

56

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA

“HIBRIDACION EN FASE SOLIDA “COLONY BLOT”
PARA LA IDENTIFICACION DE *Escherichia coli*
PATOGENA CAUSANTE DE DIARREA”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A :
MARIA GUADALUPE RINCON MENDEZ

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



ASESORAS: M. en C. MARIA GUADALUPE RODRIGUEZ ANGELES
O.F.B. LOURDES VEGA NAVARETE

2001

MEXICO, D.F.

2001

LO HUBIERA LEI
DE NUESTRA SELECCION



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



REPUBLICA NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES "ZARAGOZA"

JEFATURA DE LA CARRERA DE QUÍMICO
FARMACÉUTICO BIÓLOGO

ASUNTO: ASIGNACIÓN DE SINODALES

ESTIMADOS MAESTROS:

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

MARÍA GUADALUPE RINCÓN MÉNDEZ.

para obtener el Título de Químico Farmacéutico Biólogo

Les agradeceré se sirvan revisar el trabajo escrito intitulado: **Hibridación en fase sólida "Colony blot" para la identificación de Escherichia coli patógena causante de diarrea.**

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

PRESIDENTE Q.F.B. MA DE LAS MERCEDES ZAMUDIO DURÁN

VOCAL Q.F.B. PATRICIA VIDAL MILLAN.

SECRETARIO Q.F.B. RAQUEL RETANA UGALDE

SUPLENTE Q.F.B. LOURDES VEGA NAVARRETE

SUPLENTE M en C MA GUADALUPE RODRIGUEZ ANGELES

M Zamudio

Patricia Vidal

Raquel Retana

Lourdes Vega

Ma Guadalupe

ATENTAMENTE.
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
México, D.F. a, 24 de abril de 2001.

Roberto Cruz González-Meléndez

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

El presente trabajo fue realizado en el Laboratorio de Bacteriología Molecular de Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológica (InDRE), bajo la dirección de la M. en C. María Guadalupe Rodríguez Ángeles y la asesoría de la Q. F. B. Lourdes Vega Navarrete.

AGRADECIMIENTOS:

A Dios antes que nadie, por haberme permitido vivir y disfrutar de este maravilloso sueño como profesional y como persona.

A mi mamá por ser una mujer ejemplar, que nunca dejó de mostrar su espíritu incansable para que mis hermanos y yo lográramos nuestros sueños y metas.

A mi papá que también con su gran ejemplo de tenacidad y amigo incondicional me brindó la confianza suficiente para terminar esta etapa de mi vida.

A cada uno de mis hermanos: José Alfredo, Víctor Manuel, Marco Antonio, Cristy, Paulo César, Tere y Moni, que en su momento me brindaron su apoyo y su tiempo, les dedico este trabajo y mis metas futuras.

Un especial agradecimiento por su ayuda incondicional y ejemplo de disciplina y constancia a Eduardo mi primo.

En fin a toda mi familia. Abuelita, tías, tíos, primos y primas que de alguna manera se interesaron y pusieron su granito de arena.

A Lupita Rodríguez, mi directora de tesis que sin tu importantísima ayuda esto no hubiera sido posible... Gracias.

A todos lo muchachos y muchachas del Departamento de Biología Molecular por su amistad y por haberme permitido convivir con ustedes.

A mis compañeros y amigos de la FES "Zaragoza":

Alejandra González, Laura Ventura, Miriam Hinojosa, Elena Flores, Alina Machado, Sixto Espinosa, Angélica Otero, Marino Alcántara, Coral Lozano, Paty Palacio, Silvestre Ramírez, Víctor Chávez , Erika Nava, Antonio Vázquez, Gisela Reyes, Lourdes Espejel, Jaime Herrera, Lisset Nieto.....

Gracias

INDICE.	Páginas
Abreviaturas	i
Resumen	iii
I Introducción	1
1 <i>Escherichia coli</i> enterotoxigénica (ETEC)	3
1.1 Producción de toxinas LT y ST	4
1.2 Factor de colonización	4
2 <i>Escherichia coli</i> enteropatógena (EPEC)	5
2.1 Histopatología de la “adherencia y esfacelación” (A/E)	5
2.2 Plásmido de 60 MDa involucrado en la A/E	7
2.3 Fimbria <i>bfp</i>	7
3 <i>Escherichia coli</i> enteroinvasiva (EIEC)	8
3.1 Invasividad	9
3.2 Producción de la enterotoxina	9
4 <i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica (EHEC)	10
4.1 Producción de citotoxinas	10
4.2 Plásmido de 60 MDa involucrado en la síntesis de la hemolisina	11
5. <i>Escherichia coli</i> enteroagregativa (EAEC)	12
5.1 Estimulación de la producción de moco	13
5.2 Adherencia	14
6 <i>Escherichia coli</i> enterodifusa (ADEC)	15

7	Técnicas moleculares de diagnóstico para bacterias	17
8	Ensayos de hibridación	18
9	Variantes del procedimiento de hibridación	21
9.1	Hibridación en fase líquida	21
9.2	Hibridación <i>in situ</i>	21
II	Fundamento de la hibridación en fase sólida "colony blot"	21
III	Planteamiento del problema	23
IV	Objetivos	24
V	Hipótesis	25
VI	Material y método	26
10	Metodología de la hibridación en fase sólida "colony blot"	30
VII	Resultados	33
VIII	Discusión de resultados	50
IX	Conclusiones	63
X	Anexo I	64
XI	Glosario	65
XII	Bibliografía	67

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Representación de los mecanismos de patogenicidad de los diferentes grupos patógenos de <i>Escherichia coli</i>	16
Figura 2.	Diagrama de flujo de la hibridación en fase sólida "colony blot"	29
Figura 3.	Membranas de nylon con cepas de <i>Escherichia coli</i> hibridadas por "colony blot"	34
Figura 4.	Porcentaje de cepas de <i>Escherichia coli</i> patógenas y no patógenas aisladas durante el periodo de noviembre de 1999 a junio del 2000.	35
Figura 5.	Distribución estacional de <i>Escherichia coli</i> patógena en México durante noviembre de 1999 a junio del 2000	36
Figura 6	Distribución del grupo ETEC	38
Figura 7.	Distribución del grupo EIEC	39
Figura 8.	Distribución del grupo EPEC	40
Figura 9.	Distribución del grupo EHEC	41
Figura 10	Distribución de los cuatro grupos patógenos de <i>Escherichia coli</i> en México.	44
Figura 11	Relación entre el sexo y la susceptibilidad a <i>Escherichia coli</i> patógena	49

ABREVIATURAS

- ETEC enterotoxigénica
- EIEC enteroinvasiva
- EPEC enteropatógena
- EHEC. enterohemorrágica
- EAEC: enteroagregativa
- ADEC: enterodifusa
- LT: termolábil
- ST: termoestable
- *bfp*: Pili en forma de rizo (bundle-forming-pilus)
- *ial*: Locus de invasividad
- *hlyA*: Gene de la hemolisina
- cAMP: Adenosin monofosfato cíclico
- cGMP: Guanosin monofosfato cíclico
- CFA Factor de colonización
- A/E Adherencia y esfacelación
- EAF: Factor de adherencia y esfacelación
- SLTX: “Shiga like toxins” o tixina semejante a la producida por *Shigella*
disenteriae
- VTEC. *Escherichia coli* productora de verotoxinas
- SLTEC Shiga like toxin producida por *Escherichia coli*

- SLT. "shiga like toxin"
- SUH: Síndrome Urémico Hemolítico
- PTT. Púrpura Trombocitopénica
- MDa: Megadaltones
- AAF/I Adherent-Agreggative-Fimbrial-I
- AA: Adherencia agregativa
- DA. Adherencia difusa
- OMP Proteína de membrana externa
- DNA. Acido desoxirribonucleico
- RNA. Acido ribonucleico
- PCR. Reacción en cadena de la polimerasa
- ml: mililitros
- μ l: microlitros
- nm nanómetro
- KDa Kilodaltones
- U.V ultravioleta
- SSC Solución salina citratos
- TRIS. Tris-hidroximetil amino metano
- NaCl: Cloruro de sodio
- NBT. Nitro azul de tetrazolio
- BCIP 5-bromo-4-cloro-3-indoil fosfato
- SDS Duodecil sulfato de sodio

RESUMEN.

Actualmente el diagnóstico para *E. coli* y otras bacterias patógenas se está realizando con base a técnicas que estudian los genes o productos de virulencia de cada cepa obteniendo pruebas con resultados específicos. Dichos estudios han permitido mostrar los mecanismos de patogenicidad de cada grupo de *E. coli* causante de diarrea, de los cuales se han descrito seis: enterotoxigénico, enteroinvasivo, enteropatógeno, enterohemorrágico, enterodifuso, enteroagregativo que son considerados potencialmente patógenos en los seres humanos.

El método utilizado para el diagnóstico de los cuatro grupos patógenos de *E. coli* más importantes en México, ETEC, EIEC, EPEC y EHEC fue “colony blot” en fase sólida para cepas aisladas de casos de diarrea

Se hibridaron 4850 cepas de *E. coli* de pacientes de los diferentes Estados de la República Mexicana que reportaron cuadro diarreico durante los meses de noviembre de 1999 a junio del 2000, se inocularon las cepas en una membrana de nylon junto con los testigos de referencia, posteriormente se desnaturalizó el DNA con hidróxido de sodio, quedando la cadena del DNA problema expuesta, se fijó el DNA a la membrana con luz uv, se adicionó la sonda correspondiente de DNA marcada con digoxigenina y así formar una cadena de DNA estable, dándose de esta manera la reacción de hibridación. Por último se reveló la membrana adicionando el sustrato de la enzima que fue una mezcla de NBT-BCIP

Los resultados obtenidos mostraron una prevalencia importante de *E. coli* ya que 3005 cepas resultaron positivas a alguno de los cuatro diferentes grupos patógenos de las 4850 que se hibridaron. El grupo ETEC, fue el más diagnosticado con 2345 cepas y su mayor frecuencia fue en el mes de junio, le siguió el grupo EIEC con 424 cepas, presentó un incremento importante en el mes de marzo, el grupo EPEC con 206 cepas que también tuvo un incremento de casos en el mes de marzo y el grupo EHEC con 30 cepas, siendo noviembre el mes que más casos reportó

Los niños menores de 5 años fueron los más afectados, sin encontrarse relación con el sexo de los pacientes

El estudio epidemiológico sobre los cuatro importantes grupos de *E. coli* como agentes etiológicos de diarreas en la población mexicana mostró que existe un gran número de casos debido a la infección por alguno de estos grupos, principalmente ETEC y por lo tanto debe ser considerado como un verdadero problema de salud pública

I. INTRODUCCION

Las bacterias que causan enfermedades diarreicas pertenecen a una gran familia de bastones gramnegativos, la *Enterobacteriaceae*. La familia *Enterobacteriaceae* incluye miembros de la flora normal del colon así como a otros que resultan patógenos. A esta familia también se le conoce como microorganismos entéricos abarcando gran número de especies que se diferencian sobre la base de sus características metabólicas, de serología y actualmente mediante diagnósticos que identifican genes de virulencia del microorganismo, utilizando para ello sondas de DNA, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y otros métodos moleculares. (1,2)

La *Escherichia coli* es un microorganismo entérico que pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*, es el más abundante en las heces de personas sanas. Siendo un microorganismo anaerobio facultativo que coloniza el tracto gastrointestinal del recién nacido desde las primeras horas de vida. La *E. coli* normalmente permanece confinada al lumen intestinal indefinidamente sin causar daño, sin embargo cuando la persona está inmunodeprimida, débil o bien cuando la bacteria traspasa las barreras gastrointestinales se desarrolla la infección incluso de las bacterias no patógenas. En ocasiones las personas sanas pueden ser susceptibles a infección por uno o varios tipos de *E. coli* que se hayan adaptado y que juntas hayan desarrollado la habilidad de causar enfermedad (2,3)

Los cuadros clínicos asociados a *E. coli* como agente causal son infección del tracto urinario, sepsis, meningitis y la diarrea (2)

En cuanto a su morfología individual la *E. coli* es un bacilo Gram negativo, capsulado, no esporulado, móvil que puede poseer o no flagelos peritricos (2)

La identificación de la de *E. coli* se ha venido realizando mediante su cultivo en el laboratorio de bacteriología, en medios de cultivo que permiten su mejor desarrollo, como agar MacConkey, donde sus colonias son lisas, mucoides, convexas, circulares, brillantes y dan una coloración rosa intenso debido a la fermentación de la lactosa. Mientras que en agar EMB (Eosina y Azul de Metileno), las colonias son violetas con brillo metálico característico de *E. coli* (2,4).

La identificación de la especie *E. coli* por pruebas bioquímicas que determinan su metabolismo muestra que es catalasa positivo, citocromo oxidasa negativo, además reduce los nitratos a nitritos, licúa la gelatina, es indol positivo, rojo de metilo positivo, Voges Proskauer negativo, citrato negativo y ureasa negativo. También acidifica y produce gas a partir de glucosa, maltosa, manitol, lactosa, xilosa, ramnosa y arabinosa (2).

La serología de *E. coli* permite identificar a las diferentes cepas de este microorganismo con base a la presencia de sus tres antígenos, según el sistema Kauffman propuesto en 1944: el antígeno “O” que se encuentra en la pared celular también llamado somático, el “K” o capsular y el “H” que es la proteína flagelar. Hasta ahora se conocen 171 antígenos “O”, 103 antígenos “K” y 56 antígenos “H” (1,2,5)

Actualmente el diagnóstico para *E. coli* y otras bacterias patógenas se está realizando al nivel de genes o a los productos de virulencia de cada cepa obteniendo pruebas con resultados específicos, por otra parte, de acuerdo a su mecanismo de patogenicidad se ha clasificado a la *E. coli* en seis grupos: enterotoxigénica, enteropatógena, enteroinvasiva, enterohemorrágica, enteroagregativa y enterodifusa (2,3,4)

A continuación se mencionan las principales características de cada grupo:

1. *Escherichia coli* enterotoxigénica (ETEC).

La ETEC es una causa común de diarrea en niños que origina deshidratación sobre todo en países en desarrollo y de la “diarrea del viajero” en adultos de países industrializados que viajan a países en desarrollo (1). El agua y alimentos contaminados han sido considerados los vehículos transmisores en la mayoría de los brotes que han afectado tanto a niños como adultos (5).

1.1 Producción de toxinas LT y ST.

Las ETEC pueden sintetizar dos enterotoxinas, la termolábil (LT) y la termoestable (ST). La enterotoxina LT es una proteína de elevado peso molecular (85000 a 87000 Da), constituida por una subunidad A y cinco subunidades B, mientras que la ST está constituida por pequeños polipéptidos de 1900 a 5000 Da. La LT actúa incrementando la concentración de adenosin monofosfato cíclico (cAMP) y la ST aumenta la concentración de guanosin monofosfato (cGMP) en los enterocitos, lo que provoca una fuerte salida de agua y electrolitos al lumen intestinal (3,5)

Para que una ETEC pueda causar diarrea, además de sintetizar enterotoxinas debe poseer un factor de colonización que le permita adherirse y colonizar el epitelio del intestino delgado, evitando con ello la acción del lavado mecánico ejercido por el peristaltismo intestinal (5)

1.2 Factor de colonización.

El factor de colonización es un filamento protéico llamado pili o fimbria y se encuentran en gran cantidad a lo largo de toda la superficie bacteriana. Las fimbrias que pueden ser rígidas o flexibles, constan de unas 1000 subunidades estructurales repetitivas y unas pocas subunidades funcionales, entre las que se encuentran las responsables de la adhesión. Dichos factores han sido llamados CFA/I, CFA/II, CFA/III, CFA/IV, según el serotipo al que pertenecen. (2,4,6)

2. *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC).

La EPEC es una importante causa de diarrea en niños de países en desarrollo y aún causan casos esporádicos y brotes ocasionales de enteritis infantil en países industrializados. Antiguamente sólo se le definía sobre las bases de los serotipos O y H, EPEC es ahora identificada sobre sus características patogénicas. (1,2,)

2.1 Histopatología de la “Adherencia y esfacelación” (A/E)

Lo que marca o caracteriza las infecciones por EPEC es la histopatología de la “adherencia y esfacelación” (A/E), la cual puede ser observada en biopsias intestinales de pacientes y animales infectados que pueden ser reproducidas en cultivo celular (7).

Este fenotipo parece estar caracterizado por la “adherencia” íntima entre la bacteria y la membrana de la célula epitelial de la microvellosidad (8).

El citoesqueleto adquiere cambios marcados, incluyendo la acumulación de actina polimerizada, que se ve directamente por debajo de la bacteria (8,9,10) La bacteria algunas veces se deposita o coloca sobre un “ligero pedestal” o estructura de cáliz (11).

Esta estructura en forma de pedestal o cáliz puede extenderse desde 10µm sobre la estructura epitelial en forma de pseudópodos (11,12) Esta lesión es completamente diferente a la histopatología causada por la ETEC y *V. cholerae*, en las cuales los organismos no se adhieren íntimamente y no se adhieren a las microvellosidades ni polimerizan la actina (13)

Aunque estudios recientes también han reportado esta histopatología Moon et al (9), quien asoció fuertemente este fenotipo con EPEC y le dio el nombre de “adherencia y esfacelación”, que consiste en acortar, desprender o “rasurar” la microvellosidad del enterocito

Así es como las cepas EPEC son el prototipo perfecto de las bacterias entéricas patógenas que producen lesión A/E en las células epiteliales (14), existen múltiples pasos que involucran la producción de la lesión histopatológica A/E característica En 1992 Donnerberg y Kaper (15), propusieron tres pasos en la patogénesis de EPEC i) adherencia localizada, ii) señal de transducción y iii) adherencia íntima

La secuencia de estos eventos es incierta y seguramente, algunos eventos pueden ocurrir conjuntamente Sin embargo estos modelos pueden aportar avances a la investigación de la patogénesis de EPEC

2.2 Plásmido de 60 MDa involucrado en E/A.

La adherencia de EPEC a las células Hep-2, fue descrita primero por Cravioto et al (16), Baldini et al (17), quienes mostraron que las cepas EPEC tienen la habilidad de adherirse y lo hacen mostrando un patrón de adherencia localizado que depende de la presencia de un plásmido de 60 MDa

Este plásmido fue designado para EPEC como factor de adherencia (EAF), y un fragmento de 1-Kb, fue desarrollado para pruebas de DNA como diagnóstico (prueba EAF) (18,19).

2.3 Fimbria *hfp*.

El factor involucrado en la adherencia localizada se reportó en 1991 por Giron et al. (19), quien describió una fimbria de 7 nm de diámetro producida por cepas EPEC la cual tiende a agregarse y formar haces ondulados, por ello recibe el nombre de "bundle-forming-pilus" (*hfp*)

Esta fimbria es producida sólo bajo ciertas condiciones de cultivo.

3. *Escherichia coli* enteroinvasiva (EIEC).

Las cepas EIEC tienen características patógenas, bioquímicas y genéticas relacionadas con *Shigella spp* (20,21), la semejanza de las cepas EIEC con *Shigella spp* es que generalmente en las pruebas bioquímicas resultan ser lisina descarboxilasa negativas, no móviles y lactosa negativo (1)

El grupo EIEC produce una disentería caracterizada por diarrea acuosa con moco y sangre, afecta a adultos principalmente, y los brotes generalmente se dan por alimentos contaminados, es un grupo que se aísla poco como agente causal de diarrea (1,2,5)

En lo que respecta a su mecanismo de patogenicidad, el modelo preciso para describir a las cepas EIEC, no se tiene todavía bien elucidado, sin embargo la patogénesis estudiada para EIEC sugiere factores de patogenicidad que son virtualmente idénticos a los de *Shigella spp* (22,23).

Ambos microorganismos han mostrado al invadir y colonizar el epitelio, un fenotipo regulado por un plásmido y un loci cromosomal denominado *ial*. Además, ambas EIEC y *Shigella spp*, elaboran una o más enterotoxinas secretoras y estas pueden jugar un papel importante en la patogénesis de la diarrea (24)

3.1 Invasividad.

El modelo admitido para la patogénesis de EIEC y *Shigella spp* comprende

Penetración a la célula epitelial, lisis de la vacuola endocítica, multiplicación intracelular, movimiento direccional a través del citoplasma y extensión hacia la célula epitelial adyacente (21,22)

Cuando la infección es severa, esta secuencia de eventos ponen al descubierto una fuerte reacción inflamatoria la cual se manifiesta por una ulceración severa y el blanco o sitio de infección para EIEC y *Shigella* es la mucosa del colon (22,23).

3.2 Producción de la enterotóxina.

Ambas infecciones, tanto por EIEC como por *Shigella* son caracterizadas por un periodo de diarrea acuosa, precedida por evacuaciones con moco y sangre

Nataro, et al (24), clonaron y secuenciaron un plásmido que codifica para una proteína de 63 kDa. El papel de las enterotoxinas no es comprobable, pero su presencia puede ser explicada por la característica diarrea acuosa acompañada por moco y a veces sangre atribuida a EIEC

4. *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC).

Las EHEC son las responsables de diarreas agudas y crónicas en niños, generalmente los brotes provienen de consumir alimentos contaminados (1,2)

El mecanismo de patogenicidad inicia con la adherencia de la bacteria a los enterocitos por medio de sus fimbrias, además producen citotoxinas semejantes a *Shigella dysenteriae* tipo I (SLT) denominadas verotoxinas (25,26)

4.1 Producción de citotoxinas.

Las *E. coli* productoras de verotoxinas han recibido diferentes denominaciones según la bibliografía, *E. coli* verotoxigénicas (VTEC) denominadas así por su capacidad de producir efecto citotóxico *in vitro* en células de riñón de mono verde africano (células Vero), *E. coli* enterohemorrágicas (EHEC), *E. coli* productoras de toxinas semejantes a shiga (SLTEC) y más recientemente se le da la denominación Shiga like toxin (SLTX) (27,28).

Existen dos tipos de verotoxinas, VT1 o SLTXI y diversas variantes de VT2 o SLTII, SLTX2, tales como la VT2vha y la VT2vhb. Si bien la VT2 y sus variantes también son consideradas “shiga like toxins” sus actividades biológicas no son neutralizadas con un antisuero para la toxina shiga (28).

Las verotoxinas están constituidas por una subunidad enzimática A (aproximadamente 33000 Da) y cinco subunidades B (aproximadamente 7500 Da) que fijan la toxina a receptores celulares compuestos por glicolípidos (receptores Gb3 o Gb4). Estas toxinas inhiben síntesis proteica al inactivar catalíticamente la subunidad ribosomal 60S.

Las verotoxinas son liberadas en el intestino y después de absorberse, pasan a la sangre causando lesiones en el endotelio vascular. Inducen una coagulación intravascular local y una acumulación de fibrina en el sistema nervioso central, en el tubo digestivo y en los riñones (26). Todo esto puede conducir a un daño intestinal, renal, cerebral o multisistémico.

Las EHEC pueden provocar en los seres humanos colitis hemorrágica, el síndrome urémico hemolítico (SUH), púrpura trombocitopénica (PTT) diarrea no sanguinolenta e incluso infecciones sintomáticas. La manifestación clínica más común es la colitis hemorrágica, caracterizada por un cuadro severo de dolor abdominal y diarrea sanguinolenta (2,5,26).

4.2 Plásmido de 60 MDa involucrado en la síntesis de la hemolisina.

El plásmido de 60 MDa comunmente encontrado en las cepas EHEC O157:H7 contiene genes que codifican para una hemolisina (27). Esta enterohemolisina está estrechamente relacionada con todas las cepas O157:H7 y distribuida en menor cantidad entre las cepas no O157:H7 productoras de "Shiga like toxins" STX

El gen que codifica para la hemolisina *hlyA*, se expresa generalmente en cepas de *E. coli* patógena que ocasionan daño urémico hemolítico (28,29). El papel de la enterohemolisina esta todavía sujeto a especulación, ya que solo se ha demostrado que lisa a los eritrocitos *in vivo*, reemplaza al grupo “hem” y aumenta su desarrollo utilizando el hierro como fuente nutricional dentro del individuo.

5. *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC).

Las cepas EAEC se han encontrado asociadas a diarreas persistentes (de más de dos semanas de duración) en numerosos países (1,2) La EAEC fue llamada así porque estas cepas se adhieren a las células Hep-2 o HeLa en un patrón de adherencia agregativo, alineadas en filas paralelas y de manera inespecífica se adhieren en la célula y al vidrio (30) Las cepas EAEC no secretan enterotoxinas LT o ST (31)

Las diferencias en la patogenicidad de las EAEC en humanos ha sido confirmada en estudios con voluntarios en distintos brotes (31,32,33)

La patogénesis de la infección por EAEC no está del todo estudiada y se ha propuesto la presencia de una lesión histopatológica característica, además de diferentes candidatos como factores de virulencia (34)

5.1 Estimulación de la producción de moco.

Un indicio importante de la patogénesis de EAEC ha sido la examinación histopatológica de pacientes infectados y modelos animales. Las cepas de EAEC se caracterizan por estimular una gran cantidad de moco intestinal, el cual atrapa a las bacterias formando una película fina de moco y bacterias (33,34).

Tzipori; et al, (35), inoculó una serie de cepas de EAEC, en cerdos, algunos de estos animales no experimentaron diarrea, sin embargo todos los animales probados desarrollaron un inusual moco gelatinoso fuertemente adherido al intestino delgado. Una minuciosa examinación de este moco reveló la presencia de numerosos paquetes de bacterias agregadas.

La habilidad de EAEC de “envolverse” de moco ha sido demostrada *in vitro*, ya que voluntarios a los que se les han administrado cepas de EAEC han desarrollado diarrea y es predominante la presencia de mucosidad (33,36)

La formación característica de la biopelícula de moco, proporciona evidencias que sugieren que la infección de la EAEC va acompañada por efecto citotóxico en la mucosa intestinal (36)

Vial, et al (36), fueron los primeros en mostrar la infección por cepas de EAEC en asa ligada de conejo y rata en donde observaron una lesión demostrable en el microscopio de luz.

La lesión fue caracterizada por acortamiento de vellosidades, la necrosis hemorrágica en el extremo de la vellosidad y una leve inflamación responsable del edema y la infiltración mononuclear a la submucosa

La destrucción de la mucosa ha sido demostrada en autopsias de intestino de pacientes que han muerto por diarrea persistente provocada por EAEC

5.2 Adherencia.

El fenotipo adherencia agregativa (AA) de las cepas EAEC ha sido estudiado en detalle, Nataro et al, han identificado una estructura flexible “bundle-forming-fimbrial” de 2 a 3 nm de diámetro que denominó “Adherent-Agreggative-Fimbrial-I” (AAF/I) (37).

La AAF/I facilita la adherencia a las células Hep-2 y la hemaglutinación en los enterocitos humanos con cepas del serotipo O17H2. Los genes para AAF/I están organizados en dos grupos separados. El grupo I contiene un conjunto de genes que sintetizan y ensamblan la fimbria, incluyendo la unidad estructural para la misma fimbria (38)

La región o grupo II codifica un activador transcripcional de AAF/I, expresión que muestra homología entre el DNA de miembros de la familia de estas proteínas (39)

6. *Escherichia coli* enterodifusa (ADEC).

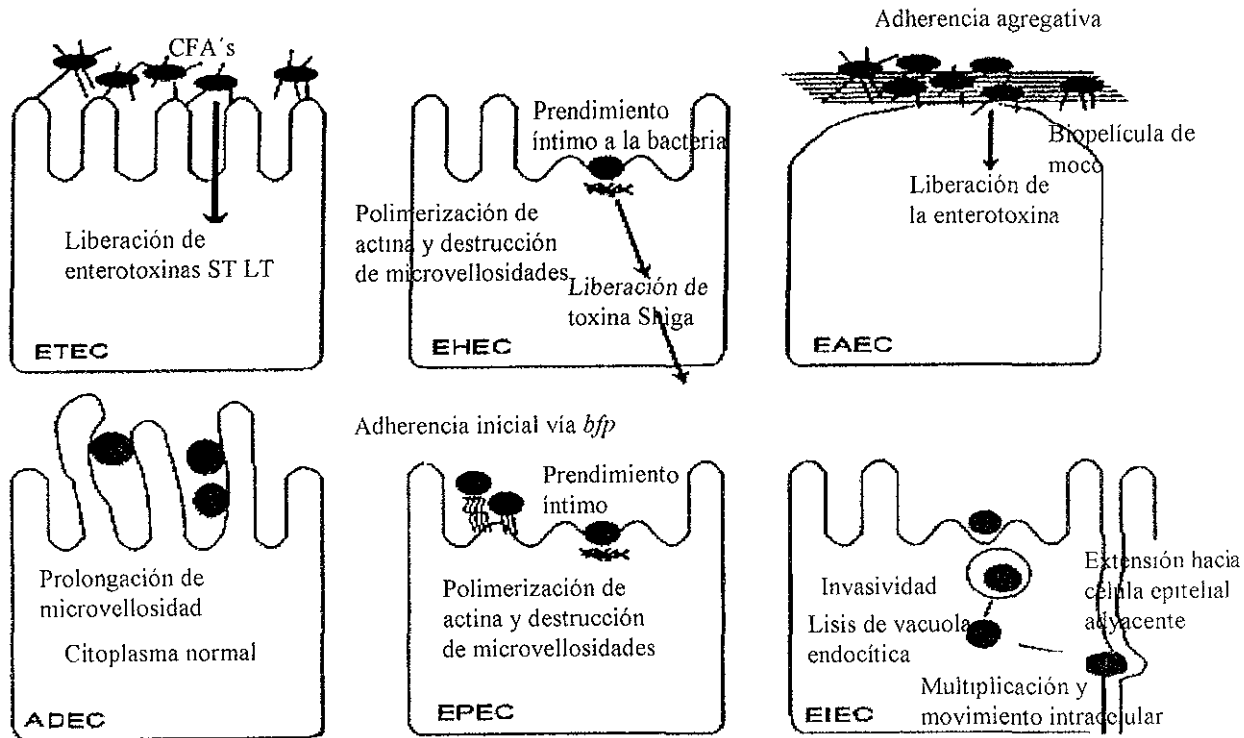
El término "*E. coli* enteroadherente difusa" fue inicialmente usado para referirse a algunas cepas de *E. coli* que se adhieren a las células Hep-2, las cuales no formaban microcolonias semejantes a EPEC (2) Se da entonces el descubrimiento de ADEC como un grupo independiente y potencialmente patógeno causante de diarrea (40).

Son poco conocidos los factores de patogenicidad de ADEC diarrogénica Bilge et al (40), han descrito la clonación y caracterización de los genes que codifican para la fimbria de esta cepa, cuyo fenotipo es adherencia difusa (DA) Los genes encontrados en esta fimbria son designados F1845 los cuales se pueden encontrar en el genoma de las bacterias o en un plásmido (41,42)

Benz et al (42) describieron una proteína de membrana externa (OMP) de 100 kDa la cual está asociada con el fenotipo DA en cepas del serotipo O126 H27

Yamamoto y Cookson (44), mostraron que estas cepas son capaces de inducir proyecciones semejantes a un dedo, en células Caco. Estas proyecciones aparentemente atrapan a la bacteria, le proveen protección contra la gentamicina, pero sin penetrar o traspasar las microvellosidades (43,44)

En la figura 1 se indican los mecanismos de patogenicidad propuestos para los seis diferentes grupos de *E. coli*.



Fuente Nataro J P and J B Kaper 1998 Clin Microbiol Rev. 11:142-201

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

7. Técnicas moleculares de diagnóstico para bacterias

Algunas de las técnicas moleculares pueden emplearse para identificar al agente causal de la infección, aún antes de que el cultivo bacteriológico haya reportado el aislamiento del microorganismo patógeno. Sin embargo, las metodologías moleculares nunca van a sustituir al cultivo bacteriano, ya que la obtención de un microorganismo vivo nos permite estudiarlo cuidadosamente en cuanto a sus características genéticas como la expresión de factores de patogenicidad por ejemplo adhesinas, enterotoxinas, hemolisinas y hemaglutininas, sobre todo en el campo de la investigación. Aunque si hay metodologías moleculares que no dependen del aislamiento del microorganismo para ser válidas, es decir, para ellas el cultivo no es una prueba confirmatoria, esto es, porque son pruebas capaces de evidenciar la presencia de un patógeno aún cuando ya no sea viable y no pueda ser aislado en el cultivo microbiano, por tal razón es muy importante que el análisis contenga los testigos adecuados, ya que estos son los únicos que pueden dar validez a este diagnóstico.

En la actualidad se acepta la utilización de técnicas moleculares en el campo de la epidemiología, a lo que se ha denominado epidemiología molecular (45).

Las técnicas de biología molecular permiten la identificación más que de los microorganismos las de sus características a nivel genético, siendo posible poner de manifiesto la presencia de un fragmento de DNA que contenga el mensaje de una subunidad para alguna toxina, o también la presencia de fragmentos de genes de resistencia a algunos medicamentos.

Ya que estas metodologías se basan en la característica de homología y complementariedad que hay entre las cadenas del DNA de los ácidos nucleicos. La molécula de DNA de doble cadena se puede desnaturalizar y separar en cadenas sencillas por calentamiento o por adición de sustancias químicas como el hidróxido de sodio y luego se renaturaliza bajo condiciones adecuadas (45,46)

Las pruebas de biología molecular empleadas para estudios a nivel genético, se pueden clasificar en dos grupos que son:

- 1 Los ensayos de hibridación
- 2 Las metodologías que involucran la amplificación de secuencias nucleotídicas

8. Ensayos de hibridación

La hibridación es la unión de dos cadenas individuales complementarias de ácido nucleico de diferente origen, una de las cuales es de secuencia conocida y es previamente marcada, a la que se le denomina sonda, mientras que la otra es la cadena problema y se unen para formar una molécula de doble cadena estable (46). Se pueden unir las secuencias complementarias de cadenas de DNA-DNA, RNA-RNA y de DNA-RNA.

Las cadenas cuyas secuencias de bases son complementarias se unen entre sí, semejando el cierre de una cremallera y como tales permanecen unidas. La estabilidad de la hibridación depende de la homología entre la secuencia nucleotídica de las cadenas y las condiciones de la hibridación (46).

Para fines diagnósticos la hibridación se efectúa entre el DNA blanco o molde que se encuentra en la muestra y un fragmento de DNA de secuencia conocida, al que ya conocemos como **sonda** (46).

En la hibridación el primer paso es a partir de cadenas dobles de DNA blanco que se desnaturalizan para poder trabajar con cadenas sencillas (46).

La cadena sencilla por su parte es capaz de reasociarse con otra cadena de DNA o bien con un RNA de secuencia complementaria y así formar un híbrido.

Son cuatro los componentes de la hibridación para completar la reacción: la sonda, el sitio blanco que está contenido en la muestra problema, la molécula reportera y el método de hibridación (45).

Las sondas empleadas para el diagnóstico de *E. coli* causante de diarrea, previamente son evaluadas con respecto a sensibilidad y especificidad empleando modelos de experimentación en asa ligada y en cultivo celular como se muestra en la tabla 1.

Tabla 1. Pruebas de referencia y estándares de oro para demostrar el mecanismo de patogenicidad de los cuatro diferentes grupos de *Escherichia coli* patógena.

Grupo	Mecanismos de patogenicidad	Pruebas más comunes
ETEC	Enterotoxinas LT y ST	Asa ligada de conejo, prueba de factor de permeabilidad, ensayo en cultivo de tejidos (CHO* Y1**), ELISA, hibridación de DNA con sondas moleculares.
EIEC	Invasividad	Pruebas invasividad de cultivos celulares (HeLa***, Hep-2****), prueba de Sereny positiva (queratoconjuntivitis en cobayos o conejos), hibridación del DNA.
EPEC	Adherencia	Pruebas de adherencia en cultivos celulares (HeLa, Hep-2), hibridación de DNA
EHEC	Citotoxinas SLT1 y SLTII (VT1y VT2)	Efecto citotóxico sobre cultivos celulares (HeLa, Vero), hibridación de DNA

*CHO. Células de ovario de hámster chino

**Y1: Células de tumor adrenal

***HeLa. Células de carcinoma de cérvix.

****Hep-2 Células de carcinoma laríngeo

Fuente: Eslava C, J Villaseca, A Cravioto Cepas de *Escherichia coli* relacionadas con diarrea. Diagnóstico de laboratorio de infecciones gastrointestinales Giono C S, A Escobar , J. L. Valdespino (ed) México InDRE SSA 1994 pp 254

9. Variantes del procedimiento de hibridación

9.1 Hibridación en fase líquida.

Es la llamada Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), que consiste en un procedimiento rápido para la amplificación enzimática *in vitro* de un segmento específico de DNA (47) Tanto el DNA a identificar como los iniciadores o “primers” se encuentran libres y en movimiento aumentando la probabilidad de que las secuencias complementarias se alinien y se unan, tiene la ventaja de que aquí la hibridación es de 5 a 10 veces más rápida que en la fase sólida (48)

9.2 Hibridación *in situ*.

La hibridación *in situ* se realiza en tejidos fijados con formalina e incluidos en parafina. Esta técnica es útil principalmente en microorganismos patógenos intracelulares como los virus, además de que se puede observar simultáneamente la citopatología en el tejido, con la presencia del agente infeccioso detectado con una sonda específica marcada con la peroxidasa o fosfatasa alcalina (49).

II. Fundamento de la hibridación en fase sólida "colony blot"

La hibridación en fase sólida "colony blot", se fundamenta en la unión de dos cadenas individuales homólogas y complementarias de ácido nucleico de diferente origen que se unen para formar una molécula de doble cadena estable, que permanecen unidas, sobre una membrana de nylon o nitrocelulosa que sirve como soporte sólido.

A una cadena se le llama molde o blanco y está en la muestra y la otra cadena se le llama sonda y es de secuencia conocida. La muestra es la fuente de ácido nucleico por analizarse y puede ser una suspensión de un organismo desconocido (cepa pura para confirmación del cultivo) o una muestra clínica como materia fecal o hisopo rectal (45,46)

El ácido nucleico en la muestra es referido como el DNA o RNA blanco, y la sonda marcada, cuya marca puede ser radiactiva (con un radioisótopo) o no radiactiva (una enzima, digoxigenina o biotina) y es lo que se conoce como molécula reportera (46)

En el diagnóstico, las herramientas de biología molecular se pueden emplear con fines epidemiológicos, como es el caso de la técnica de hibridación en fase sólida "colony blot", la cual es altamente sensible y específica por lo que fue utilizada con efectividad para determinar los cuatro principales grupos patógenos de *E. coli* causantes de diarrea en México

III. Planteamiento del problema

La finalidad de haber utilizado la técnica de hibridación en fase sólida “colony blot” en el presente estudio fue para obtener información epidemiológica confiable sobre los cuatro principales grupos patógenos de *E. coli* en algunos Estados de la República Mexicana, la cual no existe, así como también conocer el mecanismo de patogenicidad de cada uno de los grupos patógenos diagnosticados, ETEC, EIEC, EPEC y EHEC, relacionar el conjunto de signos y síntomas de los pacientes con cada grupo diagnosticado, determinar de acuerdo a la edad quienes son más vulnerables y a que grupo patógeno, relacionar si hay más susceptibilidad del sexo femenino o masculino a la infección por *E. coli* patógena y hacer un balance de la distribución estacional en México

Por lo que se propone que es necesario realizar estudios de diagnóstico como la hibridación en fase sólida “colony blot”, que ayuden a conocer y reafirmar la importancia de *E. coli* como agente causal de diarreas en nuestro país ya que en México no existe información epidemiológica de sus cuatro principales grupos patógenos

IV. Objetivos

GENERAL

- Determinar el grupo patógeno al que pertenecen las cepas de *E. coli* aisladas de casos de diarrea en México por medio de la hibridación en fase sólida "colony blot"

PARTICULARES

- Caracterizar cepas aisladas de *E. coli* utilizando la técnica de hibridación en fase sólida "colony blot"
- Relacionar los grupos ETEC, EPEC, EIEC y EHEC, con los casos de diarrea por *E. coli* reportados en la República Mexicana con fines epidemiológicos
- Determinar la distribución estacional y etárea de cada grupo patógeno
- Conocer la relación entre cuadro clínico y grupo patógeno
- Estudiar la relación entre sexo y la susceptibilidad a *E. coli* en la población mexicana .

V. Hipótesis

Si se utilizan sondas de DNA provenientes de genes de virulencia específicos para cada uno de los cuatro grupos patógenos de *E. coli* ETEC, EIEC, EPEC y EHEC, en el diagnóstico por hibridación en fase sólida “colony blot” de las cepas aisladas, es posible establecer la relación como agente etiológico a uno de los cuatro grupos patógenos de *E. coli* con los episodios de diarrea, así como también obtener información sobre el cuadro clínico y si existe vínculo entre sexo y susceptibilidad a *E. coli* en la población mexicana

VI. MATERIAL Y METODO

Material biológico

Se estudiaron 4850 cepas de *Escherichia coli* aisladas de casos de diarrea en 22 Estados de la República Mexicana

Material

- Placas de BAB (base agar sangre)
- Soportes de cuadrícula enumeradas
- Asas bacteriológicas
- Mechero Fischer
- Membranas de nylon "Millipore"
- Pinzas de disección
- Papel filtro
- Recipientes de vidrio o refractarios
- Bolsas chicas de plástico (al tamaño aproximado de la membrana)
- Pipetas desechables estériles de 2, 5 y 10 ml
- Cajas de petri
- Vasos de precipitados de 500 ml
- Matraces erlenmeyer de 100, 250 y 500 ml
- Probetas de 10, 50, 100, 500 y 1000 ml
- Espátula

- Charolas de plástico para pesar
- Gasas
- Tijeras
- Lápiz
- Guantes de látex desechable
- Micropipeta de 100 μ l

Equipo

- Estufa de incubación a 37°C, “Thelco Model 6”
- Baño maría a 65°C, “Blue M”
- Parrilla de agitación y calentamiento, “Corning”
- Balanza analítica digital, “Chyo Balance”
- Horno de luz ultravioleta, “Bio-Rad 6s Gene LinkerTM”
- Agitador eléctrico de movimientos oscilatorios y temperatura graduables, “Lab-Line Orbit Environ-Shake”

Reactivos y soluciones

Para lisar las colonias y obtener el DNA

- Hidróxido de sodio al 0.5 N
- TRIS pH 8 al 1 M
- Solución TRIS pH 8 al 1 M-NaCl 1.5 M
- SSC 2X

Para la hibridación del DNA y revelado de la membrana

- Solución de prehibridación
- Sondas de DNA: LT, ST, *ial*, Bfp y *hlyA*, marcadas con digoxigenina
- Solución de lavado
- Buffer A
- Buffer B
- Buffer B + antidigoxigenina (anticuerpo conjugado a peroxidasa)
- Buffer C
- Buffer C + Nitro Azul de Tetrazolio (NBT) + 5-bromol-4-cloro-3-indol fosfato (BCIP)

Para sanitizar áreas y desactivar desechos

- Solución de etanol-benzal (1:1)
- Solución de hipoclorito de sodio al 13%

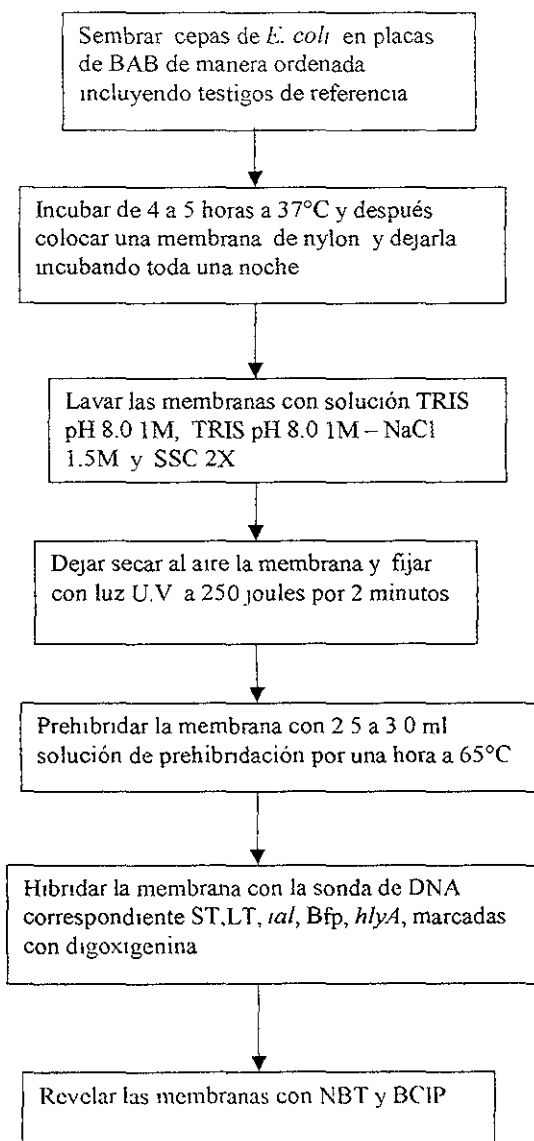


Figura 2. Diagrama de flujo de la hibridación en fase sólida "colony blot".

10. Metodología de la hibridación en fase sólida "colony blot"

El diagrama de la figura 2 resume la metodología que se describe a continuación

Se sembraron las cepas por quintuplicado sobre placas de agar base sangre siguiendo una cuadrícula para sembrar 100 cepas en cada placa de manera ordenada incluyendo a las cinco cepas de referencia

Se incubaron las placas de 4 a 6 horas a 37°C

Sobre la superficie de cada una de las placas se colocó una membrana de nylon "Millipore"

Se dejaron incubando toda una noche a 37°C

Se retiraron las membranas de las placas y se colocaron sobre papel filtro saturado con NaOH 0.5 N, para romper bacterias

Las membranas reposaron 15 minutos sobre el papel filtro con NaOH con las colonias hacia arriba

Posteriormente se transfirieron las membranas a papel filtro saturado con solución TRIS 1 M pH 8 y se dejaron 10 minutos, para neutralizar el pH

Se transfirieron las membranas a papel filtro con una solución TRIS 1M pH 8 y NaCl 1.5 M por 10 minutos

Las membranas se enjuagaron en solución SSC 2X

Las membranas se dejaron secar a temperatura ambiente

El DNA después se fijó a la membrana con luz UV a 250 joules por 2 minutos

Las membranas se colocaron en bolsitas de plástico y se les adicionó 5 ml de solución de prehibridación y se dejaron incubar a 65°C por una hora en baño de agua

La solución de prehibridación se desechó de cada una de las membranas

Se adicionó 2.5 ml de líquido de prehibridación con cada una de las sondas de DNA marcada con digoxigenina a la membrana correspondiente y se dejaron hibridar toda la noche a 65°C en baño de agua

Al día siguiente se prepararon 300 ml de solución de lavado manteniéndola a 65°C hasta su uso

Se retiraron las sondas de DNA de cada membrana y se guardaron para su reuso

Se colocaron las membranas por separado, con el DNA hacia arriba, en recipientes de plástico y se enjuagaron con 20 ml de solución de lavado

Se desechó la solución de lavado y se le adicionaron otros 20 ml a cada membrana y se incubaron a 65°C por 15 minutos

Se desechó la solución de lavado de cada membrana y se repitió el paso anterior

Después se agregaron 20 ml a cada membrana de buffer A y se agitaron por 1 minuto

Se transfirió cada membrana a 20 ml de buffer B y se colocó en agitación por 30 minutos

Las membranas se colocaron en 10 ml de buffer B con 1.5 µl de anticuerpo (antidigoxigenina), conjugado a fosfatasa alcalina y se dejaron incubar por 30 minutos a temperatura ambiente y en agitación

Pasado este tiempo cada membrana se lavó dos veces con 20 ml de buffer A y en agitación durante 15 minutos

Se enjuagó cada membrana con 20 ml de buffer C y en agitación de 1 minuto

Cada membrana se colocó en 10 ml de buffer C y se adicionaron los reactivos para revelar la hibridación: 45µl de NBT y 35µl de BCIP, que fueron el sustrato de la enzima

Las membranas se dejaron incubando en un lugar oscuro y a temperatura ambiente hasta la aparición de color negro

Las membranas después se enjuagaron con 20 ml de buffer C y se dejaron secar a temperatura ambiente

Las membranas ya secas se guardaron en bolsas de plástico para su posterior interpretación.

Los resultados se registraron en la libreta de control.

VII. RESULTADOS

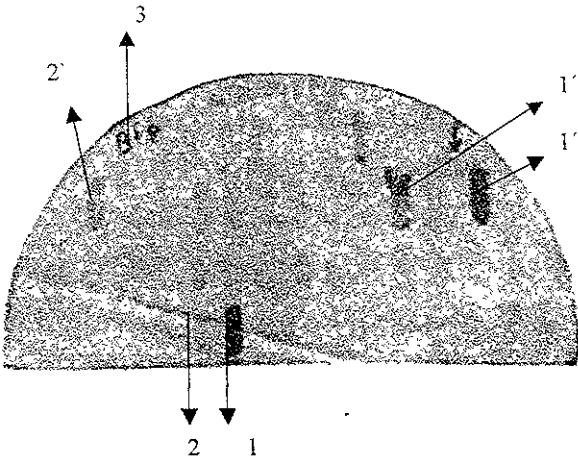
Se estudiaron 4850 cepas de *E. coli* aisladas de pacientes con diarrea provenientes de 22 Estados de la República Mexicana durante el periodo de noviembre de 1999 a junio del 2000

La figura 3 muestra la membrana de nylon sometida a hibridación en fase sólida "colony blot".

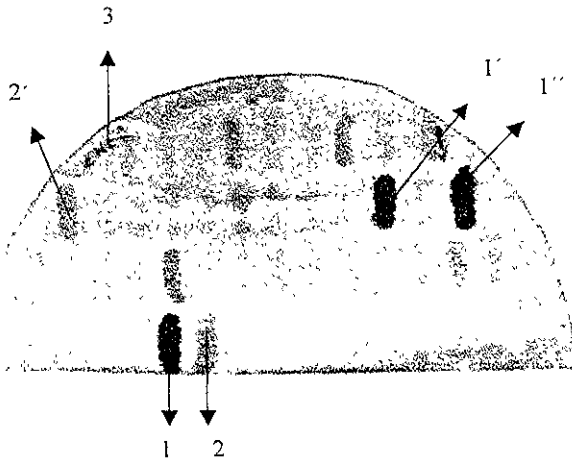
El análisis estadístico se realizó para determinar la importancia de cada grupo patógeno de *E. coli* en la población mexicana. En la figura 4 se puede observar que el porcentaje de distribución de las cepas que resultaron positivas a alguno de los grupos patógenos fue del 62% (3005 cepas), siendo ETEC el más importante y el menos frecuente EHEC y las que no resultaron patógenas fueron el 38% (1845 cepas)

En México se cuenta con poca información epidemiológica que indique la distribución estacional de *E. coli* como agente patógeno, motivo por el cual con los resultados obtenidos se construyó la gráfica de la figura 5 y la tabla 2, que muestran que el grupo ETEC fue el más importante. La figura 6 indica que ETEC estuvo presente de manera importante en el mes de junio, en tanto que los grupos EIEC y EPEC le siguieron en importancia y con un ligero incremento de casos en el mes de marzo como indican las figuras 7 y 8, mientras que el grupo con menos casos fue EHEC cuyo incremento de muestras fue en el mes de noviembre lo cual se observa en la figura 9

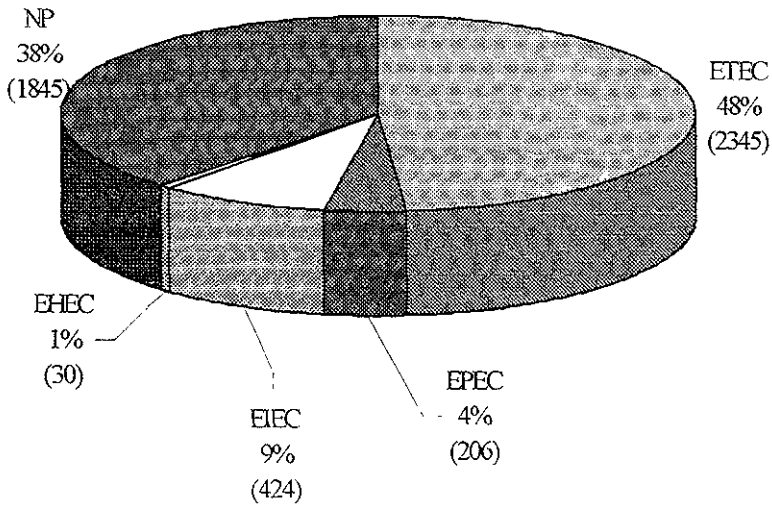
12. Membranas con cepas de *Escherichia coli* sometidas a la técnica hibridación en fase sólida "colony blot".



- 1 Control positivo para la cepas de *E. coli* enteropatógenas EPEC
- 2 Control negativo
3. Señal que indica que la membrana fue hibrida con sonda *bfp* para el grupo EPEC
- 1' *E. coli* positiva al grupo EPEC.
- 1'' *E. coli* positiva al grupo EPEC.
- 2' *E. coli* negativa



1. Control positivo para las cepas de *E. coli* enterohemorrágicas EHEC.
- 2 Control negativo
3. Señal que indica que membrana fue hibridada con sonda *hlyA* para el grupo EHEC
- 1' *E. coli* positiva al grupo EHEC
- 1'' *E. coli* positiva al grupo EHEC.
- 2' *E. coli* negativa



NP= No patógena

Figura 4. Porcentaje de cepas de *Escherichia coli* patógenas y patógenas aisladas durante el periodo de noviembre de 1999 a junio del 2000.

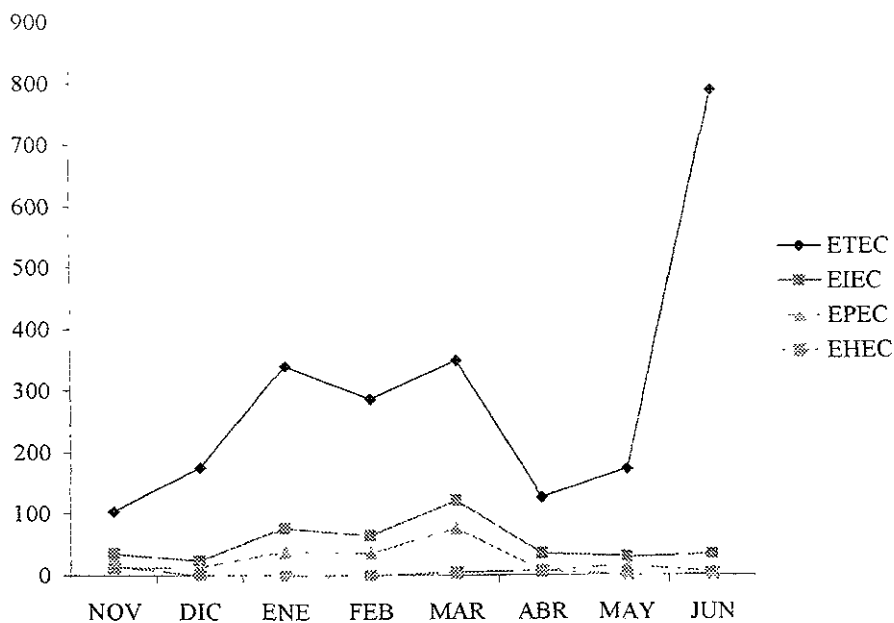


Figura 5. Distribución estacional de *Escherichia coli* patógena en México durante noviembre de 1999 a junio del 2000.

Tabla 2. Distribución estacional del total de cepas obtenidas de *Escherichia coli* en México durante noviembre de 1999 a junio del 2000.

MES/GPO	ETEC	EPEC	EIEC	EHEC	NP	TOTAL
NOV	104	12	35	16	98	265
DIC	175	13	25	0	199	412
ENE	341	39	77	0	260	717
FEB	287	37	65	0	151	540
MAR	350	76	122	5	222	775
ABR	126	7	35	7	168	343
MAY	173	16	31	0	184	404
JUN	789	6	34	2	563	1394
TOTAL	2345	206	424	30	1845	4850

NP = No patógena

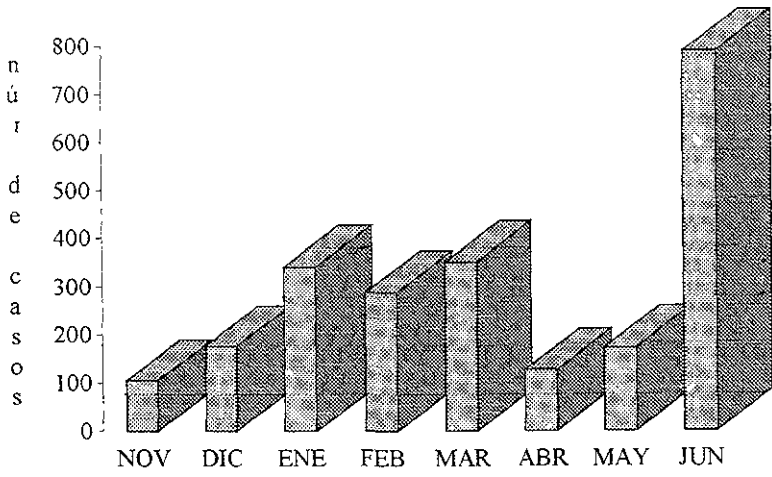


Figura 6. Distribución del grupo ETEC durante el periodo de noviembre de 1999 a junio del 2000.

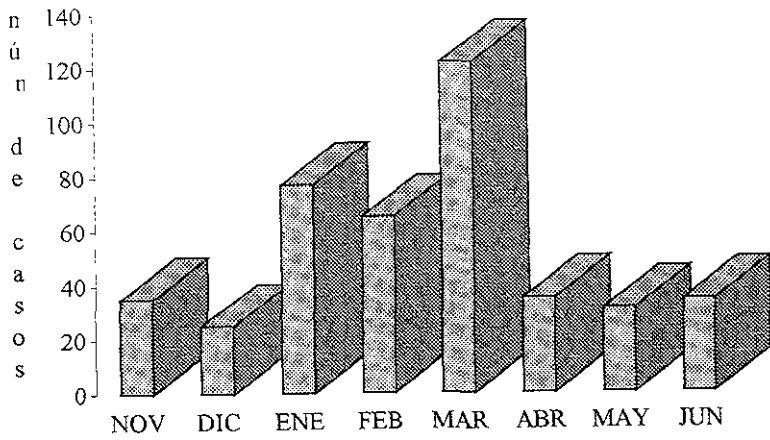


Figura 7. Distribución del grupo EIEC durante el periodo de noviembre de 1999 a junio del 2000.

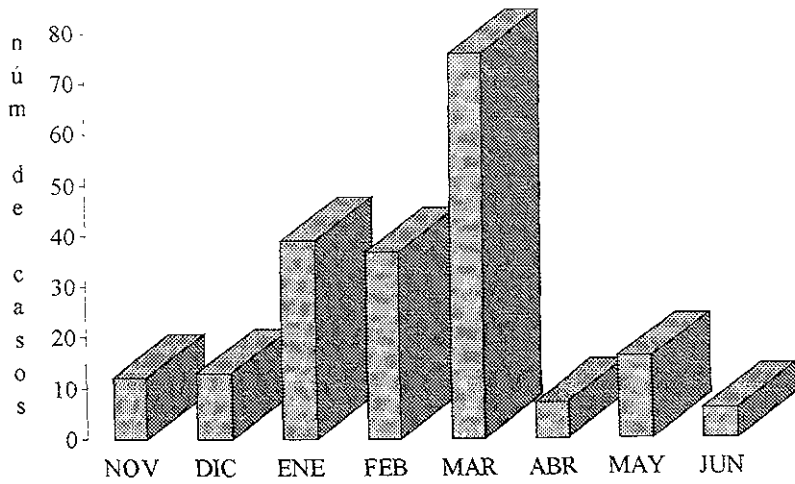


Figura 8. Distribución del grupo EPEC durante el periodo de noviembre de 1999 a junio del 2000.

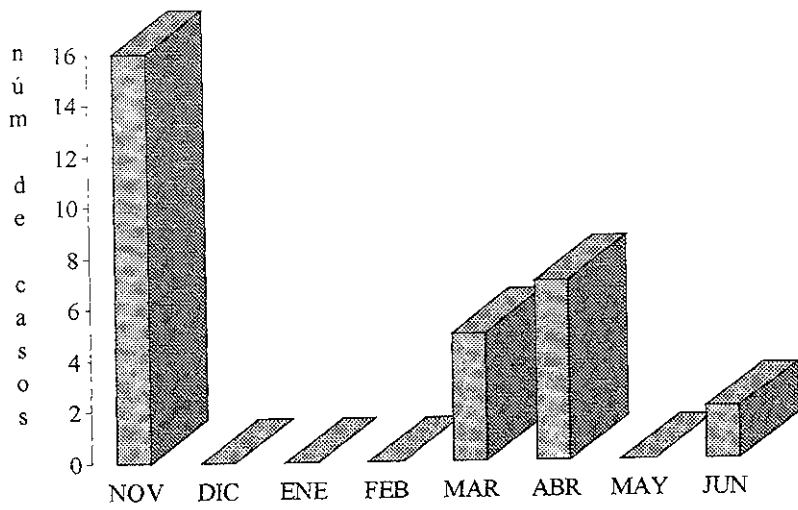


Figura 9. Distribución del grupo EHEC durante el periodo de noviembre de 1999 a junio del 2000.

La frecuencia de casos de diarrea por grupo se presenta en la tabla 2. en la cual se observa que en orden de importancia ETEC fue el grupo más frecuente con 2345 casos y EHEC el que causó sólo 30 casos. Cabe aclarar que a las 30 cepas que hibridaron para EHEC se les realizó serología para saber si correspondían al grupo O157 y resultaron negativas a la serología. Esto indica que en México hay cepas EHEC no O157 H7

Por lo que respecta al panorama general en los Estados de la República Mexicana en la tabla 3 se muestran las cifras y grupo de las cepas que resultaron patógenas, así como la entidad federativa de la que provenían. El mapa de México de la figura 10 ilustra la distribución de los grupos patógenos indicando que hay Estados que tienen los 4 grupos patógenos básicamente en la zona del Golfo de México, en el DF y Michoacán. Los Estados en los que se diagnosticó tres grupos patógenos ETEC, EIEC y EPEC, fueron del norte de la República como BCS, Chihuahua, del sur del país Chiapas, en el centro, Estado de México y Tlaxcala. También hubo Estados en los que sólo se diagnosticaron cepas para EIEC y EPEC como en el caso de Nayarit y Sonora y donde sólo hubo cepas para EIEC y EPEC, fue en Nuevo León.

Además hubo Estados en los que solo se encontró un grupo patógeno, ETEC como en Jalisco, Querétaro, Oaxaca y Morelos, en tanto que en San Luis Potosí solo se diagnosticaron casos de diarrea causada por EIEC.

Tabla 3. Casos de diarrea causados por *Escherichia coli* patógena por entidad federativa en México.

EDO/GPO	ETEC	EIEC	EPEC	EHEC	TOTAL
BCS	14	1	1	0	16
CAMP	32	3	5	1	41
CHIH	12	1	1	0	14
CHIS	23	3	1	0	27
DF	117	32	18	1	168
HIDALGO	1140	263	133	21	1557
JALISCO	455	0	0	0	455
MEX EDO	125	4	2	0	131
MICHOAC	3	39	19	2	63
MOREL	12	0	0	0	12
NAYAR	92	2	0	0	94
NVOLEON	0	12	5	0	17
OAXACA	5	0	0	0	5
QUERET	1	0	0	0	1
SLP	0	1	0	0	1
SONORA	1	1	0	0	2
TABASCO	25	5	5	1	36
TLAXCALA	134	32	7	0	173
VERACR	154	25	9	4	192
TOTAL	2345	424	206	30	3005

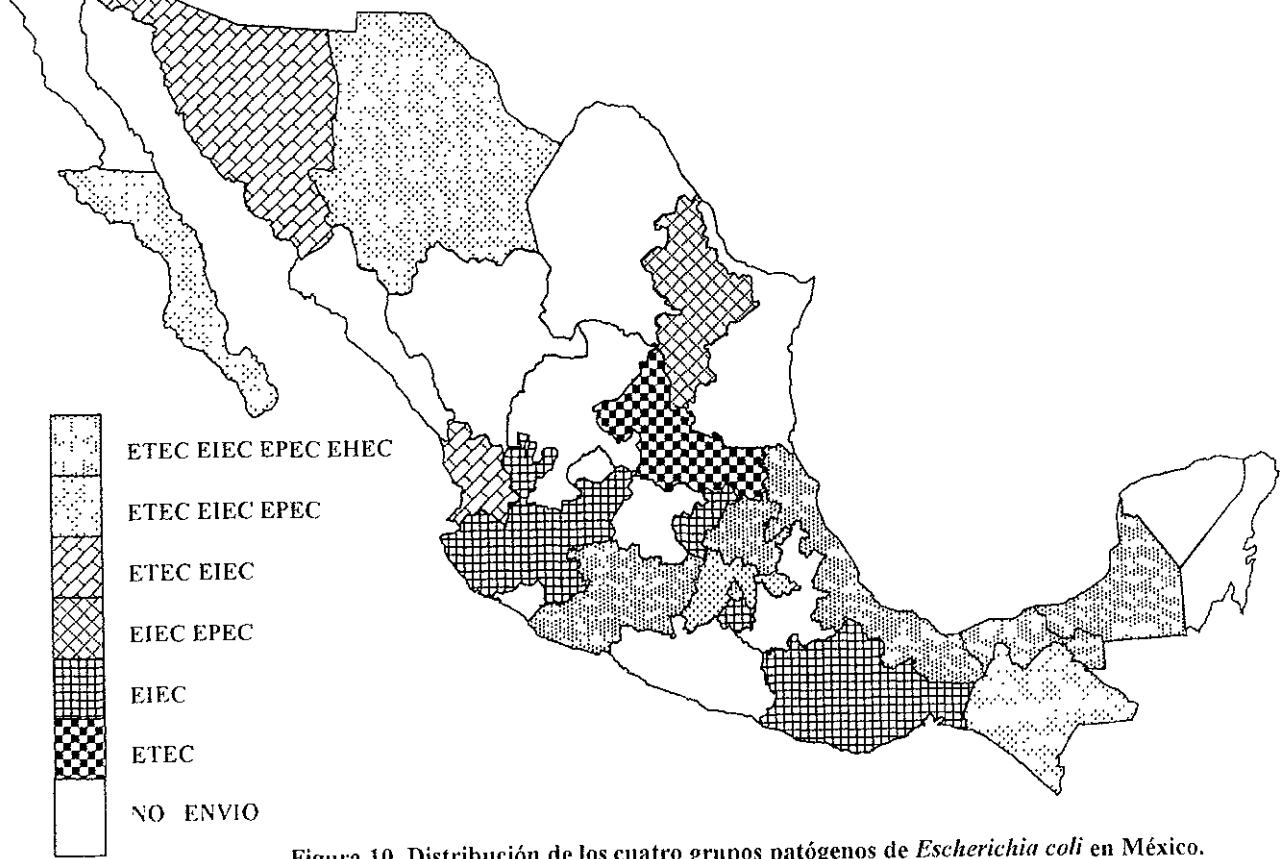


Figura 10. Distribución de los cuatro grupos patógenos de *Escherichia coli* en México.

Los Estados que participaron activamente y enviaron al InDRE un número considerable de muestras fueron Hidalgo, Tabasco y Veracruz

Diez Estados no enviaron cepas al InDRE razón por la que se desconoce que grupos patógenos están presentes

De acuerdo a la edad de los pacientes diagnosticados la cual se muestra en la tabla 4 se pudo observar que los niños menores de 1 año fueron los mas afectados, por los 4 grupos patógenos, ya que un número importante de los casos pertenecieron a esta edad, principalmente el grupo ETEC, también se observó que de solo 30 casos diagnosticados como EHEC en todo el estudio, 12 fueron en niños de 0-1 año.

Siguiendo con los niños de 2 a 5 años que también mostraron ser importantes candidatos a los cuatro grupos patógenos De los 6 años en adelante se agruparon las edades en intervalos de 10 en 10 años de edad hasta los 85 años mostrando la tendencia a ser mayor el número de casos del grupo ETEC, seguido por EIEC, que también reportó cifras importantes sobre todo de los 6-15 años

En lo que respecta al cuadro clínico, con la información obtenida de los pacientes durante los episodios de diarrea se construyó la tabla 5, donde se aprecia que en el grupo ETEC los síntomas más frecuentes fueron la diarrea, vómito y deshidratación En los grupos EIEC y EHEC la diarrea con sangre no fue con la frecuencia que se esperaba El grupo EHEC principalmente causó diarrea mientras que en EPEC la diarrea se presentó con vómito sólo en 19 de 206 casos y en EIEC la diarrea no presentó moco

Tabla 4. Distribución etárea de los casos diagnosticados de *Escherichia coli* patógena en México durante noviembre de 1999 a junio del 2000.

EDAD/GPO	ETEC	EIEC	EPEC	EHEC	NP	TOTAL
0-1	817	155	88	12	632	1704
2	174	52	13	2	174	415
3	126	20	12	0	86	244
4	68	14	7	1	92	182
5	87	9	5	0	55	156
6 a 15	272	48	19	3	206	548
16 a 25	156	29	7	2	113	307
26 a 35	178	22	8	3	111	322
36 a 45	131	16	14	2	102	265
46 a 55	82	14	9	2	60	167
56 a 65	37	6	7	1	40	91
66 a 75	48	7	5	0	26	86
76 a 85	17	0	5	1	18	41
85 a más	152	32	7	1	130	322
TOTAL	2345	424	206	30	1845	4850

NP = No patógena

Tabla 5. Relación de los cuadros clínicos durante los episodios de diarrea por *Escherichia coli* patógena y no patógena en los pacientes diagnosticados durante los meses de noviembre de 1999 a junio del 2000.

GRUPO	D/S	DIARREA	VOMITO	PIEBRE	DESHIDRATAACION
EIEC	7	2338	71	6	60
EIEC	5	419	17	0	7
EPEC	1	205	19	2	1
EHEC	0	30	1	0	0
NP	5	1840	48	9	28
TOTAL	18	4832	156	17	96

D/S = Diarrea con sangre

NP= No patógena

La figura 11 señala que en cuanto al sexo la distribución de casos de diarrea es homogénea, sólo es ligeramente mayor en el sexo femenino en los casos debidos a EHEC.

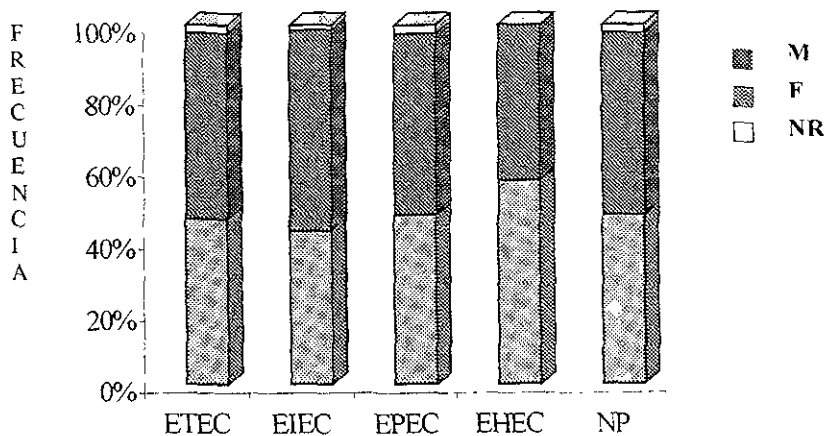


Figura 11. Relación entre el sexo y la susceptibilidad a *Escherichia coli* patógena en la población estudiada.

NR= No reportado

NP= No patógena

M= Masculino

F= Femenino

VIII. DISCUSION DE RESULTADOS

La importancia de diagnosticar adecuadamente las enfermedades diarreicas en una población radica en que en la mayoría de los casos el agente etiológico es muy fácil de transmitir propiciando que se desencadene un brote, también porque a veces resulta ser resistente a los medicamentos más comunes y lo más grave es que es causante de un alto índice de mortalidad sin que en su momento, se logre identificar adecuadamente al agente etiológico en muchos de los casos, como lo reportan Schaechter et al, Muhldorfer et al y Blanco et al en sus estudios (1,4,5).

Las técnicas de diagnóstico molecular nos dan resultados específicos del agente etiológico, el tiempo para conocer el resultado es mucho menor que con las técnicas microbiológicas convencionales aislando al microorganismo en medios de cultivo, pruebas bioquímicas que suelen en ocasiones ser inespecíficas. La serología tiene sus desventajas también, ya que debe obtener al microorganismo aislado y puro, además de que muchas veces sirve sólo como apoyo al diagnóstico.

Por lo tanto desde que se desarrollaron las técnicas de diagnóstico molecular, se pueden obtener resultados específicos, ya que por medio de los fragmentos de DNA de los microorganismos se desarrollaron las llamadas sondas, para formar híbridos con las muestras problema que correspondan, Figueroa et al (45)

Existen varias metodologías para identificar microorganismos por medio de biología molecular, en este caso se utilizó la hibridación en fase sólida "colony blot", para colonias de *E. coli* aisladas. Se utilizaron las sondas específicas para cada grupo, ST y LT para ETEC, *iat* para EIEC, *bfp* para EPEC y *hlyA* para EHEC, al igual que las que utilizan algunos investigadores de enfermedades diarreicas causadas por *E. coli* patógena, Nataro, Kaper (2)

Cada una de estas sondas contiene los genes involucrados en la patogenicidad que caracteriza a cada grupo y que ha sido secuenciado para el diagnóstico de *E. coli* patógena y cuatro de sus principales grupos según los reportes de, Nataro y Kaper (2)

En México se vienen realizando los diagnósticos de algunas enfermedades infecciosas por medio de técnicas de biología molecular, desde 1997, sin embargo no existen registros oficiales de los casos diagnosticados, a pesar de que en países como Estados Unidos desde el 1992 se vienen registrando casos de diarrea por ETEC de personas que viajan a nuestro país y contraen la infección, según los datos reportados de estudios realizados por Figueroa et al y Zhi- Dong et al (45,50).

En el presente estudio en orden de importancia, resultó ser ETEC el grupo más diagnosticado, con una incidencia de 48%, datos de estudios realizados por Albert et al , Flores et al y Hoque et al (51,52,53), muestran que el porcentaje de casos endémicos por ETEC varía de 10 a 30% que principalmente abarca a la población infantil, en tanto que en niños de edad escolar y en adultos, la incidencia es baja quizá porque por lo general la infección es asintomática, Mangia et al y Tornieprth et al (54,55).

En comparación con los resultados obtenidos de los 22 Estados de la República Mexicana la edad más afectada fue la de 0-1 año de edad con 817 casos de los 2345 para ETEC, seguido de 368 casos de niños entre 2 y 4 años y los pacientes de edad escolar que generalmente son de los 5 a 15 años presentó 359 casos, siendo por lo tanto los niños de 0-1 año los más afectados

El promedio de aislamiento reportado para ETEC es del 42% de los casos en América Latina, el 16% en Asia y el 36% en Africa, utilizando las técnicas de hibridación para su diagnóstico, según Abdul et al y Schultsz (56,57), dato que se confirma que en México también es el grupo que ocasiona más cuadros diarreicos con un 48% de casos en la población mexicana.

Así como alrededor del mundo, ETEC se encuentra más en zonas marginadas, existen reportes de mayor frecuencia de casos en zonas con condiciones higiénicas bajas como es el caso de la zonas rurales, Nataro et al (2)

En México la mayoría de los casos se dieron en zonas o Estados donde las condiciones ambientales favorecen la infección, como muestra la tabla 2, Hidalgo, Jalisco, Tlaxcala, Veracruz y Estado de México que presentaron el mayor número de casos en el orden de importancia. El otro caso fue un desastre natural el que dió las condiciones propicias para que se desencadenara el brote diarreico, como fue el caso de Chalco que en el mes junio por las fuertes lluvias se inundó la zona y el vehículo de infección fueron las aguas negras estancadas, dando como resultado un número elevado de casos de diarrea por ETEC como se puede apreciar en la gráfica de la figura 6

Nataro et al y Zhi-Dong et al (2,50) mencionan que ETEC es el grupo más diagnosticado principalmente en países en desarrollo y en personas de países desarrollados que adquieren la infección al visitar zonas o países endémicos, donde los brotes de diarrea por este agente etiológico son muy comunes

El grupo ETEC presenta un mecanismo de patogenicidad que le permite infectar fácilmente al ser humano, así como causarle enfermedad, sobre todo a personas inmunosuprimidas, niños de 0 hasta 5 o 6 años como lo reporta Nataro et al (2), sin embargo personas adultas sanas también suelen ser ideales para que algunos de estos grupos patógenos provoque diarrea

ETEC fue de los primeros grupos en los que se estudió bien su mecanismo de patogenicidad y la inmunidad que causa al exponerse la persona a cepas ETEC, ocasionando gran interés para la elaboración de vacunas para prevenir la infección, y por supuesto el diagnóstico rápido, Levine et al (58).

Ya está definido que sólo por medio de la producción de toxinas LT (termolábil) y ST (termoestable) y diferentes factores de colonización ETEC puede provocar diarrea, mecanismo de patogenicidad estudiado por Nataro et al y Moseley et al (2, 3), dando como

resultado que en poco tiempo haya una fuerte salida de agua y electrolitos y por supuesto que el paciente se deshidrate de manera importante, como muestran los resultados de la tabla 5 que indica los síntomas que predominaron durante el cuadro diarreico y en este caso fue la deshidratación con 60 casos.

En el diagnóstico de ETEC las cepas tienen la característica de producir más la toxina ST en la mayoría de los casos endémicos, datos referidos por Albert et al y Flores et al (51,52). Lo cual concuerda con los resultados obtenidos de las cepas aisladas en el InDRE

El cuadro clínico que se manifestó generalmente fue diarrea, el vómito en sólo 71 casos, deshidratación en 60, fiebre en 6 casos y en 7 diarrea con sangre, cabe hacer mención que este tipo de información no resulta suficiente para apoyar al diagnóstico, ya que sería conveniente realizar las encuestas de manera que se obtenga la mayor información real sobre el cuadro diarreico en el paciente y ésta sea aplicada en toda la República Mexicana, aunque no todas las personas reaccionen igual a la infección.

El estudio de la relación entre sexo y susceptibilidad a *E. coli* patógena en la población mexicana nos mostró que es igualmente importante en los dos ya que resultó ser muy homogéneo. La comparación de este factor no está reportado en la bibliografía al parecer se considera que por igual puede afectar a mujeres como a hombres como lo describen los resultados obtenidos.

El grupo EIEC resultó ser el segundo en importancia para este estudio con 9% de los casos en el periodo de noviembre de 1999 a junio del 2000.

Estudios epidemiológicos sobre EIEC han mostrado que se dan brotes en personas que han consumido alimentos o agua contaminados en lugares o zonas delimitadas como por ejemplo restaurantes o banquetes, Nataro y Kaper (2), reportaron un brote de un restaurante en Texas enfermaron de diarrea 370 personas adultas

En el caso de los 22 Estados de la República Mexicana se puede apreciar que los brotes están distribuidos en 18 Estados, concentrando el mayor número de casos en Hidalgo, pero esto es porque éste Estado fue el que mayor número de cepas envió al InDRE durante los 8 meses estudiados

Nataro y Kaper (2) reportan una incidencia alta en adultos en la mayoría de los casos, sin embargo es un dato que difiere con los resultados obtenidos y presentados en la tabla 3, que de 424 casos diagnosticados 155 fueron en pacientes de 0-1 año, mientras que de 6-15 años reportaron 48 casos, siguiendo los pacientes de 85 años o más con 32 casos, lo cual nos dice que en México el grupo EIEC por orden de importancia atacó más a infantes de 0-1 año de edad seguido por los de 2 años y por último a los de 6-15 años, en el periodo de noviembre de 1999 a junio del 2000

La distribución del grupo EIEC en los 18 Estados de la República Mexicana posiblemente es debida, a lo ya mencionado, falta de higiene y hábitos en la población, principalmente la rural, en cuanto a la edad mas afectada difiere a lo que determinan Nataro y Kaper (2), en estudios sobre epidemiología de estas enfermedades infecciosas, suele ocurrir que, como la mayoría de las infecciones son transmisibles de persona a persona, alimentos o agua contaminada, no se descarta la posibilidad de que estos pacientes hayan adquirido la infección por alguna de estas vías.

La importancia de diagnosticar adecuadamente al grupo EIEC como agente causal de diarrea es por que su mecanismo de patogenicidad es similar al de *Shigella sp.* Parsot y Nataro (22,24) investigaron que ambos microorganismos tienen el fenotipo que causa enfermedad la invasividad del epitelio y la producción de una enterotoxina que provoca diarrea acuosa acompañada de moco y a veces sangrado, indicio que nos muestra el daño

que pueden causar estos microorganismos, por lo que el diagnóstico adecuado permitirá en algún momento dar el tratamiento adecuado y reestablecer la salud del paciente

Sin embargo las cepas aisladas en el presente estudio no refieren estos signos, contrario a lo reportado por Nataro y Kaper (2) el cuadro clínico reportado por los pacientes que presentaron diarrea por EIEC advierte que de las 424 cepas aisladas solo 5 presentaron diarrea con sangre y ninguna refirió la presencia de moco, estos reportes concuerdan que en países en desarrollo los casos de diarrea por EIEC pueden ser semejantes a ETEC, Nataro y Seritawa (24).

Otra posibilidad pudiera ser que quizá el dato no haya sido proporcionado por los pacientes, ya que es indicio importante de los signos en episodios de diarrea para el apoyo en el diagnóstico de EIEC, según su mecanismo de patogenicidad

Los resultados obtenidos de la distribución en los diferentes Estados de la República Mexicana, sin duda Hidalgo fue el que más casos de diarrea presentó por EIEC, seguido por Michoacán, Tlaxcala, el DF y Veracruz, siendo los Estados con un número importante de casos, mientras que en los otros Estados se puede determinar que se presentaron brotes aislados de diarrea por este agente etiológico

Por lo que respecta a la susceptibilidad a este grupo la población estudiada resultó ser homogénea al igual que en ETEC con un ligero incremento de casos en el sexo masculino.

El siguiente grupo en importancia fue EPEC, aunque se aisló en mucho menor proporción que ETEC y EIEC, con un 4% mostró ser un agente causal importante de diarrea en niños de 0, 1, 2 y 3 años y de 6-15 años, lo que concuerda con los estudios epidemiológicos realizados por Levine y Edelman (58) muchos países muestran un panorama con el 17-20% de casos principalmente en niños de 2 años a los cuales se les realiza el diagnóstico directamente de la materia fecal, resultando positivos al serotipo EPEC. Numerosos casos control han sido estudiados, por Nataro y Kaper (2) en los seis continentes encontrando a EPEC como el más frecuentemente aislado en infantes con diarrea

EPEC provoca el tipo de enteritis infantil que ocasiona daños graves al intestino debido a que posee un mecanismo de patogenicidad que le permite adherirse a las microvellosidades para causar una lesión histopatológica la cual puede ser observada en biopsias de intestino, en necropsias de animales infectados y en cultivo celular donde se puede apreciar la adherencia localizada de las bacterias por medio del factor *bfp*, cuyo gene fue secuenciado como resultado de las investigaciones de Donnenberg et al, Cravioto et al y Baldini et al (15,16,17) para la obtención de la sonda en el diagnóstico del grupo patógeno EPEC

De su distribución en los 22 Estados reportados se halló el mayor número de casos en el Estado de Hidalgo con 133 casos, siendo en todo el estudio el Estado que más cepas refirieron al InDRE, después Michoacán con 19, DF con 18 y otros Estados se puede decir que su aislamiento fue ocasional pero estuvo presente en la mayoría de las entidades estudiadas

Dado que se le clasifica como una enteritis infantil el mayor número de casos se diagnosticó a la edad de 0-1 año con 88 casos de los 206 aislados, 37 casos entre los 2 y 5 años de edad, hablamos de que 125 cepas de 206 (60%), correspondientes a EPEC están distribuidas en la población infantil de 0-5 años, quiere decir que fue muy frecuente el grupo EPEC en niños menores al igual como lo reportan Nataro et al y Levine et al (2, 58)

El cuadro clínico que predominó en este grupo fue la diarrea acompañada con vomito en 19 casos, la diarrea con sangre no fue importante.

La susceptibilidad a EPEC fue más homogénea que en los grupos ETEC, EIEC, ya que tanto el sexo femenino como masculino mostraron ser susceptibles de igual manera a diarrea por EPEC, representado en la figura 11

Al grupo EHEC se le responsabiliza de provocar el tipo de diarrea aguda y crónica en niños, principalmente cuando han consumido alimentos contaminados, Nataro y Kaper (2)

EHEC fue el grupo que menos casos presentó en el periodo estudiado, lo cual coincide con los datos de un estudio realizado sobre un brote de diarrea sanguinolenta reportado en los EU por Jonson (59), involucró a 5 pacientes con infección por EHEC de 234 diagnosticados y que el 20-25% de los casos que presentan el cuadro grave más común, Síndrome Urémico Hemolítico (SUH), resultaron ser causados por EHEC no O157 H7, en otros países como Chile, Argentina, y Australia, Goldwater et al, Ojeda et al y Louie et al (60,61,62) registraron que el mayor número de casos de SUH por cepas EHEC no O157 H7 son también aisladas de pacientes con diarrea no sanguinolenta

Un estudio en Bélgica realizado por Pierad et al (63), diagnosticó un porcentaje del 62% de cepas de *E. coli* no O157 H7 aisladas a partir de pacientes con diarrea no sanguinolenta comparado con un 32% que resultaron ser O157 H7

Dichos estudios muestran la similitud con los resultados obtenidos, ya que de las 30 cepas EHEC que se aislaron, ninguna presentó diarrea sanguinolenta, tampoco se tuvo el dato que fueran cepas provenientes de pacientes con SUH además resultaron negativas a la serotipificación lo quiere decir que el 100% fueron cepas no O157 H7

Por lo tanto el hecho de que no se hayan reportado pacientes con diarrea sanguinolenta no es coincidencia ya que la serología nos confirmó que fueron cepas que no provocaron daño hemolítico

La mayoría de los casos de diarrea por EHEC se manifestó en niños de 0-1 año, ya que de las 30 cepas, 12 se presentaron a esta edad, mostrando que al igual que en los otros grupos diagnosticados los mejores candidatos a enfermar de diarrea por alguno de los grupos patógenos de *E. coli* fueron los menores de 0-5 años

La susceptibilidad al grupo EHEC fue ligeramente elevada en el sexo femenino, mostrada en la figura 11, no hay reportes de que éste sexo sea mas vulnerable a EHEC

Por lo tanto los resultados obtenidos en el presente trabajo tienen la finalidad de mostrar interés en este tipo de infecciones que por mucho son consideradas de tercer mundo, ya que en la mayoría de las investigaciones y reportes epidemiológicos, se habla de las enfermedades de primer mundo, como diabetes, hipertensión, enfermedades del corazón y los distintos tipos de cáncer, enfermedades virales como el VIH, por mencionar algunas, las cuales también se están incrementando de manera importante en países en desarrollo como México, mientras que la enfermedades infecciosas como la diarrea por *E. coli* patógena se están quedando relegadas o bien solo se están realizando estudios a nivel investigación

IX. CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos del presente estudio se puede apreciar que *E. coli* y sus cuatro principales grupos patógenos, ETEC, EIEC, EPEC y EHEC son agentes etiológicos causantes de un importante número de cuadros diarreicos en la población mexicana

En cuanto a la técnica de biología molecular “colony blot” se puede decir que permitió determinar el grupo patógeno en las cepas de *E. coli* causantes de diarrea. De los cuales ETEC fue el grupo más importante en el diagnóstico, principalmente en el mes de junio, mientras que EIEC fue el segundo en importancia con una frecuencia alta en el mes de marzo

EPEC presentó un número de casos que lo sitúan en el tercer lugar en importancia, siendo el mes de marzo en el que más casos de aislaron, por último para el grupo EHEC se reportaron 30 cepas y noviembre fue el mes en el que más casos se diagnosticaron

El cuadro clínico más frecuente asociado a *E. coli* fue la diarrea y en ningún grupo hubo asociación directa con un cuadro clínico en particular.

En lo que respecta al grupo de edad más afectado a la infección por *E. coli* patógena fueron los menores de 1 año de edad

Por último, la infección por *E. coli* estuvo distribuida de manera homogénea entre hombres y mujeres

X. ANEXO I

Soluciones para colony blot

1 Solución de prehibridación

SSC 5X

Reactivo bloqueador 1%

N-laurilsarcosina 0.1%

SDS 0.02%

2 Solución de lavado

SSC 1X

SDS 0.1%

3 Buffer A

TRIS 100 mM pH 7.5

NaCl 150 mM

4 Buffer B

Solución A

Leche descremada 5%

5 Buffer C

TRIS 100 mM pH 9.5

NaCl 100 mM

MgCl₂ 50 mM

XI. GLOSARIO

- Adhesinas: pili o fimbrias involucradas en la adherencia
- Anticuerpo: proteínas que produce el sistema inmunológico cuando hay presencia de algún agente extraño al cuerpo
- Antígeno: sustancia que estimula la respuesta inmune
- Células Caco: células de intestino de perro
- Células Hep-2 o Hela: células de carcinoma
- Citoesqueleto: estructura que le confiere rigidez a la célula
- Clonar: introducir un gene o un fragmento de gene en una bacteria
- Desnaturalizar: separar la doble hélice de DNA o RNA utilizando medios físicos y químicos como el incremento de la temperatura o adición de hidróxido de sodio.
- Disenteria: enfermedad que produce una diarrea acuosa con moco y sangre
- Edema: acumulación de líquido.
- Enterocitos: células del intestino
- Enterotoxinas: toxinas que producen las bacterias y cuya acción se efectúa en el aparato digestivo
- Factor de colonización: proteínas que ayudan a la bacteria a colonizar el intestino y causar daño
- Fenotipo: característica notable en las bacterias conferida por los genes de virulencia
- Fimbria: estructura protéica de 7nm de diámetro que se encuentra en gran cantidad a lo largo de la bacteria
- Flagelos peritricos: flagelos alrededor de la bacteria
- Genes: fragmentos de DNA con información específica
- Hemaglutininas: proteínas que aglutinan a los eritrocitos
- Hemolisina: enzima que lisa los eritrocitos
- Hibridación: unión de dos cadenas de DNA o RNA de diferente origen pero que presentan homología

- Homología se habla de homología entre dos cadenas de DNA o RNA cuando tienen en común pares de bases o nucleótidos de su información genética
- Lisis ruptura
- Loci conjunto de genes que codifican para una proteína o algunas enzimas
- Microvellosidad. estructura microscópica que forma parte de la mucosa del intestino
- Peristaltismo: movimiento del intestino para ejercer el lavado intestinal
- Pili. filamento proteico que se encuentra a lo largo de la superficie bacteriana, también llamado fimbria.
- Plásmido: material genético extracromosomal
- Prehibridación: tratamiento previo que se le da a la superficie sólida en donde está adherido el DNA o RNA, que se va a diagnosticar, con DNA o de esperma de salmón o timo de cabra, en solución, para evitar uniones inespecíficas durante la hibridación
- Primers o iniciadores. secuencias específicas de nucleótidos
- Pseudopodo prolongación o saliente
- Renaturalizar. formar nuevamente estructuras de doble cadena
- Secuenciar determinar la composición de bases puricas y pirimídicas que forman parte de un segmento de DNA
- Sonda: fragmento de DNA o RNA de secuencia conocida.
- Termolábil: que no es estable a altas temperaturas.
- Termoestable: que es estable a altas temperaturas
- Verotoxina. toxina que ocasiona daño a las células Vero

XII. BIBLIOGRAFÍA

- 1 Schaechter M y G Medoff MICROBIOLOGIA Mecanismos de las enfermedades infecciosas. 2ª. Argentina Medica Panamericana 1994 272-283
- 2 Nataro J P and J B Kaper 1998 Diarrheagenic *Escherichia coli*. Clin Microbiol Rev. 11: 142-201.
- 3 Moseley S, I Huq A So M Alim, M Samapur-Motalebi and S Falkow. 1980 Detection of enterotoxigenic *Escherichia coli* by DNA colony hybridization J Infect Dis 142 892-898.
- 4 Muhldorfer I. and J. Hacker 1994. Genetic aspects of *Escherichia coli* virulence. Microbiol Pathogen. 16 171-181
5. Blanco J.E, M. Blanco and J Blanco. 1995 *Escherichia coli* enterotoxigenicas, verotoxigenicas y necrotoxigenicas en alimentos y en muestras clínicas. Papel de los animales como reservorio de cepas patógenas para el hombre Microbiología 11 97-110.
- 6 Chao K, L and L. A Dreyfus. 1997 Interaction of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin B with cultured human intestinal epithelial cells. Infect Immun 63:3209-3217
- 7 Jerse A. E, J.Yu, B. D. Tall and J. B. Kaper 1990. A genetic locus of enteropathogenic *Escherichia coli* necessary for the production of attaching and effacing lesions on tissue culture cells. Acad Sci USA 87.7839-7843
- 8 Knutton S M, M. Baldini, J B Kaper and S. Mc Neish 1987 Role of plasmid-encoded adherence factors in adhesion of enteropathogenic *Escherichia coli* to Hep-2 cells. Infect Immun. 55 78-85.
9. Moon H. W, S C Whipp, R A Argenzio, M.M Levine and R A Giannella 1983 Attaching and effacing activities of rabbit a human enteropathogenic *Escherichia coli* in pig and rabbit intestines. Infect Immun 41.1340-1351.
10. Staley T E W Jones and L D. Corley. 1969. Attachment and penetration of *Escherichia coli* into intestinal epithelium of the ileum in new bor pigs. Amb Journal Pathology. 56. 371-392

- 11 Taylor C. J, R M Hort, C Batt McDougall and L McLean 1986 Ultrastructural and biochemical changes in human jejunal mucosa associated with enteropathogenic *Escherichia coli* O. 111 Infect J. Pediat Gastroenterol Nut. 5. 70-73
- 12 Tzipori S, M. Robins-Browne, G Gonis, J. Hayes, Withers and E McCarthy 1985. Enteropathogenic *Escherichia coli* enteritis: evaluation of gnotobiotic piglet human infection. Gut 26 570-578.
13. Andrade J.R, V F Da Veiga, M. R. De Santa Rosa, I Suassuna 1989. An endocytic process in Hep-2 cells induced by enteropathogenic *Escherichia coli*. J Med Microbiol. 28: 49-57
14. Ulshem M. H and J.L Rollo 1980. Pathogenesis of *Escherichia coli* gastroenteritis in man-another mechanism N. Engl. J Medical 302.99-101.
15. Donnenberg M. S and J. B. Kaper. 1992 Enteropathogenic *Escherichia coli*. Infect Immun 60: 3953-3961
16. Cravioto A R, R J Gross, M. Scotland and B. Rowe. 1979. An adhesive factor found in strains of *Escherichia coli* belonging to the traditional infantile enteropathogenic serotypes Curr Microbiol 3. 95-99.
17. Baldini M. M, J. P Nataro and J. B Kaper. 1986 Localization of a determinant for Hep-2 cells adherence by enteropathogenic *Escherichia coli* Infect Immun. 52: 334-336
18. Nataro J P, M. M Baldini, J. B. Kaper, R. E. Blanck, N. Bravo and M. M Levine 1985. Detection of an adherence factor of enteropathogenic *Escherichia coli* with a DNA probe. J Infect Dis 152 560-565
19. Giron J. A, Y A S Ho and G. K Shoolnik 1991 An inducible bundle-forming-pilus of enteropathogenic *Escherichia coli* Science 254:710-713.
- 20 Brenner D J, G R. Fanning, G V Miklos and A. G. Stergerwalt 1973 Polynucleotide sequence relatedness among *Shigella* species Infect J Syst Bacteriology 23 1-7
- 21 Goldberg M B and P J Sansonetti 1993 *Shigella* subversion of the cellular cytoskeleton. a strategy for epithelial colonization Infect Immun 61. 4941-4946

22. Parsot C and P J Sansonetti. Invasion and the pathogenesis of *Shigella* infections. *Curr Top Microbiol.* **209**: 25-42
23. Sansonetti P J. Molecular and cellular biology of *Shigella flexneri* invasiveness: from cell assay systems to shigellosis. *Curr Top Microbiol Immun* **180**: 1-19
24. Nataro J. P., J Seriwatana, A Fasano, D R. Maneval, L D Guers, F Noriega. 1995. Identification and cloning of a novel plasmid-encoded enterotoxin of enteroinvasive *Escherichia coli* and *Shigella* strains. *Infect Immun* **63** 4721-4728
25. Elliot E, Z. Li, C Bell, D Stiel, A Buret, J Wallace, I Brzuszczyk and E O'Loughlin. 1994. Modulation of host response to *Escherichia coli* O157:H7 infection by anti CD18 antibody in rabbits. *Gastroenterol* **106**. 1554-1561
26. Griffin P. M. 1995. *Escherichia coli* O157:H7 and other enterohemorrhagic *Escherichia coli*. Infections of the gastrointestinal tract. Raven Press New York 739-761.
27. Schmidt H, L. Beutin and H. Karch. 1995. Molecular analysis of the plasmid-encoded hemolysin of *Escherichia coli* O157 H7 strain EDL 933. *Infect Immun* **63**:1055-1061
28. Bauer M. E. and R. A. Welch. 1996. Characterization of an RTX toxin from enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 H7. *Infect. Immun.* **64** 167-175
29. Schmidt H and H. Karch. 1996. Enterohemolytic phenotypes and genotypes of shiga like toxin-producing of *Escherichia coli* O111 strains from patients with diarrhea and hemolytic uremic syndrome. *J Clin Microbiol* **34**.2364-2367
30. Scaletsky I. C. A. M. L. M. Silva and L. R. Trabulsi. 1984. Distinctive patterns of adherence of enteropathogenic *Escherichia coli* to HeLa cells. *Infect Immun* **45** 534-536
31. Eslava C, J Villaseca, R Morales, A. Navarro and A Cravioto. 1993. Identification of a protein with toxic activity produced by enteroaggregative *Escherichia coli*. *American Society for Microbiology Washington D. C.* pp 44
32. Mathewson J. J., P. C. Johnson and H. L. DuPont. 1986. Pathogenicity of the enteroadherent *Escherichia coli* in adult volunteers. *J Infect Dis* **154** 524-527

- 33 Nataro J P, D Yikang, S Cookson, A Cravioto, S J Savarino, L D Guers, M M Levine and C O Tacket 1995 Heterogenicity of enteroaggregative *Escherichia coli* virulence demonstrated in volunteers J Infect Dis. 171 465-468
- 34 Smith H R, S M Scotland, G. A. Willshaw, B Rowe, A. Cravioto and C Eslava. 1994 Isolates of *Escherichia coli* 044 H18 of diverse origin are enteroaggregative J Infect Dis 170 1610-1613
- 35 Tzipori S, J Montanario, R M. Robins-Browne, P. A. Vial, R. Gibson and M. M. Levine 1992 Studies with enteroaggregative *Escherichia coli* in the gnotobiotic piglet gastroenteritis model. Infect Immun. 60: 5302-5306
- 36 Vial P A, R. M. Robins-Browne, H Lior, V Prado, J. B. Kaper, J. P. Nataro, D Maneval. A. Eslayed and M. M Levine. 1988 Characterization of enteroadherent-aggregative *Escherichia coli* a putative agent of diarrheal disease. J Infect Dis. 158: 70-79
- 37 Nataro J. P., Y. Deng, D R Maneval, A L German, W. C Martin and M M Levine 1992. Aggregative adherence fimbriae I of enteroaggregative *Escherichia coli* mediate adherence to Hep-2 cells and hemagglutination of human erythrocytes. Infect Immun 60: 2297-2304
38. Nataro J. P., D Yikang and K. Walker. 1994 Agg r a transcriptional activator of aggregative adherence fibrial I expression in enteroaggregative *Escherichia coli* J Bacteriol. 176: 4691-4699
39. Bilge S S, Jr J M Apostol, M A Aldape and S L Moseley 1993. mRNA processing independent of Rnase III and RNase E in the expression of the F 1845 fimbrial adhesin of *Escherichia coli* Proc Natl Acad Sci USA 90. 1455-1454
- 40 Bilge S. S, Jr J M Apostol, K. J Fullner K and S. L. Moseley 1993. Transcriptional organization of the F1845 fimbrial adhesion determinant of *Escherichia coli* 7 993-1006.
- 41 Bilge S. S, C R Clausen, W Lau and S. L. Moseley 1989 Molecular characterization of a fimbria adhesin F1845 mediating diffuse adherence of diarrhea-associated *Escherichia coli* to Hep-2 cells. J Bacteriol 171:4281-4289
42. Benz I and M A Schmidt 1992 AIDA 1 the adhesin involved in diffuse adherence of the diarrheagenic *Escherichia coli* strain 2787 (O126, 27) is synthesized via a precursor molecule Mol Microbiol 6 1539-1546

- 43 Yamamoto T, M Kancko, S Changchawalt, O Serichantalergs, S Ijuin and P Echeverria 1994 Actin accumulation associated with clustered and localized adherence in *Escherichia coli* isolated from patients with diarrhea. *Infect Immun* **62** 2917-2929
- 44 Cookson S. T and J P Nataro. 1996. Characterization of Hep-2 cell projection formation induced by diffusely adherent *Escherichia coli* *Microbiol Pathol* **21**: 421-434
- 45 Figueroa A. Técnicas de biología molecular en el diagnóstico de infecciones gastrointestinales. Diagnóstico de laboratorio de infecciones gastrointestinales S Giono, A. Escobar y J. L. Valdespino (ed) INDRE. SSA México 1993 369-394
- 46 Rodríguez A M G II Curso Básico Teórico-Práctico, Estudio y diagnóstico molecular de *Escherichia coli* y otros enteropatógenos. INDRE 2000.
47. Coen D.M. The polymerase chain reaction. In: Current protocols in molecular biology F Ausubel, M R. Brent, R. E. Kingston, D D. Moore, J G Seidam, J A. Smith and K Strohi K (ed) 1994 pp. 15 03-15.76.
48. Tenover F. C. 1998. Diagnostic desoxyribonucleic acid probes for infectious diseases. *Clin Microbiol Rev* **1**. 82-101
49. Brigatti D. J, D Myerson, J J Leary, B. Spalholz, S. Z Travis, C. K Y. Fong, G D. Husiung and D. C. Ward 1983 Detection of viral genomes in cultured cells and paraffin embedded tissue sections using biotin-labeled hybridization probes. *Virology* **126**: 32-50
50. Zhi-Dong J J, J. Mathwson, C D. Ericsson, A. M. Svennerholm, C. Pulido and H. L DuPont. 2000. Characterization of enterotoxigenic *Escherichia coli* strains in patients with traveler's diarrhea adquired in Guadalajara, Mexico 1992-1997 *J Infect Dis* **181**.779-782
51. Albert M. J, S.M. Faruque, A. S Faruque, P. K. Neogi, M Ansaruzzaman, N A. Bhuiyan, K. Alam and M. S Akbar. 1995. Controlled study of *Escherichia coli* diarrheal infection in Bangladesh children *J Clin Microbiol* **33**.973-977
52. Flores-Abuxapqui J J, G J Suarez-Itoil, M. R Heredia-Navarrete, M A Puc-Franco and J Franco-Monsreal 1994 Frequency of enterotoxigenic *Escherichia coli* in infants during the first three months of life *Arch Med Rev* **25** 303-307
53. Hoque S S, A S Faruque, D Mahalanabis and A Hasnat 1994 Infectious agents causing acute watery diarrhoea in infant and young children in Bangladesh and their public health implications *J Trop Pediatr* **40**:351-354

54. Mangia A H, A N Duarte, R Duarte, L A Silva, V L Bravo and M C Leal 1993. Actiology of acute diarrhoea in hospitalized children in Rio de Janeiro City Brazil. *J Trop. Pediatr.* **39** 365-367
55. Tornieporth N.G, J John, K. Salgado, P De Jesús, E Latham, M C Melo, S T Gunzburg and L. W Riley 1995. Differentiation of pathogenic *Escherichia coli* strains in Brazilian children by PCR. *J Clin Microbiol* **33**.1371-1374
56. Abdul A A, S M. Faruque, Q. S Ahmad, K M Hussain, D Mahalanabis and M J Albert 1994. Evaluation of non-radioactive chemiluminescent method for using oligonucleotide and polynucleotide probes to identify enterotoxigenic *Escherichia coli*. *J Diar. Dis Res.* **12**:113-116
57. Schultz C. 1994. Dtection of enterotoxigenic *Escherichia coli* in stool samples by using nonradioactive labeled oligonucleotide DNA probes and PCR. *J Clin Microbiol* 1994.2393-2397
58. Levine M. M and R. Edelman. 1984. Enteropathogenic *Escherichia coli* of classic serotypes associated with infant diarrhea, epidemiology and pathogenesis *Epidemiol Rev.* **6**: 31-51
59. Johnson R P, R. C Clark, J B Wilson, S. C. Read, K. Rahn, S. A Renwick, K. A Sandhu, D. Alves, M A. Karmali, H Lior, S A McEwen, J S. Spika and C. L Gyles. 1996. Growing concerns and recent outbreaks involving non-O157:H7 serotypes verotoxigenic *Escherichia coli*. *J Food Prot* **59**. 1112-1122.
60. Goldwater P N and K A Bettlheim. The role of enterohaemorrhagic *E. coli* serotypes other than O157:H7 as causes of disease. In Recent advances in verocytotoxin producing *Escherichia coli* infections M A Karmali and A. G Goglio (ed) Amsterdam. The Netherlands Elsevier Science B V. 1994 pp 45-65.
61. Ojeda A, V Prado, J Martincz, C. Arellano, A Borczyk, W Jonson, H Lior and M M Levine 1995. Sorbitol-negative phenotype among enterohemorrhagic *Escherichia coli* strains of different serotypes and from different sources. *J Clin Microbiol* **33** 2199-2201

62. Louie M. J., C. S. De Azavedo, M. Y. Handelsman, C. G. Clark, B. Ally, M. Dytoe, P. Sherman and O. Brunton 1993 Expression and characterization of the *eaeI* gene product of *Escherichia coli* serotype O157:H7. *Infect. Immun.* 61:4085-4092.
63. Prerad D. R., Van Etterijck, J. Breynaert, L. Moriau and S. Lauwer 1990 Results of screening for verocytotoxin-producing *Escherichia coli* in faeces in Belgium. *Eur J Clin Microbiol Infect. Dis.* 9: 198-201.