

ESCUELA POLITÉCNICA DEL EJÉRCITO

**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA
INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

**“IMPLEMENTACIÓN DE UN ENSAYO PCR
MULTIPLEX PARA LA IDENTIFICACIÓN DE LAS
ENTEROVARIEDADES DE *Escherichia coli* PATÓGENAS”**

Previa a la obtención del Título:

INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA

ELABORADO POR:

ANDREA MARCELA ZAMBRANO COBOS

SANGOLQUÍ, 15 de Marzo de 2012

HOJA DE LEGALIZACIÓN DE FIRMAS

ELABORADO POR

Andrea Marcela Zambrano Cobos

COORDINADOR DE LA CARRERA

Ing. Grace Tatiana Páez Barrera

SECRETARIO ACADÉMICO

Abg. Carlos Orozco

Lugar y Fecha: Sangolquí, 15 de marzo 2012

CERTIFICACIÓN

B.Sc. Karina Ponce

Dr. Marcelo Grijalva

Certifican:

Que el trabajo titulado IMPLEMENTACIÓN DE UN ENSAYO PCR MULTIPLEX PARA LA IDENTIFICACIÓN DE LAS ENTEROVARIEDADES DE *Escherichia coli* PATÓGENAS, realizado por ANDREA MARCELA ZAMBRANO COBOS, ha sido guiado y revisado periódicamente y cumple normas estatutarias establecidas por la ESPE, en el Reglamento de Estudiantes de la Escuela Politécnica del Ejército.

Debido a la relevancia científica y académica del presente trabajo recomiendan su publicación.

El mencionado trabajo consta de un documento empastado y un disco compacto el cual contiene los archivos en formato portátil de Acrobat (pdf). Autorizan a ANDREA MARCELA ZAMBRANO COBOS que lo entregue a ING. GRACE TATIANA PÁEZ BARRERA, en su calidad de Coordinadora de la Carrera.

Sangolquí, 15 de marzo de 2012.

BSc. Karina Ponce

Dr. Marcelo Grijalva

DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD

Yo, Andrea Marcela Zambrano Cobos.

Declaro que:

El proyecto de grado denominado IMPLEMENTACIÓN DE UN ENSAYO PCR MULTIPLEX PARA LA IDENTIFICACIÓN DE LAS ENTEROVARIEDADES DE *Escherichia coli* PATÓGENAS, ha sido desarrollado con base a una investigación exhaustiva, respetando derechos intelectuales de terceros, conforme las citas que constan al pie de las páginas correspondientes, cuyas fuentes se incorporan en la bibliografía. Consecuentemente este trabajo es de mí autoría.

En virtud de esta declaración, me responsabilizo del contenido, veracidad y alcance científico del proyecto de grado en mención.

Sangolquí, 15 de marzo de 2012.

Andrea Marcela Zambrano Cobos

AUTORIZACIÓN

Yo, Andrea Marcela Zambrano Cobos

Autorizo a la Escuela Politécnica del Ejército la publicación, en la biblioteca virtual de la Institución del trabajo IMPLEMENTACIÓN DE UN ENSAYO PCR MULTIPLEX PARA LA IDENTIFICACIÓN DE LAS ENTEROVARIEDADES DE *Escherichia coli* PATÓGENAS, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi exclusiva responsabilidad y autoría.

Sangolquí, 15 de marzo de 2012

Andrea Marcela Zambrano Cobos

DEDICATORIA

A Dios por haberme permitido llegar a este punto, y por darme fortaleza cuando más lo necesité.

A mi padre a quien le debo todo en la vida, y por ser ejemplo de perseverancia y constancia.

A mi madre por darme la vida, por haberme educado, por sus valores, sus sabios consejos y su apoyo incondicional.

A mis hermanos Mari y Luis por su cariño y apoyo que me brindan cada día y forman parte de este logro.

Andrea Zambrano Cobos

AGRADECIMIENTO

A Dios por su amor y haberme regalado estos años que hoy reflejan un logro profesional, de muchos que vendrán.

A mis padres por el esfuerzo que hicieron estos años, a mis hermanos por alentarme todos los días.

A mi directora de tesis B.Sc. Karina Ponce y codirector Dr. Marcelo Grijalva por toda su ayuda para la ejecución de este proyecto.

Al Instituto Nacional de Higiene y Medicina Tropical “Leopoldo Izquieta Pérez” por darme la oportunidad de realizar el proyecto en sus laboratorios.

Al Dr. Santiago Escalante por su confianza, compartir sus conocimientos e inspirar en mi gratitud y admiración.

A todo el equipo de trabajo de campos pulsados Eduardo, Andrés y Majito por la ayuda que me brindaron durante la realización de la tesis.

A mis amigas Fer, Majo y Carlita por haber estado en los buenos y malos momentos durante mi vida universitaria, pero sobre todo por esa amistad incondicional que me brindan todos los días.

A todas esas personas maravillosas que fui conociendo y que de distinta manera me acompañaron durante este tiempo y contribuyeron a este logro.

Andrea Zambrano Cobos

ÍNDICE DE CONTENIDO

HOJA DE LEGALIZACIÓN DE FIRMAS	I
CERTIFICACIÓN.....	II
DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD	III
AUTORIZACIÓN	IV
DEDICATORIA	V
AGRADECIMIENTO	VI
NOMENCLATURA	XIII
RESUMEN	XIV
ABSTRACT	XV
CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN.....	- 1 -
1.1 Formulación del problema:.....	- 1 -
1.2 Justificación del problema	- 2 -
1.3 Objetivos de la investigación.....	- 4 -
1.3.1. Objetivo general.....	- 4 -
1.3.2. Objetivos específicos	- 4 -
1.4 Marco teórico	- 5 -
1.4.1. Etiología.....	- 5 -
1.4.2. <i>Escherichia coli</i>	- 5 -
1.4.3. Aislamiento e identificación.....	- 6 -
1.4.4. Bioquímica	- 7 -
1.4.5. Serotipificación.....	- 7 -
1.4.6. <i>Escherichia coli</i> diarreicas.....	- 9 -
1.4.7. Métodos moleculares:	- 19 -
1.4.8. Límite de detección	- 22 -
1.5 Sistema de hipótesis.....	- 22 -
CAPÍTULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS	- 23 -
2.1. Participantes	- 23 -
2.2. Zona de estudio	- 23 -
2.4. Diseño	- 24 -
2.5. Procedimientos.....	- 24 -
2.5.1. Obtención de cepas <i>E. coli</i> patógenas	- 24 -
2.5.2. Siembra de cepas <i>E. coli</i> patógenas.....	- 25 -

2.5.3. Aislamiento de ADN genómico	- 26 -
2.5.4. Electroforesis del ADN genómico	- 27 -
2.5.5. Sistema PCR	- 28 -
2.5.5.4. Determinación de la sensibilidad analítica del sistema	- 35 -
2.6. Muestras de heces fecales	- 35 -
CAPÍTULO 3: RESULTADOS	- 36 -
3.1. Cepas <i>E. coli</i>	- 36 -
3.2.1. ADN de controles positivos	- 39 -
3.3. Optimización PCR multiplex	- 41 -
3.3.1. <i>Gradiente de Temperatura</i>	- 41 -
3.3.2. <i>Concentración de cebadores</i>	- 45 -
3.4. PCR multiplex	- 46 -
3.4.1. <i>Primer ensayo de la PCR multiplex</i>	- 48 -
3.4.2. <i>PCR dúplex</i>	- 51 -
3.4.3. <i>PCR multiplex A y B</i>	- 52 -
3.5. Fase confirmatoria	- 53 -
3.5.1. <i>Sensibilidad analítica de la multiplex A.</i>	- 54 -
3.5.2. <i>Sensibilidad analítica de la multiplex B.</i>	- 55 -
3.5.3. <i>Especificidad del sistema</i>	- 55 -
3.6. Muestras de heces fecales	- 57 -
CAPÍTULO 4: DISCUSIÓN	- 58 -
CAPÍTULO 5: CONCLUSIONES	- 62 -
CAPÍTULO 6: RECOMENDACIONES	- 64 -
CAPÍTULO 7: BIBLIOGRAFÍA	- 65 -

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 2.1.....	- 25 -
Tabla 3.1.....	- 56 -

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 2.1. Secuencia de cebadores de los factores de virulencia....	- 28 -
Cuadro 2.2. Protocolo de Máster Mix del gradiente de temperatura...	- 30 -
Cuadro 2.3. Condiciones del termociclador	- 30 -
Cuadro 2.4. Máster Mix del primer ensayo de PCR multiplex.....	- 32 -
Cuadro 2.5. Máster Mix de PCR multiplex A.....	- 33 -
Cuadro 2.6. Máster Mix para PCR multiplex B.....	- 34 -
Cuadro 2.7. Condiciones del termociclador para la multiplex A.	- 34 -
Cuadro 3.1. Lecturas del ADN extraído de las cepas controles.....	- 39 -
Cuadro 3.2. Lectura de ADN extraído de algunas bacterias.....	- 40 -
Cuadro 3.3. Temperatura de hibridación de los genes ipaH y de eae.-	- 42 -
Cuadro 3.4. Temperatura de hibridación del gen eltB y del gen aggR -	- 43 -
Cuadro 3.5. Temperaturas de hibridación de la ECEI y de la ECDA. .	- 44 -
Cuadro 3.6. Condiciones del termociclador.	- 49 -

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. Microfotografía electrónica de la <i>E. coli</i>	- 6 -
Figura 1.2. Representación de los antígenos de <i>Escherichia coli</i>	- 8 -
Figura 1.3. Representación esquemática de elementos genéticos....	- 10 -
Figura 1.4. Esquema patogénico de <i>E. coli</i> diarreicas	- 12 -
Figura 1.5. Mecanismo de acción de ECET.....	- 14 -
Figura 2.1. Diagrama del aislamiento de ADN.....	- 27 -
Figura 2.2. Primers reconstituidos a una concentración de 100 uM. ...	- 29 -
Figura 2.3. Diluciones seriadas del ADN.	- 35 -
Figura 3.1. Siembra de <i>E. coli</i> patógena y no patógena	- 36 -
Figura 3.2. <i>E. coli</i> ECEA y <i>E. coli</i> O157:H7 en Mac Conkey Sorbitol..	- 37 -
Figura 3.3. <i>E. coli</i> ECET y <i>E. coli</i> O157:H7 analizadas en Fluorocult. -	- 37 -
Figura 3.4. Pruebas bioquímicas de <i>E. coli</i>	- 38 -
Figura 3.5. Tests bioquímicos miniaturizados API 20E.....	- 38 -
Figura 3.6. Extracción de ADN genómico	- 40 -
Figura 3.7. Extracción de ADN genómico	- 41 -
Figura 3.8. Gradiente de temperatura del gen <i>lpaH</i> y <i>eae</i>	- 42 -
Figura 3.9. Gradiente de temperatura del gen <i>eltB</i> y <i>aggR</i>	- 43 -
Figura 3.10. Gradiente de temperatura del gen <i>ipaH</i> y <i>DA</i>	- 44 -
Figura 3.11. Concentración de primers <i>vt1</i> , <i>eae</i> , <i>eltB</i> , <i>aggR</i> , <i>Da</i>	- 45 -
Figura 3.12. Concentración de los primers <i>vt1</i> , <i>eae</i> , <i>eltB</i>	- 46 -
Figura 3.13. Concentración de primers <i>ipaH</i> <i>vt1</i> , <i>estA</i>	- 47 -
Figura 3.14. PCR multiplex identificación de ECEP, ECET, ECEA.....	- 48 -
Figura 3.15. PCR touchdown.....	- 50 -
Figura 3.16. PCR multiplex de las enterovarietades de <i>E. coli</i>	- 50 -
Figura 3.17. Combinación de la PCR multiplex	- 51 -
Figura 3.19. Optimización de la PCR multiplex A y B.	- 53 -
Figura 3.21. Limite de detección del sistema de la PCR multiplex.....	- 55 -
Figura 3.22. Ensayo de PCR multiplex en otras bacterias.....	- 56 -

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO A - 71 -

NOMENCLATURA

A:	Adenina
ADN:	Ácido desoxirribonucleico
ATCC:	American Type Culture Collection
C:	Citosina
dNTP:	Deoxinucleótido trifosfato
DEC:	Diarreicas <i>Escherichia coli</i>
ECDA:	<i>Escherichia coli</i> Difusa Adherente
ECEA:	<i>Escherichia coli</i> Enteroagregativa
ECEH:	<i>Escherichia coli</i> Enterohemorrágica
ECEI:	<i>Escherichia coli</i> Enteroinvasiva
ECEP:	<i>Escherichia coli</i> Enteropatógena
ECET:	<i>Escherichia coli</i> Enterotoxigénica
EDTA:	Etilén diamino tetra acético
G:	Guanina
Kda:	Kilo Dalton
pb:	Pares de bases
PCR:	Reacción en Cadena de la Polimerasa
T:	Timina
TAE:	Tris base ácido acético y EDTA
UV:	Luz Ultravioleta
V:	Voltio

RESUMEN

Escherichia coli patógenas son agentes causantes de enfermedades diarreicas en las personas, especialmente en niños de países en vía de desarrollo, poseen diferentes mecanismos de patogenicidad y se clasifican en *E. coli* Enterotoxigénica (ECET), *E. coli* Enteropatógena (ECEP), *E. coli* Enteroinvasiva (ECEI), *E. coli* Enteroagregativa (ECEA), *E. coli* Enterohemorrágica (ECEH), y *E. coli* Entero difusa adherente (ECDA).

En el Ecuador se ha reportado la identificación de ECEP, ECET, y ECEI mediante PCR individuales por lo que el objetivo de esta tesis fue implementar un ensayo PCR multiplex, con el fin de identificar cada *Escherichia coli* patógena, mediante un diseño de tipo exploratorio y confirmatorio. Primero, se obtuvo las cepas patógenas control positivo a las cuales se las analizó microbiológicamente y luego se aisló el ADN de cada una con un kit comercial, para proceder a diseñar la PCR.

Inicialmente se optimizó las temperaturas de hibridación, se evaluó la concentración final de cada primer y los tiempos del termociclador para poder amplificar los genes *vt1*, *vt2*, *eae*, *estA*, *eltB*, *aggR*, *ipaH* y *Da*. Por el gran número de primers utilizados en esta técnica y para evitar interferencia entre cada uno, no fue posible diseñar una PCR multiplex, por lo que fue dividida en dos. Una amplificó las enterovariedades ECEH, ECEP, ECDA y la otra ECET, ECEI, ECEA.

Para cada PCR implementada se realizó el límite de detección tomando como patógenos de referencia a ECEH para la primera PCR multiplex y ECET para la segunda, con un límite de detección de 0,0029 ng/μL y 0,011 ng/μL respectivamente. La técnica propuesta presentó una alta eficiencia, sensibilidad y especificidad en los controles positivos, otras cepas y muestras de heces, en un ensayo de campo limitado.

ABSTRACT

Escherichia coli pathogens are important agents that causes of childhood diarrhea, the mechanisms of pathogenesis are qualifies in enterotoxigenic *E. coli* (ETEC), enteropathogenic *E. coli* EPEC, enteroinvasive *E. coli* (EIEC), enteroaggregative *E. coli* (EAEC), enterohaemorrhagic *E. coli* (EHEC), and diffusely adherente *E. coli* (DAEC).

In Ecuador there are studies of EPEC, ETEC, and EIEC by individual PCR. The aim of this project was implemented a PCR multiplex to identify of pathogenic *Escherichia coli*. First, the pathogens were obtained positive controls and were analyzed microbiologically, therefore, the DNA was isolated by commercial Kit to be employed at the PCR. The implementation divided in two phases: design of PCR multiplex, and determination of the sensibility and specificity.

Initially the temperatures of hybridization were optimized, there was evaluated the final concentration to everyone and the times of the thermocycler to be able to amplify the genes *vt1*, *vt2*, *eae*, this one, *eltB*, *aggR*, *ipaH* and *It* gives. To avoid interference between each primers, it was not possible to design a PCR multiplex, for this reason, it was divided in two.

Each method had a limit of detection, the first amplified the enteropathogens EHEC, EPEC, DAEC and another ETEC, EIEC, EAEC. For every PCR the limit of detection was realized taking like pathogens of reference to EHEC to the first PCR multiplex and ETEC for the second one, with a limit of 0,0029 ng/ μ L and 0,011 ng/ μ L respectively. The proposed of the thesis presented a high efficiency, sensibility and specificity, with the positive controls, other strains and samples of feces, in a limited field test.

CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN

1.1 Formulación del problema:

Escherichia coli se encuentra en la microflora intestinal de personas y animales, como anaerobio facultativo, donde por lo general es inocua y comensal inofensivo, sin embargo algunas cepas son patógenas y provocan enfermedades diarreicas, especialmente en niños, representando un problema de salud pública en los países subdesarrollados (Nataro & Kaper, 1998; Sharafi, *et al*, 2011).

Han sido clasificadas en seis grupos de acuerdo a sus factores de virulencia: *E. coli* Enteropatógena ECEP, *E. coli* Enterotoxigénica ECET, *E. coli* Enteroinvasiva ECEI, *E. coli* Enterohemorrágica ECEH, *E. coli* Enteroagregativa ECEA, *E. coli* Difusa Adherente ECDA (WHO, 2008; Nataro, 2004).

La prevalencia de cada categoría es diferente en cada región, en Latinoamérica se ha reportado *Escherichia coli* diarreogénicas en niños, por identificación de PCR multiplex, como es el caso de la ciudad de Corrientes, Argentina donde Esquivel y colaboradores en el 2009 reportaron a *E. coli* (ECET) como la más prevalente (8.5%), *E. coli* (ECEA) (7.8%), *E. coli* (ECEH) (7.0%), *E. coli* (ECEP) (4.7%) y *E. coli* (ECEI) (3.1%).

En Brasil, en el año 2007, en localidad de Vitória, Espírito Santo, se publicó un estudio que reflejaba a *E. coli* Adherente difusa (ECDA) como el patotipo más frecuente en los niños (18.3%), ECET (3.2%), ECEP típica (0.9%) y ECEI (0.4%) (Spano, 2008). En Colombia Gómez y colaboradores en el 2010 detectaron que en la región Caribe el patotipo más frecuente fue

la ECET (6.9%) ECEH (3.5%), ECEA (2.3%), ECEP (1.2%), ECDA (1.2%) (Gómez, 2010).

En el Ecuador no se ha desarrollado la identificación de todas las seis categorías de *E. coli*, sin embargo, en el 2007 Vieira y colaboradores, identificaron a ECEP, ECET, ECEI, entre el 2003 y 2005, en una población abierta en una zona rural en la costa ecuatoriana norte, provincia de Esmeraldas, utilizando PCR individual para cada patógeno a partir de cepas aisladas en medios de cultivo selectivos diferenciales (Vieira, 2007).

1.2 Justificación del problema

La identificación de los patógenos en el país aporta información a la investigación epidemiológica de brotes, para buscar las fuentes de infección y mecanismos de transmisión, de esta manera poder elaborar tratamientos y nuevas políticas sobre el uso de antimicrobianos (Campos, *et al*, 2010).

El análisis microbiológico es fundamental para la identificación de microorganismos, adicional a esto, existen técnicas moleculares como la PCR para diagnosticar enfermedades, ya que son altamente sensibles y específicas para la detección y caracterización de factores de virulencia de enteropatógenos.

La presente tesis propone una PCR multiplex que se implementará para la identificación de las seis enterovarietades de *Escherichia coli*, según sus factores de virulencia a partir del DNA genómico.

Por lo general los laboratorios solo reportan la presencia de ECEP ó ECEH, los cuatro patotipos restantes son subestimados en la práctica clínica, debido a que su detección exige métodos específicos como ensayos de serotipificación, fenotípicos y moleculares (LLuque, *et al*, 2010).

Para identificar los factores virulentos de cada linaje, se escogió trabajar con la técnica molecular PCR múltiple, porque permite a través de un solo ensayo la identificación de varios blancos genéticos por amplificación simultánea de dos o más loci en una única reacción.

Las ventajas sobre los otros métodos de detección han sido ampliamente descritas: proveer rápido diagnóstico, tener alta confiabilidad, precisión y exactitud, involucrar bajos tiempos de realización, por lo que es una técnica con mejor relación costo-beneficio, a diferencia de ensayos, que no siempre están correlacionados con la presencia de genes involucrados con la patogenicidad.

A pesar del potencial que tiene la PCR, no ha ganado ampliamente aceptación en diagnósticos de rutina, ni se ha incorporado en métodos de estandarización. La falta de validación y optimización de protocolos, la calidad variable de reactivos y equipos, pueden influir en la diseminación eficiente de metodología de PCR en todos los laboratorios (Malorny, 2002).

La combinación de la biología molecular y microbiología clínica, es de gran importancia para obtener resultados confiables en menor tiempo y poder dar tratamiento a personas infectadas. La PCR multiplex permite la amplificación de varias secuencias dianas en una sola reacción, es una herramienta usada para la identificación de especies y subespecies (Fonseca, Mateus & Contreras, 2010).

La implementación de esta técnica molecular beneficia al laboratorio de referencia nacional, el Instituto Nacional de Higiene y Medicina Tropical “Leopoldo Izquieta Pérez” para sus diagnósticos de rutina, reportando de una manera más rápida y segura la presencia de cada patotipo patogénico en las muestras analizadas.

1.3 Objetivos de la investigación

1.3.1. Objetivo general

Implementar un ensayo PCR multiplex para la identificación de las enterovarietades de *Escherichia coli* patógenas.

1.3.2. Objetivos específicos

- Optimizar el sistema según los parámetros: Temperatura de hibridación, concentración de primers, tiempo y ciclos de amplificación
- Identificar los genes *eltB* y *estA* de *E.coli* enterotoxigénica, genes *vt1*, *vt2* y *eaeA* de *E.coli* enterohemorrágica, gen *ipaH* de *E.coli* enteroinvasiva, gen *eaeA* de *E.coli* enteropatógena, gen *aggR* de *E.coli* enteroagregativa, gen *DA* de *E.coli* difusa adherente
- Determinar la sensibilidad analítica del sistema.
- Elaborar un protocolo de implementación del ensayo PCR multiplex para la identificación de las enterovarietades de *Escherichia coli* patógenas.

1.4 Marco teórico

1.4.1. Etiología

En el Ecuador las enfermedades diarreicas de presunto origen infeccioso se encuentran entre los 10 principales causas de mortalidad y la tercera causa de morbilidad infantil (INEC, 2009).

Los agentes etiológicos más frecuentes aislados son: Rotavirus que representa más del 80% de todas las infecciones entéricas, bacterias como *Escherichia coli*, *Campylobacter jejuni*, *Salmonella* spp. y *Shigella* spp., representan el 15% y parásitos el 5% (OPS, 1987).

1.4.2. *Escherichia coli*

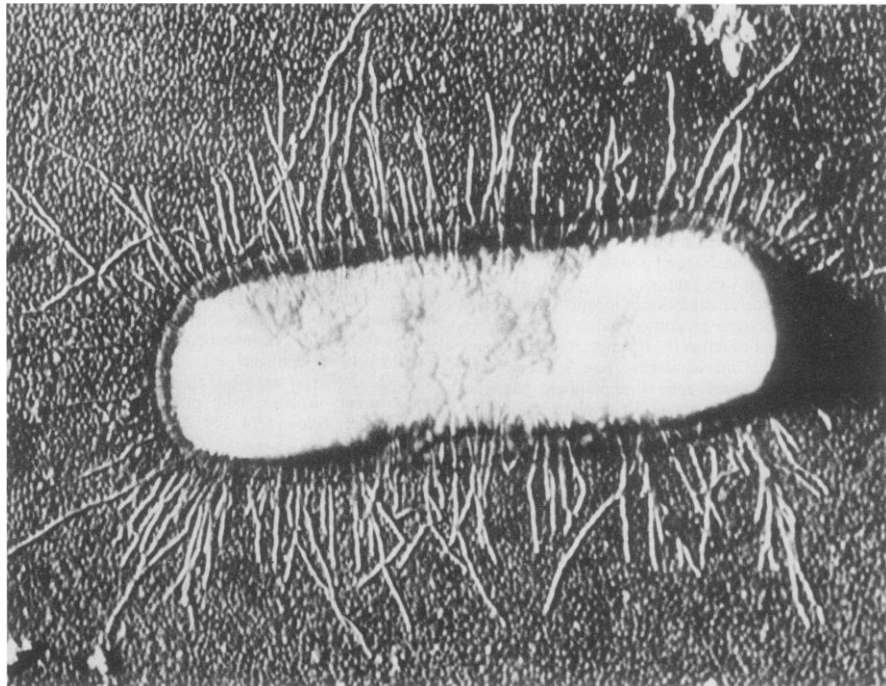
Las especies de *Escherichia* son las siguientes: *Escherichia blattae*, *Escherichia coli*, *Escherichia fergusonii*, *Escherichia hermannii* y *Escherichia vulneris*, de todas solo *E. coli* tiene relevancia clínica (Bhunias, 2008).

En 1885, Teodoro Escherich, bacteriólogo alemán aisló de una muestra de heces una bacteria llamada *Bacteria coli*, años más tarde la llamaron *Escherichia coli* (Bhunias, 2008).

Escherichia coli se encuentra de manera abundante en la flora normal de los humanos, su nicho ecológico natural es el intestino delgado y grueso. Tiene una pared celular rígida y porosa para brindar protección y forma, está compuesta por lipopolisacáridos en el exterior, polisacáridos en el interior y pequeños péptidos. Algunas bacterias tienen flagelos de composición proteica, su membrana celular está compuesta por lípidos y proteínas (Bradley & Peter, 1987; Romero, 2007)

La mayoría de *E. coli* no patógenas han sido utilizadas como microorganismos modelos para el estudio de fisiología bacteriana, regulación metabólica y genética, estudios de transducción y sobre la estructura y función de la pared celular (Bhunja, 2008).

Figura 1.1. Microfotografía electrónica de *E. coli*, donde se puede observar los protoplastos, la pared celular y las fimbrias.



Fuente: Johnson, 1991.

E. coli es un bacilo Gram negativo, móvil, taxonómicamente pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*, tiene una sola cadena espiral de ADN, aerobio y anaerobio facultativo, posee flagelos peritricos, existen cepas que fabrican una microcápsula y otras una macrocápsula y no fabrican esporas. El genoma contiene aproximadamente 5000 genes (Hill & drasar, 1975; Romero, 2007).

1.4.3. Aislamiento e identificación

En condiciones aerobias, la bacteria crece aproximadamente a una temperatura de 37°C, por lo general se siembran en un agar selectivo como

MacConkey. La identificación de cepas de *E. coli* patógenas, debe realizarse en casos de diarrea persistente, especialmente en viajeros, niños y personas inmunodeprimidas, así como en brotes diarreicos (Nataro & Kaper, 1998).

1.4.4. Bioquímica

Su identificación puede ser por reacciones bioquímicas: oxidasa negativa, fermentadora de glucosa, lactosa y sacarosa, positiva al indol, descarboxilasa de la lisina, fermentación de manitol y gas a partir de glucosa, su pH óptimo es de 6.0-7.0. El 90% de *E. coli* son lactosa positiva, sin embargo existen algunas cepas patógenas, incluyendo ciertas *E. coli* enteroinvasivas que son lactosa negativas (Nataro & Kaper, 1998; Fotadar *et al.*, 2005).

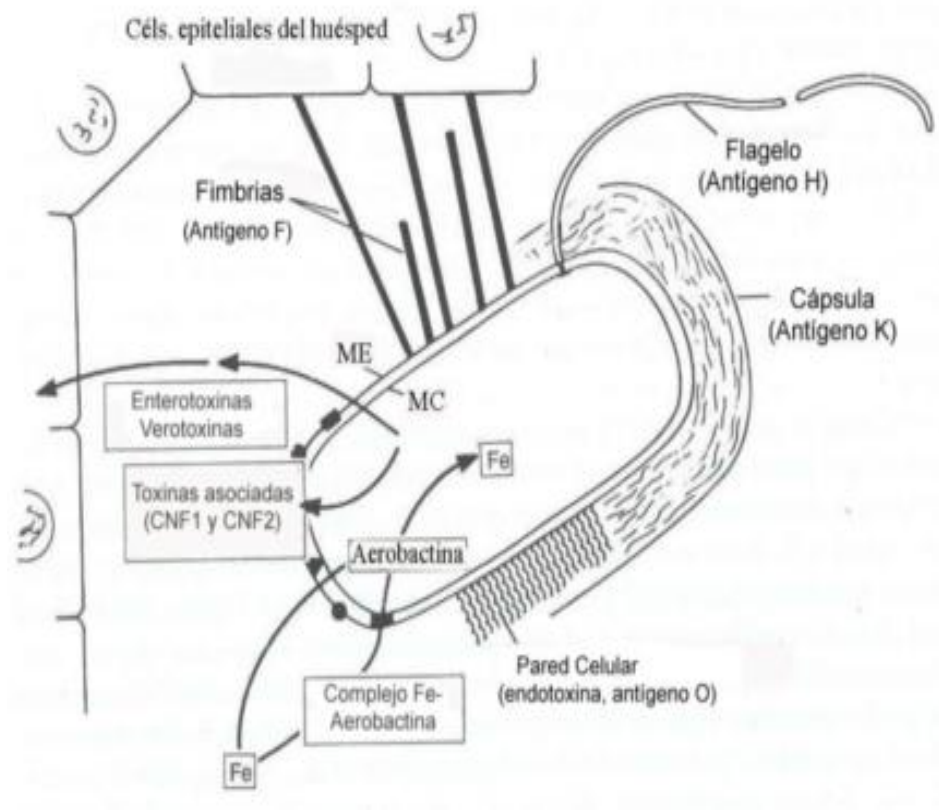
1.4.5. Serotipificación

En 1944, Kauffman propuso un esquema de clasificación serológica de *E. coli*, basado en 176 antígenos somáticos (O), 112 antígenos flagelares (H), y 60 antígenos capsulares (K) (Rodríguez, 2002; Nataro & Kaper 1998).

El antígeno somático O define el serogrupo, que está en los liposacáridos presentes sobre la pared de bacterias Gram negativas, el antígeno flagelar H es de naturaleza proteica y presente en la estructura flagelar que permite la movilidad de la bacteria (Tap, 2004).

Por pruebas de aglutinación se puede identificar los antígenos O y H, mientras que la identificación del antígeno K se realiza por otras técnicas. Existe reacciones cruzadas entre los antígenos O y K de diferentes cepas de *E. coli* y con los antígenos de otros géneros de enterobacterias (Tap, 2004).

Figura 1.2. Representación de los antígenos de superficie y de factores de virulencia en *Escherichia coli*.



Fuente: Blanco, s/a

Tabla 1.1. Serotipos de *E. coli* patógenas

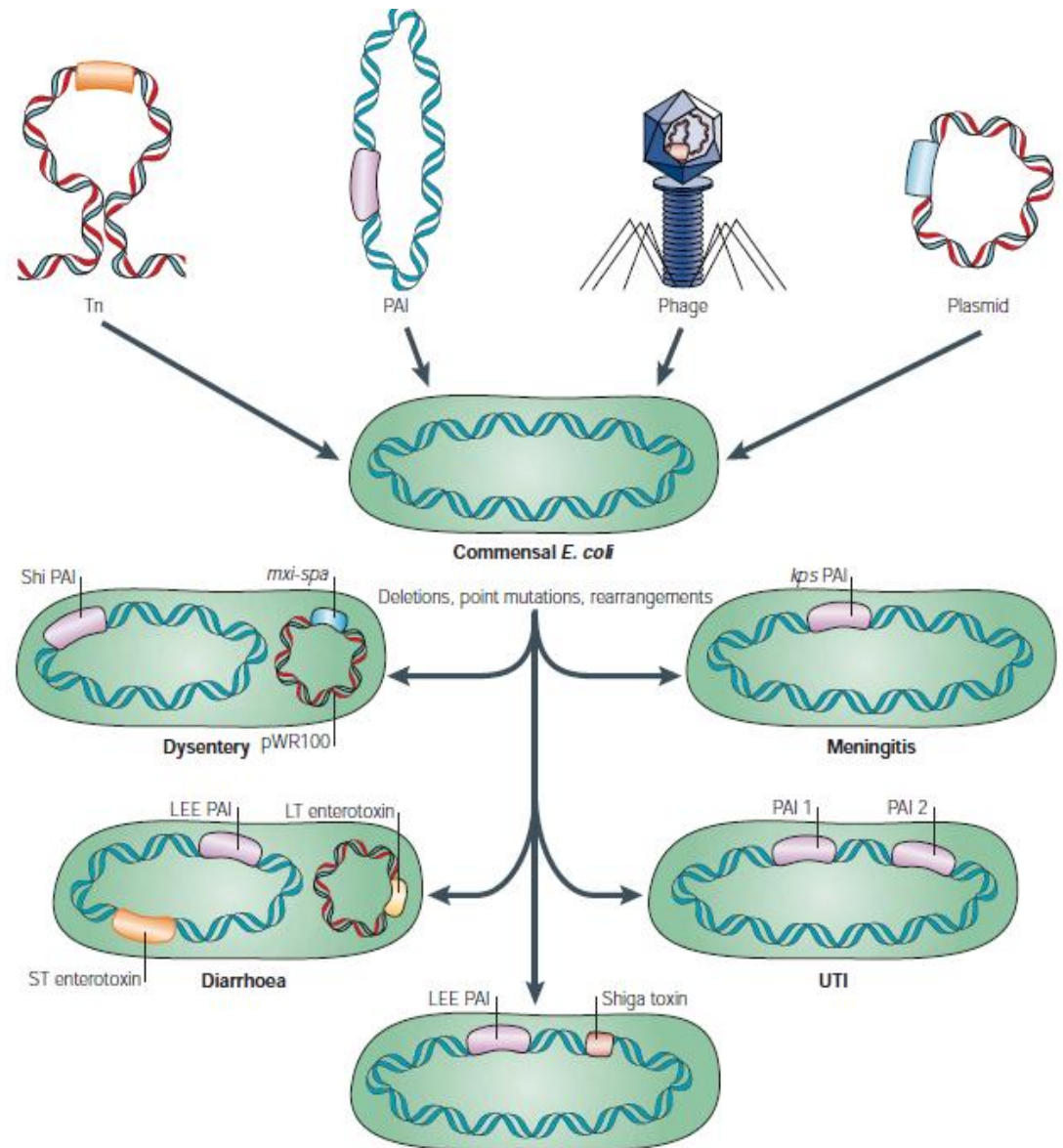
Category	Serogroup	Associated H antigen(s)
ETEC	O6	H16
	O8	H9
	O11	H27
	O15	H11
	O20	NM
	O25	H42, NM
	O27	H7
	O78	H11, H12
	O128	H7
	O148	H28
	O149	H10
	O159	H20
	O173	NM
EPEC	O55	H6, NM
	O86	H34, NM
	O111	H2, H12, NM
	O119	H6, NM
	O125ac	H21
	O126	H27, NM
	O127	H6, NM
	O128	H2, H12
	O142	H6
EHEC	O26	H11, H32, NM
	O55	H7
	O111ab	H8, NM
	O113	H21
	O117	H14
	O157	H7
EAEC	O3	H2
	O15	H18
	O44	H18
	O86	NM
	O77	H18
	O111	H21
	O127	H2
	O ^{7a}	H10

Fuente: Nataro & Kaper, 1998

1.4.6. *Escherichia coli* diarreicas

Existen algunos clones de *E. coli* que han adquirido factores virulentos específicos que confieren la capacidad de adaptarse a nuevos nichos, causando un amplio espectro de enfermedades entéricas ó diarrea, infecciones en el tracto urinario y sepsis ó meningitis (Nataro & Kaper, 2004).

Figura 1.3. Representación esquemática de la contribución de elementos móviles genéticos en la evolución de *E. coli* patógenas. Los factores de virulencia están codificados por transposones, plásmidos, bacteriófagos e islas de patogenicidad (PAIs).



Fuente: Nataro & Kaper, 2004

Las cepas de *E. coli* causantes de diarrea, tienen diferentes mecanismos de patogenicidad, de acuerdo a estas características se dividen en patovariedades, que son taxones con un rango jerárquico inferior a la subespecie, las cuales se caracterizan por su poder patógeno. Según esto se clasifican en (Tap, 2004; Rodríguez, 2002):

Escherichia coli Enterotoxigénica (ECET)
Escherichia coli Enteropatógena (ECEP)
Escherichia coli Enteroinvasiva (ECEI)
Escherichia coli Enteroagregativa (ECEA)
Escherichia coli Enterohemorrágica (ECEH)
Escherichia coli Entero difusa adherente (ECDA)

Estos patógenos son una causa importante de diarrea en niños en países en vías de desarrollo, pero no son rutinariamente diagnosticadas; a excepción de *E. coli* productora de Shiga toxina (Nataro, 1998).

Tabla 1.2. Características epidemiológicas y clínicas de las seis *E. coli* enteropatógenas.

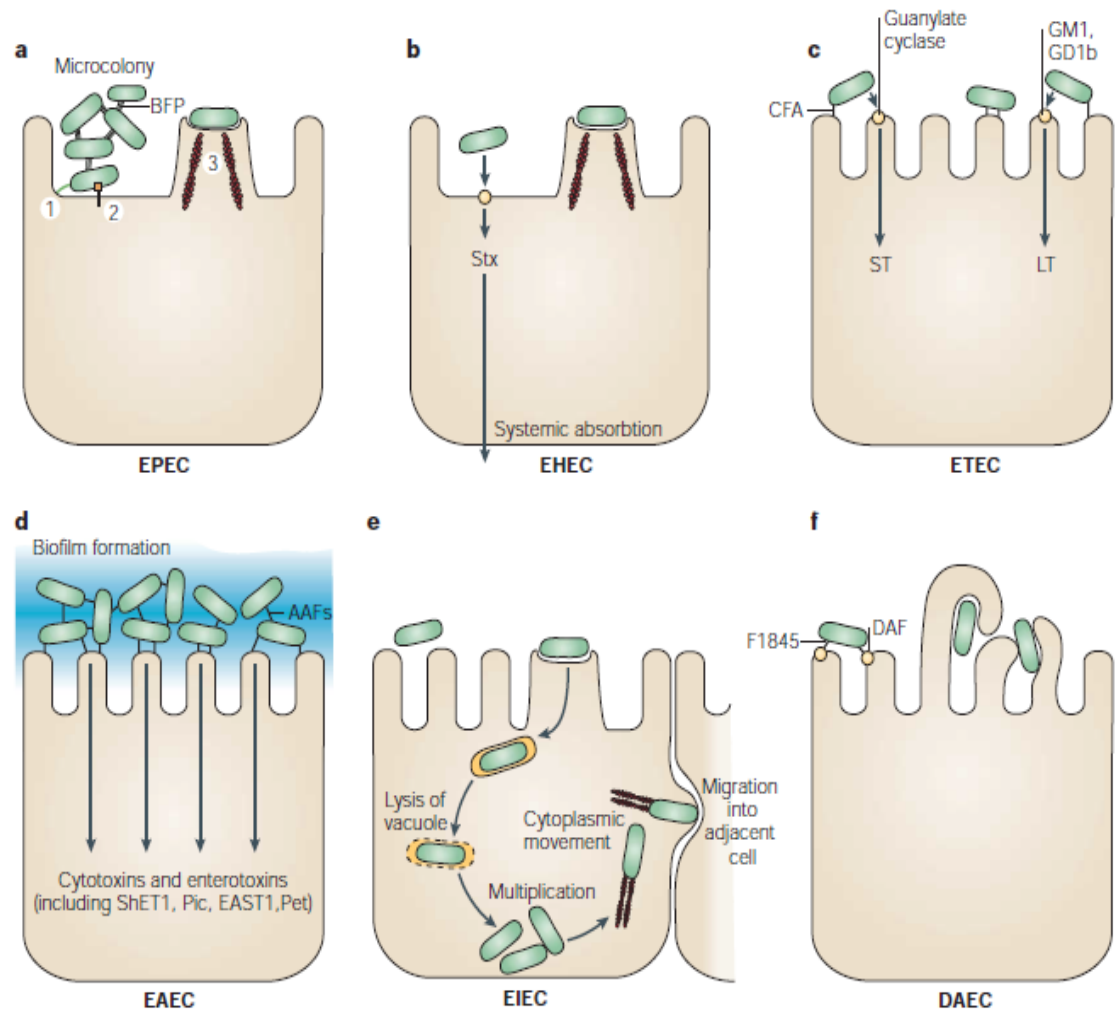
Patotipo	Grupos representativos del antígeno O	Síndromes e infecciones asociadas	Principales fuentes de infección
ECEP	18, 26, 44, 55, 86, 111ab, 114, 119, 125ac, 126, 127, 128 ab, 142, 157, 158	Diarrea acuosa, principalmente en niños menores de 2 años	Alimentos de destete, agua contaminada, juguetes de los niños, etc.
ECET	1, 6, 7, 8, 9, 11, 12, 15, 20, 25, 27, 60, 63, 75, 78, 80, 85, 88, 89, 99, 101, 109, 114, 115, 128ac, 139, 148, 149, 153, 159, 166, 167	Diarrea del viajero, diarrea del destete, diarrea que va desde lo mas leve a lo mas grave	Comida (atún, papas, macarrones) y agua
ECEI	11, 28ac, 29, 112, 115, 121, 124, 136, 143, 144, 147, 152, 164, 173	diarrea sin sangre, disentería	Comida (Vegetales y queso), agua
ECEH	26, 103, 111, 145, 157, aprox. 50 más	Diarrea sanguinolenta	Comida(especialmente en carnes) y agua
ECEA	3, 15, 44, 51, 77, 78, 86, 91, 92, 111, 113, 126, 127, 141, 146	Diarrea persistente (afecta a infantes y niños)	Comida
ECDA	11, 15, 75, 126	Diarrea (principalmente en niños)	Todavía no se conoce las principales fuentes de infección

Fuente: Meng & Schoroeder, 2007.

E. coli diarreicas pueden producir infecciones entéricas como la diarrea, disentería, colitis hemorrágica, síndrome urémico hemolítico, o extraintestinales como infecciones del tracto urinario, bacteriemias o septicemias, meningitis, peritonitis, mastitis e infecciones pulmonares y de heridas (Nataro, 1998).

La identificación de estas patovariedades requiere de la diferenciación molecular que se basa en la presencia de genes que son codificados en el cromosoma y plásmido (Vilchez, 2009).

Figura 1.4. Esquema patogénico de *E. coli* diarreicas



Fuente: Nataro & Kaper, 2004.

La mayoría de las *E. coli* diarreicas son patógenos extracelulares, pero EIEC es intracelular por que invade y se replica sin macrófagos y células epiteliales (Nataro & Kaper, 2004).

1.4.6.1. *Escherichia coli* Enterotoxigénica (ECET):

La ECET es uno de los patotipos más estudiados, asociado con morbilidad en niños menores a 5 años, en los adultos puede ser asintomática, poco frecuente o puede provocar la denominada diarrea del viajero (Rodríguez, 2002).

Los principales síntomas de la ECET son: diarrea acuosa, dolor abdominal, náuseas y vómitos, (Ochoa, s/a).

- Mecanismo de acción

La ECET coloniza la superficie de la mucosa del intestino delgado y secreta dos enterotoxinas, la toxina termo-lábil LT y aquella termo-estable ST; provocando inhibición de la absorción del sodio y secreción estimulada por el ion cloro lo que hace que sea acuosa (Spangler, 1992). La colonización es inmediata por una o más fimbrias o factores de colonización fibrilar CFs, más de 20 CFs han sido caracterizados. (Nataro & Kaper, 2004).

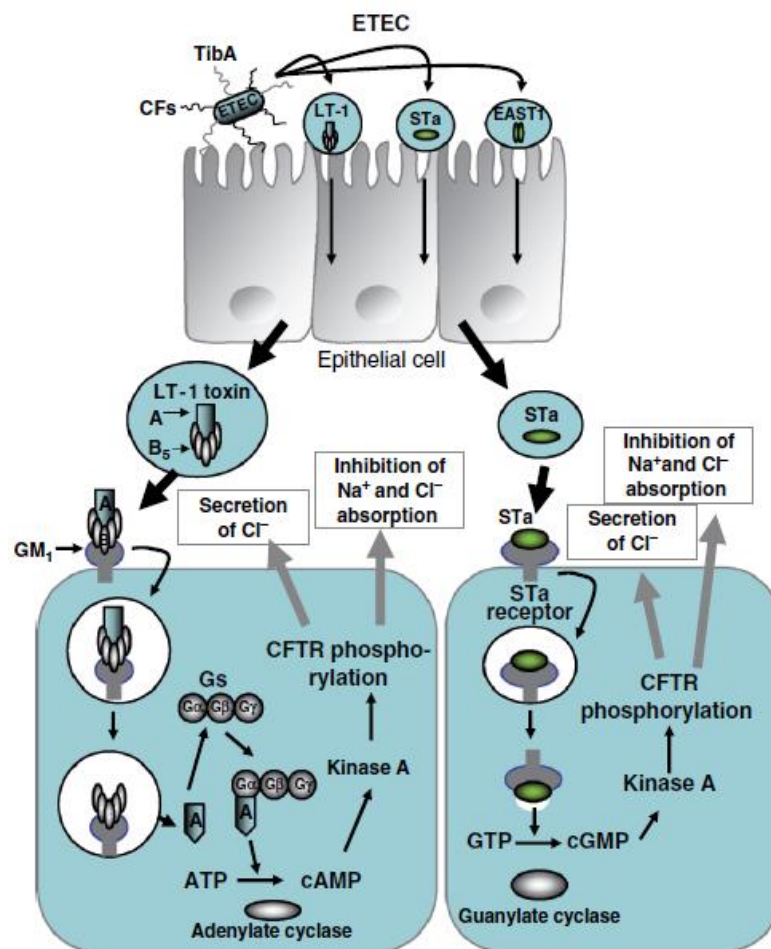
Toxina termolábil: Están codificadas por cromosomas, son oligoméricas, están relacionadas con la enterotoxina del cólera, por que comparten algunas características como: la estructura de la holotoxina, secuencia proteica, identificación del receptor primario, y actividad enzimática. La termo-lábil LTI está asociada a enfermedades de humanos y animales y LTII solo en animales (Nataro & Kaper, 2004 & Spangler, 1992).

LTI: es una toxina oligomérica de 86 kDa compuesta de una subunidad A de 28 kDa y cinco idénticas subunidades de 11.5 kDa. La enterotoxina LT aumenta el nivel intracelular de monofosfato adenosina cíclico cAMP, provocando que se abran los canales de cloro y exista una

reducción de la absorción del NaCl, como resultado se dará una diarrea osmótica (Natarro, & Kaper, 2004; Sears & Kaper, 1996).

Toxina termoestable: Se divide en STI y STII, difieren en la estructura y mecanismo de acción y están codificadas por plásmidos, ST aumenta el nivel intracelular de monofosfato de guanidina cíclico cGMP, y produce un desbalance de electrolitos (Natarro, 1998, Sears & Kaper, 1996).

Figura 1.5. Mecanismo de acción de la *E. coli* Enterotoxigénica, de las toxinas: LT, ST y EAST1



Fuente: Bhundia, 2008

Se diagnostica por la prueba de asa ligada de conejo para LT, cultivos celulares, ELISA para LT y ST, hibridación con sondas específicas y PCR para identificación de ST y LT (Rodríguez, 2002).

1.4.6.2. *Escherichia coli* Enteroinvasiva (EIEC):

La EIEC está relacionada con *Shigella* spp. genéticamente, son taxonómicamente indistinguibles a nivel de especies. Los pacientes presentan una colitis inflamatoria, diarrea acuosa y disentería (Nataro & Kaper, 2004 & Rodríguez, 2002).

- Mecanismo de acción:

La fase temprana de patogenicidad incluye la penetración de la célula epitelial, seguida por lisis de la vacuola. De esta manera, EIEC invade el epitelio del colon, se adhiere a la mucosa requiriendo de dos proteínas mucinasas y adhesinas, para entrar a endocitosis en la célula, multiplicándose adentro de ella y diseminándose a las células sanas adyacentes (Rodríguez, 2002; Nataro & Kaper, 2004).

El mecanismo de patogenicidad está en el loci del cromosoma y plásmido, los genes de la invasividad se encuentran en un plásmido de 140 MDa llamado pInv, que codifica proteínas, como Ipa y otras que están involucradas en el proceso de patogénesis (Rodríguez, 2002).

La detección se puede realizar por la prueba de Sereny en cobayo, invasividad en células HeLa, ELISA, hibridación por sondas, y PCR (Rodríguez, 2002).

1.4.6.3. *Escherichia coli* Enteropatogénica (EPEC):

La EPEC fue la primera variedad que se identificó serológicamente, esta bacteria no produce ninguna toxina, su principal factor de

patogenicidad es la adherencia. Provoca una diarrea acuosa, con vómito y fiebre (Ochoa, s/a & Rodríguez, 2002).

- Mecanismo de acción

La ECEP se adhiere íntimamente a la membrana de las células epiteliales, lo que se conoce como “adherencia y esfacelamiento” (A/E). La adherencia está mediada por pilis o fimbrias llamadas Bfp (en inglés *bundle-forming pilus*), codificados por un plásmido EAF (factor de adherencia ECEP) y de algunos genes cromosomales (Rodríguez, 2002).

Los genes que son codificados por plásmidos y cromosomas son necesarios para A/E. La síntesis de la proteína íntima de membrana externa, necesaria para la adherencia, es codificada por el gen cromosomal *eae* (Nataro & Kaper, 1998).

EAF es responsable de que el gen *bfp* codifique la formación del pili, en las células epiteliales y microcolonias, dando lugar a la adherencia (Donnenberg, 1992).

Las ECEP se consideran típicas cuando tienen los genes *eae* que participa en A/E y el plásmido EAF que codifica para *bfp*. Se consideran atípicas cuando solo presentan genes *eae* y no *bfp*. Para diagnosticarla existen ensayos in vitro, en cultivos celulares, y métodos moleculares como PCR (Rodríguez, 2002).

1.4.6.4. *Escherichia coli* Enteroagregativa (ECEA):

ECEA tiene la capacidad de incrementar la mucosa y secreción del moco, se adhieren al epitelio intestinal por unas fimbrias de adherencia agregativa (AAFs en inglés *aggregative adherence fimbriae*) produciendo inflamación y daño de la mucosa, existen cuatro variantes alélicas de AAFs (Nataro, 2005; Nataro & Kaper, 2004).

Algunas toxinas han sido descritas para ECEA, la enterotoxina EAST1 es responsable de la diarrea acuosa, sin embargo el gen de esta (*astA*) puede ser aislado de comensales de *E. coli*. Este patotipo secreta una enterotoxina llamada Pet, codificada por un plásmido. Algunos factores de virulencia de ECEA están regulados por un activador transcripcional llamado AggR que se encuentra en un plásmido de 60 Mda. El diagnóstico puede darse por una prueba de adherencia agregativa en células Hep-2 y HeLa, hibridación de sondas y PCR (Nataro & Kaper, 2004; Baudry, *et al*, 1990).

1.4.6.5. *Escherichia coli* Enterohemorrágica (ECEH):

La *Escherichia coli* productora de toxina Shiga es un patógeno transmitido por alimentos, que se asocia a casos esporádicos y brotes de diarrea, colitis hemorrágica y síndrome urémico hemolítico SHU. El serotipo más aislado es *E.coli* O157:H7. Las cepas ECEH no-O157 no tienen una característica bioquímica que las diferencie del resto de *E.coli*. La O157:H7 no fermenta sorbitol y no posee actividad β -glucoronidasa (Rivas, *et al*, 2007).

- Mecanismo de acción

ECEH tiene los siguientes marcadores moleculares (Patón, *et al*, 1998).

a. Citotoxinas (Stx): tienen una estructura de dos subunidades, A-B; codificadas por bacteriófagos. Pueden producir Stx1, Stx2 ó variantes de las dos, presentarse solas o con las dos citotoxinas (Friedrich *et al.*, 2003).

Estas dos citotoxinas presentan similitud en su estructura y función, pero se diferencian en su toxicidad en tejidos celulares y en animales. Stx2

es más citotóxica que Stx1 y es causante de diarreas sanguinolenta y tienen mayor riesgo de desarrollar SHU (Rivas, et al, 2007).

Según Scheutz y Strockbine (2005), se clasifican en 6 tipos, 1, 2, 2c, 2d, 2e y 2f, y se los agrupan en 22 variantes Stx.

b. En O157:H7 se encuentra un plásmido de 60 MDa, que contiene algunos genes que codifican para los factores de virulencia de espP, katP, hlyA, etp (Rivas, et al, 2007).

c. Los factores de adherencia intestinal pueden codificar o no en la región LEE (en inglés *locus of enterocyte effacement*), el que codifica en esta es el gen eae (Rivas, et al, 2007).

1.4.6.6. *Escherichia coli* Entero difusa adherente (ECDA):

La ECDA corresponde a un grupo heterogéneo de microorganismos con virulencia variable; se identifica por su adherencia a células Hep-2 en un patrón difuso; posee una fimbria F1845 que participa en el fenómeno de adherencia difusa; los genes que la codifican pueden estar en el cromosoma o en un plásmido (Rodríguez, 2002).

Las cepas ECDA inducen un efecto citopático, se debe a un desarrollo de la extensión celular que está junto a la adherencia de la bacteria (Nataro & Kaper, 2004).

ECDA ha sido asociado a casos de diarrea en niños menores de 1 año, el diagnóstico se lo realiza por una prueba de adherencia difusa en células Hep-2 y HeLa y PCR (Rodríguez, 2002).

1.4.7. Métodos moleculares:

1.4.7.1. Aislamiento de ADN

En un análisis molecular es fundamental realizar primero una extracción de ADN para separarlo de todos los componentes celulares: proteínas, ARN, lípidos, iones inorgánicos, entre otros, sin alterar físicamente y químicamente. Con un correcto aislamiento se obtiene ADN de buena calidad, íntegro, puro y concentrado. Aunque existen diferentes métodos para el aislamiento, los pasos esenciales para un buen aislamiento y purificación son los siguientes (Surszycki, 2000):

- a. Lisis celular
- b. Remoción de proteínas y RNA
- c. Concentración del DNA
- d. Determinación de la concentración y pureza

Surszycki (2002) recomienda conservar el ADN a -80°C en un congelador o a -120° en nitrógeno líquido, para evitar su degradación.

El ADN de *E. coli* está localizado en el nucleoide, la composición de su célula es 70% agua, 0.4% aminoácidos, 2.2% lípidos, 15% proteínas, 6% ARN y 1% iones inorgánicos y ADN (Surszycki, 2000).

1.4.7.2. La reacción en cadena de la polimerasa PCR

La PCR es una técnica de biología molecular, descrita por Kary Mullis, que permite la amplificación enzimática *in vitro* de un segmento de ADN específico. En la investigación de patógenos, la PCR es la indicada para amplificar una región específica del ADN que permite la detección de determinado locus de virulencia (Barrera & Rodríguez, 2004).

La amplificación de la PCR se da en tres pasos:

a).Desnaturalización del ADN: La temperatura se incrementa para separar las dos cadenas que componen la doble hélice del DNA.

b).Hibridación: Disminuye la temperatura de reacción, para que pequeñas secuencias de ADN de cadena sencilla, se unan a sus secuencias complementarias del ADN diana.

c).Extensión: Se eleva la temperatura de la reacción a la óptima de la polimerasa de ADN (Dorado, s/a).

Estos tres pasos se repiten “n” veces, duplicando en cada ciclo el número de cadenas delimitadas por los oligos. La PCR es una amplificación exponencial o logarítmica, en que las cadenas previamente sintetizadas sirven de molde a futuras amplificaciones. Técnicas convencionales para la investigación de *E. coli* diarreogénicas han sido publicadas. La PCR multiplex es una técnica variante de la convencional en la que dos o más dianas son simultáneamente amplificadas en la misma reacción utilizando varios pares de primers (Henegariu *et al*, 1997).

1.4.7.3. *PCR Multiplex*

Consiste en la amplificación de varias secuencias a la vez, de esta forma se reduce el gasto de reactivos y tiempo invertido, especialmente cuando se analiza un gran número de muestras. Se han descrito amplificaciones múltiples de decenas de secuencias. Una de las desventajas de esta variante es su puesta a punto, ya que es empírica. Así, al añadir o eliminar una pareja de cebadores de una PCR múltiple, se pueden alterar los rendimientos previos del resto de secuencias amplificadas. Por ello, se recomienda hacer la optimización incluyendo desde el inicio todas las secuencias que se deseen amplificar (Innis, *et al*, 1999, Dorado, s/a).

1.4.7.3.1. *Optimización de PCR multiplex*

Una rápida optimización para realizar una PCR multiplex específica y eficiente, requiere de algunos parámetros críticos, el principal problema es la formación de dímeros de primers, que son productos pequeños.

Se debe optimizar la enzima polimerasa, las concentraciones de MgCl₂, temperatura de reacción e hibridación (Innis, et al, 1999).

La PCR multiplex debe ser optimizada para evitar la formación de dímeros o fragmentos inespecíficos, evitando las altas concentraciones para inhibir interacciones débiles entre ellos (Brownie, et al, 1999).

Para reducir el número de ensayos necesarios para la detección de DEC, se han desarrollado varios sistemas de PCR múltiple para la amplificación simultánea de dos o más loci en una única reacción, identificando las siguientes categorías de *E. coli* patógenas cuyos marcadores de virulencia ya están bien definidos: ECET, ECEP, ECEI, ECEH, ECEA, ECDA (Fusco Da Costa, 2010).

La amplificación in vitro de los ácidos nucleicos usando la PCR se ha convertido en una herramienta valiosa complementaria a los métodos de detección convencional. Entre sus ventajas para la automatización está la velocidad, límite de detección, especificidad, y sensibilidad (Molorny, et al, 2002).

1.4.7.4. *Electroforesis de ADN*

Una PCR convencional requiere de la visualización de los amplicones. Para ello, la electroforesis en gel de agarosa es una técnica rápida y simple, que consiste en la separación de moléculas a través de

una matriz tamponada. La agarosa es un polisacárido compuesto de 400 unidades aproximadamente de agarobiosa, su peso molecular es de 120,000 daltons (Surszycki, 2000).

Para la migración de los fragmentos se debe tener en cuenta el tamaño de las moléculas, concentración del gel de agarosa, voltaje aplicado, conformación de DNA y buffer usado para electroforesis (Surszycki, 2000).

1.4.8. Límite de detección

El límite de detección es la cantidad más pequeña de copias de genomas de agentes infecciosos que puede detectarse y distinguirse a partir de un resultado cero, se determina a partir de una dilución del cultivo o ADN (OPS, 2006).

La PCR tiene la ventaja de dar un buen límite de detección, especificidad y sensibilidad. Teóricamente la muestra pre-enriquecida puede ser detectada de 10^3 - 10^4 células/ml y la bacteria en la reacción al menos de 10-100 copias de (Malorny, et al, 2002).

1.5 Sistema de hipótesis

La implementación de PCR múltiple permite la identificación de los genes patógenos y consiguiente diferenciación de las serovariedades de *Escherichia coli*.

CAPÍTULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Participantes

La presente tesis se realizó con la colaboración financiera del Instituto Nacional de Higiene y Medicina Tropical. “Leopoldo Izquieta Pérez”. Bajo la dirección y codirección de docentes de la Escuela Politécnica del Ejército, B.Sc. Karina Ponce y Dr. Marcelo Grijalva.

Las seis cepas puras de las variedades patógenas de *Escherichia coli* fueron proporcionadas por el Dr. PhD James Nataro de la Universidad de Virginia y Dr. Roberto Vidal del Instituto de Ciencias Biomédicas de la Universidad de Chile.

2.2. Zona de estudio

La investigación se realizó en los laboratorios de Microbiología y Campos Pulsados del Instituto Nacional De Higiene y Medicina Tropical. “Leopoldo Izquieta Pérez”, ubicados en la Ciudad de Quito en la calle Yaguachí e Iquique, cantón Quito, provincia Pichincha.

2.3. Período de investigación

Este proyecto inició en julio del 2011 y concluyó en enero del 2012.

2.4. Diseño

El trabajo de investigación tuvo un diseño de tipo exploratorio-confirmativo porque es el punto de partida para estudios posteriores de mayor profundidad.

La fase exploratoria comprendió la optimización del sistema de una PCR multiplex para la identificación de los genes *eltB* y *estA* de *E.coli* enterotoxigénica, *vt1*, *vt2* y *eaeA* de *E.coli* enterohemorrágica, *ipaH* de *E.coli* enteroinvasiva, *eaeA* de *E.coli* enteroagregativa y *DA* de *E.coli* difusa adherente.

La fase confirmatoria y de campo, consistió en aplicar el sistema optimizado de la PCR multiplex para la detección de las patovariedades de *E. coli* y observar su sensibilidad y especificidad con otras cepas incluyendo *E. coli* no patógenas del cepario del Laboratorio de Epidemiología Molecular-Campos Pulsados del Instituto Nacional de Higiene y Medicina Tropical “Leopoldo Izquieta Pérez”.

2.5. Procedimientos

2.5.1. Obtención de cepas *E. coli* patógenas

Las cepas fueron enviadas en agar nutritivo por el Instituto de Ciencias Biomédicas de la Universidad de Chile y sembradas en agar sangre de borrego. Se realizó la identificación de *E. coli* patógenas por microbiología y pruebas bioquímicas cortas con agar citrato de Simmons (Merck), hierro de Kligler (Merck), hierro de lisina (Merck), SIM (Merck), caldo de Vogues Proskauer (Difco), caldo de rojo de metilo (Difco), caldo urea (Merck) y galería API 20E BioMérieux ® para la identificación completa.

Se sembró en diferentes agares (ver Tabla 2.1) para la identificación de cepas de *Escherichia coli* especialmente ECEH.

Tabla 2.1 Medios sólidos para la detección de *E. coli* patógenas.

Medios sólidos	FUNDAMENTO	Interpretación de resultados		
		<i>E. coli</i> O157 H7	<i>E. coli</i> patógenas	Contaminantes
Agar McConkey	Las colonias lactosa positivas son rojas por la acidificación detectada con el indicador rojo neutro	Rojas con halo turbio		Incoloras
Agar McConkey Sorbitol (SMAC)	La fórmula es similar al Agar Mac Conkey pero la lactosa ha sido reemplazada por sorbitol.	Transparentes	Rosadas	
Agar McConkey Sorbitol + Telurito + Cefixima (CT-SMAC)	El suplemento de telurito de potasio y cefixima era inhibitorio de muchas otras bacterias entéricas no fermentadoras de sorbitol como <i>Proteus</i>	Transparentes	Rosadas	
MUG	Reacciona con bacterias productoras de β -Dglucuronidasa dando 4-metilumbeliferona, que fluoresce al irradiar con luz ultravioleta	Verdoso	Amarillo	Pardo/negro
Agar Fluorocult <i>E. coli</i> O157:H7	El MUG evidencia las cepas β -Dglucuronidasa positivas ya que son fluorescentes a la radiación con la luz UV de larga longitud de onda	Sin fluorescencia	Fluorescencia	Blancas

2.5.2. Siembra de cepas *E. coli* patógenas.

Se sembró las seis *E. coli* patógenas en agar Mac Conkey (Difco) y se incubó a 37°C por 24 horas.

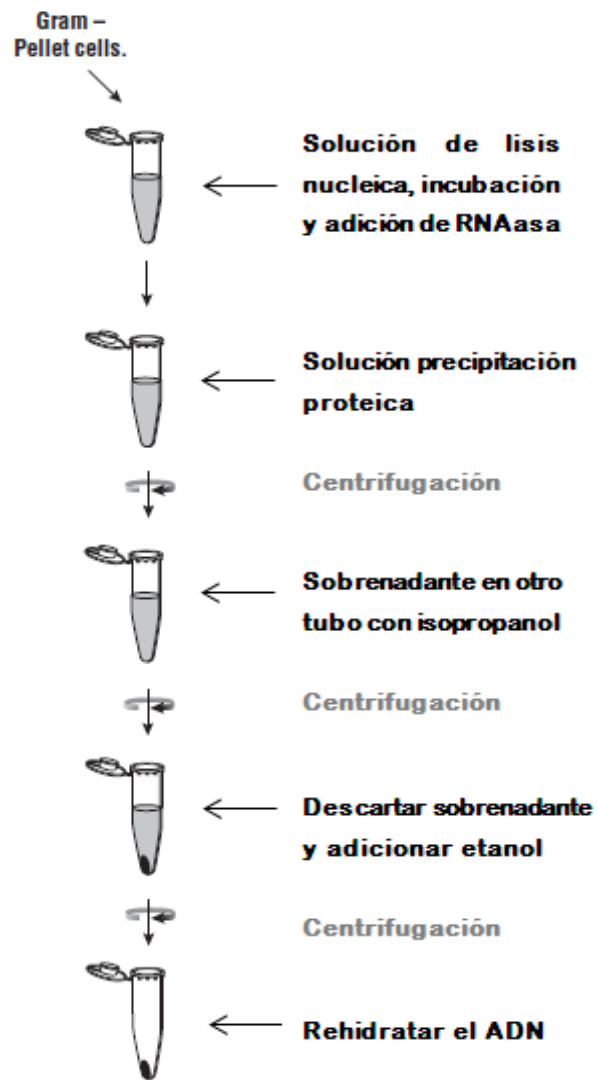
Se tomó una cantidad de colonias, luego se suspendió en 1 ml de buffer de suspensión, y se procedió a leer la densidad óptica, DO, igual a uno, en el Biofotómetro Plus de Eppendorf®.

2.5.3. Aislamiento de ADN genómico

A partir de suspensiones bacterianas se extrajo el ADN según el protocolo del Kit comercial de Promega Wizard Genomic DNA Purification, con los pasos que se describen a continuación (Promega, 2010):

- Se adicionó 1 ml del cultivo bacteriano y se centrifugó 2 minutos a 13,000-16,000 xg. Se removió el sobrenadante y se adicionó 600 μ L de la solución de lisis nucleica.
- Se incubó a 80°C por 5 minutos para la lisis celular y se adicionó 3 μ L de la solución de RNAsa.
- Luego se incubó 37°C por 15-60 minutos y se enfrió la muestra a temperatura ambiente. Posteriormente se adicionó 200 μ L de la solución de precipitación proteica.
- Después de ese tiempo, se centrifugó 3 minutos a 13,000-16,000 xg y se transfirió el sobrenadante con el ADN a un tubo de 1,5 mL que contenía 600 μ L del isopropanol.
- Cuidadosamente se mezcló por inversión el ADN y se centrifugó por 2 minutos a 13,000-16,000 x g.
- Se descartó cuidadosamente el sobrenadante y adicionó 600 μ L de etanol al 70% a temperatura ambiente y se invirtió varias veces.
- Finalmente se tuvo que centrifugar a 13,000-16,000 xg por 2 minutos y se secó el tubo en un papel absorbente y se dejó que el pellet se secase por 10 a 15 minutos.
- Se adicionó 100 μ L de la solución de rehidratación de DNA y se incubó a 65°C una hora.
- Se almacenó el DNA a -80°C.

Figura 2.1. Diagrama del aislamiento de ADN de bacterias Gram negativas.



Fuente: Promega, 2010

2.5.4. Electroforesis del ADN genómico

Para poder visualizar la integridad del ADN extraído, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1% por 1 hora a 110V, la tinción del gel se la realizó con bromuro de etidio y luego fue visualizado en luz UV en el transiluminador de UVP de Benchtop.

2.5.5. Sistema PCR

2.5.5.1. Cebadores o Primers

Las secuencias de los cebadores fueron obtenidas de Nguyen *et al* (2005) y Aranda, *et al* (2006). Posteriormente se utilizó el programa bioinformático *ClustalX versión 2.0* para visualizar el alineamiento de los primers.

Cuadro 2.1. Secuencia de cebadores de los factores de virulencia de las patovariedades de *E. coli*.

GEN	SECUENCIA PRIMERS 5'-3'	TAMAÑO (bp)	TM (C)	Microorganismo
<i>eltB</i>	5'-TCTCTATGTGCATACGGAGC-3' 5'-CCATACTGATTGCCGCAAT-3'	322	62°C 61°C	ECET
<i>estA</i>	5'-GCTAAACCAGTAGAGTCTTCAAAA-3' 5'-CCCGGTACAAGCAGGATTACAACA-3'	147	57°C	ECET
<i>vt1</i>	5'-GAAGAGTCCGTGGGATTACG-3' 5'-AGCGATGCAGCTATTAATAA-3'	130	57°C 63°C	ECEH
<i>vt2</i>	5'-ACCGTTTTTTCAGATTTTACACATA-3' 5'-TACACAGGAGCAGTTTCAGACAGT-3'	298	57°C	ECEH
<i>eae</i>	5'-CACACGAATAAACTGACTAAAATG-3' 5'-AAAAACGCTGACCCGCACCTAAAT-3'	376	63°C 69°C	ECEP
<i>ipaH</i>	5'-GTTCCCTTGACCGCCTTTCCGATACCGTC-3' 5'-GCCGGTCAGCCACCCTCTGAGAGTAC-3'	600	59°C 60°C	ECEI
<i>aggR</i>	5'-GTATACACAAAAGAAGGAAGC-3' 5'-ACAGAATCGTCAGCATCAGC-3'	230	58°C 64°C	ECEA
<i>DA</i>	5'-GCTGGGCAGCAAAGTATAACTCT-3' 5'-CATCAAGCTGTTTGTTCGTCCGCCG-3'	750	68°C 72°C	ECDA

Los primers forward y reverse de todos los genes, fueron reconstituidos de acuerdo al número de moles de cada primer de INVITROGEN, de esta manera se obtuvo una concentración de 100 µM de cada primer y luego se procedió a bajar la concentración a 10 µM, con la cual se trabajó en la máster mix.

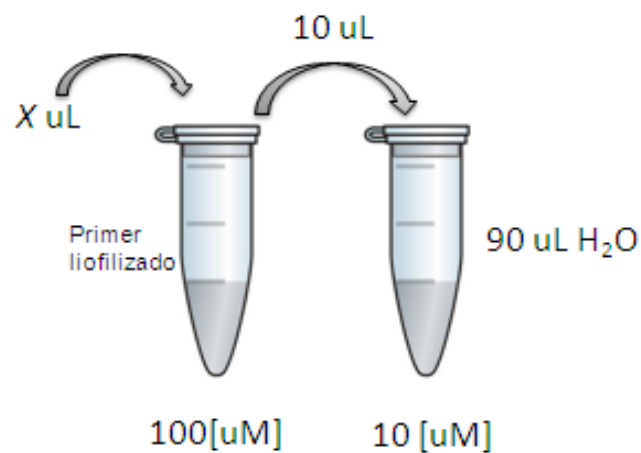
$$Xnmol \times \frac{1000pmol}{1nmol} \times \frac{1uL}{100pmol} = XuL$$

Donde:

Xnmol = nmoles del primer de cada gen.

X μ L = Volumen que se debe agregar de agua para reconstituir cada primer.

Figura 2.2. Primers reconstituidos a una concentración de 100 μ M.



(Autora)

Una vez reconstituidos los primers o cebadores, se alicuotaron y se procedió a almacenarlos a -20°C .

2.5.5.2. Optimización PCR monoplex

2.5.5.2.1 Temperatura de hibridación

Para cada par de primer, se evaluó el gradiente de temperatura con diferentes rangos y se eligió la apropiada.

Cuadro 2.2. Protocolo de Máster Mix del gradiente de temperatura para hibridación de primers en la amplificación de los genes.

Reactivo	Concentración inicial	Concentración final	1 RX	9 RX
Agua			9,5 uL	85,5 uL
PF	10 uM	0,4 uM	1 uL	9 uL
PR	10 uM	0,4 uM	1 uL	9 uL
Go Taq Hot Start Green	2X	1X	12,5 uL	112,5 uL
DNA			1 uL	9 uL
Volumen final			25	

Cuadro 2.3. Condiciones del termociclador.

Pasos	Temperatura	Tiempo	# Ciclos
Denaturación inicial	94°C	4 min	1
Denaturación	94°C	1 min	
Hibridación	55,7-65,0°C	1 min	30
Extensión	72°C	1 min	
Extensión final	72°C	7 min	1

La temperatura de hibridación se modificó en cada par de cebadores, el rango que se evaluó fue de 56°C-68°C en el termociclador S1000 (Biorad).

2.5.5.2.2. Concentración de cebadores

Para la optimización del sistema monoplex fue necesario variar las concentraciones de cada primer y escoger la más óptima. Se trabajó con concentraciones finales de 0,2 µM, 0,4 µM, 0,5 µM, 0,75 µM y 1 µM.

2.5.5.2.3. Condiciones del termociclador

Con la finalidad de realizar una PCR en menor tiempo, pero sin alterar la eficiencia del sistema se evaluó tiempos de denaturación, hibridación y extensión de 20 segundos, 45 segundos y 1 minuto, con 30 ciclos.

2.5.5.3. Optimización PCR Multiplex

2.5.5.3.1 Pool de todos los ADN

Antes de optimizar el sistema de PCR multiplex se procedió a realizar un pool de ADN para obtener en el gel de agarosa un carril con todos los fragmentos de los genes de las enterovarietades de *E. coli*.

2.5.5.3.2. PCR multiplex de todas las enterovarietades de *E. coli*

En el primer ensayo se colocó en la máster mix, ocho pares de primers de *E. coli* patógenas, para identificar a cada una de las bacterias.

Cuadro 2.4. Máster Mix del primer ensayo de PCR multiplex para la identificación de enterovarietades de *Escherichia coli*.

Reactivo	Concentración inicial	Concentración final	1 RX	3 RX
Agua			20,5 uL	61,5 uL
PFeae	10 uM	0,4 uM	1 uL	3 uL
PRae	10 uM	0,4 uM	1 uL	3 uL
PFvt1	10 uM	0,4 uM	1 uL	3 uL
PRvt1	10 uM	0,4 uM	1 uL	3 uL
PFvt2	10 uM	0,4 uM	1 uL	3 uL
PRvt2	10 uM	0,4 uM	1 uL	3 uL
PFDa	10 uM	0,4 uM	1 uL	3 uL
PRDa	10 uM	0,4 uM	1 uL	3 uL
PFipaH	10 uM	0,4 uM	1 uL	3 uL
PRipaH	10 uM	0,4 uM	1 uL	3 uL
PFeltB	10 uM	0,4 uM	1 uL	3 uL
PReltB	10 uM	0,4 uM	1 uL	3 uL
PFestA	10 uM	0,4 uM	1 uL	3 uL
PRestA	10 uM	0,4 uM	1 uL	3 uL
PFaggR	10 uM	0,4 uM	1 uL	3 uL
PRaggR	10 uM	0,4 uM	1 uL	3 uL
Go Taq Hot Start Green	2X	1X	12,5 uL	38 uL
DNA (ECEH, ECEP, ECET, ECEA)			1 uL	1 uL
Volumen total			50 uL	

2.5.5.3.3. PCR dúplex de las 6 enterovarietades

Debido a la similitud de los pares de base del producto amplificado de la PCR multiplex, se realizó combinaciones entre dos pares de primers, que tenían una amplia separación de pares de bases.

2.5.5.3.4. Diseño de la PCR multiplex A y B

Se realizó dos multiplex A y B, la primera identificó los genes de las enterovarietades de *E. coli* ECEH, ECEH, ECDA y la segunda ECET, ECEA, ECEI.

Cuadro 2.5. Máster Mix de PCR multiplex A.

Reactivo	Concentración inicial	Concentración final	1 RX	4 RX
Agua			5 uL	20 uL
PFeae	10 uM	0,3 uM	0,75 uL	3 uL
PRae	10 uM	0,3 uM	0,75 uL	3 uL
PFvt1	10 uM	0,5 uM	1,25 uL	5 uL
PRvt1	10 uM	0,5 uM	1,25 uL	5 uL
PFvt2	10 uM	0,2 uM	0,5 uL	2 uL
PRvt2	10 uM	0,2 uM	0,5 uL	2 uL
PFDa	10 uM	0,3 uM	0,75 uL	3 uL
PRDa	10 uM	0,3 uM	0,75 uL	3 uL
Go Taq Hot Start Green	2X	1X	12,5 uL	50 uL
DNA (ECEH, ECEP, ECDA)			1 uL	1 uL
Volumen final			25 uL	

Cuadro 2.6. Máster Mix para PCR multiplex B

Reactivo	Concentración inicial	Concentración final	1 RX	4 RX
Agua			5,38 uL	22 uL
PFipaH	10 uM	0,124 uM	0,31 uL	1,2 uL
PRipaH	10 uM	0,124 uM	0,31 uL	1,2 uL
PFeltB	10 uM	0,4 uM	1 uL	4 uL
PReltB	10 uM	0,4 uM	1 uL	4 uL
PFestA	10 uM	0,5 uM	1,25 uL	5 uL
PRestA	10 uM	0,5 uM	1,25 uL	5 uL
PFaggR	10 uM	0,2 uM	0,5 uL	2 uL
PRaggR	10 uM	0,2 uM	0,5 uL	2 uL
Go Taq Hot Start Green	2X	1X	12,5 uL	50 uL
DNA (ECEI, ECET, ECEA)			1 uL	1 uL
Volumen total			25 uL	

Cuadro 2.7. Condiciones del termociclador para la multiplex A.

Pasos	Temperatura	Tiempo	# Ciclos
Denaturación inicial	96°C	4 min	1
Denaturación	94°C	45 seg	
Hibridación	57°C	45 seg	30
Extensión	72°C	45 seg	
Extensión final	72°C	7 min	1

Los amplicones se visualizaron en un gel de agarosa al 2,5% con un tiempo de 110 minutos y voltaje de 90V.

Los fragmentos de las bandas que se visualizaron fueron de 600pb para ECEI, 322pb y 147pb para ECET; y 230pb para ECEA.

2.5.5.4. Determinación de la sensibilidad analítica del sistema

2.5.5.4.1 Sensibilidad analítica medida en concentración de ADN

La mínima concentración de ADN detectable se determinó por los dos sistemas de PCR multiplex A y B, las diluciones fueron en buffer TE.

Para poder determinar la sensibilidad analítica de los dos sistemas se tomó como referencia controles positivos de ECEH y ECET, en la PCR multiplex A y B respectivamente, partiendo de una concentración de ADN de 3 ng/ μ L y realizando diluciones seriadas 1:2.

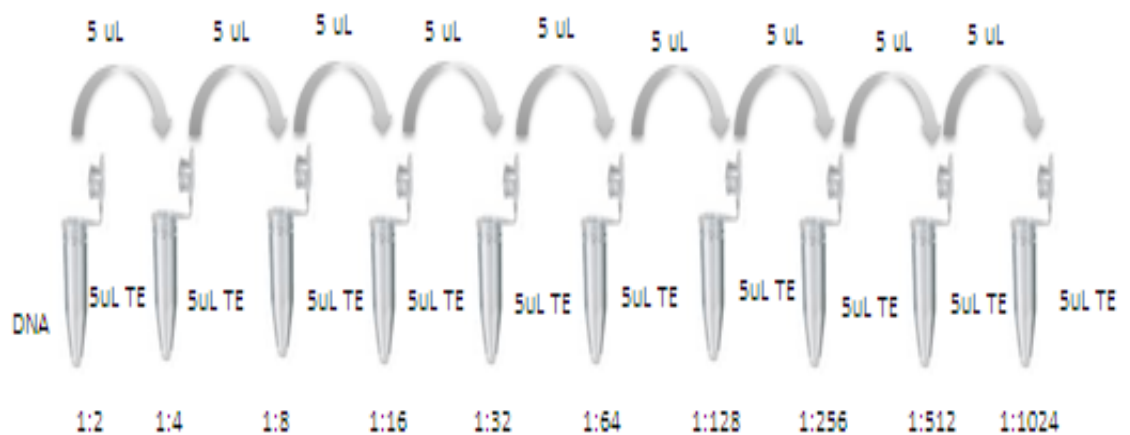


Figura 2.3. Diluciones seriadas del ADN (Autora).

2.6. Muestras de heces fecales

Se trabajó con 4 muestras fecales, a todas se les realizó la extracción de ADN directamente con el kit comercial Z.N.A Stool DNA kit de OMEGA (Ver Anexo A).

Posteriormente se aplicó el sistema de las dos PCR multiplex con un volumen final de 25 μ L en cada muestra y un control positivo y negativo.

CAPÍTULO 3: RESULTADOS

3.1. Cepas *E. coli*

Se analizaron microbiológicamente los controles positivos, que fueron seis cepas de *E. coli* patógenas enviadas desde Chile y cuatro *E. coli* del cepario del Laboratorio de Microbiología del INHMT, *E. coli* O157:H7, *E. coli* ATCC 25922, *E. coli* ATCC 51313 y *E. coli* no patógenas.

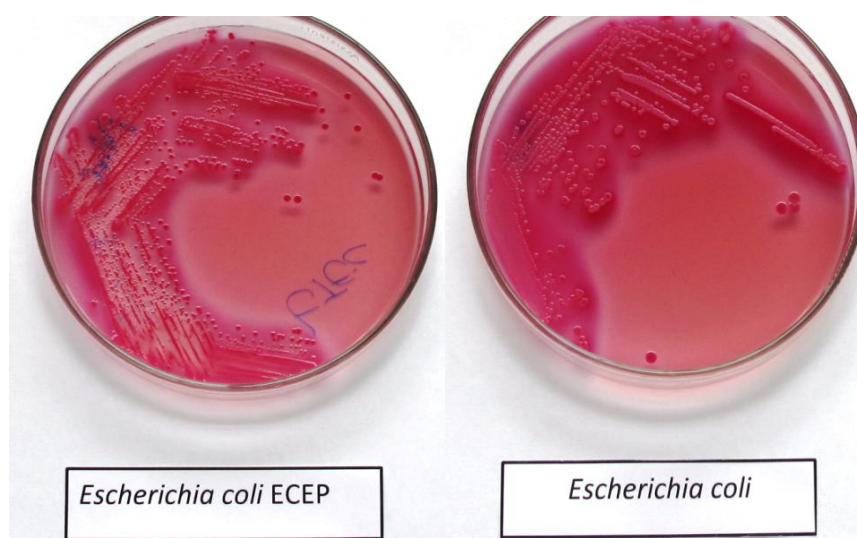


Figura 3.1. Siembra de *E. coli* patógena y no patógena en agar Mac Conkey.

En la Figura 3.1 la coloración rosada en el agar Mac Conkey es un indicador de fermentación de lactosa. Esta característica se observó tanto en *E. coli* no patógenas como patógenas.

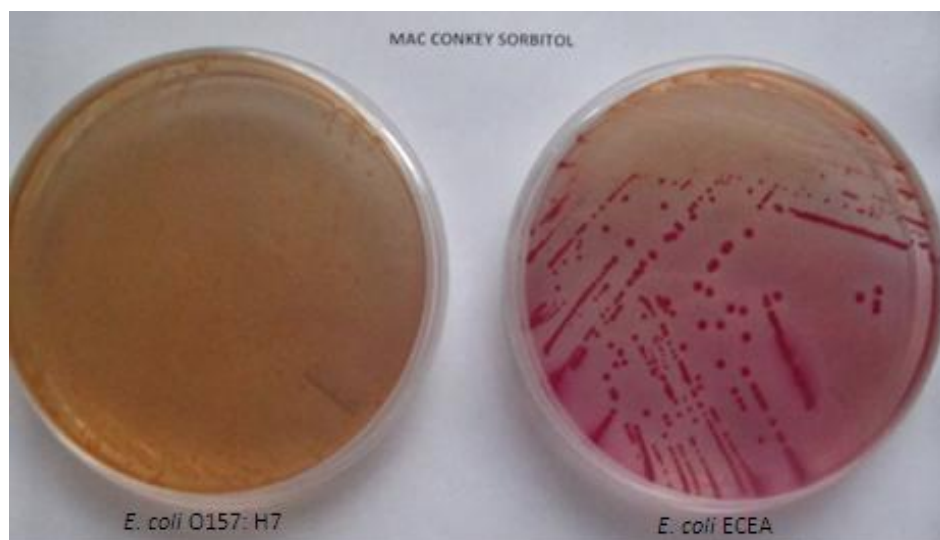


Figura 3.2. *E. coli* ECEA y *E. coli* O157:H7 sembradas en Agar Mac Conkey Sorbitol.

En la Figura 3.2 se observó que *E. coli* O157:H7 no es fermentadora de sorbitol en comparación con el resto de *E. coli* patógenas y no patógenas las cuales son fermentadoras de sorbitol presentándose colonias rosadas.



Figura 3.3. *E. coli* ECET y *E. coli* O157:H7 analizadas en Agar Fluorocult.

En la Figura 3.3 se puede observar la diferencia de colonias *E. coli* O157:H7 en la caja Petri sin fluorescencia, las que no fueron fermentadoras de sorbitol. En la segunda caja Petri *E. coli* ECET se observó con un cambio de color debido a la fermentación de sorbitol y al observarse bajo luz UV se visualizó la fluorescencia.

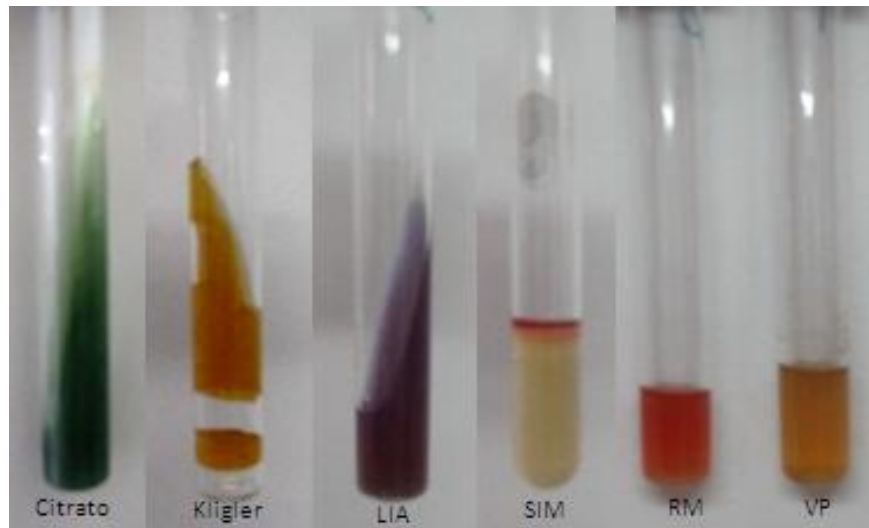


Figura 3.4. Pruebas bioquímicas positivas para *E. coli*.

A todas las cepas se les realizó pruebas bioquímicas con batería corta y galería de identificación API 20E.



Figura 3.5. Galería API 20E.

3.2. Aislamiento de ADN genómico

Se extrajo el ADN de las cepas control positivo, *E. coli* ATCC 25922, *E. coli* ATCC 51313, *E. coli* 0157:H7, *Salmonella* serotipo Enteritidis, *Vibrio cholerae*, *Klebsiella pneumoniae*. Y fue cuantificado en unidades ng/ μ L en biofotómetro Eppendorf®. Para observar la integridad del ADN, se visualizó en electroforesis de gel de agarosa al 1% corrido por 60 minutos a 110V.

3.2.1. ADN de controles positivos

Cuadro 3.1. Lecturas del ADN extraído de las cepas controles positivos

Muestra ADN	Lectura #1 ng/uL	Lectura#2 ng/uL	Lectura#3 ng/uL	Promedio ng/uL
<i>E. coli</i> ECET	35	32	34	33,6
<i>E. coli</i> ECEP	19,4	19,4	22	20,2
<i>E. coli</i> ECEI	17,6	19	17	17,8
<i>E. coli</i> ECEH	16,5	17	18,4	17,3
<i>E. coli</i> ECEA	48,3	48	46,3	47,5
<i>E. coli</i> ECDA	11,4	9,8	11,4	10,8

Las concentraciones de ADN genómico de los controles positivos presentaron valores variables.

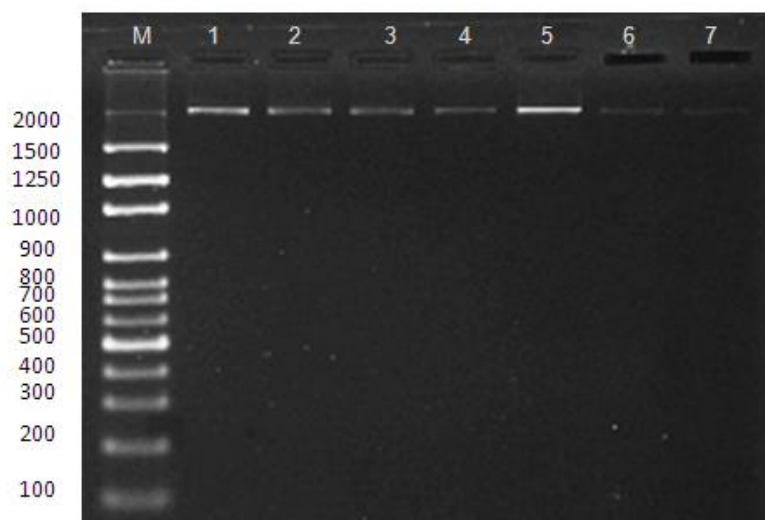


Figura 3.6. Fotografía de la extracción de ADN genómico mediante el Kitcomercial de Promega Wizard Genomic DNA Purification; visualizado en una electroforesis de gel de agarosa al 1% corrido por 60 minutos a 110V teñido con bromuro de etidio. Carril M: Marcador molecular de 100pb (Labnet); 1: ECET; 2: ECEP; 3: ECHE; 4: ECEI; 5: ECEA; 6: ECDA; 7: *E. coli*.

3.2.2. ADN de bacterias

Cuadro 3.2. Lectura de ADN extraído de algunas bacterias.

Muestra ADN	Lectura #1 ng/L	Lectura#2 ng/uL	Lectura#3 ng/uL	Promedio ng/uL
<i>E. coli</i>	33,8	30	34	32,6
<i>E. coli</i> ATCC 25922	18,6	17,5	17,5	19,3
<i>E. coli</i> ATCC 51313	23,5	24	23,5	23,6
<i>E. coli</i> O157:H7	22,8	23,9	22,8	23,1
<i>Salmonella</i> serotipo Enteritidis	33,4	33,4	33,4	33,4
<i>Vibrio cholera</i>	17,5	16	16	16,5
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	19	20,8	19,9	19,9



Figura 3.7. Fotografía de extracción de ADN genómico mediante el Kit comercial de Promega Wizard Genomic DNA Purification; visualizado en una electroforesis de gel de agarosa al 1% corrido por 45 minutos a 110V, teñido con bromuro de etidio. Carril M: Marcador molecular de 100 pb; 1: *E. coli* ATCC 25922; 2: *E. coli* ATCC 51313; 3: *E. coli* O157:H7; 4: *Salmonella* serotipo Enteritidis; 5: *Vibrio cholerae*; 6: *Klebsiella neumoniae*.

3.3. Optimización PCR multiplex

Previo a la optimización de la PCR multiplex, se realizarón pruebas preliminares, como el gradiente de temperatura de hibridación, concentración de cebadores o primers y condiciones del termociclador.

3.3.1. Gradiente de Temperatura

Para evaluar la temperatura de hibridación de las secuencias de primers, se trabajó con la master mix del Cuadro 2.2. y se programó el termociclador modificando la temperatura de hibridación para cada par de primer (ver Cuadro 2.3). Finalmente se visualizaron todos los primers en geles de agarosa al 2.5% corridos a 90V por 110 minutos, teñidos con bromuro de etidio y visualizados en luz UV.



Figura 3.8. Fotografía de la corrida electroforética del gradiente de temperatura para hibridación de primers para amplificación del gen *ipaH* de ECEI y *eae* de ECEP y ECEH. M: marcador molecular 100pb (Labnet); Carriles 1,2,3,4: gen *ipaH*, Carriles 5,6,7,8: gen *eae*.

Cuadro 3.3. Temperatura de hibridación de los oligos para los genes *ipaH* y de *eae*.

Carril	Gen	Temperatura de hibridación
1	<i>ipaH</i>	68,1°C
2	<i>ipaH</i>	65,1°C
3	<i>ipaH</i>	63°C
4	<i>ipaH</i>	60°C
5	<i>eae</i>	65,1°C
6	<i>eae</i>	62,1°C
7	<i>eae</i>	60°C
8	<i>eae</i>	57°C

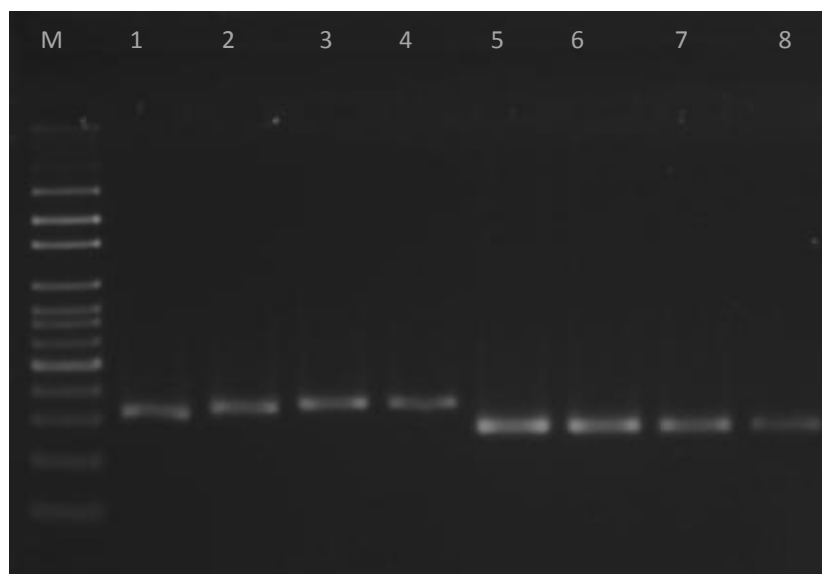


Figura 3.9. Fotografía de la corrida electroforética del gradiente de temperatura para hibridación de primers para amplificación del gen eltB de ECET y aggR de EAEC. M: marcador molecular 100pb;carriles 1,2,3,4: gen eltB, carriles 5,6,7,8: gen agg.

Cuadro 3.4. Temperatura de hibridación de los oligos para los genes eltB y aggR.

Carril	Gen	Temperatura de hibridación
1	eltB	60,3°C
2	eltB	58,5°C
3	eltB	57°C
4	eltB	56°C
5	aggR	58,4°C
6	aggR	57,4°C
7	aggR	55,8°C
8	aggR	53,9°C

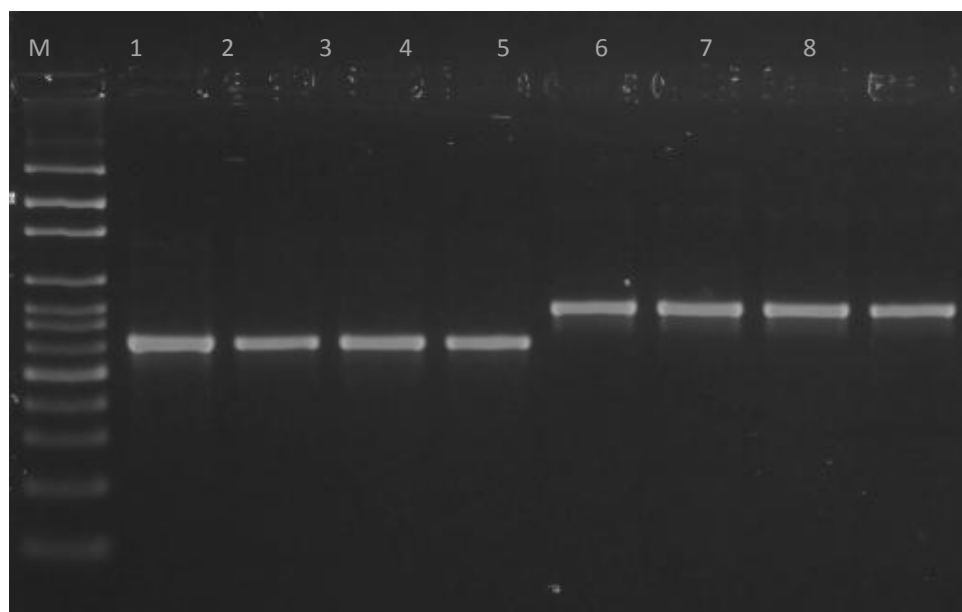


Figura 3.10. Fotografía de la corrida electroforética del gradiente de temperatura para hibridación de primers para amplificación del gen ipaH que codifica para ECEI y gen DA de ECDA. M: Marcador molecular 100pb, carriles 1, 2, 3, 4: gen ipaH, carriles 5,6, 7,8: gen Da.

Cuadro 3.5. Temperatura de hibridación de los oligos de ECEI y ECDA.

Carril	Gen	Temperatura de hibridación
1	ipaH	65,1°C
2	ipaH	62,1°C
3	ipaH	60°C
4	ipaH	57°C
5	Da	67°C
6	Da	65,1°C
7	Da	60°C
8	Da	58,1°C

3.3.2. Concentración de cebadores

La concentración varió en cada par de cebadores, el rango osciló entre 0.2uM y 0,5 uM.



Figura 3.11. Fotografía de la corrida electroforética de la concentración de primers vt1, eae, eltB, aggR, Da. En el carril M: Marcador molecular, 1: primer vt1; 2: primer eae; 3: primer eltB; 4: primer aggR; 5: primer Da; 6: primer vt1; 7: primer eae; 8: primer eltB; 9: primer aggR; 10: primer Da; 11: primer Da; 12: primer Da; 13: control negativo.

En la Figura 3.11 se puede visualizar los fragmentos de los amplicones a diferentes concentraciones. En los carriles 1 al 5 se trabajó los primers a una concentración de 0,4 μ M, en los carriles 6 al 10 se trabajó a 0,2 μ M; carril 11 presenta 0,5 μ M del primer DA y el 12 con 0,2uM de primer Da.



Figura 3.12. Fotografía de la corrida electroforética de la concentración de los primers vt1, eae, eltB. En el carril M: Marcador molecular 100pb-2000pb; 1: primer vt1, eae a una concentración de 0,2 μ M; 2: primer eae a una concentración de 0,4 μ M; 3: eae y vt1 a una concentración de 0,4 μ M; 4: eltB a una concentración de 0,2 μ M. Carriles de 6-9: controles negativos.

Los primers estA, ipaH fueron analizados con concentraciones de 0,2 y 0,4 μ M (Ver Figura 3.13).

3.4. PCR multiplex

Antes de realizar la amplificación se procedió a realizar una electroforesis del ADN extraído para verificar la integridad del ADN (Ver Figura 3.13).



Figura 3.13. Fotografía de la corrida electroforética de la concentración de primers ipaH vt1, estA; Primer ensayo de PCR multiplex; integridad de ADN. Carril M: Marcador molecular 100pb; carril 1: Primer vt1 a una concentración de 0,4 μ M; carril 2: Primer estA a 0,5 μ M; carril 3: Primer ipaH a 0,4 μ M; carril 4: Primer estA a 0,4 μ M; carril 5: Primer vt1 a 0,5 μ M; carril 6: control negativo; carril 7: PCR multiplex con un pool de ADN de todas las bacterias; 8: PCR multiplex en un pool de ADN ECEI, ECEA, ECET; 9: PCR multiplex con un pool de ADN y ECEH, ECEP, ECDA.

Se trató de obtener en un carril, un propio marcador molecular con los fragmentos de todas las *E. coli* patógenas (Ver Figura 3.13). Para esto se realizó un pool de todos los ADN, y un pool separando ECEI, ECEA, ECET de ECEH, ECEP, ECDA.

Los fragmentos amplificados tienen similitud en peso de pares de bases, por lo cual se procedió a dividir el sistema en multiplex A y B.

Dentro de la multiplex A se estableció los genes que codifican para ECEH, ECEP, ECDA y en B: ECEI, ECEA, ECET.

3.4.1. Primer ensayo de la PCR multiplex

Se comenzó realizando una PCR convencional multiplex de cada una de las enterovarietades, y se trabajó con una máster mix (Cuadro 2.4) de acuerdo a las concentraciones y temperaturas de hibridación optimizadas en la PCR monoplex.

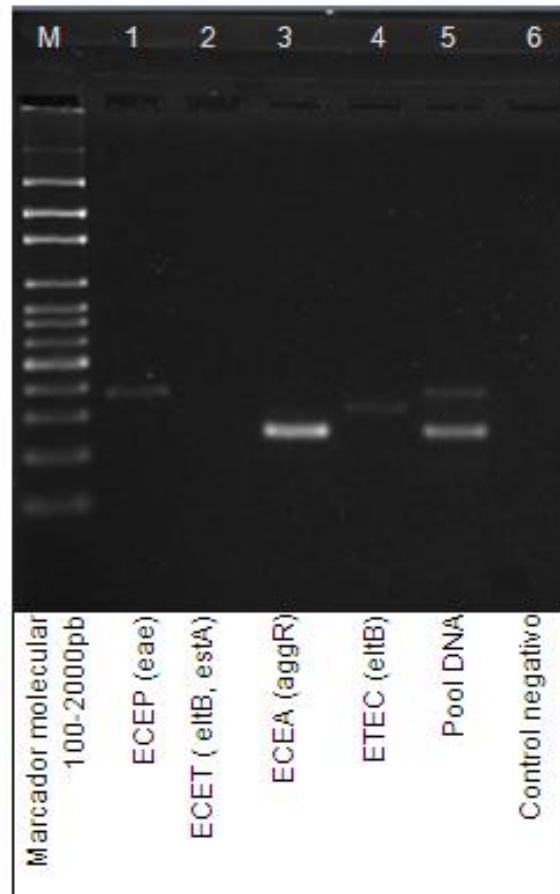


Figura 3.14. Fotografía de corrida electroforética en gel de agarosa que muestra los productos del ensayo de PCR multiplex para la identificación de ECEP, ECET, ECEA. M= Marcador molecular 100 pb; 1= ECEP (eae); 2= ECET (eltB, estA); 3= ECEA (aggR); 4= ECET (eltB); 5= Pool ADN; 6=Control negativo.

El programa de termociclador se realizó de acuerdo al siguiente cuadro:

Cuadro 3.6. Condiciones del termociclador.

Pasos	Temperatura	Tiempo	# Ciclos
Denaturación inicial	94°C	4 min	1
Denaturación	94°C	1 min	
Hibridación	57°C	1 min	30
Extensión	72°C	1 min	
Extensión final	72°C	7 min	1

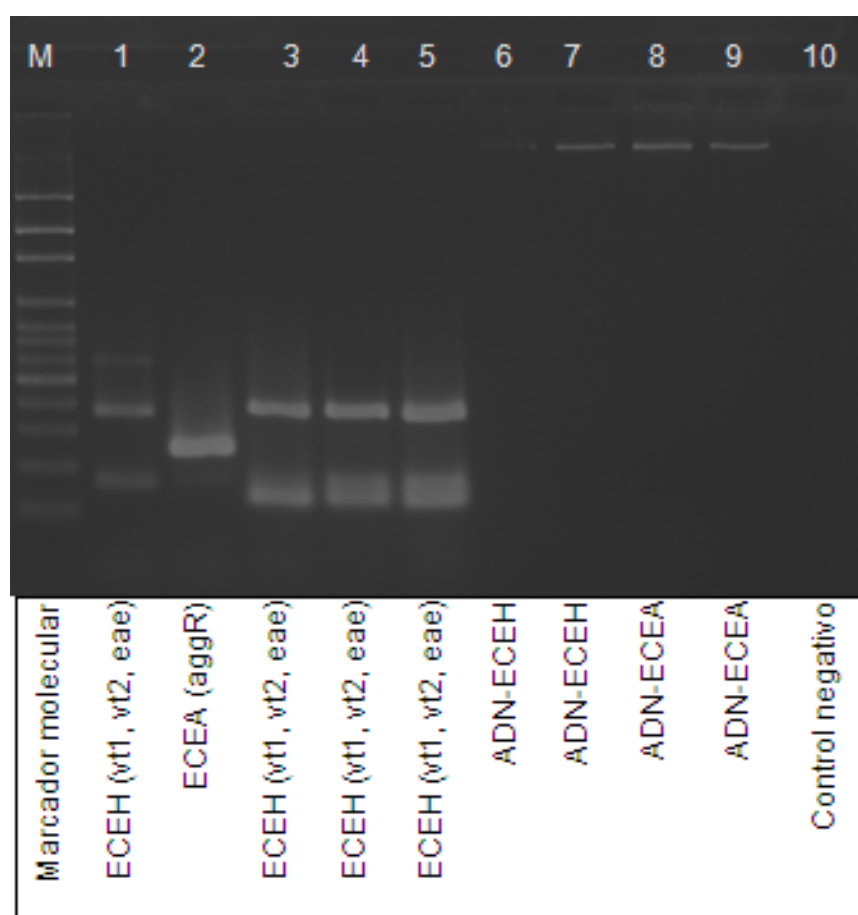


Figura. 3.15. Fotografía de corrida electroforética en gel de agarosa que muestra los productos del ensayo de PCR multiplex para la identificación de ECEH y ECEA, y DNA de las dos bacterias.

En la Figura 3.15 el carril 1 fue amplificado con el programa del Cuadro 3.6 los carriles del 2 al 5 se observan los productos del ensayo PCR touchdown que se realizó para poder observar mayor eficiencia del producto amplificado.

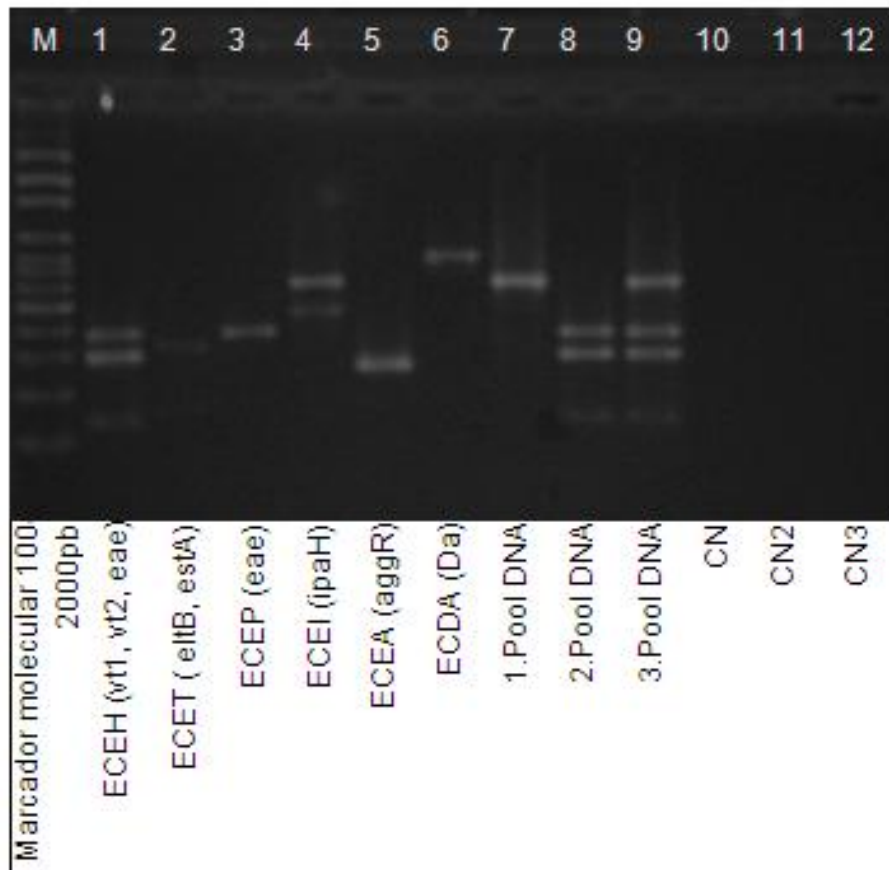


Figura 3.16. Fotografía de corrida electroforética en gel de agarosa que muestra los productos del ensayo de PCR multiplex de todas las enterovarieties de *Escherichia coli*.

En la Figura 3.16 se obtuvo la PCR multiplex de todas las enterovarieties, con fragmentos inespecíficos y se realizó un pool de ADN, en el carril 7 está el ADN de ECEI, ECET, ECEA, en el 8 el ADN de ECEH, ECEP, ECDA, y en el 9 un pool de todos los ADN de las enterovarieties. La concentración de primers, en este ensayo fue modificado a 0,3 μ M.

3.4.2. PCR dúplex

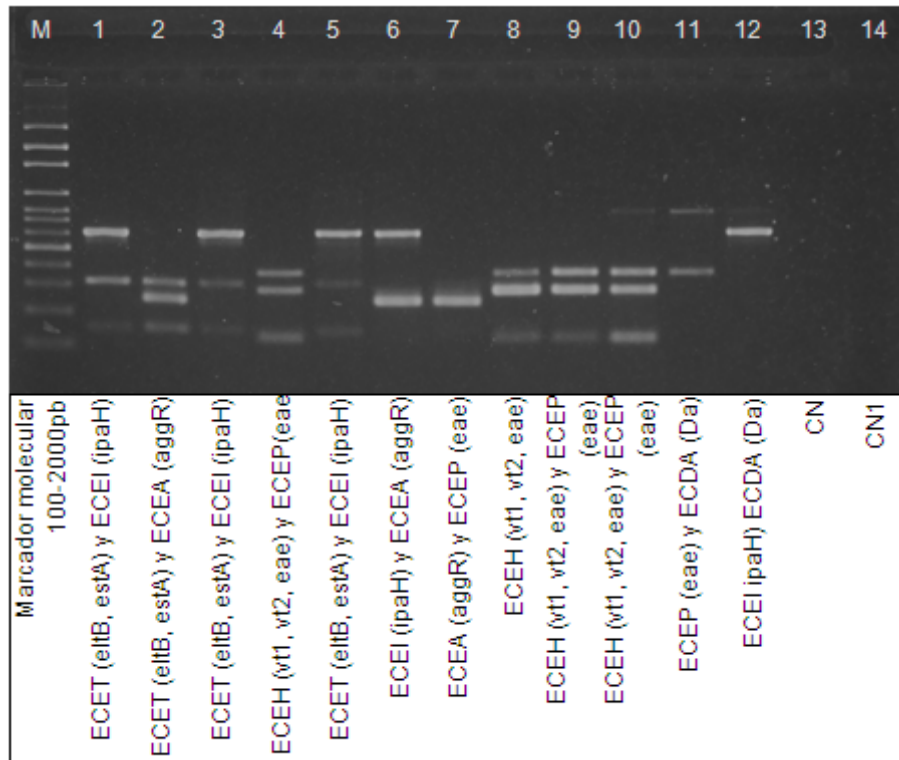


Figura 3.17. Fotografía de corrida electroforética en gel de agarosa que muestra los productos del ensayo de combinación de la PCR multiplex entre dos *E. coli* patógenas.

Una vez que se realizó la combinación entre dos bacterias de *E. coli* se procedió a diseñar las dos PCR multiplex A y B con las mismas concentraciones de primers.

3.4.3. PCR multiplex A y B

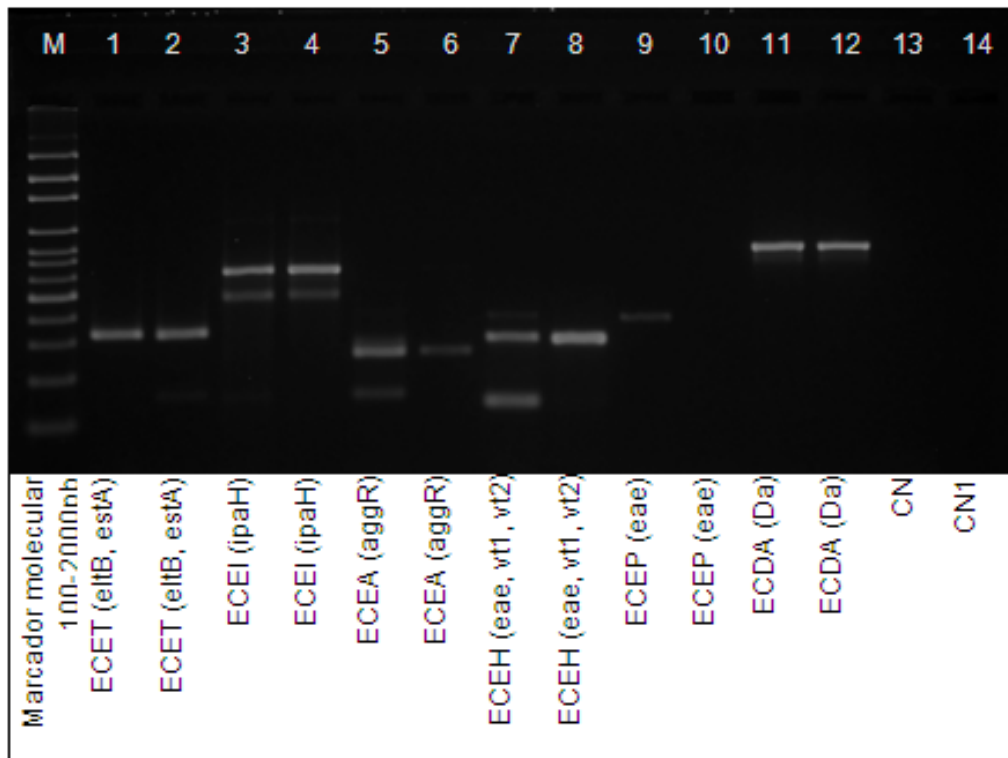


Figura 3.18. Fotografía de corrida electroforética en gel de agarosa que muestra los productos del ensayo de PCR multiplex A y B. Carril M: Marcador peso molecular 100 pb, 1,2: ECET (eltB, estA); 3,4: ECEI (ipaH); 5,6: ECEA (aggR); 7,8 ECEH (eae, vt1, vt2); 9,10: ECEP (eae); 11,12: ECDA (Da); 13,14: Controles negativos.

En la Figura 3.18 se observa el ensayo del sistema PCR multiplex A y B. Los carriles del 1 al 6 pertenecen a la PCR multiplex A, donde se trabajó con diferentes concentraciones de primers, mientras que la PCR multiplex B pertenece a los carriles 7, 9, 12. La optimización se realizó con el protocolo del cuadro 2.5.

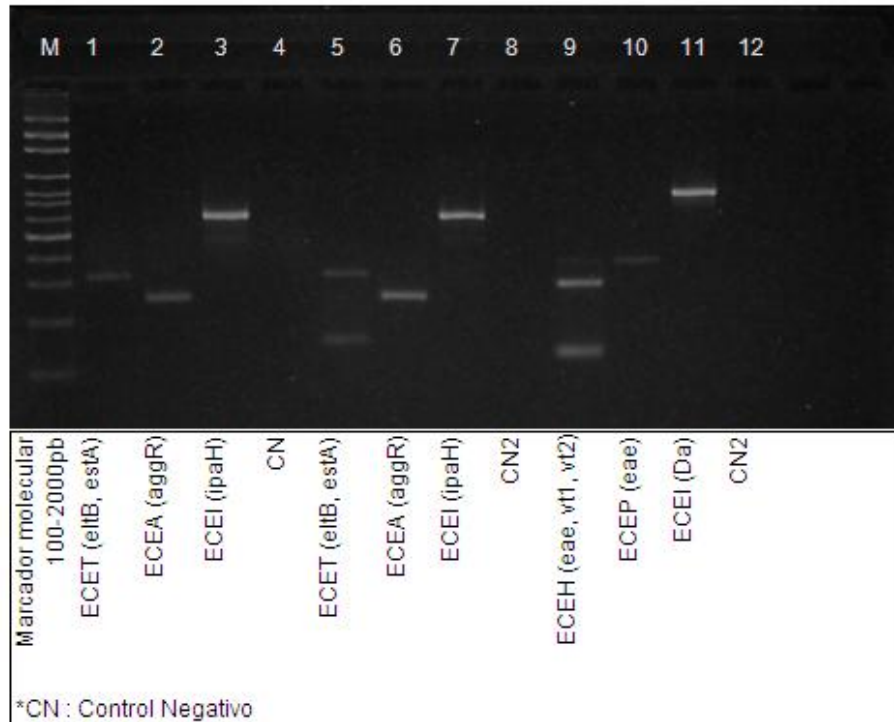


Figura 3.19. Fotografía de corrida electroforética en gel de agarosa que muestra los productos del ensayo de optimización de la PCR multiplex A y B. Carril M: marcador molecular de 100pb Labnet; 1,5: ECET (eltB, estA); 2,6: ECEA (aggR); 3,7: ECEI (ipaH); 4, 8, 12: controles negativos; 9: ECEH (eae, vt1, vt2); 10: ECEP (eae); 11: ECDA (Da).

En la Figura 3.19 se puede observar la PCR multiplex A y B optimizadas del sistema para la identificación de las seis enterovarietades.

3.5. Fase confirmatoria

La sensibilidad analítica evaluó los dos sistemas de PCR multiplex (A y B).

3.5.1. *Sensibilidad analítica medida en concentraciones de ADN de la multiplex A.*



Figura 3.20. Fotografía de corrida electroforética en gel de agarosa que muestra los productos del ensayo de límite de detección del sistema de la PCR multiplex A. M: Marcador molecular 100 pb Labnet. 1= 1,5 ng/μL; 2=0,75 ng/μL; 3= 0,375 ng/μL; 4= 0,18 ng/μL; 5= 0,093 ng/μL; 6= 0,046 ng/μL; 7= 0,023 ng/μL; 8=0,011 ng/μL; 9=0,0058 ng/μL; 10= 0,0029 ng/μL; 11= control negativo.

Se partió de una concentración de ADN de 3 ng/μL y se realizó una dilución 2:1. En la dilución 9 de ADN a 0,0058 ng/μL se observó los fragmentos de *eae* de ECEH y ECEP y en la dilución 10 de ADN a 0,0029 ng/μL se pudo observar fragmentos de la toxina vt1 y vt2 de ECEH.

3.5.2. Sensibilidad analítica medida en concentraciones de ADN de la multiplex B.

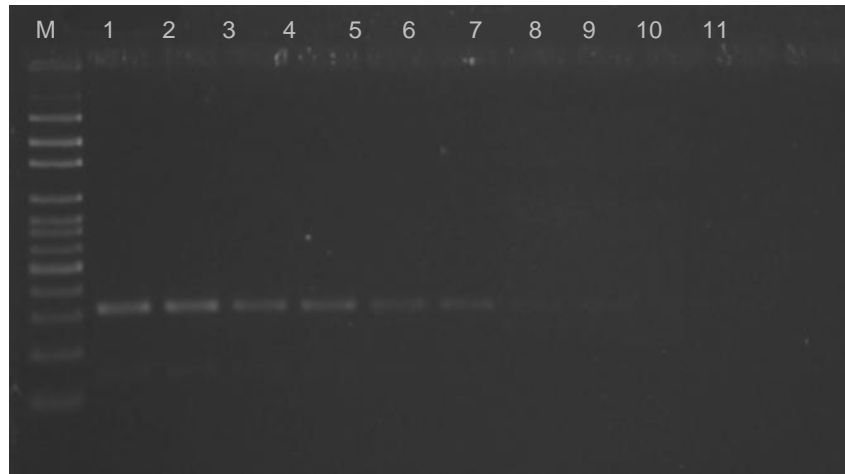


Figura 3.21. Fotografía de corrida electroforética en gel de agarosa que muestra los productos del ensayo de límite de detección del sistema de la PCR multiplex B. M= Marcador molecular 100 pb Labnet.1= 1,5 ng/ μ L; 2=0,75 ng/ μ L; 3= 0,375 ng/ μ L; 4= 0,18 ng/ μ L; 5= 0,093 ng/ μ L; 6= 0,046 ng/ μ L; 7= 0,023 ng/ μ L; 8=0,011 ng/ μ L; 9=0,0058 ng/ μ L; 10= 0,0029 ng/ μ L; 11= control negativo.

La sensibilidad analítica del segundo sistema de PCR multiplex detectó hasta la dilución 8 de ADN (0,011 ng/ μ L), partiendo de una concentración inicial de 3,0 ng/ μ L.

3. 5. 3. Especificidad del sistema

Se tomaron en cuenta cepas *E. coli* no patógenas y otras como *Salmonella* serotipo Enteritidis, *Vibrio cholera* y *Klebsiella pneumoniae* para evaluar la especificidad.

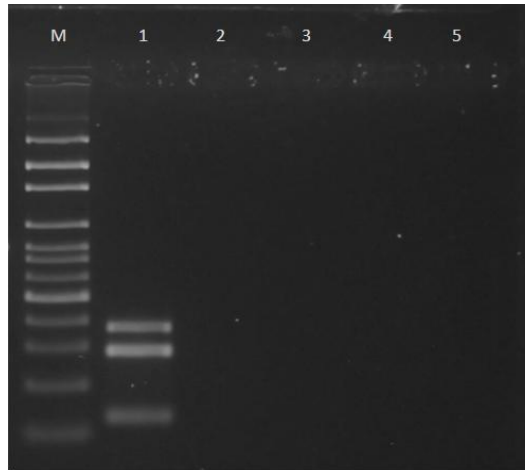


Figura 3. 22. Fotografía de corrida electroforética en gel de agarosa que muestra los productos del ensayo de ensayo de PCR multiplex de las enterovariedades de *E. coli* en otras bacterias. M=Marcador molecular de 100pb Labnet. 1= ECEH; 2= *Salmonella* serotipo Enteritidis; 3= *Vibrio cholerae*; 4= *Klebsiella pneumoniae*, 5= Control negativo.

El sistema dio resultado negativo a las amplificaciones de los genes de *Escherichia coli* patógenas (Ver Tabla 3.1).

Tabla 3.1. Lista de bacterias usadas para la implementación de una PCR multiplex para la identificación de *Escherichia coli* patógenas.

No.	Especie	CEPA	Genes							Da
			vt1	vt2	eltB	estA	ipaH	eae	aggR	
1	<i>E. coli</i>	Enterotoxigénica	-	-	+	+	-	-	-	-
2	<i>E. coli</i>	Enterohemorrágica	+	+	-	-	-	+	-	-
3	<i>E. coli</i>	Enteroinvasiva	-	-	-	-	+	-	-	-
4	<i>E. coli</i>	Enteropatógena	-	-	-	-	-	+	-	-
5	<i>E. coli</i>	Enteroagregativa	-	-	-	-	-	-	+	-
6	<i>E. coli</i>	Difusa adherente	-	-	-	-	-	-	-	+
7	<i>E. coli</i>	ATCC 25922	-	-	-	-	-	-	-	-
8	<i>E. coli</i>	ATCC 51313	-	-	-	-	-	-	-	-
9	<i>E. coli</i>	O157:H7	-	-	-	-	-	-	-	-
10	<i>Salmonella</i> serotipo Enteritidis		-	-	-	-	-	-	-	-
11	<i>Vibrio cholera</i>		-	-	-	-	-	-	-	-
12	<i>Klebsiella pneumoniae</i>		-	-	-	-	-	-	-	-

ATCC, american type culture collection.

3.6. Muestras de heces fecales

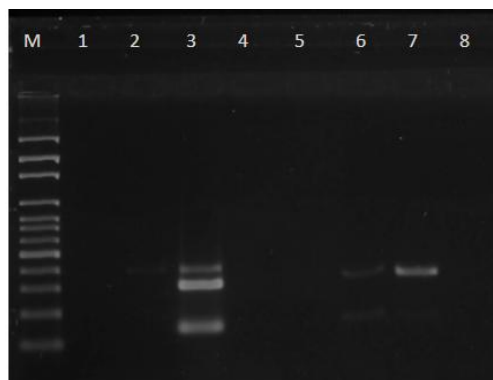


Figura 3.23. Fotografía de corrida electroforética en gel de agarosa de los productos del ensayo de muestras de heces fecales. Carril M= Marcador, Carriles de multiplex A, 1= Primera muestra; 2= Segunda muestra; 3= Control positivo ECEH; 4= Control negativo; Carriles de multiplex B, 5= Primera muestra; 6= Segunda muestra; 7= Control positivo ECET; 8= Control negativo.

Se logró optimizar el sistema directamente desde las 4 muestras trabajadas (Ver Figura 3.23), solo una dio positiva a dos enterovarietades, las tres restantes fueron negativas.

CAPÍTULO 4: DISCUSIÓN

El objetivo principal de este estudio fue la implementación de un ensayo PCR multiplex para la identificación de *Escherichia coli* patógenas ECEH, ECEP, ECET, ECEI, ECEA y ECDA.

Welch en 2006 asegura que *E. coli* es fácil sembrarla en los laboratorios clínicos, pero la detección de los diferentes genotipos patógenos requiere de métodos específicos y no todos los laboratorios están en la capacidad de identificarlos. Para la detección se utilizaron cepas control positivo que fueron analizadas mediante microbiología clásica.

Se identificó los genes de virulencia mediante el método molecular PCR multiplex, por ser una técnica que brinda rapidez, alta sensibilidad y confiabilidad, siendo una alternativa para detectar microorganismos patógenos (Kim, *et al*, 2010; Mukhopadhyay, 2006). La presente tesis diseñó un sistema de PCR multiplex para la identificación de los genes de vt1, vt2 (genes de la toxina shiga 1 y 2) para ECEH; *eae* (gen estructural de la intimina) para ECEH y ECEP; *eltB*, y *estA* (genes de las enterotoxinas) para ECET; *ipaH* para ECEI; *aggR* para ECEA; y *Da* para ECDA. Algunas cepas ECEH comparten el gen *eae* de ECEP por ser responsables de la codificación de una proteína conocida como íntimina. El gen *ipaH* de ECEI es igual al de *Shigella* spp. causa disentería y está estrechamente relacionado (Yazdi, 2010).

En la biología molecular, antes de realizar estudios de ADN como RFLPs, librerías genómicas y PCR, se extrae primero el ADN y luego se purifica (Surszycki, 2002). A todas las muestras de *E. coli* patógenas se les realizó la extracción mediante un kit comercial de Promega Wizard Genomic DNA Purification, posteriormente se visualizó el ADN en un gel de agarosa al 1% para analizar su cantidad, calidad e integridad y descartar la variabilidad de estos parámetros que puede afectar los resultados de la técnica como lo sugiere Surszycki en el 2002. La cantidad y pureza de ADN fue muy variable posiblemente debido al número de colonias de bacterias que se tomaron para

este procedimiento. La concentración final de ADN de *E. coli* fue llevada a 10ng/μL, se colocó en cada reacción 10 ng en un volumen final de 25 μL de la máster mix.

Anteriores estudios se enfocan en la optimización de la enzima polimerasa, concentraciones de MgCl₂, temperatura de reacción e hibridación, evitando la formación de dímeros o fragmentos inespecíficos en la PCR multiplex (Innis, et al, 1999; & Brownie, et al, 1999). La aplicación de esta técnica se dividió en dos fases: exploratoria (optimización del sistema y diseño de la PCR multiplex) y confirmatoria (sensibilidad analítica y especificidad).

En la fase preliminar de la investigación se realizó una PCR monoplex para evaluar concentraciones de los cebadores entre 0,2 μM y 1 μM y temperaturas de hibridación de cada par de cebadores entre 56 a 68°C mediante un gradiente de temperatura para observar la amplificación de todos los pares de primers ya que tenían diferentes temperaturas de melting (T_m). Los cebadores que se utilizaron cumplieron los principales criterios de un buen primer como: secuencias cortas de 20-25 nucleótidos de longitud, la mayoría tuvieron como base en el extremo 3' una G o una C; y el contenido de GC fue entre 40-60% (Loffert, et al,1997; Surszycki, 2002)

Se calculó la temperatura de melting (T_m) de todos los primers mediante la fórmula $T_m = 2^\circ\text{C} (A+T) + 4^\circ\text{C} (G+C)$. Teóricamente se sabe que como punto de partida, la temperatura de hibridación debe estar 5°C por debajo de la T_m calculada, la cual puede ser ajustada por medio de un gradiente de temperatura (Loffert, et al,1997; Surszycki, 2002)

Teniendo en cuenta la temperatura de hibridación se procedió a analizar la concentración de los cebadores en la reacción que se recomienda debe estar entre 0,1 μM y 1 μM. Concentraciones altas de primers puede producir fragmentos inespecíficos o dímeros de primers como indica Surszycki (2002). Otro parámetro que debió ser tomado en cuenta pero se omitió fue la concentración de magnesio en el sistema; debido a que se trabajó con un

máster mix comercial de Promega Go Taq Hot Start Green que contiene el substrato (dNTPs); la enzima Taq polimerasa; cloruro de magnesio con una concentración de 4mM; buffer de reacción para aumentar la densidad de la muestra y el colorante cuya función es teñir a los productos de la PCR para luego analizarlos directamente en un gel de agarosa.

La optimización inicial de la técnica estableció trabajar inicialmente con una concentración de primers de 0,4 μ M, la temperatura de hibridación de 57°C y trabajar en cada paso de la amplificación con un tiempo de 45 segundos por 30 ciclos.

Con el fin de obtener un marcador molecular con todos los pares de primers, se realizaron tres pools de ADN (Figura 3.13), se combinó pares de primers y ADN de las seis enterovarietades, pero no fue posible observar en un solo carril los 8 pares de primers, debido a la interferencia de genes que causó la amplificación.

En los primeros ensayos del diseño de la multiplex no se obtuvo buenos resultados porque no se amplificaron algunas *E. coli*. En el segundo ensayo se procedió a combinar dos pares de primers y dos ADN en la preparación de la máster mix, con el fin de poder hacer dos grupos dependiendo del peso de las pares de bases de los fragmentos amplificados. Primero se combinó ECET con ECEA, ECET con ECEI, ECEA con ECEI, ECEH con ECEP, y EHEC con ECDA basándose en la publicación de Nguyen en el 2005.

Uno de los problemas que presentó la implementación de la PCR multiplex fue la concentración de los primers, por lo que se vio obligada la técnica a dividirse en dos. Luego de observar la amplificación de las combinaciones se procedió a dividir la PCR multiplex en A y B, utilizando las mismas condiciones de la PCR monoplex. La cantidad de primers utilizados dio como resultado la generación de productos no específicos y formación de dímeros reduciendo de esta manera la especificidad y sensibilidad, pero al

modificar las concentraciones se eliminaron estos problemas y el uso de una Taq Hot Start ayudó a incrementar la especificidad de la PCR (Engel, *et al*, s/a).

Otro motivo por el cual se separó la PCR multiplex fue por el tamaño de los productos amplificados porque eran similares: eltB de 322 pb, estA de 147 pb, vt1 de 130 pb, vt2 de 298 pb, eae de 376 pb, ipaH de 600 pb, aggR de 230 pb, y Da de 750 pb.

La técnica implementada es altamente específica y sensible, sin embargo las cepas ECEI están estrechamente relacionadas con *Shigella* spp. poseen similares propiedades fenotípicas y virulentas y hasta la fecha no se ha podido diferenciar entre las dos bacterias molecularmente (Nguyen, *et al*, 2005). Vieira y colaboradores en el 2007 recalcan que no es necesario diferenciarlas, desde el punto de vista clínico porque el tratamiento es el mismo.

El límite de detección de los dos sistemas de PCR multiplex A y B fueron medidos en base a la concentración de ADN. Se utilizó como concentración inicial 3 ng/μL de ADN de las dos bacterias ECEH y ECET. Así se visualizó que en la PCR multiplex A, la concentración mínima detectada fue de 0,0029 ng/μL y en la B fue de 0,011 ng/μL de ADN.

Algunos autores han realizado la estandarización de la detección de *E. coli* patógenas desde la cepa, pero en esta tesis al trabajar directamente con muestras fecales, demostró que los dos sistemas de PCR multiplex presentados pueden ser utilizados desde la muestra o desde la cepa aislada de cada posible patógeno.

CAPÍTULO 5: CONCLUSIONES

Se implementó un ensayo PCR multiplex para la identificación de *Escherichia coli* patógenos: ECET, ECEP, ECEH, ECEI, ECEA, ECDA.

Los resultados presentados en esta tesis, permitieron detectar los 8 genes virulentos de *E. coli* diarreicas en dos PCR multiplex. Este método ofreció una rápida identificación de los mecanismos patógenos.

La concentración de ADN genómico extraído mediante el kit comercial varió entre 10,8 ng/ μ L y 33,6 ng/ μ L.

La PCR multiplex que se presentó fue utilizada para identificar y diferenciar las *E. coli* patógenas detectando un virotipo. Una vez implementada esta técnica se da paso a diseñar una PCR que se dirija a un único serotipo de una enterovariedad, como es la *E. coli* O157:H7, ECEP típicas y atípicas, entre otros.

Los parámetros que fueron optimizados en la PCR monoplex variaron al momento de diseñar la PCR multiplex, modificando las concentraciones de primers, temperatura, y ciclos del termociclador.

Las concentraciones de los primers oscilaron entre 0,1 μ M a 1,25 μ M, en los dos sistemas, la temperatura de hibridación optimizada fue de 57°C, el tiempo de los pasos de la PCR fueron de 45 segundos en cada uno.

El exceso de la concentración de primers dio paso a la formación de fragmentos inespecíficos o dímeros de primers.

El sistema de implementación se dividió en 2 PCR multiplex; la A identificó los genes vt1, vt2, eae de ECEH; el gen eae de ECEP; y el gen Da de

ECDA y la B genes *eltB* y *estA* para ECET; *ipaH* para ECEI; y *aggR* para ECDA.

Se obtuvo productos de PCR con los siguientes tamaños: 322 pb y 147 pb para ECET, 130 pb, 298 pb y 376 pb para la ECEH, 376 pb para ECEP, 600 pb para ECEI, 230 pb para ECEA, y 750 pb para ECDA.

La sensibilidad analítica medida en concentración de ADN del sistema de la PCR multiplex A fue de 0,0029 ng/μL y de B fue de 0,011 ng/μL.

La especificidad del sistema se evaluó aplicando la técnica para identificación de otros microorganismos, dando como negativo la amplificación de genes de *E. coli* diarreicas.

La técnica implementada fue un sistema de PCR multiplex sensible, específica, rápida y fácil de realizarla, obteniendo de esta manera resultados fiables y consistentes.

La elaboración de los protocolos realizados para la identificación de las enterovariedades *Escherichia coli* patógenas permanecerán en el laboratorio del INHMT Leopoldo Izquieta Pérez para dar uso a la técnica con las muestras que deseen ser analizadas en próximos estudios y programas a nivel local y nacional.

CAPÍTULO 6: RECOMENDACIONES

Realizar la técnica directamente desde las muestras de heces o cepas de bacterias, aislando el ADN mediante kits comerciales.

Incluir en el ensayo de PCR un control de amplificación para identificar los resultados falsos negativos y adicionar la amplificación del gen 16S en enterobacterias.

Antes de diseñar la PCR multiplex optimizar la temperatura de hibridación de cada cebador y concentraciones de los mismos.

Usar PCR multiplex para investigar un número elevado de microorganismos en clínica y estudios epidemiológicos para facilitar su diagnóstico.

La PCR multiplex requiere de una combinación de primers por lo que se debe trabajar con las concentraciones adecuadas de cada reactivo y así obtener buenos resultados.

Hacer uso de esta técnica para estudios a mayor escala como prevalencia de las diferentes enterovariedades de *E. coli*, caracterización genotípica, entre otros.

CAPÍTULO 7: BIBLIOGRAFÍA

1. Aranda, K., Fabbricotti, S., Fagundes, U., Scaletsky, I. (2006). Single multiplex assay to identify simultaneously enteropathogenic, enteroaggregative, enterotoxigenic, enteroinvasive and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains in Brazilian children.
2. Blanco, J., Blanco, M., Blanco, J.E., Mora, A., Alonso, M.P., González, E., & Bernárdez, M. (s/a). *Escherichia coli* patógenos para seres humanos y animales. Laboratorio de Referencia de *E.coli* (LREC). Departamento de Microbiología y Parasitología. Universidad de Santiago de Compostela. Lugo- España.
3. Bradley, F., & Peter, T., (1987). Bioquímica. Editorial Reverte S.A. España. pp. 50-60.
4. Brownie, J., Shawcross, S., Theaker, J., Whitcombe, D., Ferrie, R., Newton, C., Little, S. (1997). The Elimination Of Primer-Dimer Accumulation in PCR. Nucleic acids research, vol 25, N°16. Pp. 3235-3241.
5. Bhunia, A. (2008). Foodborne Microbial Pathogens, Mechanisms and Pathogenesis. Chemistry and materials Science. Springer New York.
6. Campos, E., Bolaños, H., Chanto, G., Jiménez, A., Acuña, M.T., Duarte, F. (2010). Guía para la vigilancia de laboratorio de enfermedades

bacterianas y otros eventos de importancia en salud pública. Tres Ríos, Costa Rica: INCIENSA.

7. Dorado, G. (s/a). Amplificación de DNA mediante PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa). Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Campus Universitario de Rabanales. Córdoba-España.
8. Esquivel, P., Lifschitz, V., Lösch, L., Medina, M., Pato, A., Cacciamani, A., Y Merino, L. (2010). Molecular characterization of diarrheagenic *Escherichia coli* isolates from children and adults in the city of Corrientes, Argentina. Revi Panam Infectol, 12(3) pp. 17-21.
9. Fonseca, D., Mateus, H., & Contreras, N. (2010). Prácticas de laboratorio de biología molecular su aplicación en genética básica. Editorial Universidad del Rosario. Colección lecciones Escuela de Medicina y Ciencias de la Salud. Pp: 37-40.
10. Gómez-Duarte, O., Arzuza, O., Urbina, D., Bai, J., Guerra, J., Montes, O., Puello, M., Mendoza, K., Y Castro, G. (2010). Detection of *Escherichia coli* Enteropathogens by Multiplex Polymerase Chain Reaction from Children's Diarrheal Stools in Two Caribbean-Colombian Cities. Foodborne Pathogens and Disease. 0355 pp. 199-206.
11. Donnenberg, MS., & Kaper, J. (1992). Enteropathogenic *Escherichia coli*. Infect. Immun., 60(10): 3953-3961.

12. Engel, H., Küppers, C., & Löffert, D. (s/a). Highly efficient multiplex PCR using novel reaction chemistry. Lab Chip. QUIAGEN.
13. Innis, M., Gelfand, D., Sninsky, J. (1999). PCR applications, protocols for functional genomics. Academic Press. pp74-76.
14. Johnson, J. (1991). Virulence factors in *Escherichia coli* urinary tract infection. Clinical Microbiology. Revista. 4:80-128.
15. Kim, K., Cho, J., Cheung, C., Lim, J., Cho, S., Cho, D., Kang, C., & Kim, D. (2010). Development of multiplex PCR assays to identify *Escherichia coli* pathogenic genes in food. Food Sci. Biotechnology 19(5): 1205-1210
16. Lluque, A., Mercado, E., Riveros, M., Alvarado, L., Carlos, E., Colichón, A., Salazar, E., & Ochoa, T. 2010. Comparación entre el diagnóstico serológico y el diagnóstico por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC). Rev Gastroenterol Peru. 30:121-5.
17. Löffert, D., Karger, S., Berkenkopf, M., Seip, N., & Kang, J. (1997). PCR optimization: primer design. QUIAGEN. Issue No. 5.
18. Malorny, B., Tassios, P., Radström, P., Cook, N., Wagner, M., & Hoorfar, J. (2003). Standardization of diagnostic PCR for the detection of foodborne pathogens. International journal of food microbiology 83 39-48.

19. Meng, J., Schoeder, C. (2007). Foodborne Diseases. Shabbir Simjee. Humana Press.
20. Mukhopadhyay, A., Mukhopadhyay, U. (2006). Novel multiplex PCR approaches for the simultaneous detection of human pathogens: *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes*. Elsevier. Journal of Microbiological Methods. 193-200.
21. Nataro JP y Kaper JB, (1998). Diarrheagenic *Escherichia coli*. Clinical Microbiology Reviews, 11:142–201.
22. OPS. (1987). Manual de tratamientos de diarrea. Serie Paltex N°13 P-85.
23. OPS (2006). Manual de pruebas de diagnóstico. Validación y control de calidad de los métodos de reacción en cadena de la polimerasa utilizados para el diagnóstico de enfermedades infecciosas.
24. Pass, M., Odedra, R., & Batt, R. (2000). Multiplex PCRs for identification of *Escherichia coli* virulence genes. Journal of clinical microbiology. Pp. 2001-2004.
25. PROMEGA. (2010). Wizard Genomic DNA Purification. [En línea: <http://www.promega.com/resources/protocols/technical-manuals/0/wizard-genomic-dna-purification-kit-protocol/>]

26. Rodríguez – Ángeles, G. (2002). Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. pp: 464-475.
27. Sears, C.L & Kaper, J. B. (1996). Enteric bacterial toxins; mechanisms of action and linkage to intestinal secretion. Microbiol. Rev 60, 167-215.
28. Sharifi, Y; Akbari, A; Y Soltan, D; (2011). Multiplex polymerase chain reaction (PCR) assay for simultaneous detection of shiga-like toxin (stx1 and stx2), intimin (eae) and invasive plasmid antigen H (ipaH) genes in diarrheagenic *Escherichia coli*. African Journal of Biotechnology Vol. 10(9), pp. 1522-1526.
29. Spano, L., Sadovsky, A., Segui, P., Saick, K., Kitagawa, S., Pereira, F., Fagundes-Neto, U., Y Scaletsky, S. (2008). Age-specific prevalence of diffusely adherent *Escherichia coli* in Brazilian children with acute diarrhoea. Journal of Medical Microbiology 57, pp 359–363.
30. Surzycki, S. (2000). Basic techniques in molecular biology. Berlin: Springer-Verlag.
31. Romero, R. (2007). Microbiología y parasitología humana. Tercera Edición. Editorial Médica Panamericana. México. Pp 745-757.

32. Tap, J. (2004). Caractérisation moléculaire des *Escherichia coli* O111 et diversité des souches isolées en France. Centre national de référence des *Escherichia coli* et *Shigella*. Institut Pasteur.
33. Vieira, N., Bates, S., Solberg, O., Ponce, K., Howson, R., Cevallos, W., Trueba, G., Riley, L., Y Eisenberg, J. (2007). High prevalence of enteroinvasive *Escherichia coli* isolated in a remote region of northern coastal Ecuador. The American journal of tropical medicine and hygiene, 76(3), , pp. 528-533.
34. Vilchez, B. (2009). Molecular and phenotypic characterization of diarrhoeagenic *Escherichia coli* from Nicaraguan children. Departament of laboratory Medicine, UNAN-Leon.
35. Welch, R. (2006). The genus *Escherichia*. The prokaryotes. Volume 6. Springer New York.
36. WHO global salm. (2008). Manual de procedimientos, Diagnóstico y caracterización de *Escherichia coli* O157 productor de toxina Shiga a partir de alimentos.

ANEXO A

Protocolo de detección de patógenos del kit comercial Z.N.A Stool DNA kit de OMEGA

1. Pesar 250 mg de muestra de heces en un tubo de centrifuga de 2 mL que contiene 200 mg de perlas de vidrio y colocar el tubo en hielo.
Nota: Si la muestra se encuentra líquida, pipetear 200 µl en el tubo de centrifuga.
2. Añadir 540 µl de Buffer SLB. Agitar en vórtex a velocidad máxima durante 10 minutos o hasta que la muestra de heces este homogenizada.
3. Añadir 60 µl de Buffer DS y 20 µl de Proteinasa K. Homogenizar bien pipeteando. Incubar a 70 °C durante 10 minutos (13 min si está congelado). Agitar la muestra en el vórtex dos veces durante la incubación.
4. Añadir 200 µl del Buffer SP2. Agitar bien la muestra utilizando el vórtex durante 30 segundos.
5. Incubar la muestra en hielo por 5 minutos.
6. Centrifugar a velocidad máxima (13,000 x g) en una microcentrifuga durante 5 minutos para precipitar las partículas de las heces formando un pellet.
7. Aspirar cuidadosamente 400 µl del sobrenadante y transferirlo a un nuevo tubo para centrifuga de 1.5 mL, sin perturbar el pellet ni transferir residuos celulares.

8. Añadir 200 µl del reactivo HRT. Agitar la muestra en vórtex durante 10 segundos.
9. Incubar a temperatura ambiente durante 2 minutos.
10. Centrifugar a velocidad máxima (>13,000 x g) por 2 minutos para precipitar los inhibidores formando pellet, y absorber el reactivo HRT.
11. Transferir 250 µl del sobrenadante a un nuevo tubo de 1.5 mL.
12. Añadir 250 µl de Buffer BL, seguido de 250 µl de etanol absoluto para el lisado. Mezclar bien la muestra en vórtex durante 10 segundos.
13. Aplicar toda la muestra del paso 14 incluyendo cualquier precipitación que puede haberse formado, a la columna HiBind ADN Column. Centrifugar a velocidad máxima (>13,000 x g) por 1 minuto a temperatura ambiente. Descartar el líquido y el recolector.
14. Colocar la columna HiBind ADN en un nuevo recolector de 2 mL y añadir 500 µl del Buffer VHB y centrifugar a 10,000 x g por 30 segundos. Descartar el líquido y reusar el recolector para el siguiente paso.
15. Añadir 700 µl del ADN Wash Buffer a la columna HiBind ADN. Centrifugar a velocidad máxima (>13,000 x g) por 1 minuto. Descartar el líquido y el tubo de recolección.
16. Colocar la columna HiBind ADN en un nuevo tubo de recolección. Añadir 700 µl de ADN Wash Buffer en la columna y centrifugar a velocidad máxima (>13,000 x g) por 1 minuto. Descartar el líquido y reinsertar la columna en un tubo de recolección vacío.
17. Centrifugar la columna a velocidad máxima (>13,000 x g) por 2 minutos a temperatura ambiente para secar la columna.

18. Colocar la columna en un nuevo tubo de 1.5 mL. Para eluir el ADN, añadir de 100 a 200 μ l de Buffer de Elución (10 mM Tris buffer, pH 8.5) precalentado a 65 °C a la columna HiBind ADN. Incubar a temperatura ambiente por 2 minutos. Centrifugar a velocidad máxima ($>13,000 \times g$) por 1 minuto para eluir el ADN.