonable asumir que existen otros factores bacterianos que no se han caracterizado y asociado con ITU y que podrían ser

importantes en dicha patogénesis. En México se han realizado pocos estudios al respecto, es necesario caracterizar las cepas aisladas de infecciones urinarias e identificar sus factores de virulencia lo cual permitirá entender el mecanismo patógeno de dichas bacterias y su tratamiento medico en nuestro país (Ángel, 2005).

Escherichia coli causante de meningitis neonatal NMEC.

E. coli es la bacteria Gram negativa más comúnmente productora de septicemia durante el período neonatal. Alrededor del 40% del as cepas de *E. Coli* que causan septicemia poseen el antígeno capsular K1 y es normal identificar cepas idénticas a las sanguíneas en los cultivos de nasofaringe o recto del paciente. Las características clínicas de la sepsis por *E. coli* son generalmente similares a las observadas en los recién nacidos con enfermedad causada por otros patógenos. Hoy en día es materia de preocupación, la aparición de infección en neonatos prematuros, sobre todo después de rotura de membranas, causadas por enterobacterias resistentes, hecho favorecido por el uso abusivo de antibióticos en la madre (Ruvinsky ,2002).

Las infecciones del torrente sanguíneo se producen fundamentalmente en recién nacidos que tienen comprometidos sus mecanismos de defensa. (Prescott ,1999).

Escherichia coli Necrotoxigénica NTEC.

Escherichia coli Necrotoxigénica (NTEC) fue definida originalmente como capaz de producir una toxina llamada el factor de necrotización citotóxico (CNF) (De Rycke 1999). También se ha sugerido que NTEC pudo ser patógeno oportunista que causaba enfermedades diarreicas en seres humanos. Sin embargo, se ha encontrado recientemente que *Escherichia coli* Necrotoxigénica NTEC se puede aislar de las heces en un porcentaje representativo de niños sanos y por lo tanto, la asociación de *E.coli* NTEC con diarrea humana y animal debe ser investigada cuidadosamente (Lugo ,2000) .

I.3.2.b) Clasificación de *Escherichia coli* diarreagénica

Las categorías de *Escherichia coli* diarreagénica son difíciles de distinguir de aquellas que son de flora intestinal normal de humanos, los factores de virulencia específicos para cada categoría se encuentran codificados en una gran variedad de elementos genéticos como cromosoma, bacteriófagos, transposones, plásmidos e islas de patogenicidad y el dinamismo de estos últimos elementos provee un problema para la categorización de los diferentes patotipos (Martínez, 2002).

Con base en su mecanismo de patogenicidad y cuadro clínico, las cepas de *E. coli* causantes de diarrea se clasifican en seis grupos (Rodríguez-Ángeles 2002):

TABLA II: Mecanismos patogénicos de la diarrea por *E. coli*

<i>Escherichia coli</i> Enteropatógena (EPEC)
<i>Escherichia coli</i> Enterohemorrágica (EHEC)
<i>Escherichia coli</i> Enterotoxigénico (ETEC)
<i>Escherichia coli</i> Enteroinvasivo (EIEC)
<i>Escherichia coli</i> Enteroagregativo(EAEC)
<i>Escherichia coli</i> De Adhesión Difusa (DAEC)

Rodríguez-Ángeles 2002

***E. coli* enteropatógena (EPEC)**

EPEC puede ocasionar brotes o casos aislados de diarrea. Este grupo afecta principalmente a niños menores de seis meses y a los de dos años. También puede aislarse en adultos enfermos y sanos, principalmente cuando hay un factor predisponente como diabetes. La forma de transmisión de la enfermedad es fecal-oral por manos contaminadas de manipuladores de alimentos. Los reservorios de EPEC pueden ser niños y adultos con o sin síntomas (Barnes, 2006).

***E.coli* enterotoxigénica (ETEC)**

Las ETEC colonizan la mucosa del intestino delgado por medio de pilis o fimbrias que tienen diversas formas denominadas CFA (factor de colonización de antigénica),

siendo su principal mecanismo de patogenicidad la síntesis de alguna o ambas enterotoxinas llamadas toxina termolábil (LT) y toxina termoestable (ST). Las toxinas LT y ST aumentan el nivel intracelular de AMPc y GMPc respectivamente, que se encuentran en la membrana de las células intestinales, provocando la salida de agua e iones. Las ETEC son importantes en lactantes, principalmente en niños menores de dos años, y en particular durante los primeros seis meses de vida. La frecuencia de aislamiento de este grupo patógeno de *E. coli* en niños con diarrea es de 10 a 30% (Margall , 2000).

E. coli enteroinvasiva (EIEC)

El grupo EIEC y *Shigella spp* están relacionados genética y bioquímicamente ya que son descarboxilasa negativas, no móviles y lactosa negativas. El mecanismo de patogenicidad de EIEC es la invasión del epitelio del colon; para ello el primer paso es la adherencia de la bacteria a las vellosidades de la mucosa requiriendo de mucinasa y adhesinas, para después entrar por endocitosis a la célula, y posterior multiplicación de la EIEC dentro de la célula y diseminación a células sanas adyacentes. La información genética para este mecanismo está en loci del cromosoma y del plásmido, además de tener la capacidad de elaborar una o más enterotoxinas que pudieran ser importantes en la producción de diarrea. Las cepas EIEC se asocian más con brotes que con casos aislados, en los cuales la transmisión puede ser de persona a persona, por ingestión de alimentos y agua contaminada, convirtiéndose en un patógeno importante en niños mayores de seis meses (Margall ,2000).

E. coli enterohemorrágica (EHEC)

Riley describió y relacionó a EHEC con brotes caracterizados por dolor abdominal, diarrea acuosa con sangre y poco o nada de fiebre, cuadro al que se le llamó colitis hemorrágica (CH) y que era debido a la ingestión de carne cruda o mal cocida. La bacteria aislada de todos los casos fue *E. coli* del serotipo O157:H7. Karmali en 1983, la asoció con casos aislados de síndrome urémico hemolítico (SUH)

caracterizado por daño renal agudo, trombocitopenia y anemia hemolítica microangiopática, precedida por diarrea con sangre, con la presencia en heces de *E. coli* productora de una citotóxica con actividad en células Vero, por lo que se le llama verotoxina (VT), y a las cepas capaces de producirla se les denominó *E. coli* verotoxigénicas (VTEC). Además, se observó que la citotóxica se neutralizó con antitoxina obtenida a partir de *Shigella dysenteriae* tipo 1, por lo que también se le llamó "shiga-like toxin" o toxina semejante a shiga (SLT) o "shiga toxin" (STX), y a las *E. coli* capaces de producirla se les da el nombre de STEC.

El periodo de incubación de EHEC es de 1 a 8 días; inicialmente produce diarrea sin sangre, con o sin vómito, dolor abdominal, fiebre, y después de 1 a 2 días la diarrea se torna sanguinolenta y se intensifica el dolor abdominal, de una duración de 4 a 10 días, con heces abundantemente sanguinolentas (Bellin, 2001).

E. coli enteroagregativa (EAEC)

Scaletsky y Nataro encontraron cepas aisladas de pacientes con diarrea, las cuales por serología no correspondían al grupo EPEC pero si presentaban un patrón característico de adherencia diferente a EPEC y que además eran negativas a la prueba de EAF. 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 la producción y secreción de moco que atrapa a las bacterias que se auto aglutinan en una fina película en el epitelio intestinal.

El sitio blanco de daño de EAEC puede ser la mucosa del intestino grueso y delgado, con un periodo de incubación de menos de ocho horas y puede durar hasta 18 o 20 días. Esta bacteria puede causar brotes o casos aislados de diarrea persistente (Margall, 2000).

E. coli de adherencia difusa (DAEC)

Las cepas de *E. coli* de adherencia difusa, no forman micro colonias cuando se adhieren a células Hep-2 (2). Se sabe poco de su mecanismo de patogenicidad pero se ha caracterizado una fimbria de superficie, conocida como F1845, involucrada en el fenómeno de adherencia difusa. Los genes que codifican para esta fimbria se

pueden encontrar en el cromosoma o en un plásmido., las cepas DAEC tienen la capacidad de inducir la formación de estructuras protuberantes, semejantes a dedos, las cuales confieren protección a las bacterias, pero la presencia de dichas estructuras no se ha demostrado *in vivo*.

El grupo DAEC se puede aislar tanto de personas sanas como en personas con diarrea, siendo más importante en niños de 4 a 5 años. Los principales síntomas que se presentan son diarrea acuosa sin sangre y sin leucocitos. Pero puede presentar falsos positivos, y el diagnóstico empleando PCR aún no se ha desarrollado (Scaletsky,2002).

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). En la tabla siguiente se muestran algunos métodos de estudio de los diferentes grupos patógenos o patotipos de *E. coli*.

TABLA III: Pruebas para evidenciar el mecanismo de patogenicidad de *Escherichia coli* causante de diarrea.

GRUPO	MECANISMO DE PATOGENICIDAD	PRUEBAS
ETEC	Enterotoxina LT y ST	Asa ligada de conejo para LT Efecto citopático en células CHO, VERO y YI para LT Ratón lactante para ST RIA para ST Elisa para LT y ST Hibridación en fase sólida "colony blot" con sondas para LT y ST Hibridación Southern PCR (ST y LT)
EPEC	Adherencia localizada	Adherencia localizada en células Hep-2 y HeLa Prueba de FAS Extracción del plásmido EAF Hibridación en fase sólida "colony blot" (EAF, Bfp) Hibridación Southern (EAF, Bfp) PCR (EAF, Bfp)
EIEC	Invasividad	Prueba de sereny en cobayo Invasividad en células HeLa Captación de rojo de congo Extracción de plásmido de 140 MDa ELISA para el gen <i>ipaC</i> necesario para la invasión Hibridación con sondas derivadas del plásmido plnv PCR para genes <i>ial</i> , <i>ipaH</i>
EHEC	Citotoxinas STX1 y STX2	Serotipificación Efecto citopático en células VERO, HeLa causado por STX ELISA Aglutinación en látex Inmunofluorescencia Separación inmunomagnética Extracción de plásmido Hibridación Southern PCR (eae, SLTI, SLTII, plásmido pO157) Campos pulsados Fagotipificación
EAEC	Adherencia agregativa	Adherencia agregativa en células Hep-2 y HeLa Plásmido de 65 MDa Hibridación con sonda obtenida del plásmido de 65 MDa PCR (plásmido)
DAEC	Adherencia difusa	Adherencia difusa en células Hep-2 y HeLa Hibridación con sonda para la fimbria F1845

Modificado de Rodríguez Ángeles, 2002

I.4 METODOS EMPLEADOS EN LA IDENTIFICACIÓN DE

Escherichia coli

La microbiología clínica se ha beneficiado mucho de los progresos tecnológicos en equipos, programas informáticas y bases de datos, biología molecular e inmunoquímica. En lo que respecta a los métodos de detección de microorganismos en muestras clínicas, se ha producido un cambio de los métodos múltiples pasos descritos anteriormente a procedimientos y sistemas unitarios que incorporan la estandarización, miniaturización, mecanización y automatización (Prescott ,1999).

Para el aislamiento, la identificación y la caracterización de cepas de *E. coli* se aplican métodos tradicionales, métodos *in vivo* e *in vitro* y de biología molecular. Los métodos usados en la identificación de bacterias se basan en el análisis morfológico, fisiológico, bioquímico y datos genéticos de las bacterias blanco (Chizhikov, 2001).

Los avances tecnológicos en el avance del ADN abren nuevas posibilidades para el desarrollo de métodos con mayor selectividad para *E.coli* (Karkkainen, 1998).

I.4.1 DIAGNOSTICO MOLECULAR

Los métodos moleculares se han desarrollado para aumentar la rapidez del análisis. Pueden alcanzar un alto grado de la sensibilidad y de la especificidad sin la necesidad de un cultivo complejo y pasos adicionales de la confirmación. Por lo tanto, alguno de estos métodos permiten la detección de cultivos específicos y/o bacterias no cultivables dentro de horas, en vez de los días requeridos con los métodos tradicionales

(A. Rompre, 2002).

Las pruebas moleculares como RFLP, hibridación, campos pulsados, PCR y RAPD-PCR pueden detectar hasta 10^2 UFC/0.1g de materia fecal, además de que permiten realizar una subtipificación con fines epidemiológicos de este grupo de bacterias (Boop ,1999).

En la década pasada, se desarrollaron métodos de diagnóstico basados en la detección directa de los genes específicos de bacterias en muestras clínicas y de

alimento y muchos oligonucleótidos de las especies o género específicos han sido utilizados para tal fin (Tsen, 2001; Rudi y col., 2000).

La detección de coliformes por métodos genético moleculares u obtención de huellas moleculares se pueden realizar por dos estrategias: las huellas basadas en la hibridación tipo Southern y las huellas basadas en la amplificación de regiones genéticas mediante PCR (Katouli, 2000).

I.4.2 DESARROLLO DE LA TECNICA DE REACCION EN CADENA

La técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés se basa en la replicación del ADN en los organismos eucariotas realizada por la ADN polimerasa. Estas enzimas realizan la síntesis de una cadena complementaria de ADN en el sentido 5'→ 3' usando un molde de cadena sencilla, pero a partir de una región de doble cadena. Para crear esta región doble cadena se usan los denominados iniciadores (primers). Son una pareja de oligonucleótidos sintetizados de manera que sean complementarios a cada uno de los extremos 3' del fragmento de ADN que se desea amplificar.

Partiendo de este principio, la PCR se basa en la repetición de un ciclo formado por tres etapas:

1ª Desnaturalización del ADN doble cadena

2ª Hibridación de los iniciadores a la zona 3' específica de cada una de las hebras

3ª Extensión del cebador por actuación de la ADN polimerasa

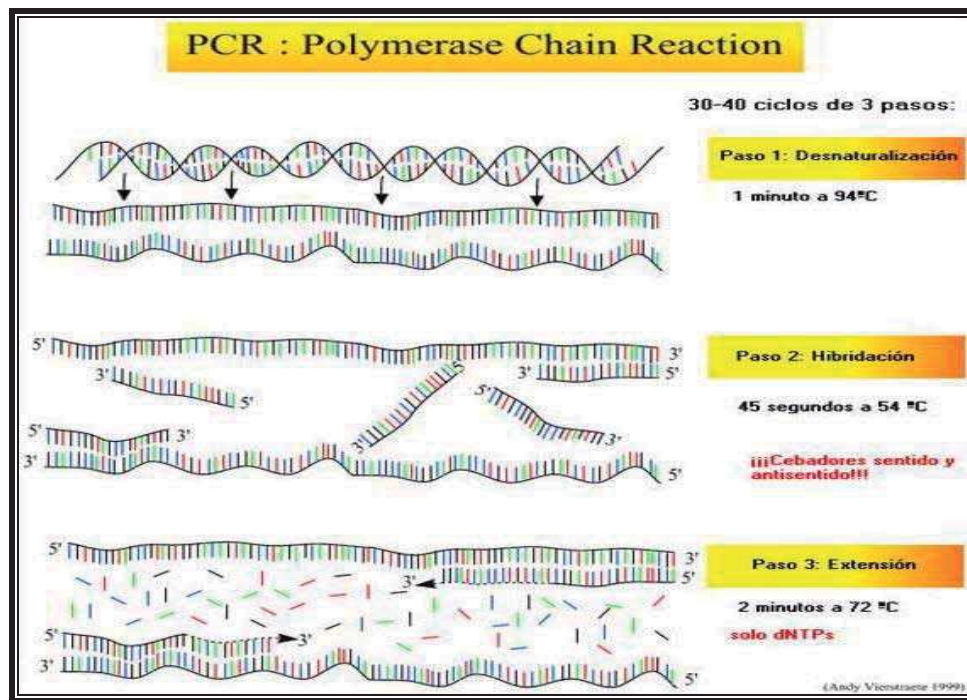


Figura . 1 : Pasos básicos de la PCR (de Andy Vierstracte 1999)

Este proceso se lleva a cabo en un termociclador, un instrumento que automáticamente controla y alterna las temperaturas durante períodos programados de tiempo para el número apropiado de ciclos (usualmente 30-40 ciclos).

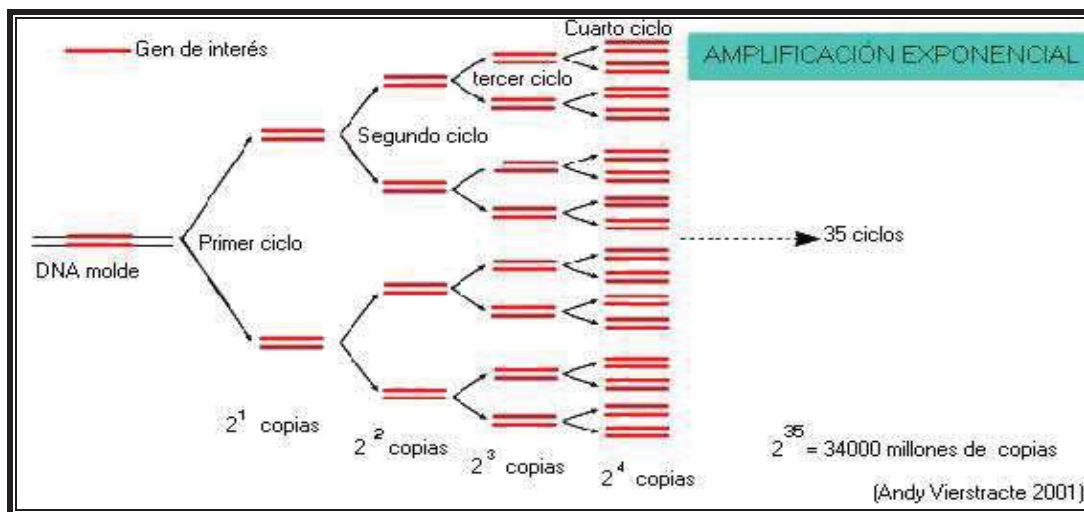


Figura. 2 : Amplificación exponencial del PCR (de Andy Vierstracte 2001)

La detección del producto de la Reacción en Cadena de la Polimerasa se realiza normalmente mediante corrido electroforético, dependiendo del tamaño de la amplificación y la resolución que deseemos utilizaremos diferentes medios (agarosa, poliacrilamida) a distintas concentraciones. La posterior visualización se puede realizar con bromuro de estudio (lámpara de luz UV), tinción de plata, fluorescencia, radioactividad.

I.4.3 TRASCENDENCIA DE LA TECNICA DE PCR EN EL DIAGNOSTICO DE ENFERMEDADES MICROBIANAS

La zona intestinal humana abriga una comunidad grande, activa y compleja de microorganismos. La microflora intestinal desempeña papeles significativos en la digestión del alimento, el metabolismo endógeno y los compuestos exógenos, la inmunopotenciación, y la prevención de la colonización del aparato gastrointestinal por los patógenos y por lo tanto está implicado en mantener la salud humana (Matsuki, 2004).

Para entender la relación entre la flora intestinal y la salud humana, es importante desarrollar un método exacto para analizar a las varias poblaciones microbianas. La microflora del intestino ha sido supervisada en gran detalle por las técnicas basadas en el cultivo de los microorganismos (Watanabe, 2004) pero las limitaciones inherentes en estas técnicas y el desarrollo de métodos de detección moleculares más sensibles y más exactos ha traído nuevas penetraciones al campo (Tanaka, 2004).

Los estudios de la composición genética de poblaciones bacterianas han sido obligados tradicionalmente a depender de métodos basados en cultivos (Herrick, 1998).

Los microbiólogos ambientales por lo tanto han comenzado a explorar el uso de métodos moleculares para evitar las técnicas cultivo-dependientes (Madsen, 1998).

El método de PCR, es una hibridación que se realiza entre el ADN blanco presente en la muestra y el iniciador que es una secuencia específica de un gen involucrado en la patogenicidad de cepas de *E.coli* (López-Saucedo 2003).

El análisis del ARNr extraído o del ADN ribosomal (ADNr) ha probado ser particularmente útil para identificar bacterias (Herrick ,1998).

Debido a que los ribosomas son críticos para la función celular e interaccionan con un gran numero de otras moléculas, incluyendo el ARN mensajero (ARNm) y el ARN de transferencia (ARNt), las secuencias de las moléculas de ARNr están altamente obligadas y se han conservado notablemente a través de la evolución (Herrera, 1999). El ARNr es la mejor molécula blanco para estudiar las relaciones filogenéticas debido a que se encuentra presente en todos los microorganismos, es funcionalmente constante y se compone de dominios tanto altamente conservados como variables (Stackebrandt y col., 1994).

La comparación de las secuencias de gen 16S de ARNr, ha facilitado la identificación de bacterias, incluyendo microorganismos no cultivables y la elucidación de sus relaciones naturales. Consecuentemente, estas pueden ser utilizadas para determinar relaciones taxonómicas entre especies que presentan poca interrelación en su ADN (Pace, 1996).

Inicialmente se comenzaron a realizar estudios de secuenciación del gen 16S de ARNr, posteriormente, los estudios se extendieron al gen 23S. Las secuencias nucleotídicas constantes del gen 16S presentan la ventaja de proporcionar un sitio de iniciación adecuado para la elongación de los iniciadores y así aplicar de forma más fácil la técnica de secuenciación (Dams y col., 1988).

Las moléculas del ARNr consisten típicamente en las secuencias altamente conservadas entremezcladas con regiones de secuencias más variables (Tyson, 2001). Junto con el desarrollo de la técnica de PCR (Schleper, 2001), este conocimiento ha proporcionado un acercamiento para el reconocimiento de patógeno bacterianos.

A mediados de los años 80, se realizó un acercamiento molecular que punteó la necesidad de cultivar un microorganismo para determinar la secuencia de su gen RNAr 16S (ADNr 16S) (Hugenholtz,2001).

Esencialmente, los ácidos nucleicos se extraen directamente de muestras ambientales, las secuencias del ADNr 16S se aíslan típicamente vía PCR, al final estas secuencias se comparan con las secuencias conocidas.

A las secuencias del gen obtenidas de este modo se les pueden entonces asignar una localización en un árbol filogenético y pueden actuar así como un marcador para el organismo de el cual fueron obtenidas (Hugenholtz, 2002).

La mayoría de las pruebas de PCR se basan en la detección de las secuencias bacterianas del ARNr de la subunidad 16S (Nozaki ,2001). Esta subunidad del ADN está presente en copias múltiples en todas las especies bacterianas y contiene secuencias especies-específicas altamente conservadas (Boutaga, 2003) .

Numerosos trabajos han utilizado el gen 16S como blanco para la detección de bacterias no cultivadas y ha sido la más utilizada para la amplificación universal de ADNs de una amplia gama de los organismos por el método de PCR (Guiver ,2000).

En la última década, fueron desarrolladas numerosas técnicas basadas en la PCR para ser utilizadas en el diagnóstico de microorganismos patógenos presentes en muestras clínicas, de animales, de alimentos y ambientales (Leotta , 2005).

I.4.4 Ventajas de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) ha conducido a una detección rápida y sensible de *E. coli* en muestras clínicas y en varios alimentos (Fratamico 2000; McKillip y Drake 2000; Hsu y Tsen 2001).

La detección del gen bacteriano en especímenes clínicos por PCR tiene una sensibilidad y una especificidad más altas que cultivar la sangre y puede proporcionar una manera rápida para determinar la etiología de la septicemia neonatal (Shang, 2005).

La PCR es específica y sensible, detecta una gran diversidad de tipos de *E.coli* con facilidad, rapidez y economía, además de permitir una fácil manipulación de la muestra (López-Saucedo 2003) y analizar genómicamente a miles de agentes causales de la enfermedad (Bekal, 2003).

La PCR provee un mecanismo para detectar cantidades diminutas de organismos con alta especificidad, además de dar resultados en el mismo día para organismos que normalmente tomarían varias semanas usando tecnologías convencionales (Poza, 2001).

Hasta hace poco, la identificación microbiológica requería de aislamiento de cultivos puros seguido por múltiples pruebas bioquímicas o fisiológicas. Un microbiólogo exitoso era determinado por la habilidad de cultivar microorganismos. Consecuentemente, cualquier acercamiento para identificar poblaciones microbianas específicas sin cultivo, directamente en su ambiente natural, podría ser revolucionario, a partir de esto podría cambiarse el carácter de la microbiología (Amann y col., 1995). El uso de la PCR podría tener ventajas, puesto que detecta la presencia de bacterias sin requerir ser cultivadas (Heininger, 2004).

Las secuencias del ARNr han demostrado ser extremadamente útiles para los estudios de la taxonomía bacteriana (Engstrand, 1992).

Además de la información taxonómica el análisis de ácidos nucleicos extraídos PCR puede proporcionar la información sobre la variación genética en las poblaciones microbianas que realizan ambientalmente funciones importantes (Herrick, 1993).

Otra ventaja de PCR bacteriano es que los patógenos raros o inesperados pueden ser encontrados (Rantakoko, 2000).

PCR puede ser utilizado para amplificar genes bacterianos directamente de las muestras clínicas, con el fin de establecer diagnosis etiológicas de varias enfermedades bacterianas adentro un ajuste clínico (Jalava, 2000).

I.4.5 Aplicaciones de la técnica de PCR

La técnica de PCR resuelve las demandas mas importantes de la detección directa de *Listeria monocytogenes* en quesos suaves (Delfgou 1991). *Helicobacter* (K. Wernars 1992, Sajan 2004) además que ofrece ventajas significativas en tiempo y en manipulación en la detección de *Mycobacterium tuberculosis* (Bodo 1998). *Neisseria Meningitidis*, *Escherichia coli*, *Hemophilus influenzae*, (Guiver 2000); salmonellas spp. (Gendel, 1996; Lin y Tsen, 1996; Tsen y Lin, 1999), y *B.*

thuringiensis, *B.anthraxis* y *B.mycoides* (Ash y otros., 1991; Giffel y otros., 1997). el *Estafilococcus* spp. y *vibrión* spp (Cheng, 2005).

Por otra parte se ha divulgado la amplificación de genes bacterianos de superficies ambientales y de agua subterránea por la reacción en cadena de la polimerasa PCR (Batr ,1993) .

Detección de mutaciones: La técnica de PCR nos permite localizar mutaciones previamente descritas. Se emplea así en la secuenciación de ADN como un método de diagnóstico: Una vez que se ha caracterizado la relación con una enfermedad de una determinada mutación puntual (mutaciones en el gen de la galactosa 1P uridiltransferasa en la galactosemia, mutaciones en c-Ras y cáncer, etc.) o de una pequeña delección (delección de tres bases en el gen CFTR de fibrosis quística) puede desarrollarse un método de detección rutinario, la secuenciación automática puede implementarse como método de screening para la localización de nuevas mutaciones. Secuencias de ADN a partir de unas pocas copias intactas presentes en especímenes de museos y descubrimientos arqueológicos en los cuales la mayoría de las moléculas están dañadas o degradadas, para proceder posteriormente a su estudio mediante secuenciación (Lisker, 2000).

Secuenciación de ADNs fósiles: El uso del PCR ha abierto la posibilidad de aislar secuencias de ADN a partir de unas pocas copias intactas presentes en especímenes de museo y descubrimientos arqueológicos en los cuales la mayoría de las moléculas están dañadas o degradadas, para proceder posteriormente a su estudio mediante secuenciación (Rodríguez, 2000).

PCR demuestra una promesa como herramienta eficaz para investigar los efectos del prebióticos o de probióticos, de los efectos secundarios de antibióticos, y de la relación entre la microflora y las enfermedades digestivas, tales como enfermedad inflamatoria del intestino, las enfermedades infecciosas, y el cáncer de los dos puntos (Nikkari, 2000).

Diagnóstico prenatal/Diagnóstico reimplantación: Diagnóstico de enfermedades hereditarias o determinación del sexo del feto previamente a su implantación en procesos de fecundación in Vitro. Una o dos células del preembrión se retiran en el estado de ocho a dieciséis células, previo a la implantación. Estas pueden utilizarse

para amplificar un gen o genes específicos y así estudiar la enfermedad genética o el sexo (utilizando genes específicos del cromosoma Y) (Poza ,2001).

PCR demuestra en la actualidad una herramienta útil en: Investigación en microbiología para la identificación de especies, Identificación de especies vegetales, Diagnóstico de enfermedades, Análisis de ADN antiguo, Investigación básica en bioquímica y biología molecular, discriminación alélica , Expresión génica/Cuantificación de ARN , detección de SNPs (Single nucleotide polymorphisms) , Genotipo de mutaciones específicas, Análisis de ADN fósil, Mutagénesis, Clonación de genes, test de paternidad entre otros .

La técnica de PCR puede utilizarse para amplificar cantidades muy pequeñas de ADN específico y proporcionar material suficiente para secuenciar y clonar el fragmento con preedición mediante técnicas estándar (Prescott, 1999).

La técnica de PCR se ha empleado en la detección de supuestos cultivos de *Escherichia coli* Enteragregativa EAEC (Morais, 2002) en evaluación de genotipos de *Escherichia coli* (Meacham, 2003; Vidal 2004), esta técnica ha sido comparada con las de cultivo en la detección de *Porphyromonas gingivalis* concluyendo que el primero ofrece ventajas significativas con respecto a la rapidez y a la sensibilidad (Boutaga ,2003) ,además permite investigar la composición de la flora intestinal humana usando la ADN extraída de muestras fecales obteniendo una sensibilidad mas alta (Matsuki ,2004).

I.5 Técnicas de extracción de DNA

Muchos tipos de muestras en especial las heces contienen inhibidores de PCR (González y otros. 1999), por ello requieren una correcta extracción del ácido nucleico (Fratamico y otros 2000).

La extracción de la ADN es un factor limitador probable para el PCR (Herrick, 1993). La purificación del ADN de bacterias es una herramienta esencial en la tecnología del ADN recombinante y se ha convertido en una tarea esencial en los laboratorios y en las industrias (Chowdhury, 2005).

La ADN genómico puede ser extraído con el Kit Qbiogene (Carlsbad, CA). La lisis de la célula de cultivos puros se logró con una máquina de FastPrep (Qbiogene) los ADN fueron extraídas usando el DNeasy kit del tejido fino (QIAGEN, Valencia, CA) según las instrucciones del fabricante. El ADN fue cuantificado usando la solución de la cuantificación de PicoGreen (Molecular Probes Inc.) y un fluorómetro TBS-380 (Turner BioSystems Inc., Sunnyvale, CA) que usa ADN genómico de *E. coli* como estándar. Los resultados de la cuantificación obtenidos con el fluorómetro fueron comparados con la banda ADN genómica de peso molecular visualizada en el bromuro de etidio (Spano, 2004).

Otra técnica se basa en el empleo de cinco colonias de *E. coli* puras que se emulsionan en 500 microlitros de agua inyectable estéril. La suspensión fue hervida por 10 minutos y después rápidamente refrescada y llevada a cabo en 220°C por 1 minuto para desnaturalizar el ADN. Después de la centrifugación a 12.000 por 5 minutos, la pastilla extraída del DNA fue distribuida en los frascos estériles esterilizados en alícuotas de 50 ml (BioProducts molecular, San Diego, California) y almacenada en 280°C hasta su uso (Guiver, 2000).

El kit de UltraClean tiene una ventaja sobre las columnas fenol/coloroformo /PVPP puesto que la identificación toma aproximadamente 1.5 h, mientras que por medio de la columna las muestras requieren la precipitación del DNA de la muestra por una noche. Sin embargo, la cantidad de tiempo que lleva identificar *E. coli* usando cualquier Kit o el fenol/cloroformo /PVPP de UltraClean, se han reducido perceptiblemente de hasta 5 días usando los cultivos estandar y pruebas bioquímicas, a entre 1 y 2 días, respectivamente. Sin embargo, las columnas de fenol/cloroformo/PVPP tiene una clara ventaja por sobre el costo del kit comercial (Trochimchuka, 2003).

Ahora comparando el método de extracción con buffer tritón X-100 al 1% (Merck, Germany) y el kit comercial (Wizard™, Madison, Wisconsin.). Se ha demostrado que el primero permitió obtener cantidades adecuadas de ADN para la PCR, tratándose de una técnica más rápida, menos laboriosa y más económica que la utilización de equipos comerciales. Por este motivo es la recomendada en la rutina diagnóstica (Leotta, 2005).

Otros kit comerciales son: IsoQuick Kit, NucliSens kit y QIAamp kit, los resultados falsos-negativos en la PCR pueden ser debidos a la presencia de inhibidores presentes en la muestra o que hay pequeñas cantidades de organismos. La presencia de grandes cantidades de bacterias en relación a la cantidad blanco de *E. coli* puede resultar en una sensibilidad menor en los ensayos. Todos los kit comerciales fueron rápidos y fáciles de usar, aunque el ADN extraído con el kit QIAamp no requiere diluciones adicionales del ADN antes de la PCR (Spano, 2005). El microsistema bioanalítico representa una gran ventaja sobre los kit comerciales, ya que estos implican pasos rutinarios laboriosos como medir con una pipeta, someter al vortex y luego una centrifugación para quitar desechos de la célula y recuperar ADN genómico altamente purificado (Elsevier, 2005).

Existe una extracción que se basa en diluciones altas de bacterianas sometidas a un intermediario de TAE (10 microlitros Tris-HCl, EDTA de 1 microlitro; pH 8.0). Cada suspensión es hervida por 15 minutos para llevar acabo la lisis de las células y así cada aislado se identifica con cartillas grupo-especificas de PCR (Matsuki, 2004).

Otra técnica de extracción, es en la que la muestra fecal se somete a tres lavados, suspendiéndolas en un buffer de fosfato y centrifugando para quitar los inhibidores posibles de PCR. Posteriormente, se realizan las extracciones con fenol-cloroformo para ser sometidas a la precipitación con isopropanol. Finalmente, el ADN fue suspendido en 1 ml de Tris-tris-EDTA (Matsuki, 2004).

El ADN también ha sido extraído con un volumen igual de una mezcla del alcohol fenol-cloroformo-isoamílico. Después de otra extracción con alcohol isoamílico y cloroformo, el ADN es precipitado con etanol y la pastilla es disuelta en el

almacenador intermediario de TAE (10 ml Tris, EDTA de 1 milímetro, pH 8,0) (Engstrand,1992).

En la extracción por el método de Tsai y de Olson; 1 g (peso mojado) de cada muestra es lavado dos o tres veces en el almacenador intermediario de fosfato del sodio de 100 microlitros (pH 8,0) y después es incubado en la solución del lysozima (150 microlitros de NaCl, 100 microlitros de Na, EDTA (pH 8,0) en 37°C por 2 h. Una solución del sulfato dodecil de sodio (SDS) (100 microlitros de NaCl, 500 microlitros Tris-HCl (pH 8,0), el 10% SDS) fue agregada, y la mezcla de reacción es mezclada e incubada en la temperatura ambiente por 5 minutos y entonces el sólido alternativamente congelado en nitrógeno líquido y deshelada en un baño de agua 65°C tres veces. Una solución del acetato del amonio (7,5 M) es agregada para alcanzar una concentración de 2,5 M, y el lisado era sometido a un vortex vigoroso y después centrifugado en 6.000 por 10 minutos. El sobrenadante es transferido a un tubo nuevo y precipitado con etanol y 20 ug del glicógeno por ml (grado molecular; Boehringer Mannheim, Indianapolis, Ind.) Después de secarse, el precipitado es suspendido de nuevo en 10 microlitros de EDTA de Tris-HCl-1 microlitro (pH 7,6) (Herrick , 1993) .

Las proteínas y el RNA se podrían quitar por un simple lavado suave con Tris y el ADN multimerico del plasmido , se podría enjuagar en un solo paso del agregado de la proteína. Además, el ADN aislado del plasmido se podía digerir fácilmente por las enzimas de restricción y tener alta funcionalidad en la expresión de la proteína. Así, en vista de su simplicidad notable y de la eficacia en producir ADN suficientemente puro del plasmido, la nueva estrategia emergería una herramienta útil en tecnología recombinante moderna y usos terapéuticos (Chowdhury, 2005).

Así pues, se ha revelado totalmente una nueva técnica para aislar la DNA altamente puro del plásmido en manera más simplificada y menos desperdiciadora de tiempo, teniendo usos inmediatos en los laboratorios.

El aislamiento sobre todo de formas multiméricas del ADN del plásmido por este nuevo acercamiento pudo tener efecto aditivo sobre funcionalidad desde la coexistencia de copias múltiples de un solo gene y podría realzar notablemente la eficacia de la expresión del gene (Vob y otros., 2003).

I.5.1 Problemáticas en la obtención de DNA útil para la técnica de PCR

Las técnicas basadas en cultivos son demasiado lentas proporcionando resultados solamente después de algunos días, y son muy dependientes del medio y la temperatura incubación (Spano ,2004).

Sin embargo, muchos tipos de muestras en especial las heces contienen inhibidores de PCR (González 1999), por ello requieren una correcta extracción del ácido nucleico (Fratamico ,2000).

Recientemente, cadena de la polimerasa la reacción (PCR) ha llegado a ser una rápida y confiable método para la diagnosis de infeccioso numerosas enfermedades (Holanda y otros., 2000). Sin embargo, el material fecal contiene cantidades grandes inhibidores que afectan el método de PCR tal como sales de bilis, bilirrubinas, polisacáridos, y heparina (Stacy-Phipps 1995; Lantz y otros., 1997; Wilson, 1997). Por lo tanto, se confía en la detección de los patógenos usando técnicas de extracción de ADN antes de llevar a cabo la PCR. Estas técnicas deben disminuir la cantidad de las sustancias que inhiben PCR sin la reducción en la producción del ADN. (Wilson, 1997; Stewart 1998 Trochimchuka 2003).

La PCR ha llegado a ser una herramienta rápida y confiable para el diagnóstico basado en biología molecular de una gran variedad de enfermedades infecciosas. La PCR ha sido aplicada para la detección de microorganismos de cultivos microbianos, tejidos y directamente de muestras clínicas. Muestras fecales están entre los especímenes más complejos para probar directamente por PCR debido a la presencia de inhibidores inherentes que a menudo son extraídos con junto con el ADN bacteriano. Inhibidores potenciales encontrados en muestras de heces incluyen hemo, bilirrubinas, sales biliares y carbohidratos complejos. Pocos estudios han evaluado o comparado métodos de extracción simple de ADN que facilitarían y mejorarían la sensibilidad de detección por PCR de patógenos entéricos de muestras fecales (Spano, 2005).

De muchos otros informes, se sabe que la polimerasa termoestable de Taq en el análisis de PCR es muy susceptible a la inhibición por los compuestos que pueden

estar presentes en una muestra. Consecuentemente, la extracción y la purificación de la ADN de la muestra antes de PCR requieren un cuidado especial para quitar los compuestos inhibitorios (Wernars 1991, Herrik 1993).

Ha estado bien documentado que la polimerasa de Taq puede contener una fuente de contaminación del ADN como resultado de su fabricación y purificación incompleta. La enzima que se expresa como proteína recombinante en *E. coli* o es comúnmente obtenida como proteína nativa del aquaticus de Thermus. Varios investigadores han encontrado y han procurado superar este problema por una estrategia que somete a la polimerasa a un tratamiento físico, químico, y o medios enzimáticos (Guiver, 2000).

II JUSTIFICACION

La tecnología molecular representa una herramienta rápida y practica para detectar la presencia de genes patógenos, una de estas técnicas es la reacción en cadena de la polimerasa, la cual permite una amplificación de genes bacterianos directamente

de la muestra clínica y por lo tanto ofrece ventajas importantes como lo es alta sensibilidad, especificidad, rapidez comparadas con lo métodos convencionales.

III OBJETIVOS

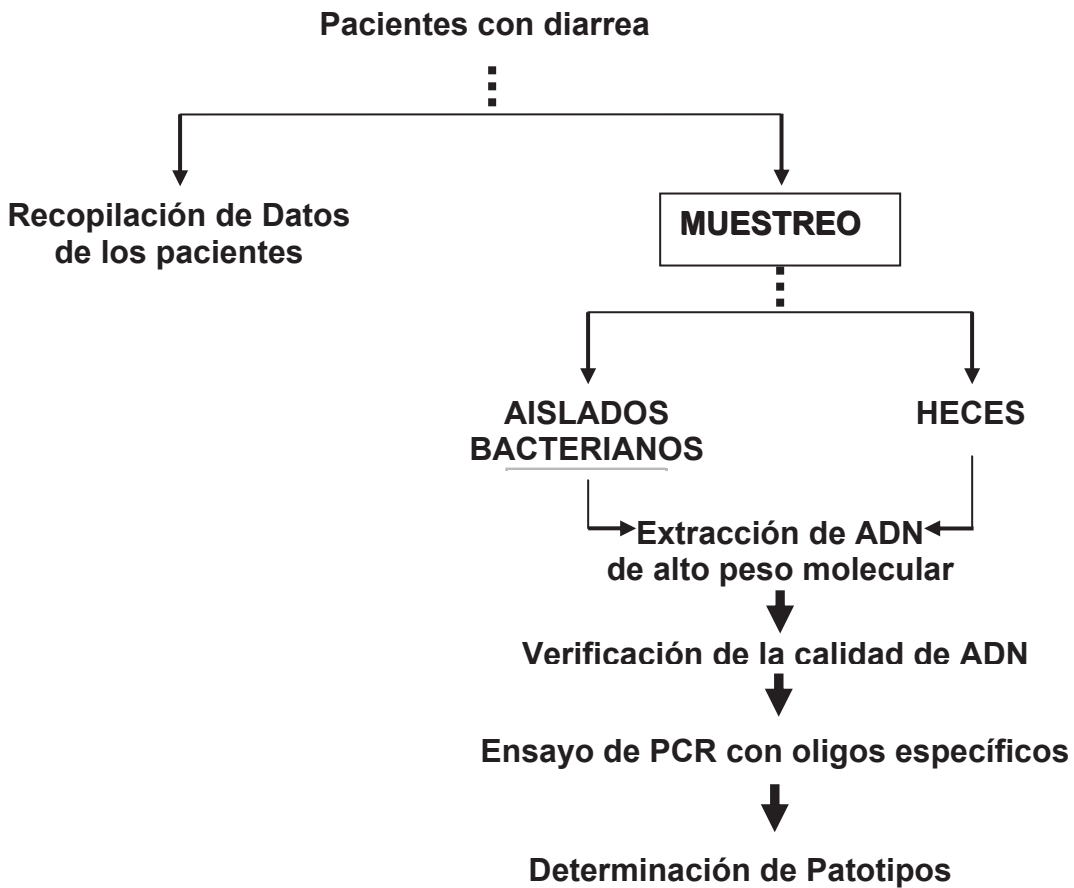
OBJETIVO GENERAL

Identificar genético molecularmente a *E.coli*, heces de pacientes del IMSS en la ciudad de Morelia, Michoacán, México

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Aislar ADN útil para hacer amplificaciones PCR, de heces de pacientes con problemas gastrointestinales.
- Identificar *E. coli* por PCR en ADN de heces y aislados bacterianos.

IV ESTRATEGIA (MATERIAL Y METODOS)



V. MATERIAL Y METODOS

V.1 MATERIAL BIOLOGICO

Se emplearon 53 muestras fecales de pacientes del IMSS de la Ciudad de Morelia, Mich, y sus respectivos aislados bacterianos colectados durante 6 meses (Octubre 2004 a Abril del 2005).

V.2 MEDIO DE CULTIVO

Los aislados de *E.coli* se crecieron en Agar Nutritivo, (BD Bioxon^{MR}) preparado de acuerdo a las especificaciones del proveedor, posteriormente se esteriliza a 121°C/15lb /pulg².

V.3 CONSERVACION DE CEPAS

Nuestras muestras se conservaron, sembrándolas en agar francés por picadura y después incubándolas a 37°C por 24 horas.

Este medio para conservación de cepas bacterianas se prepara agregando a un litro de agua desionizada Caldo nutritivo (BD Bioxon^{MR}), 10 g; Cisteina (SIGMA[®]), 10 mg; NaCl (J.T. Baker[®]), 5 g ; Timina (SIGMA[®]), 10 mg; y agar bacteriológico (BD Bioxon^{MR}), 6 g. Posteriormente se esteriliza a 121°C/15lb /pulg² . Finalmente se vacía en crioviales de 2.0 ml hasta 2/3 de su volumen.

V.4 EXTRACCION DE ADN TOTAL

Las colonias bacterianas crecidas en en Agar nutritivo sólido y cosechadas con ayuda de una espátula previamente esterilizada, se colocan en 400 µL de regulador de lisis (Tris-HCl 100mM pH 8.0, Xantogenato de potasio 50mM, NaCl 100 mM, EDTA 50mM) en un tubo de microcentrifuga, agitando vigorosamente durante 10 minutos. A continuación se agregan 400 µL de cloroformo y se agita en el vórtex durante 5 minutos. Se centrifugan durante 10 minutos a 10 000 rpm y se transfiere el

sobrenadante (fase acuosa) a otro tubo limpio cuidando de no arrastrar la fase orgánica. Se extrae con un volumen de fenol-cloroformo, centrifugando durante 5 minutos a 10 000 rpm y transfiriendo el sobrenadante a otro tubo. El ADN se precipita con 1 volumen de isopropanol frío incubando 10 minutos a -20 °C y centrifugando durante 10 minutos a 10 000 rpm. El sobrenadante se desecha y la pastilla se lava con 250 µL de etanol al 70% y se deja secar a temperatura ambiente para finalmente resuspender en un volumen mínimo de agua, aproximadamente 20 µL. La integridad del ADN obtenido se visualiza desarrollando una electroforesis en gel de agarosa al 1%.

El ADN aislado se guarda a una temperatura de -20°C hasta su utilización.

V.5 VISUALIZACION EN GELES DE AGAROSA (ELECTROFORESIS)

La calidad y la cantidad del DNA obtenido, se visualiza en geles de agarosa. La electroforesis en general permite la separación de moléculas como consecuencia de su diferente movilidad en un campo eléctrico. Por lo tanto, el parámetro esencial es la diferente carga eléctrica de las moléculas. Es importante recordar que la carga depende del pH del medio. En determinados soportes, como el gel de agarosa, el medio (gel) ofrece una resistencia notable al avance de las moléculas, por lo cual la movilidad depende mucho del tamaño de la molécula.

La calidad y la cantidad del DNA obtenido, se visualiza en geles de agarosa. Se preparan 100 ml de agarosa al 1% o 2% (p/v) con TAE 1X (Tris acetato 0.04M, EDTA 0.001 M), disolviéndolo en el horno de microondas y se adiciona bromuro de etidio (10 mg/ml), 2 µL. El gel se prepara vaciando la agarosa en la cámara de electroforesis, se colocan los peines. Se deja solidificar y se retiran los peines. Se agrega TAE 1X a la cámara hasta cubrir el gel. Las muestras de DNA se mezclan con regulador de carga (Azul de bromofenol 0.25%, Ficoll 15% en agua) y se aplican en los pozos del gel. Posteriormente se conecta la cámara a la fuente de poder y aplicar un voltaje de 80 V. Una vez terminada la electroforesis, se visualiza el DNA colocando el gel en un transiluminador UV (ChemiDoc de Bio-Rad), de

acuerdo a las técnicas convencionales (Sambrook y col., 1989).y se toma una fotografía.

V.6 ESPECTROFOTOMETRIA

La pureza y la concentración del DNA fue determinada según la relación entre la absorbancia a 260, 280 y 320 nm de longitud de onda según lo reportado por Sambrook 1989 y mas tarde por SABAT 1999. (Nacional Institutes of Health,Bethesda,Md)

V.7 AMPLIFICACION DEL GEN 16S rRNA DE *Escherichia coli*

Con la finalidad de comprobar que aislados realmente pertenecian a la especie *Escherichia coli* se amplifica el gen 16S rRNA especifico con los oligos que se muestran en la siguiente tabla:

TABLA IV: Secuencia de oligonucleotidos específicos para *Escherichia coli* y tamaño del fragmento

CEPA	GEN	CLAVE DEL OLIGO	SECUENCIA	TAMAÑO DE FRAGMENTO (pb)
<i>E. coli</i>	16S	ECA75F	5'GGAAGAAGCTTGCTTCTTTGCTGAC3'	544
		ECR619R	5'AGCCCGGGGATTTACATCTGACTTA3'	

Sabat, 2000

La composición de la mezcla de incubación para la PCR es: Tris-HCl pH 9.0 10 mM, MgCl₂ 1.0 mM, 0.2 mM de cada deoxinucleosido trifosfato (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), .5Mm de cada oligonucleotido (ECA75F, ECR619), 0.5 U de Taq polimerasa y 25 ng de ADN en un volumen total de 25 µL. La amplificación por PCR fue realizada en un termociclador GeneAmp® PCR System 2700 de Applied Biosystems bajo las siguientes condiciones: desnaturalización a 94°C por 30 segundos , seguido por 35 ciclos de desnaturalización a 94°C por 45

segundos, alineamiento a 65°C por 45 segundos y extensión a 72°C por 45 segundos. Después de completados los 35 ciclos, una extensión final a 72°C por 10 minutos y las muestras fueron después enfriadas a 4°C. Después se visualizan en gel de agarosa 1% .

V.8 DETERMINACIÓN DE PATOTIPOS DE *Escherichia coli*

TABLA V: Secuencia de oligonucleótidos específicos para cepas patógenas de *Escherichia coli* y tamaño del fragmento

CEPA	GEN	CLAVE DEL OLIGO	SECUENCIA	TAMAÑO DEL FRAGMENTO (pb)
ETEC	LT	LT-1	5'GCGACAAATTATACCGTGCT3'	708
		LT-2	5'CCGAATTCTGTTATATATGT3'	
ETEC	ST	ST-1	5'CTGTATTTGTCTTTTTCACCT3'	182
		ST-2	5'GCACCCGGTACAAGCAGGAT3'	
EIEC	ipaH	EI-1	5'GCTGGAAAACTCAGTGCCT3'	424
		EI-2	5'CCAGTCCGTAAATTCATTCT3'	
EPEC	BFP	EP-1	5'CAATGGTGCTTGCGCTTGCT3'	324
		EP-2	5'GCCGCTTTATCCAACCTGGT3'	

Basado en Harris, 1998 y Tornieporth 1995

La composición de la mezcla para la reacción de amplificación es: Tris-HCl pH 9.0 10 mM, MgCl₂ 1.0 mM, 0.2 mM de cada deoxinucleosido trifosfato (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 1 mM de cada oligonucleotido, 0.5 U de Taq polimerasa y 25 ng de ADN en un volumen total de 25 µL. La amplificación por PCR se realiza en un termociclador GeneAmp® PCR System 2700 de Applied Biosystems bajo las siguientes condiciones: desnaturalización a 94°C por 5 minutos, seguido por 35 ciclos de desnaturalización a 94°C por 45 segundos, alineamiento a 50°C por 1

minuto y extensión a 72°C por 1 minuto. Después de completados los 35 ciclos y, una extensión final a 72°C por 7 minutos, las muestras se enfrían a 4°C.

V.9 AMPLIFICACION DE FRAGMENTOS POR PCR “DUPLEX”

Se desarrolló una técnica en la que se puede usar dos pares de oligonucleótidos por cada reacción. En esta ocasión en una reacción se usaron los oligonucleótidos para amplificar el gen LT y ST de ETEC, que se muestran en la tabla V, en una sola reacción. Así como para identificar a EPEC y EIEC se utilizaron sus respectivos oligonucleótidos en una sola reacción. La composición de la mezcla de amplificación para cada PCR “duplex” es: Tris-HCl pH 9.0 10 mM, MgCl₂ 1.0 mM, 0.2 mM de cada deoxinucleosido trifosfato (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 1 mM de cada oligonucleótido, 0.5 U de *Taq* polimerasa y 25 ng de ADN en un volumen total de 25 µL. La amplificación por PCR “duplex” fue realizada en un termociclador GeneAmp® PCR System 2700 (Applied Biosystems) bajo las siguientes condiciones: desnaturalización a 94°C por 5 minutos, seguido por 35 ciclos de desnaturalización a 94°C por 45 segundos, alineamiento a 50°C por 1 minuto y extensión a 72°C por 1 minuto. Después de completados los 35 ciclos, una extensión final a 72°C por 7 minutos y las muestras fueron después enfriadas a 4°C.

Después se visualizan en gel de agarosa 1% y se identifican de acuerdo al peso de cada fragmento.

VI. RESULTADOS

VI.1 DETALLES DE LA POBLACION ANALIZADA

Primeramente para aprovechar los datos que se nos otorgaron en el IMSS con respecto a los pacientes estudiados, se presentan las siguientes estadísticas que nos servirán en el desarrollo de nuestra discusión. Como ya se menciona el muestreo comprendió 53 muestras fecales con sus respectivos aislados de *E.coli* (control), de las cuales 32 (60%) corresponden al sexo femenino y 21 (40%) al masculino.

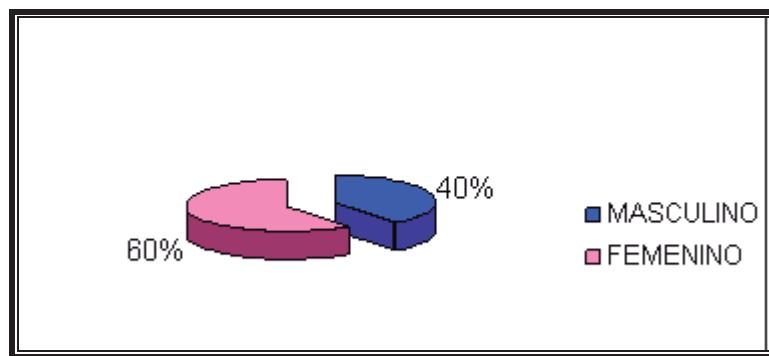


Figura . 3 : Distribución de acuerdo al sexo de los pacientes

A estos pacientes se les clasifico de acuerdo a la edad, y descubrimos que la mayor proporción pertenecía a un grupo de edad mayor de 50 años (31%) y la menor proporción se dio entre los 0- 10 años y 20-30 años (6%).

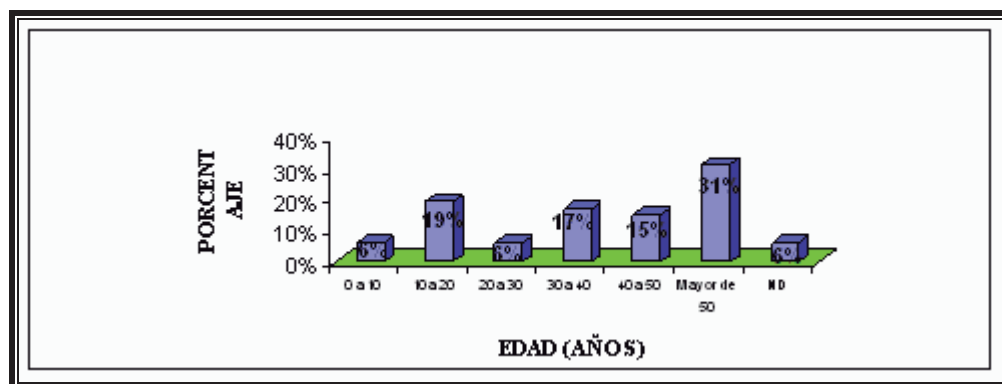


Figura . 4 : Distribución de acuerdo a la edad de los pacientes

Además queríamos ver que patologías presentaban los pacientes tratados y notamos que las causas frecuentes para la visita al medico son en su mayoría por colitis (7 casos), procesos alérgicos (6 casos) que por un cuadro diarreico propiamente (2 casos)

TABLA VI: Diagnóstico presentado por pacientes tratados

D X	CASOS
Cefalea	2
colitis	7
Insuficiencia Renal	1
Dislipidemia	1
Reflujo gastroesofágico	6
Dermatitis Atópica	2
Rinitis Alérgica	4
Neurosis depresiva	1
Desnutrición	1
Sx Febril	1
Estenosis esofágica	1
Gastritis	1
Dx Diarréico	2
Lupus Eritematoso	2
Diabetes Mellitas	1
Linfoma	1
N.D	18
N.D = No determinada	

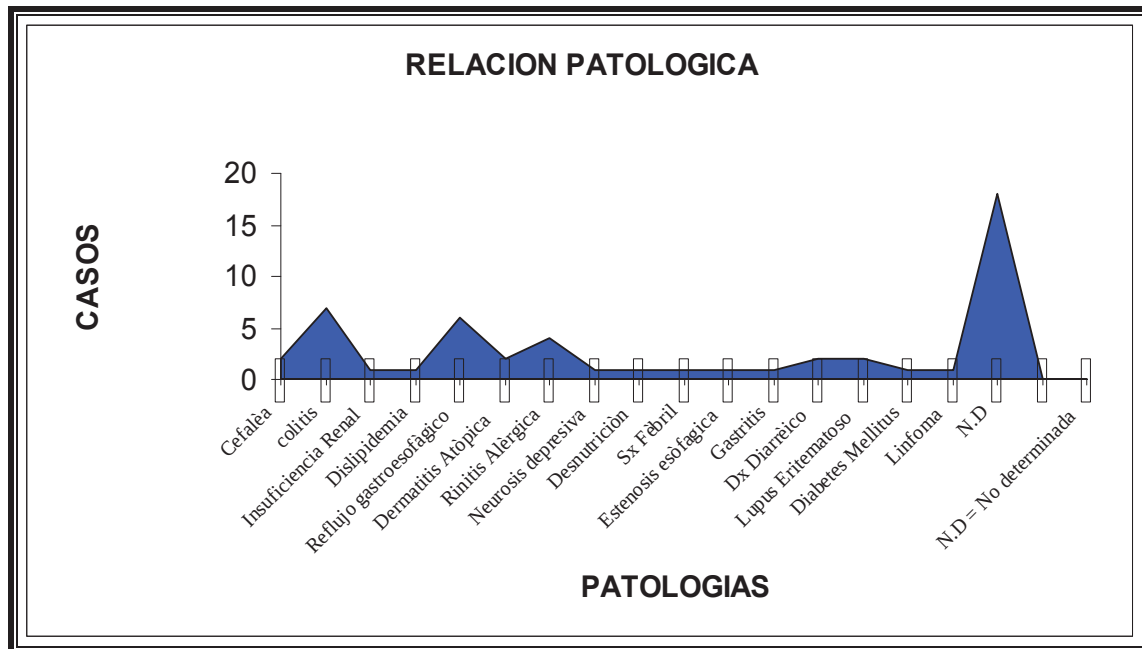


Figura. 5 : Distribución de diagnóstico presentado por pacientes tratados.

VI.2 ENSAYOS DE EVALUACIÓN DE LOS REGULADORES DE EXTRACCIÓN DE DNA

Para poder llevar a cabo la amplificación de PCR con una buena calidad y cantidad de ADN se llevó a cabo una evaluación de los reguladores de extracción que se utilizan con más frecuencia, se clasificaron de la siguiente forma :

- A) Tris-HCl 100mM pH 8.0, SDS 2%, NaCl 100 mM, EDTA 50mM
- B) Tris-HCl 100mM pH 8.0, Xantogenato de potasio 50mM, NaCl 100 mM, EDTA 50mM
- C) Tris-HCl 100mM pH 8.0, SDS 2 %, Xantogenato de potasio 50mM, NaCl 100 mM, EDTA 50mM.

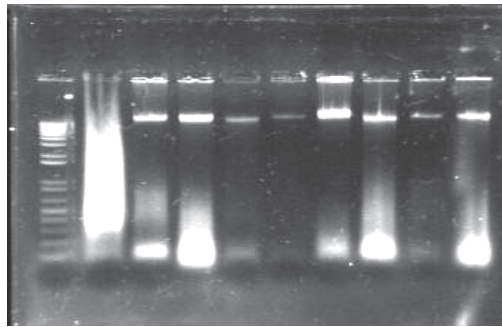


Figura . 6 : Gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio que muestra el DNA obtenido con los diferentes reguladores de extracción (carril 1 marcador de peso molecular; carriles 2, 3 y 4 contienen regulador A; carriles 5, 6,7 contienen regulador B; carriles 8, 9,10 contienen regulador C)

TABLA VII: Absorbancias y concentraciones medidas en espectrofotómetro de muestras no tratadas con RNAasa

Muestra (No. De carril)	$\lambda=260$	$\lambda=280$	$\lambda=320$	Conc. De proteínas Ug/ml	Conc. DNA Ug/ml
2	0.029	0.022	-0.003	14.41	1.117
3	0.033	0.025	0.006	8.894	1.060
4	0.040	0.023	-0.003	7.775	1.793
5	0.010	0.009	-0.004	9.000	0.400
6	0.052	0.042	0.007	19.97	1.562
7	0.048	0.037	0.011	13.03	1.562
8	0.029	0.024	0.002	12.82	0.950
9	0.004	0.001	-0.008	5.114	0.433
10	0.051	0.032	0.001	9.924	2.025

Las muestras de los carriles 2, 3, 4, 7,8 y 10 fueron tratadas con RNAasa.

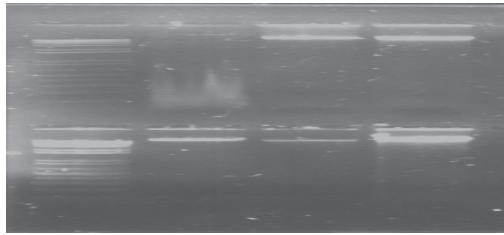


Figura 7: Gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio que muestra el tratamiento con RNAasa (Parte superior: muestras 2, 3,4; Parte inferior: muestras 7,8 y 10)

TABLA VIII: Absorbancias y concentraciones medidas en espectrofotómetro de muestras tratadas con RNAasa

Muestra (No. De carril)	$\lambda=260$	$\lambda=280$	$\lambda=320$	Conc. Proteínas Ug/ml	Conc. DNA Ug/ml
2	0.023	0.017	0.010	1.371	0.557
3	0.017	0.013	0.009	0.874	0.351
4	0.016	0.013	0.007	2.039	0.341
7	0.006	0.006	0.004	0.919	0.084
8	0.046	0.039	0.029	3.217	0.703
10	0.021	0.018	0.012	2.169	0.376

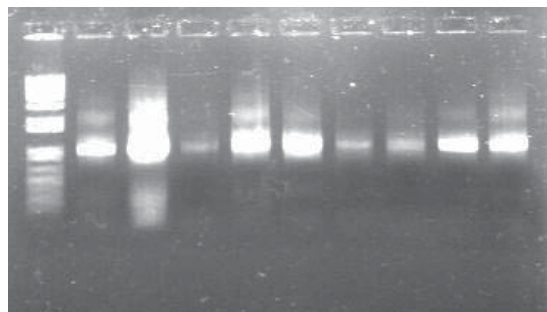


Fig. 8 : Gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio que muestra los productos amplificados con oligos universales mediante PCR (carriles 2,3,4 contienen regulador A ; carriles 5,6,7 contienen regulador B ; carriles 8,9,10 contienen regulador C)

VI.3 ENSAYOS DE LA VISUALIZACIÓN EN GELES DE AGAROSA

Se realizó la extracción del ADN tanto de los aislados clínicos (Fig. 9a), como de las heces (Fig. 9b), obteniéndose una buena calidad del DNA aislado, ya que se observó un material de alto peso molecular .

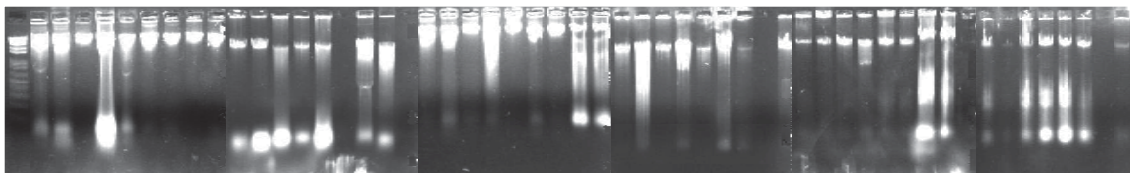


Figura. 9 a) Gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio que muestra el DNA extraído de los aislados clínicos

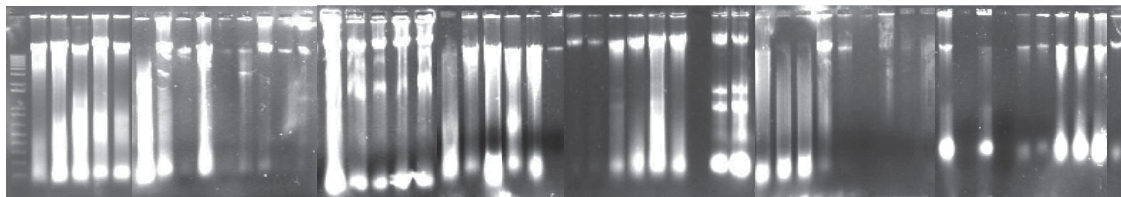


Figura. 9b). Gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio que muestra el DNA extraído de las muestras problema (HECES)

VI.4 ENSAYOS DE ESPECTROFOTOMETRIA

Para determinar la pureza y la concentración ,las muestras fueron sometidas a absorbancia de 260 , para así mismo llevar acabo las diluciones correspondientes en base a la concentración de ADN en nanogramos.

TABLA IX: Concentración de DNA mediante espectrofotometría $\lambda = 260$

# DE MUESTRA	A 260	DILUCION	Concentración de DNA (ng)
1	.026	1000	1.3
2	.025	1000	1.25
3	.049	1000	2.45
4	.103	1000	5.15
5	.038	1000	1.9
6	.024	1000	1.2
7	.045	1000	2.25
8	.549	1000	27.45
9	.062	500	3.1
10	.480	1000	24
11	.248	500	12.4
12	.155	500	7.65
13	.088	500	4.4
14	.490	1000	24.5
15	.044	500	2.2
16	.005	1000	0.25
17	.032	1000	1.6
18	.119	1000	5.95
19	.218	500	10.9
20	.344	500	17.2
21	.533	500	26.65
22	.156	500	7.9
23	.249	500	12.45
24	.322	500	16.1
25	.568	500	28.4
26	.210	500	10.5
27	.199	500	9.95
28	.338	500	16.9
29	.248	500	12.4
30	.152	500	7.6
31	.642	500	32.1
32	.245	500	12.25
33	.243	500	12.15
34	.439	500	20.45
35	.686	500	34.3
36	.598	500	29.9
37	.078	500	3.9
38	.230	500	11.5
39	.045	500	2.25
40	.342	500	17.1
41	.725	500	36.25
43	.208	500	10.4
44	.616	500	30.8
45	.176	500	8.8
46	.690	500	34.5
47	.823	500	41.15
48	.218	500	10.9
49	.599	500	29.95
50	.029	500	1.45
51	.509	500	25.45
52	.169	500	8.45
53	.431	500	21.55

VI.5 ENSAYOS DE AMPLIFICACION DEL GEN 16S rRNA DE *Escherichia coli*

Una vez que se determino la calidad de DNA de nuestro aislados, se prosiguió a comprobar si este realmente pertenecía a cepas de a la especie *Escherichia coli* amplificando mediante PCR las muestras problema (aislados y heces) el gen 16S rRNA específico con los oligos específicos, al final se obtuvo una banda de amplificación única de aprox. 640 pb, obteniendo con satisfacción un fragmento de tamaño esperado Fig. 10 a) y 10b)

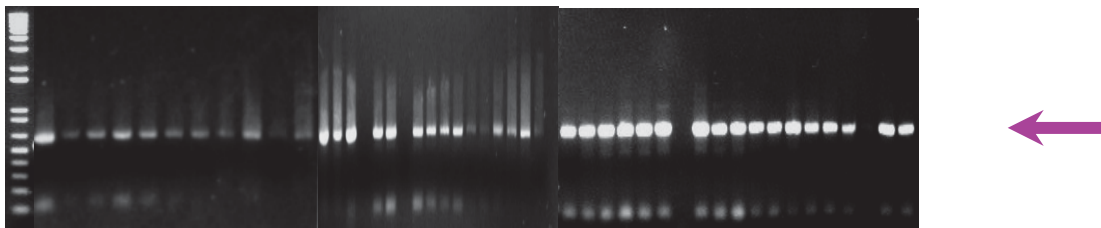


Figura. 10 a) Gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio que muestra los productos de amplificación mediante PCR del gen 16S obtenidos de los aislados clínicos

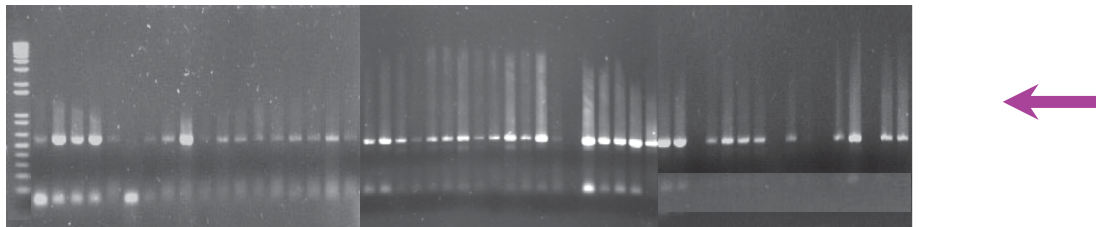


Figura. 10 b) Gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio que muestra los productos de amplificación mediante PCR del gen 16S obtenidos de las muestras problema (heces)

Como se podrá ver existen 5 aislados clínicos no amplificaron con los oligos específicos, lo cual aludimos a fallas en el aislamiento.

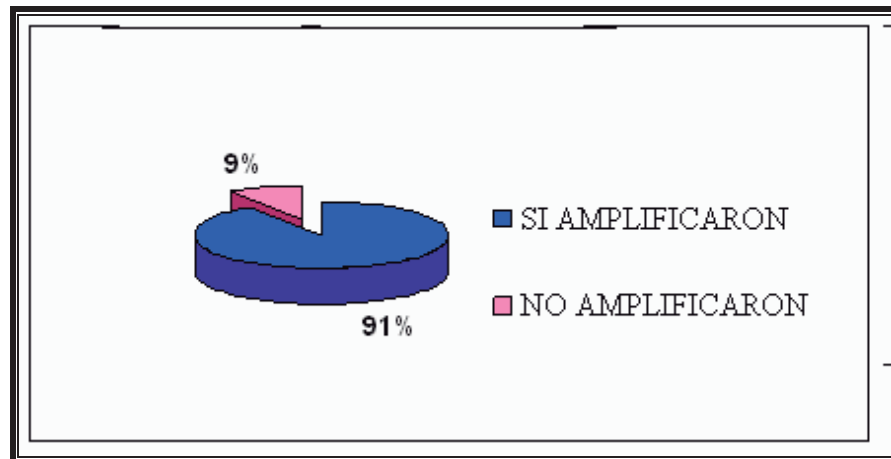


Figura 11: Amplificación del gen 16S rRNA de *Escherichia coli* en aislados clínicos

Por otra parte a las 7 muestras problema (heces) que no amplificaron con los oligos específicos para *E.coli* se les consideraron muestras perdidas, después de hacerles una amplificación con oligos universales y obtener resultado negativo, esto se puede deducir a que cuando se les volvió a correr en gel de agarosa, el ADN de la muestra pudo haber sido degradado.

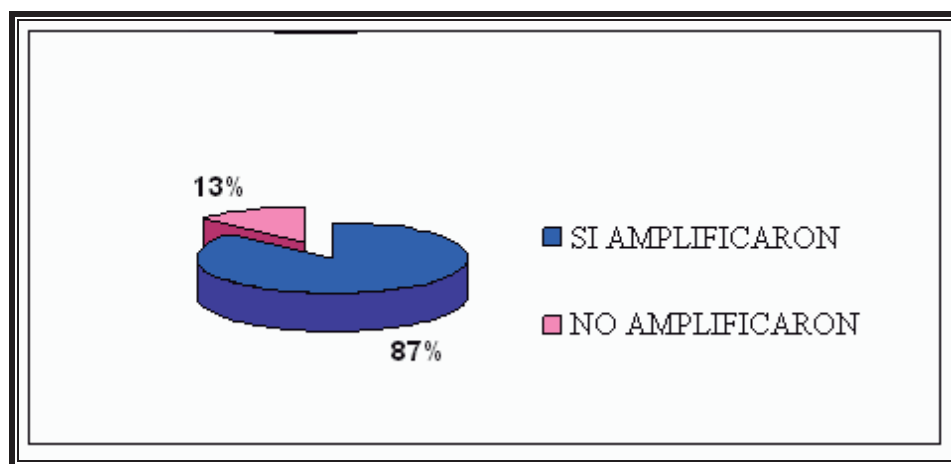


Figura 12 : Amplificación del gen 16S rRNA de *Escherichia coli* en muestras problema (Heces)

VI.6 ENSAYOS DE TIPIFICACIÓN MOLECULAR PARA *Escherichia coli*

Por ultimo las muestras fueron sometidas a una tipificación molecular, empleando PCR con oligos específicos para EPEC, EIEC, ETEC y los resultados se muestran en las imágenes siguientes:

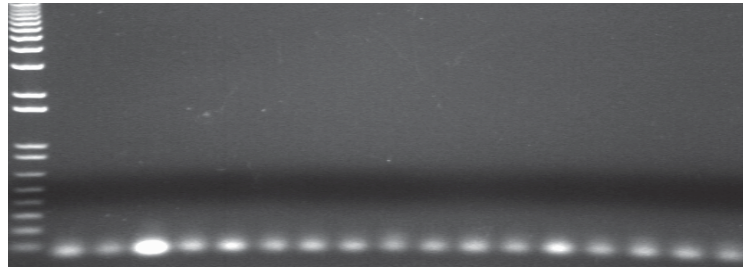


Figura 13: Gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio que muestra los patrones de amplificación obtenidos de los ensayos por PCR, con oligos específicos para ETEC

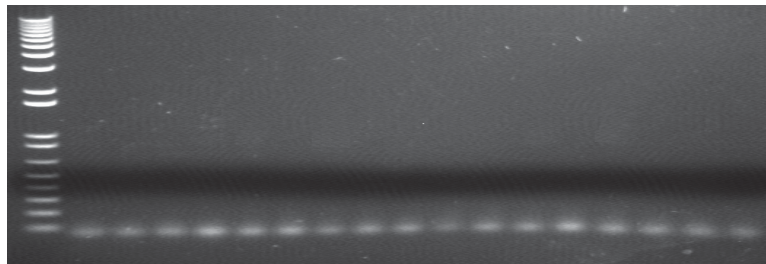


Figura 14: Gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio que muestra los patrones de amplificación obtenidos de los ensayos de amplificación por PCR “DUPLEX”, con oligos específicos para EPEC, EIEC

VII DISCUSION

El objetivo primario era desarrollar la técnica de PCR como un método rápido y de confianza que nos permitiera la amplificación del gen 16S ARNr de *Escherichia coli*.

El presente trabajo se llevo a cabo con una población proveniente del IMSS de la Cd. de Morelia Mich.

A partir de los datos proporcionados establecimos los grupos poblacionales en que se presentaban con mayor frecuencia *Escherichia coli*, lo cual arrojo que en un 60% son mas frecuentes en mujeres que en hombres.

Queríamos conocer que edad presentaban los pacientes y los agrupamos por años, siendo los más representativos los adultos mayores de 50 años, cabe mencionar que en nuestro estudio los niños menores de 1 año no eran frecuentes debido a que en su mayoría son canalizados al Hospital Infantil.

Además queríamos ver que relación patológica se establecía en los pacientes registrados, observar la causa de su visita al centro de salud si era por que estaban cursando con un cuadro diarreico o no, encontrándonos con que la mayoría asistía al centro de salud por colitis o por algún cuadro alérgico y que solo en dos casos se presentaba un cuadro diarreico. Esto representa una gran desventaja desde el punto de vista epidemiológico, pues no sabíamos con exactitud que parte de la población esta cursando con algún cuadro diarreico y mucho menos podemos investigar su etiología.

El tiempo de muestreo fue de 6 meses comprendidos entre los meses de Octubre 2004 a Abril del 2005; y el total de los pacientes analizados fue de 53, cada cual con su muestra fecal y con su respectivo aislado de *E.coli* en medio de agar nutritivo. Los medios eran preparados y entregados al IMSS para el correspondiente aislado que fungiría como control.

Las técnicas convencionales fueron llevadas a cabo en el IMSS, nosotros nos enfocamos al desarrollo de técnicas moleculares como lo representa la PCR, que detecta de manera específica cepas de *Escherichia coli*.

Al tratar los aislados de *Escherichia coli* a partir de cultivo directo con oligos específicos ECA 75F-ECR619R nos dimos cuenta que 5 muestras no amplificaron lo cual se alude quizá a un mal aislado podemos decir que la eficacia del método es de un 91%.

A las muestras fecales también se les trato directamente con oligos específicos para *E.coli*, amplificando un total de 46 muestras. Es importante mencionar que aquellas muestras de cultivo que no amplificaron, aquí si lo hicieron brindando a este segundo método mucho mas sensibilidad y especificidad.

A los 7 DNA de muestras fecales que no amplificaron se les trato con oligos universales dándonos un resultado negativo y finalmente al correr el ADN directo en gel de agarosa, observamos que la cantidad de ADN era nula y que por esta causa no amplificaron en el ensayo de PCR.

La ruptura de células y la presencia de inhibidores son dos problemas que se presentan frecuentemente en el aislamiento de ADN. Las heces es una de las muestras clínicas más complejas para la PCR directa por la presencia de inhibidores de PCR inherentes que pueden ser coextraídos con el ADN bacteriano. Un tratamiento adecuado depende de la eficiencia y rapidez de la detección del agente causal. En vista de los resultados obtenidos en la evaluación de los reguladores de extracción (SDS 2%, Xantogenato, SDS 2%-Xantogenato), se observó que con el xantogenato se obtiene un ADN con menos contaminación de ARN, eliminando con esto el tratamiento con RNAasa y optimizando aun mas el tiempo mediante la amplificación por PCR, por lo tanto todas nuestras muestras fueron sometidas con el regulador xantogenato para la extracción de ADN.

Claramente, la debilitación de cualquier paso (extensión de los fragmentos preparados de la ADN con la polimerasa de la ADN, y muchos ciclos repetidos de la desnaturalización, del recocido, y de la extensión) en esta cadena compleja disminuirá producciones.

Después de saber que el ADN obtenido en verdad correspondía al de *Escherichia coli* , queríamos realizar una tipificación molecular para conocer si estábamos

tratando con cepas patógenas o no. Basándonos en estudios anteriores, en los que se ha demostrado que *E.coli* patógena se encuentra primordialmente en niños esperábamos que no existiera amplificación en ninguna ya que nuestra población estudiada como ya se describió corresponde a personas adultas; además de que el propósito es que este grupo de muestras nos sirvan de control de referencia para proyectos posteriores. Al amplificar con iniciadores específicos mediante PCR y PCR “DUPLEX” para detectar los grupos patógenos de *E.coli*, EPEC, ETEC, EIEC, ninguna de las muestras presentó amplificación.

Se demostró que los resultados obtenidos por métodos moleculares están bien correlacionados con los obtenidos por métodos microbiológicos convencionales. Cabe mencionar que los dos únicos casos que asistieron al centro de salud por un cuadro diarreico eran personas adultas, por esto es que no hubo amplificación con los oligos específicos para EPEC, EIEC, ETEC, y como conclusión nuestros resultados muestran que la *E.coli* encontrada en estos pacientes no es patógena.

En vista de la sensibilidad de detección, nuestro análisis puede ser aplicado como adjunto alternativo o útil a los procedimientos existentes en el laboratorio de diagnóstico.

El acercamiento divulgado es algo lento y depende de mucho esfuerzo para poder ser utilizado en microbiología clínica. Sin embargo, confiamos en que el desarrollo de las técnicas automatizadas de la amplificación de la ADN junto con sistemas rápidos en la detección de la secuencia contribuirá a la utilidad del acercamiento molecular directo en el futuro cercano.

Los resultados presentados aquí se pueden utilizar como base para el desarrollo de metodologías moleculares para la identificación directa de patógenos bacterianos.

VIII CONCLUSIONES

- La extracción del ADN es un factor limitador probable para el PCR
- Se logró amplificar una región del gen 16S de rRNA específica para *E. coli* de los ADN obtenidos de ambos tipos de muestras.
- El aislamiento de *E.coli* por métodos convencionales, no presenta una exactitud del 100% al contrario se pueden presentar errores, además de que el establecimiento de un diagnostico es demasiado lento.
- Es posible la identificación de *E.coli* a partir de una muestra fecal, por métodos moleculares como lo es la PCR, proveyendo resultados con más especificidad y rapidez (en un mismo día), incluso se puede amplificar *E.coli* en la modalidad de muestra clínica que con aislados clínicos no lo hicieron, otorgando con esto una ventaja más: la sensibilidad.
- Los procedimientos para la extracción de ADN, la purificación, y la amplificación de PCR descrita aquí demuestran que el PCR es una herramienta potencialmente útil en la detección de microorganismos.
- Al realizar una evaluación de los diversos reguladores de extracción , se optó por el xantogenato, pues mediante éste se obtiene un DNA con muy poca contaminación de RNA ,optimizando asi mas el tiempo en la amplificación por PCR .
- PCR debe implementarse como un método avanzado para el estudio de la microflora intestinal humana.
- Se comprobó que *E.coli* en adultos se presenta como flora normal, no así en niños donde puede causar hasta la muerte.

IX. BIBLIOGRAFIA

- Abdulmawjood A, Bülte M, Roth S, Schönenbrücher H, Cook N, D'Agostino M, et al. (2004) Toward an International Standard for PCR-Based Detection of Foodborne *Escherichia coli* O157: Validation of the PCR-Based Method in a Multicenter Interlaboratory. J. AOAC Internat. 87: 856-860.
- Baca B.E.; M.M.P. Arenas Hernández y E. Barrios Villa. 2004. Sistemas de secreción tipo iii (sstt), y la patogenicidad bacteriana. Mecanismos de patogenicidad e interacción parásito hospedero. Rocha-Gracia R. del C., Martínez-Laguna, Y., Lozano-Zarain, P. (eds). Publicación especial de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. pp. 20-43. Puebla, Pue, México. ISBN
- BODO R. EING.,ANDREA BECKER, ARTHUR SOHNS, AND RONALD RINGELMANN,1998 Comparison of Roche Cobas Amplicor *Mycobacterium tuberculosis* Assay with In-House PCR and Culture for Detection of *M. tuberculosis* p. 2023–2029
- Breeuwer, P., and T. Abee. 2000. Assessment of viability of microorganisms employing fluorescence techniques. Int. J. Food Microbiol. 55:193–200
- Cáceres DC, Velandia MP, Izquierdo VF, et al. Enfermedad diarreica aguda e infección por rotavirus, Colombia, agosto de 2003. Boletín Quincenal Epidemiológico Nacional 2003; 8: 321-336.
- Checkley W, Epstein, LD, Gilman RH, et al. Effects of El Niño and ambient temperature on hospital admissions for diarrhoea disease in Peruvian children. Lancet 2000; 355: e 442.
- Chiang Yu-Cheng 20 April 2005 Identification of *Bacillus* spp., *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Staphylococcus* spp. and *Vibrio* spp. with 16S ribosomal DNA-based oligonucleotide array hybridization
- Chowdhury, 2000, Diario de la biotecnología 119 (2005) 343-347 Comunicación corta Aislamiento rápido de la alta calidad, plasmid multimeric DNA usando el detergente zwitterionic

- Cobbold R, Desmarchelier P (2001) Characterization and clonal relationships of Shiga-toxigenic *Escherichia coli* (STEC) isolated from Australian dairy cattle. Vet. Microbiol. 79: 323-335.
- Corless CE, Guiver M, Borrow R, Edwards-Jones V, Kaczmarek EB, Fox AJ. Contamination and sensitivity issues with a real-time universal 16S rRNA PCR. J Clin Microbiol 2000; 38: 1747–1752.
- Correa A, Solarte Y, Barrera J, et al. Molecular characterization of rotavirus in the city of Santafé de Bogotá, Colombia. Determination of the electrophenotypes and typing of a strain by RT-PCR. Rev Latinoam Microbiol 1999; 41: 167-173.
- F. J. Garcia-Pena, and E. F. Rodriguez Ferri. 2000. Comparison of different PCR approaches for typing *Francisella tularensis* strains. J. Clin. Microbiol. 38:1016–1022.
- G. SABAT Feb de 2000, 0010 P. 844-849 vol. 66, no 2 Método selectivo y sensible para la amplificación de PCR de Genes del rRNA de coli de Escherichia 16S en suelo
- G.A. Leotta, I. Chinen, S. Epszteyn, E. Miliwebsky, I.C. Melamed, 2000. Extracción rápida, directa de la DNA de los suelos para el análisis de PCR usando el polyvinylpyrrolidone hacer girar columnas. Microbiología de FEMS. Lett. 138, 17 - 22.
- Glass RI, Ando T, Frankhouser R, et al. The epidemiology of enteric caliciviruses from humans: A reassessment using new diagnostics. J Infect Dis 2000; 181 (Suppl): 254-261.
- Hayashi, H., M. Sakamoto, and Y. Benno. 2002. Fecal microbial diversity in a strict vegetarian as determined by molecular analysis and cultivation. Microbiol. Immunol. 46:819–831.
- Hayashi, H., M. Sakamoto, and Y. Benno. 2002. Phylogenetic analysis of the human gut microbiota using 16S rDNA clone libraries and strictly anaerobic culture-based methods. Microbiol. Immunol. 46:535–548.

- Heininger A, M. Binder, A. Ellinger, J. Pfisterer, K. Botzenhart, K. Unertl and G. Dörring 2004 Effect of comprehensive validation of the template isolation procedure on the reliability of bacteraemia detection by a 16S rRNA gene PCR
- Herrick, J. B., E. L. Madsen, and W. C. Ghiorse. 1992. PCR detection of biodegradation genes from environmental samples: an approach to the study of bacterial populations in their native habitats, abstr. Q-91, p. 350. Abstr. 92nd Gen. Meet. Am. Soc. Microbiol. 1992. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Hugenholtz P, Goebel BM, Pace NR: Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. *J Bacteriol* 1998, 180:4765-4774.
- Hugenholtz P, Tyson GW, Blackall LL: Design and evaluation of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes for fluorescence *in situ* hybridization. In *Methods in Molecular Biology, vol. 179: Gene Probes: Principles and Protocols*. Edited by Aquino de Muro M, Rapley R. Totowa: Humana, 2001, 29-42.
- Hugenholtz P, Tyson GW, Webb RI, Wagner AM, Blackall LL: Investigation
- Huijsdens, X. W., R. K. Linskens, M. Mak, S. G. Meuwissen, C. M. Vandenbroucke- Grauls, and P. H. Savelkoul. 2002. Quantification of bacteria adherent to gastrointestinal mucosa by real-time PCR. *J. Clin. Microbiol.* 40:4423–4427.
- Isabel C. A. Scaletsky,^{1*} Sandra H. Fabbricotti,¹ Katia R. Aranda,¹ Mauro B. Morais,² and Ulysses Fagundes-Neto Apr. 2002. Comparison of DNA hybridization and PCR Assays for Detection of Putative Pathogenic enteroadherent *Escherichia coli* p. 1254–1258
- JAMES B. HERRICK, EUGENE L. MADSEN, CARL A. BATr, AND WILLIAM C. GHIORSE(1993) Polymerase Chain Reaction Amplification of Naphthalene-Catabolic and 16S rRNA Gene Sequences from Indigenous Sediment Bacteria p. 687-694
- Johnson, J. R., and T. T. O'Bryan. 2000. Improved repetitive-element PCR fingerprinting for resolving pathogenic and nonpathogenic phylogenetic groups within *Escherichia coli*. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 7:265–273.

- Junkal Garmendia May 2005 Enteropathogenic and Enterohemorrhagic *Escherichia coli* Infections: Translocation, Translocation, Translocation, p. 2573–2585
- Klerks MM, Zijlstra C, van Bruggen AHC (2004) Comparison of real-time PCR methods for detection of *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* O157:H7, and introduction of a general internal amplification control. J. Microbiol. Methods 59: 351–361
- L. W. Riley. 2001. Widespread distribution of urinary tract infections caused by a multidrug-resistant *Escherichia coli* clonal group. N. Engl. J. Med. 345:1007–1013.
- Langendijk, P. S., F. Schut, G. J. Jansen, G. C. Raangs, G. R. Kamphuis, M. H. Wilkinson, and G. W. Welling. 1995. Quantitative fluorescence in situ hybridization of *Bifidobacterium* spp. with genus-specific 16S rRNA-targeted probes and its application in fecal samples. Appl. Environ. Microbiol. 61: 3069–3075.
- LARS ENGSTRAND, ANNE-MARIE H. NGUYEN, DAVID Y. GRAHAM, AND FOUAD A. K. EL-ZAATARI, 1992. Reverse Transcription and Polymerase Chain Reaction Amplification of rRNA for Detection of Helicobacter Species p. 2295–2301
- Lee, T. M., C. Y. Chang, L. L. Chang, W. M. Chen, T. K. Wang, and S. F. Chang. 2003. One predominant type of genetically closely related *Shigella sonnei* prevalent in four sequential outbreaks in school children. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 5:173–181.
- Lisker Rubén, Armendares Salvador 2000, Introducción a la Genética Humana, primera edición Editorial El Manual Moderno México D.F.
- Lobaina Rodríguez Tamara, Raisa Zhurbenko Determinación de microorganismos indicadores de la calidad sanitaria por métodos cromogénicos y fluorogénicos 2005
- Lyons, S. R., A. L. Griffen, and E. J. Leys. 2000. Quantitative real-time PCR for *Porphyromonas gingivalis* and total bacteria. J. Clin. Microbiol. 38:2362–2365.
- M. Motter, M. Ferrer, E. Marey, M. Rivas Validación de una técnica de PCR múltiple para la detección de *Escherichia coli* productor de toxina Shiga Revista Argentina de Microbiología (2005) 37: 1–10

- Madsen, E. L., A. Winding, K. Malachowsky, C. T. Thomas, and W. C. Ghiorse. 1992. Contrasts between subsurface microbial communities and their metabolic adaptation to polycyclic aromatic hydrocarbons at a forested and an urban coal-tar disposal site. *Microb. Ecol.* 24:199-213.
- Mamani, D. Fuentes, M. O’Ryan, and V. Muñoz. 2002. Situación epidemiológica de las enfermedades transmitidas por alimentos en Santiago de Chile.
- Martin, F. E., M. A. Nadkarni, N. A. Jacques, and N. Hunter. 2002. Quantitative microbiological study of human carious dentine by culture and realtime PCR: association of anaerobes with histopathological changes in chronic pulpitis. *J. Clin. Microbiol.* 40:1698–1704.
- Mas Eva, Poza Julio; Ciriza Jesús 2001, Revista Acuatic No. 15 Fundamento de la reacción en cadena de la Polimerasa. Universidad de zaragoza españa
- Mathews Christopher 1999, Bioquímica segunda edición MacGraw Hill España pp. 94, 101-102, 114
- Matsuki, T., K. Watanabe, J. Fujimoto, Y. Kado, T. Takada, K. Matsumoto, and R. Tanaka. 2004. Quantitative PCR with 16S rRNA-gene-targeted species-specific primers for analysis of human intestinal bifidobacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 70:167–173.
- Matsuki, T., K. Watanabe, J. Fujimoto, Y. Miyamoto, T. Takada, K. Matsumoto, H. Oyaizu, and R. Tanaka. 2002. Development of 16S rRNA-gene-targeted group-specific primers for the detection and identification of predominant bacteria in human feces. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:5445–5451.
- Matsuki, T., K. Watanabe, R. Tanaka, M. Fukuda, and H. Oyaizu. 1999. Distribution of bifidobacterial species in human intestinal microflora examined with 16S rRNA-gene-targeted species-specific primers. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:4506–4512.
- Ririe, K. M., R. P. Rasmussen, and C. T. Wittwer. 1997. Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. *Anal. Biochem.* 245:154–160.

- McDaniel, J., and S. D. Pillai. 2002. Gel alignment and band scoring for DNA fingerprinting using Adobe
- Mendoza. 2001. Outbreaks and sporadic cases of *Salmonella* serovar Panama studied by DNA fingerprinting and antimicrobial resistance. Int. J. Food Microbiol. 71:35–43.
- Millar BC, Jiru X, Moore JE, Earle JAP. A simple and sensitive method to extract bacterial, yeast and fungal DNA from blood culture material. J Microbiol Meth 2000; 42: 139–147.
- Morais, and U. Fagundes-Neto. 1999. A localized adherence-like pattern as a second pattern of adherence of classic enteropathogenic *Escherichia coli* to HEp-2 cells that is associated with infantile diarrhea. Infect. Immun. 67:3410–3415.
- Mourich, D.V., y otros., 2003. Purificación de la DNA del plásmid usando la precipitación selectiva cerca agentes de condensación. Nacional. Biotechnol. 17, 822-823.
- Nadkarni, M. A., F. E. Martin, N. A. Jacques, and N. Hunter. 2002. Determination of bacterial load by real-time PCR using a broad-range (universal) probe and primers set. Microbiology 148:257–266.
- Nozaki, T., Y. Kusumoto, M. Kitamura, H. Hirano, A. Kohyama, M. Hayakawa, H. Takiguchi, Y. Abiko, S. Murakami, and H. Okada. 2001. A
- O’Ryan M, Pérez-Schael I, Mamani N, et al. Rotavirus-associated medical visits and hospitalizations in South America: a prospective study at three large sentinel hospitals. Pediatr Infect Dis J 2001; 20: 685-693.
- of candidate division TM7, a recently recognized major lineage of the domain *Bacteria* with no known pureculture
- Período 1999–2000. Rev. Med. Chile 130:495–501.
- Pettigrew, M. M., B. Foxman, Z. Ecevit, C. F. Marrs, and J. Gilsdorf. 2002. Use of pulsed-field gel electrophoresis, enterobacterial repetitive intergenic consensus typing, and automated ribotyping to assess genomic variability among strains of nontypeable *Haemophilus influenzae*. J. Clin. Microbiol. 40:660–662.
- Philip Hugenholtz, 2002 Exploring prokaryotic diversity in the genomic era

- Pierre Servais , Julia Baudart ,2001 Detección y enumeración de coliforms en agua potable: métodos actuales
- Prado, V., V. Solari, I. Alvarez, C. Arellano, R. Vidal, M. Carreño, N.
- Prats Guillem, Llobet Teresa, Margall Nuria Infecciones bacterianas Escherichia Coli O157:H7, Enterohemorrágica 23 de agosto de 2001.
- Rapid detection and quantification of five periodontopathic bacteria by real-time PCR. Microbiol. Immunol. 45:39–44.
- Roberto Vidal, Maricel Vidal, Rossana Lagos, Myron Levine, and Valeria Prado Apr. 2004 Multiplex PCR for Diagnosis of Enteric Infections Associated with Diarrheagenic *Escherichia coli* ,p. 1787–1789
- Rocha-Gracia R. del C., Martínez-Laguna, Y. , Lozano-Zarain, Patricia, Arenas Hernández, Margarita M.P. 2004. BASES MOLECULARES DE LA PATOGENICIDAD MICROBIANA. Mecanismos de patogenicidad e interacción parásito hospedero. Rocha-Gracia R. del C., Martínez-Laguna, Y. , Lozano-Zarain, P. (eds). Publicación especial de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. pp. 1-15. Puebla, Pue, México. ISBN
- Rodríguez T. Gemma, Santiago Matz. Ma. Concepción 2000 Estudio del ADN, Secuenciación automática de ADN
- Rosales Castillo, Jesús Andreí. Tipificación polifásica de aislados clínicos de *Escherichia coli* diarreagénica 2004
- Sakamoto, M., M. Umeda, I. Ishikawa, and Y. Benno. 2000. Comparison of
- Sakamoto, M., Y. Takeuchi, M. Umeda, I. Ishikawa, and Y. Benno. 2001. Rapid detection and quantification of five periodontopathic bacteria by real-time PCR. Microbiol. Immunol. 45:39–44.
- Sakamoto, M., Y. Takeuchi, M. Umeda, I. Ishikawa, and Y. Benno. 2001.
- Saxena, M. K., V. P. Singh, B. D. Lakhcharua, G. Taj, and B. Sharma. 2002. Strain differentiation of Indian isolates of *Salmonella* by ERIC-PCR. Res.
- Sayler, G. S., and A. C. Layton. 1990. Environmental application of nucleic acid hybridization. Annu. Rev. Microbiol. 44:625-648.

- Sayler, G. S., K. Nikbakht, J. T. Fleming, and J. Packard. 1992. Applications of molecular techniques to soil biochemistry. *Soil Biochem.* 7:131-172.
- Scaletsky, I. C. A., M. Z. Pedroso, C. A. G. Oliva, R. L. B. Carvalho, M. B.
- Sensitive method for detecting *Porphyromonas gingivalis* by polymerase chain reaction and its possible clinical application. *J. Periodontol.* 72:1228–1235.
- Shang Shiqiang, Guoxian Chen, Yidong WU, Lizhong DU, And Zhengyan Zhao 2005 Rapid Diagnosis of Bacterial Sepsis with PCR
- Sierra Rodríguez Alberto *ESCHERICHIA COLI* ENTEROHEMORRÁGICA Profesor Asistente. Universidad Nacional Coordinador Servicio de Lactantes, Hospital de la Misericordia. 2000
- Siu Wai Yeung, I-Ming Hsing 6 April 2005 Manipulation and extraction of genomic DNA from cell lysate by functionalized magnetic particles for lab on a chip applications
- Sleight J, Cursons R, La Pine M. Detection of bacteraemia in critically ill patients using 16S rDNA polymerase chain reaction and DNA sequencing. *Intens Care Med* 2001; 27: 1269–1273.
- Soto, S. M., B. Guerra, A. del Cerro, M. A. Gonzalez-Hevia, and M. C. Vet. Sci. 73:313–314.
- T. Trochimchuk y otros. Inhibición y facilitación de la amplificación del ácido nucleic. *Appl. Rodear. Microbiología.* 63, 3741 - 3751. /Diario de métodos microbiológicos 54 (2003) 165-175 175
- Takada, T., K. Matsumoto, and K. Nomoto. 2004. Development of multicolor FISH method for analysis of seven *Bifidobacterium* species in human feces. *J. Microbiol. Methods* 58:413–421.
- Takahiro Matsuki,* Koichi Watanabe, Junji Fujimoto, Toshihiko Takada, and Ryuichiro Tanaka, Dec 2004. Use of 16S rRNA Gene-Targeted Group-Specific Primers for Real-Time PCR Analysis of Predominant Bacteria in Human Feces p. 7220–7228
- Takahiro Matsuki,* Koichi Watanabe, Junji Fujimoto, Toshihiko Takada, and Ryuichiro Tanaka, Dec 2004. Use of 16S rRNA Gene-Targeted Group-Specific

Primers for Real-Time PCR Analysis of Predominant Bacteria in Human Feces p. 7220–7228

- Urbina D, Arzuza O, Young G, et al. Rotavirus type A and other enteric pathogens in stool samples from children with acute diarrhea on the Colombian northern coast. *Int Microbiol* 2003; 6: 27-32.
- van Elsas, J. D., and C. Waalwijk. 1991. Methods for the detection of specific bacteria and their genes in soil. *Agric.Ecosyst. Environ.* 34:97-105.
- Van Winkelhoff, A. J., B. G. Loos, W. A. Van Der Reijden, and U. Van Der Velden. 2002. Porphyromonas gingivalis, Bacteroides forsythus and other putative periodontal pathogens in subjects with and without periodontal destruction. *J. Clin. Periodontol.* 29:1023–1028.
- Vial, P. A., R. Robins Browne, H. Lior, V. Prado, J. B. Kaper, J. P. Nataro, D. Maneval, A. Elsayed, and M. M. Levine. 1988. Characterization of enteroadherent-aggregative *Escherichia coli*, a putative agent of diarrheal disease. *J. Infect. Dis.* 158:70–79. VOL. 33, 1995 PCR for screening enteroaggregative *e. Coli* 705
- Walter, J., G. W. Tannock, A. Tilsala-Timisjarvi, S. Rodtong, D. M. Loach, K. Munro, and T. Alatossava. 2000. Detection and identification of gastrointestinal *Lactobacillus* species by using denaturing gradient gel electrophoresis and species-specific PCR primers. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 297–303.
- Woese CR: Interpreting the universal phylogenetic tree. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000, 97:8392-8396.
- Wong, H., and C. Lin. 2001. Evaluation of typing of *Vibrio parahaemolyticus* by three PCR methods using specific primers. *J. Clin. Microbiol.* 39:4233–4240.
- Ygnacio Martínez Laguna, Margarita M. P. Arenas Hernández y Claudia F. Martínez de la Peña. 2002. Temas de actualidad en microbiología, AMBIENTE Y SALUD. Rocha-Gracia R. del C., Martínez-Laguna, Y. , López Olguín J. F. (eds). Publicación especial de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. pp. 95-117. Puebla, Pue, México.