

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA

The seal of the University of San Carlos of Guatemala is a circular emblem. It features a central figure of a man in a red and white robe, likely a saint or scholar, standing on a globe. The globe is surrounded by a blue sky with a golden sun and a red dragon. The background is a green landscape with a white building. The seal is encircled by a grey border containing the Latin text "CAROLINA ACADEMIA COACTEMALENSIS INTER CÆTERA GRÆBIS CONSPICUA".

**Optimización de las condiciones del Diagnóstico de
Escherichia coli Enterotoxigénica utilizando la Técnica
de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).**

JUANA INÉS DE LA CRUZ PRATDESABA ESTRADA

QUÍMICA BIÓLOGA

Guatemala, Noviembre 2013

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA

The seal of the University of San Carlos of Guatemala is a circular emblem. It features a central figure, likely a saint or scholar, standing on a pedestal. The figure is surrounded by various symbols, including a cross, a book, and other heraldic elements. The seal is set against a background of a landscape with mountains and a sky. The text "UNIVERSITAS SAN CAROLINIENSIS" is inscribed around the perimeter of the seal.

**Optimización de las condiciones del Diagnóstico de
Escherichia coli Enterotoxigénica utilizando la Técnica
de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).**

Informe de tesis

Presentado por

JUANA INÉS DE LA CRUZ PRATDESABA ESTRADA

Para optar al título de

QUÍMICA BIÓLOGA

Guatemala, Noviembre 2013

JUNTA DIRECTIVA

Oscar Manuel Cóbar Pinto, Ph. D.	Decano
Lic. Pablo Ernersto Oliva Soto, M.A.	Secretario
Licda. Liliana Vides de Urizar	Vocal I
Dr. Sergio Alejandro Melgar Valladares	Vocal II
Lic. Rodrigo José Vargas Rosales	Vocal III
Br. Fayver Manuel de León Mayorga	Vocal IV
Br. Maily Graciela Córdova Audón	Vocal V

ACTO QUE DEDICO

A Dios y a la Virgen María: Quienes supieron guiarme por el buen camino, dándome fuerza para seguir adelante, enseñándome a encarar las adversidades sin perder nunca la dignidad ni desfallecer en el intento.

A mis dos mamas (Sheny y Carlota): Por todo el esfuerzo y sacrificio para brindarme el apoyo incondicional y la confianza en cada momento de mi vida.

A mis hijos: Por toda su paciencia, apoyo, entusiasmo, amor y principalmente por ser el motor que mueve mi vida día con día. Los amo Inesita, Isa y Francisco.

A mi familia: En especial a mi hermano, cuñada y sobrinos (Jose, Diego, Peter e Irene); Paty, Laura María y Manuel, gracias por apoyarme siempre y darme su cariño incondicional.

A la Familia Cabrera Sazo: por hacerme parte de su familia y apoyarme en las buenas y en las malas. Gracias Dorly, Doña Tony y Don Rafa.

A todas las personas que forman parte de mi vida y han contribuido para el logro de mis objetivos. En especial a mis amigos Wanda, Ligia, Sergio, Edelmira, Doña Rosita, Silvia, Glenda y Astrid.

AGRADECIMIENTOS

A Dios y a la Santísima Virgen María: Seres maravillosos que me dieron la fuerza y fe para creer lo que me parecía imposible terminar. Para Dios no hay nada imposible.

A la Tricentaria Universidad de San Carlos de Guatemala: Por ser el centro de enseñanza que inculcó en mi la responsabilidad y perseverancia.

A La Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia: En especial a la Escuela de Química Biológica, por ser pilar esencial en mi formación profesional.

Al Instituto de Nutrición de Centroamérica y Panamá: Por el apoyo brindado en la realización de este trabajo de investigación.

A la Licenciada Olga Torres de Matute: Por todo su apoyo, paciencia y ayuda.

A mi familia: Por creer en mí, estar pendientes y apoyarme en todo momento.

A mis hijos (María Inés, Isabel y Francisco): Por su comprensión, amor y apoyo para poder terminar este proyecto.

A todas las personas que de una u otra manera me apoyaron para la realización de esta tesis.

INDICE

I. RESUMEN	1
II. INTRODUCCION	3
III. ANTECEDENTES	4
A. Generalidades de <i>E. coli</i>	4
B. Serotipos de <i>E. coli</i>	4
C. Virulencia de <i>E. coli</i>	4
D. Clasificación de las cepas de <i>E. coli</i> diarreogénicas	5
E. <i>E. coli</i> Enterotoxigénica	8
1. Patogénesis	8
2. Características Clínicas	11
3. Detección y diagnóstico	11
4. Epidemiología	14
5. Estudios Relacionados	15
F. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	16
1. Componentes del PCR	17
2. Fases del PCR	19
3. Detección de los productos de PCR	21
4. Prevención de la contaminación	21
5. Optimización del PCR	22
IV. JUSTIFICACION	28
V. OBJETIVOS	29
VI. HIPOTESIS	30
VII. MATERIALES Y METODOS	31
VIII. RESULTADOS	41
IX. DISCUSION DE RESULTADOS	46
X. CONCLUSIONES	50
XI. RECOMENDACIONES	51
XII. REFERENCIAS	52
XIII. ANEXOS	59

I. RESUMEN

Escherichia coli enterotoxigénica (ETEC) es un patógeno importante causante de diarrea en niños y adultos susceptibles (Nataro & Kaper, Diarrheagenic *Escherichia coli.*, 1998) (Nutrition, Center for Food Safety & Applied, 1994) (Levine, 1987). Los niños guatemaltecos provenientes de familias rurales pobres sufren de 8-11 episodios de diarrea al año. Once por ciento de estos episodios se convierten en diarrea persistente (dura 14 ó más días). ETEC fue asociado con 27% de los episodios de diarrea debilitante, mientras que en áreas peri urbanas ETEC se encontró en 16% de los niños con diarrea aguda y en 3.8% de los controles sanos. ETEC productora de toxina lábil (LT) y/o toxina estable (ST) fue asociada con 8.9% de los casos de diarrea aguda en niños menores de 12 meses de áreas rurales. Interesantemente, ETEC productora de ST también fue encontrada en 14.1% de los casos de diarrea persistente en niños de 3 años de edad. Para causar enfermedad, ETEC se adhiere al epitelio intestinal por medio de los factores de colonización (CFA's) y entonces libera una o más enterotoxinas que producen diarrea (Cruz, Etiología de diarrea aguda en infantes de áreas marginales de Guatemala., 1986) (Cruz, Epidemiology of persistent diaorrhoea among Guatemala rural children, 1992).

Métodos como la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) se han vuelto herramientas importantes para obtener más información relevante sobre la prevalencia de ETEC en países en desarrollo. Este estudio se realizó con el objetivo de disponer de un método sensible, rápido y específico para la detección de ETEC en un centro de referencia en Centro América. Se realizó, optimizando el método de PCR para la detección de ETEC bajo las condiciones del laboratorio de Biología Molecular del INCAP, y luego comparando los resultados de los métodos de PCR recomendados por el CDC de los EEUU contra los de los Ensayos Inmuno Enzimáticos (EIA) utilizados internacionalmente para la vigilancia de ETEC; para determinar si los resultados de PCR para estas toxinas son comparables a los del EIA.

En la optimización del PCR, se inició trabajando con las condiciones descritas en la literatura para ambas toxinas, al no obtener los resultados deseados, se modificaron las condiciones hasta lograr la mayor sensibilidad y especificidad posible con los iniciadores y reactivos utilizados.

Para comparar la prueba, inicialmente se trabajó con 225 muestras (110 provenientes de heces diarreicas y 115 de no diarreicas), pero el exceso de los resultados negativos, sesgó la comparación de los métodos por lo que se evaluaron con 50 muestras positivas y 50 muestras negativas, obteniéndose para LT una sensibilidad del 100%, especificidad del 82.03% y un valor de Kappa de 0.4802 que indica que hay poco acuerdo entre los métodos. Sin embargo para ST se obtuvo una sensibilidad del 42.86%, especificidad de 91.67 y un valor de Kappa de 0.1294 que indica que no hay acuerdo entre las pruebas.

De lo anterior se puede observar lo siguiente: El PCR para LT es fácil, rápido, específico y sensible al compararlo con las pruebas de EIA, sin embargo tiene un Valor de Kappa que nos indica que hay poco acuerdo con el EIA esto se puede deber a que existen bacterias que aunque no expresen los genes para LT codificados en el plásmido aún tienen las secuencias reconocidas por este ensayo. El PCR para detección de genes de ST no es suficientemente sensible, y no presenta ningún acuerdo con el EIA por lo que se necesita probar con un nuevo grupo de iniciadores para ser mejorado.

II. INTRODUCCIÓN

Escherichia coli enterotoxigénica (EPEC) es una de las principales causas de infecciones diarreicas alrededor del mundo y es la principal causa de diarrea en viajeros y niños menores de 5 años de países en vías de desarrollo. Esta bacteria se adquiere por la ingestión de agua o comida contaminada. Los principales factores de virulencia de EPEC son las fimbrias y las enterotoxinas. Produce dos tipos de enterotoxinas: la enterotoxina termolábil que posee el mismo mecanismo de la toxina de *Vibrio cholerae* estimulando la adenilato ciclasa y la toxina termoestable que actúa estimulando la guanilato ciclasa. Estas toxinas son específicas para los enterocitos del intestino delgado y producen diarrea acuosa no hemorrágica. La diarrea es acompañada de dolores abdominales, mareos y náusea. Aunque usualmente es una infección autolimitante, puede causar deshidrataciones severas en niños y personas susceptibles; en estos casos, es necesario administrar tratamiento médico. Esto es importante ya que *Escherichia coli* es muy susceptible a adquirir resistencia a antimicrobianos por lo que es indispensable realizar un buen diagnóstico y antibiograma.

Anteriormente se utilizaba el cultivo de células adrenales de ratón Y-1 para detectar la toxina termolábil y la inoculación de ratones lactantes de 1 a 3 días de edad para la detección de toxina termoestable, pero estos métodos son complicados y costosos, además que se necesita mucho tiempo para su realización. Alternativamente se han utilizado los métodos de EIA, inmunofluorescencia y PCR para su diagnóstico rápido, sensible y específico a un bajo costo en menos de 24 horas después de realizar el cultivo. El objetivo de este estudio fue poner a la disposición un método sensible, rápido y específico para la detección de EPEC, esto se realizó optimizando el método bajo las condiciones del laboratorio de biología molecular del Instituto de Nutrición de Centroamérica y Panamá (INCAP) y luego validándolo, comparando los resultados obtenidos con éste método en comparación con el método de EIA, usado ahora como método de referencia.

III. ANTECEDENTES

A. Generalidades:

Escherichia coli es un bacilo gram negativo móvil que pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*; y a la tribu *Escherichiae*, es el anaerobio facultativo predominante en la microbiota colónica humana. Este microorganismo típicamente coloniza el tracto gastrointestinal en las primeras horas de vida, y además ayuda a mantener las funciones fisiológicas normales del intestino. *E. coli* usualmente se encuentra en el lumen del intestino sin causar daño, sin embargo puede ser causa de infección al ocurrir un debilitamiento o una inmunosupresión en el hospedero, o cuando las barreras gastrointestinales son invadidas, como podría ocurrir con cepas normales no patogénicas (Nataro & Kaper, *Diarrheagenic Escherichia coli.*, 1998) (Nutrition, Center for Food Safety & Applied, 1994) (Levine, 1987).

Debido a que las infecciones por *E. coli* patogénicas pueden estar limitadas a la superficie de las mucosas o pueden diseminarse a todo el cuerpo, existen tres síndromes clínicos resultantes de la infección con cepas de *E. coli* patogénicas: (i) infección en el tracto urinario, (ii) sepsis/meningitis y (iii) enfermedad diarreica/entérica (Nataro & Kaper, *Diarrheagenic Escherichia coli.*, 1998) (Nutrition, Center for Food Safety & Applied, 1994) (Levine, 1987).

B. Serotipos:

La serotipificación de *E. coli* ocupa un lugar central en la historia de este patógeno. En 1944, Kauffman propuso un esquema de clasificación serológica para *E. coli*, el cual se utiliza actualmente con algunas modificaciones (1). De acuerdo con el esquema modificado de Kauffman, *E. coli* es clasificado serológicamente basándose en los antígenos de superficie: O (somático), H (flagelar) y K (capsular). Un total de 170 antígenos O definen el serogrupo que puede tener cualquiera de éstos. La combinación específica de antígenos O y H define el serotipo de la cepa. Serogrupos específicos de *E. coli* son asociados con diferentes síndromes clínicos (anexo 1) (Nataro & Kaper, *Diarrheagenic Escherichia coli.*, 1998) (Wolf, 1997) (Thielman, 1994).

C. Virulencia de *E. coli*:

Las cepas de *E. coli* patógenas deben seguir las siguientes estrategias de infección en la mucosa: a) colonizar el sitio de la mucosa, b) evadir la respuesta inmune del hospedero, c) multiplicarse y, d) dañar al hospedero (Levine, 1987). Las cepas de *E. coli* diarreogénicas tienen la habilidad de colonizar la superficie de la mucosa intestinal

a pesar de la perístasis y competir por los nutrientes con la microbiota normal (incluyéndose otras cepas de *E. coli*). Poseen antígenos fimbriales específicos que aumentan la habilidad de poder colonizar el intestino y poder adherirse a la mucosa del intestino delgado, un sitio que no es comúnmente colonizado (Nataro & Kaper, Diarrheogenic Escherichia coli., 1998) (Levine, 1987).

Una vez la colonización está establecida, las estrategias de patogenicidad de las diferentes *E. coli* diarreogénicas exhiben una variedad marcada. Se han descrito tres paradigmas principales por los cuales *E. coli* puede causar diarrea: producción de enterotoxinas (ETEC y EAEC, ver clasificación), invasión (EIEC) y/o adherencia íntima con la membrana (EPEC y EHEC) (Nataro & Kaper, Diarrheogenic Escherichia coli., 1998) (Levine, 1987).

D. Clasificación de las cepas de *E. coli* productoras de Diarrea:

Las cepas de *E. coli* productoras de diarrea se clasifican en siete categorías con base en sus propiedades de virulencia, interacciones con la mucosa intestinal, síndromes clínicos que producen, epidemiología y serotipos O:H asociados a cada cepa. Estas categorías son:

1. *E. coli* enterotoxigénica (ETEC)

Es una de las principales causas de diarrea en niños menores de 5 años; además es la causa más común de diarrea del viajero, producen una o dos de las enterotoxinas definidas para este grupo: la toxina termoestable (ST) y la toxina termolábil (LT) (Nataro & Kaper, Diarrheogenic Escherichia coli., 1998) (Benoit, 1994) (Hart, Batt, & Saunders, 1993). Esta categoría será descrita detalladamente más adelante.

2. *E. coli* enteropatógena (EPEC)

Es un tipo importante de *E. coli* diarreogénica, ya que ha sido ligado a diarrea infantil en países en vías de desarrollo, puede causar diarrea aguda severa, deshidratando al niño hasta un punto que hay que hospitalizarlo para evitar la muerte; pero sobre todo a diarrea crónica. Causa principalmente diarrea acuosa, y algunos casos de diarrea recurrente. Las cepas de EPEC, causan alteraciones importantes en la mucosa del intestino delgado del hospedero, ya que EPEC se encuentra íntimamente adherida a la membrana del enterocito, con destrucción importante de las vellosidades intestinales. La adherencia al enterocito de las cepas de EPEC, tiene 2

fases: una inicial mediada por adhesinas de tipo fimbriado que permiten a la bacteria acercarse a sus receptores celulares y una segunda adherencia íntima, la cual se relaciona con la pérdida de las microvellosidades y la formación de imágenes de pedestal, que son deformaciones dramáticas en la estructura de las células de la mucosa intestinal (Nataro & Kaper, Diarrheagenic *Escherichia coli.*, 1998) (Thielman, 1994) (Hart, Batt, & Saunders, 1993) (Knutton, Lloyd, & Mcneish, 1987) (Giron, Ho, & Schoolnick, 1991) (Soher, Cloning and characterization of the bundle-forming pilin gene of enteropathogenic *Escherichia coli* and its distribution in *Salmonella* serotypes., 1993) (Soher, Enteropathogenic *Escherichia coli*: Identification of a gene cluster coding for bundle-forming pilus morphogenesis, 1996) (Stone, 1996).

3. *E. coli* enterohemorrágica (EHEC)

Las cepas de EHEC, pueden causar diarrea, principalmente en países desarrollados. La diarrea en países desarrollados usualmente no es una enfermedad fatal. Sin embargo, la enfermedad producida por cepas de EHEC, puede causar la muerte por una complicación de esta enfermedad, el Síndrome Hemolítico Urémico (HUS por sus siglas en inglés), que está definido por presentar tres síntomas principales: un fallo renal agudo, trombocitopenia y anemia hemolítica microangiopática.

EHEC puede causar una infección muy similar a la disentería causada por *Shigella* spp., o a una diarrea causada por EPEC o ETEC. Las cepas de EHEC producen una toxina que juega un papel muy importante en la respuesta inflamatoria intensa producida por las cepas de EHEC y puede explicar la habilidad de EHEC de producir el HUS (Nataro & Kaper, Diarrheagenic *Escherichia coli.*, 1998) (Thielman, 1994) (Hart, Batt, & Saunders, 1993) (Griffin & Tauxe, 1991) (Whittam, 1993).

4. *E. coli* enteroagregativa (EAEC)

Causa diarrea persistente en niños, las cepas de EAEC actúan similarmente a las cepas de ETEC, ya que se unen a las células del intestino delgado, no son invasivas y causan cambios histológicos poco visibles en los enterocitos a los que se adhiere. Difieren de las cepas de ETEC principalmente en que estas no se adhieren uniformemente sobre la superficie de la mucosa intestinal. Estas cepas producen una toxina similar a

la toxina termoestable y una similar a la hemolisina. Estas cepas característicamente aumentan la secreción de moco en la mucosa intestinal. La infección por esta bacteria causa una diarrea acuosa, mucosa y secretoria, en menor grado se puede presentar fiebre y pequeños vómitos (Nataro & Kaper, Diarrheagenic *Escherichia coli.*, 1998) (Thielman, 1994) (Hart, Batt, & Saunders, 1993) (Nataro, Heterogeneity of enteroaggregative *Escherichia coli* virulence demonstrated in volunteers, 1995) (Smith, 1994).

5. *E. coli* enteroinvasiva (EIEC)

Las cepas de EIEC causan una infección que es indistinguible de una disentería causada por *Shigella* spp. Estas cepas penetran las células epiteliales, lisan la vacuola endocitada, se multiplican intracelularmente, se mueven bidireccionalmente en el citoplasma y se extienden hacia una célula epitelial adyacente. Esta secuencia de eventos provoca una reacción inflamatoria que se manifiesta con ulceraciones groseras a nivel intestinal. La infección causada por estas cepas presenta comúnmente diarrea acuosa, que es indistinguible de la diarrea secretoria causada por ETEC. Una minoría de los pacientes experimentan un síndrome disentérico, manifestado por sangre, moco y leucocitos en las heces, tenesmo y fiebre (Nataro & Kaper, Diarrheagenic *Escherichia coli.*, 1998) (Thielman, 1994) (Hart, Batt, & Saunders, 1993) (Goldberg & Sansonetti, 1993) (Parson & Sansonetti, 1996).

6. *E. coli* autoagregativa (DAEC)

La mayoría de los pacientes infectados con DAEC, presentan diarrea acuosa sin sangre o leucocitos fecales. Estudios recientes han implicado a las cepas de DAEC como un agente causante de diarrea, principalmente en niños mayores de 5 años. Las cepas de DAEC tienen la capacidad de inducir proyecciones extendidas en la superficie de los enterocitos infectados (Nataro & Kaper, Diarrheagenic *Escherichia coli.*, 1998) (Bilge, MRNA processing independent of Rnase III and Rnase E in the expresision of the F1845 fimbrial adhesin of *Escherichia coli*, 1993) (Bilge, Transcriptional organization of the F1845 fimbrial adhesin determinant of *Escherichia coli.*, 1993) (Iruka, 2000).

E. *E. coli* enterotoxigénica:

1. Patogénesis:

Las bacterias colonizan la superficie del intestino delgado, producen sus toxinas y favorecen una secreción continua de agua y electrolitos en el intestino. Para que las cepas de ETEC puedan causar diarrea, primero tienen que adherirse a los enterocitos del intestino delgado, por medio de las fimbrias de adhesión de superficie, luego causan diarrea por medio de la acción de las enterotoxinas LT y ST. Estas cepas pueden causar diarrea, expresando ya sea únicamente la LT, la ST, o bien ambas simultáneamente (Nataro & Kaper, *Diarrheagenic Escherichia coli.*, 1998) (Wolf, 1997) (Benoit, 1994) (Paniagua, 1997) (Graham, Estes, & Gentry, 1983) (Lang, 1994) (Tsen & Jian, 1998) (Sack D. , *Enterotoxigenic Escherichia coli diarrhoea of travels: a prospective study of american peace corps volunteers*, 1977) (Ceiro & DuPont, 1998) (Sack D. , *Enterotoxigenic Escherichia coli isolated patients at a hospital in Dacca.*, 1977) (Shaheen, Abdel Messih, Klena, Mansour, Wakkeelz, & Wierzba, 2009).

2. Factores de Colonización (CFs):

Para causar diarrea las cepas de ETEC primero tienen que adherirse a los enterocitos del intestino delgado, evento mediado por fimbrias de superficie, también llamadas Pili. De éstas se han caracterizado un gran número de antígenos fimbriales, se han reportado al menos 20 diferentes factores de colonización (CFs por sus siglas en inglés) en cepas de ETEC aisladas de humanos (anexo 2). Comúnmente no existe un sistema uniforme de clasificación de los CFs para ETEC aisladas de humanos basado en la morfología, tamaño, composición química, y reconocimiento del receptor de antigenicidad. En efecto, la nomenclatura de estos CFs es más bien confusa. Términos semejantes como factores antigénicos de colonización (CFA), antígeno de superficie de coli (CS) y el supuesto factor de colonización (PCF), han sido utilizados para describir los diferentes CFs de ETEC (Nataro & Kaper, *Diarrheagenic Escherichia coli.*, 1998) (Graham, Estes, & Gentry, 1983) (Pacheco, 1998) (Gaastra & Svennerholm, 1996) (Casey, 1998) (Rodas C, 2011).

3. Toxina Termolábil (LT):

La toxina termolábil de ETEC es una proteína oligomérica que está muy relacionada en estructura y función con la enterotoxina del cólera (CT), expresada por *Vibrio cholerae* (Nataro & Kaper, Diarrheagenic Escherichia coli., 1998) (Trachman & Mass, 1998) (Merrit, Sarfaty, Feil, & Hol, 1997). La LT y la CT comparten muchas características incluyendo la estructura de holotoxina, secuencia proteica (identidad del 80 por ciento), identidad del receptor primario, actividad enzimática, actividad en animales y en ensayos de cultivos celulares. Se han detectado en las toxinas algunas diferencias en el procesamiento de la enzima y secreción y en la respuesta de los linfocitos T (Nataro & Kaper, Diarrheagenic Escherichia coli., 1998) (Anrén & Jertborn, 1998) (Acres, 1985).

Existen dos grandes serogrupos: 1) La LT-I es expresada por cepas que son patógenas tanto para animales como para humanos; y 2) La LT-II, que actúa principalmente en cepas de animales y raramente en cepas de humanos. La LT-I tiene 2 subunidades (A y B); la subunidad B se adapta a la superficie del enterocito y se une fuertemente al gangliósido GM1 que es el receptor celular y débilmente al gangliósido GD1b y a algunas glicoproteínas intestinales. La subunidad A es la responsable de la actividad enzimática de la toxina y se une proteolíticamente para producir que los péptidos A1 y A2 se unan por un puente disulfuro (anexo 3) (Nataro & Kaper, Diarrheagenic Escherichia coli., 1998) (Anrén & Jertborn, 1998) (Acres, 1985).

El mecanismo de patogénesis de esta toxina, se inicia cuando la subunidad B se adhiere firmemente al gangliósido GM1 que se encuentra en la superficie del enterocito. Luego la subunidad A es cortada por una tripsinización intestinal produciendo una subunidad A₁ más pequeña, este fragmento es endocitado y traslocado a través del enterocito (Salyers & Whitt, 1994) (Hart, Batt, & Saunders, 1993). La subunidad A₁ cataliza la transferencia de una ADP-ribosa desde el NAD⁺ hasta la subunidad alfa (α) de la proteína estimuladora G (G_s), bloqueando su actividad GTPasa y manteniéndola por lo tanto permanentemente activada (anexo 4). El resultado es una activación permanente de la adenilato ciclasa de las células del epitelio intestinal con el consiguiente aumento del AMP_c que estimula la continua secreción de cloruro, bicarbonato y agua a la luz intestinal,

ocurriendo así una diarrea osmótica (Nataro & Kaper, Diarrheagenic Escherichia coli., 1998) (Lehninger, Nelson, & Cox, 2006).

4. Toxina Termoestable (ST):

La ST es una proteína pequeña, monomérica y contiene varios residuos de cisteína en su secuencia aminoacídica. Su pequeño tamaño es la característica principal por la cual no se inactivan a altas temperaturas y por lo que no produce una reacción inmune. De tal forma que los niños de países en desarrollo donde hay poco acceso a agua e higiene no adecuada pueden sufrir hasta 33 episodios de diarrea por ETEC antes de los 3 años de edad. Esto resulta en desmedro o baja talla para edad y en bajo rendimiento académico (INCAP, resultados no publicados). Existen dos clases de ST.

a. STa (soluble en metano):

Es producida por ETEC y otras bacterias Gram negativas. De esta toxina existen dos variantes, STp (St porcina o STIa) y STh (ST humana o STIb), inicialmente descubiertas en cepas aisladas de cerdos o humanos respectivamente. El mayor receptor de la STa es la guanilato ciclasa C (GC-C) que está situada en la membrana apical de las células epiteliales del intestino. Al unirse la STa a la GC-C estimula la actividad de la GC, logrando un incremento intracelular del guanosina-3',5'-monofosfato cíclico (GMPC). Esta actividad lleva por último a la estimulación de secreción de cloruro y/o a la inhibición de la absorción de NaCl, resultando en una secreción de fluidos intestinales (anexo 5) (Nataro & Kaper, Diarrheagenic Escherichia coli., 1998) (Lehninger, Nelson, & Cox, 2006).

b. STb (Insoluble en metanol):

Es asociada principalmente a cepas de ETEC aisladas de cerdos (Echeverria, 1985). La STb induce a daños histológicos del epitelio intestinal; los receptores de esta no se conocen, sólo se sabe que no estimula el incremento de la concentración intracelular de AMPc o GMP (Nataro & Kaper, Diarrheagenic Escherichia coli., 1998).

5. Características Clínicas:

La enfermedad es típicamente abrupta y tiene un período de incubación de 14 a 50 horas.

La diarrea es acuosa, usualmente libre de sangre, moco o pus; se presenta acompañada de dolores abdominales, fiebre, mareos y vómitos. La diarrea por ETEC puede ser moderada, corta y auto limitante o puede resultar tan seria como la causada por la infección por *Vibrio cholerae* (Nataro & Kaper, Diarrheagenic Escherichia coli., 1998) (Nutrition, Center for Food Safety & Applied, 1994) (Wolf, 1997) (Alexa, Rychlik, Nejezchleb, & Hamrik, 1997).

A los niños en países en desarrollo les puede provocar dezmoro y bajo rendimiento académico, debido a que la infección por ETEC no produce una reacción inmune, y pueden sufrir hasta 33 episodios de diarrea por esta causa antes de cumplir los 3 años (INCAP, resultados no publicados) (Qadri, Saha, Ahmed, Altarique, Arabegum, & Svennerholm, 2007).

6. Detección y diagnóstico:

El diagnóstico de ETEC se relaciona mayormente con la detección de las enterotoxinas LT y/o ST. (Nataro & Kaper, Diarrheagenic Escherichia coli., 1998) (Meritt, Sarfaty, Feil, & Hol, 1997) (Bolin, y otros, 2006).

a. Detección de la toxina ST:

La detección de la toxina ST se ha realizado tradicionalmente utilizando ratones lactantes de 1 a 3 días de edad (Nataro & Kaper, Diarrheagenic Escherichia coli., 1998) (Echeverria, 1985) (Lang, 1994) (Trachman & Mass, 1998) (Rademaker, 1993) (Echeverria, Taylor, Seriwatana, & Moe, 1987) (Chapman & Daly, 1993; Patamaroj, Seriwatana, & Echeverria, 1983; Li, 1987), que se inoculan oralmente con extractos conteniendo ST y colorante Azul de Evans. Las muestras positivas con ST retienen el colorante y distienden el estómago, por acumulación de fluidos y electrolitos. Por ser una enterotoxina de acción rápida, el tiempo requerido para obtener una relación máxima del peso del intestino con el peso del cuerpo, varía desde 30 a 90 minutos, dependiendo de la concentración de la enterotoxina en la muestra. La LT no tiene efecto durante este período por ser de acción lenta. El mecanismo

de retención del colorante en el estómago no está muy claro pero se piensa que se puede deber al daño de la mucosa gástrica, cierre del píloro o reducción de los movimientos peristálticos de los intestinos (Nataro & Kaper, Diarrheagenic Escherichia coli., 1998) (Mynott, Luke, & Chandler, 1995).

Varios inmunoensayos han sido desarrollados para la detección de la ST, incluyendo RIA y EIA (Patamaroj, Seriwatana, & Echeverria, 1983) (Mynott, Luke, & Chandler, 1995) (Koike, 1997) (Helander, Grewal, Gaastra, & Svennerholm, 1997) (Jerse & Kopecko, 1995). Estos dos métodos correlacionan bien con los resultados de los bioensayos con los ratones lactantes y requieren de menos experiencia, aunque no están disponibles en el mercado, sino con fines de investigación (Nataro & Kaper, Diarrheagenic Escherichia coli., 1998).

b. Detección de la toxina LT:

El bioensayo tradicional para la detección de LT puede realizarse por el uso de cultivos celulares, el ensayo de células adrenales Y1 o el ensayo de células ováricas de hámster chino (CHO) (Nataro & Kaper, Diarrheagenic Escherichia coli., 1998) (Echeverria, 1985) (Parson & Sansonetti, 1996) (Lang, 1994) (Rademaker, 1993) (Echeverria, Taylor, Seriwatana, & Moe, 1987) (Chapman & Daly, 1993) (Patamaroj, Seriwatana, & Echeverria, 1983) (Li, 1987). En ambos ensayos, el sobrenadante del cultivo de ETEC es añadido a las células y estas son examinadas en su contorno buscando la elongación de las mismas (Nataro & Kaper, Diarrheagenic Escherichia coli., 1998). Alternativamente se han desarrollado análisis inmunológicos de fácil interpretación en los laboratorios clínicos, como EIA, aglutinación en látex (Patamaroj, Seriwatana, & Echeverria, 1983) (Mynott, Luke, & Chandler, 1995) (Koike, 1997) (Helander, Grewal, Gaastra, & Svennerholm, 1997) (Jerse & Kopecko, 1995). Existen también dos pruebas comerciales eficaces, confiables y de fácil realización: el test de aglutinación pasiva indirecta y el test de coaglutinación estafilocócica (Nataro & Kaper, Diarrheagenic Escherichia coli., 1998), aunque estos métodos no están disponibles en el mercado, sino con fines de investigación de

vacunas principalmente y hoy por hoy se han constituido en los métodos de referencia o estándares de oro.

c. Métodos moleculares:

En el diagnóstico de enfermedades gastrointestinales se han sufrido dramáticos cambios con la introducción de métodos moleculares en los laboratorios clínicos. Los métodos basados en la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) han incrementado la sensibilidad, rapidez y exactitud en el diagnóstico comparado con los métodos tradicionales (Nataro & Kaper, Diarrheagenic *Escherichia coli.*, 1998) (Lou, 1997) (Stacy-Phipps, Mecca, & Weiss, 1995) (Olsvick & Strockbine, 1993). A pesar de estas ventajas, el PCR ha tenido un impacto limitado en laboratorios pequeños por los problemas en la preparación de la muestra, concernientes a la reproducibilidad y a la contaminación de la misma, y al inconveniente de detectar los productos de PCR por un gel de agarosa. El desarrollo de nuevos métodos para la preparación de muestra y la utilización de kits comerciales para la ejecución del PCR y detección de productos ha minimizado estas dificultades, pero eleva el costo, por lo que es importante desarrollar métodos sin kits. La aplicación de técnicas moleculares en los laboratorios de diagnóstico como el PCR, la hibridación con sondas, Southern Blot y Western Blot además han creado un gran campo en la epidemiología molecular y subtipificación, debido a que ha hecho una enorme contribución en el esclarecimiento de los subtipos específicos en las enfermedades humanas (Toit, Victor, & Van Helden, 1993) (Schultsz, 1994).

Las diferentes cepas de ETEC fueron los primeros microorganismos para los cuales se desarrollaron técnicas de diagnóstico molecular (Nataro & Kaper, Diarrheagenic *Escherichia coli.*, 1998). Existen algunos análisis de PCR para ETEC que han resultado ser muy sensibles y específicos al usarse directamente de muestras clínicas o en aislamiento de colonias bacterianas (Lang, 1994) (Stacy-Phipps, Mecca, & Weiss, 1995) (Olsvick & Strockbine, 1993) (Schultsz, 1994) (Oyofu, 1996). Una adaptación beneficiosa del PCR es el PCR múltiple (Olsvick & Strockbine, 1993) (Oyofu, 1996) en el que algunos oligonucleótidos iniciadores (iniciadores) son

combinados para usarse en la detección de uno o varios tipos diferentes de *E. coli* diarreogénicos. Luego del PCR múltiple, varios productos de reacción pueden ser diferenciados usualmente por el peso del producto de amplificación; además, en la fase de detección puede desarrollarse un segundo paso para la identificación definitiva de los respectivos productos de PCR, utilizando técnicas como hibridización con sondas o digestión con enzimas de restricción (Nataro & Kaper, Diarrheagenic Escherichia coli., 1998) (Tsen & Jian, 1998) (Deng, 1996) (Nicklasson, y otros, 2010) (Lothiqius A, 2008).

7. Epidemiología:

Las cepas de ETEC están asociadas principalmente con dos síndromes clínicos: diarrea acuosa en niños de países en desarrollo y diarrea del viajero. El cuadro epidemiológico de las enfermedades por ETEC está determinado en gran parte por tres factores: (i) la inmunidad de la mucosa para la infección por ETEC desarrollada por individuos expuestos; (ii) la inmunidad en individuos asintomáticos, que pueden desprender una gran cantidad de organismos virulentos de ETEC en las heces, y (iii) la alta dosis infectiva requerida (Nataro & Kaper, Diarrheagenic Escherichia coli., 1998) (Kim, 1989).

La contaminación fecal de las fuentes de agua y comida es la principal razón de la alta incidencia de las infecciones por ETEC en los países en vías de desarrollo. Las infecciones por ETEC en las áreas endémicas tienden a ser mayores en los meses cálidos y húmedos, porque la multiplicación de la bacteria en la comida y agua es más eficiente (Nataro & Kaper, Diarrheagenic Escherichia coli., 1998) (Wolf, 1997) (Yatsuyanagi, 1996).

El porcentaje de casos esporádicos debidos a ETEC, del total de los casos de diarrea en infantes en áreas endémicas usualmente varían entre 10 y 20 por ciento, y entre el 25 y 50 por ciento del total de los casos en que se aísla *E. coli* (Nataro & Kaper, Diarrheagenic Escherichia coli., 1998) (Yatsuyanagi, 1996) (Strockbine, 1992) (Begaund, 1993) (Agbonlahor & Odugbermi, 1982) (Savarino, 1996) (Albert, 1995) (Sack R. , 1975) (Gracey, 1994) (Serichantalergs, 1997) (Lindblom, 1995) (Rudoy, 1975). Los niños en edad escolar y los adultos tienen muy baja incidencia de casos sintomáticos de infección (Nataro & Kaper, Diarrheagenic Escherichia coli., 1998) (Rademaker, 1993) (Frech S, 2008).

En Guatemala (Luna, 1980) reportó en 1980 que en niños de edad preescolar del área rural de Guatemala que presentaban diarrea, se logró aislar por medio de un coprocultivo, ETEC en el 20 por ciento de los casos. De estas cepas aisladas el 25 por ciento expresaban la toxina termoestable, 5 por ciento toxina termolábil y 20 por ciento ambas toxinas. Cruz y colaboradores, entre 1985 y 1986 determinaron que ETEC se encontraba entre los principales agentes etiológicos de diarrea en niños menores de un año de la colonia "El Limón", zona 18, presentándose un 6.3 por ciento de incidencia de esta bacteria (Cruz, Etiología de diarrea aguda en infantes de áreas marginales de Guatemala., 1986). Entre 1987 y 1989, Cruz y colaboradores, determinaron la etiología de diarrea aguda en infantes de Santa María de Jesús, Sacatepéquez, encontrándose un 27.1 por ciento de incidencia de ETEC; de las cuales 38.01 por ciento presentaba la toxina termolábil, 40.96 por ciento la toxina estable y 21.03 por ciento presentaba ambas toxinas (Cruz, Epidemiology of persistent diaorrhea among Guatemala rural children, 1992).

8. Estudios Relacionados:

Paralelamente a esta investigación, se realizó un ensayo sobre una vacuna oral para la prevención de la diarrea del viajero causada por ETEC (VTU-982; SBL-OEV114), el objetivo principal fue determinar la eficacia de una nueva vacuna oral para prevenir la infección de ETEC en viajeros. Este estudio se realizó en norteamericanos que vinieron a Guatemala a estudiar español por 3 semanas. A cada uno se le administraron dos dosis de la vacuna (Sack, y otros, 2007) (Sack D. , Evaluation of an oral vaccine to prevent traveler's diarrhea due to enterotoxigenic E. coli, 1998) (Bourgeois AL, 2005). Se le tomaron de 3 a 6 muestras de heces, que fueron cultivadas para la detección de *E. coli*, *Salmonella* spp, *Shigella* spp, *Vibrio* spp y *Campylobacter jejuni*, utilizando los métodos estándar (Sack, y otros, 2007) (Sack D. , Evaluation of an oral vaccine to prevent traveler's diarrhea due to enterotoxigenic E. coli, 1998) (Bourgeois AL, 2005). Estos estudios reportaron que un 30-40% de los visitantes a Antigua Guatemala procedentes de Estados Unidos de Norteamérica, sufren de uno o más episodios de diarrea del viajero por ETEC.

En el hospital de Emergencias Pediátricas de Lima, Perú, se realizó un estudio comparando la serotipificación de antisueros para diferentes serogrupos de *E. coli* diarreogénicas, con la hibridización de productos de PCR para las toxinas ST y LT de ETEC, donde se encontró una mayor sensibilidad con la hibridización. Se encontró que el 27.9% de *E. coli* poseían el gen LT, 3.0% el gen ST y 1.3% tenían ambos. Demostrándose que la identificación serológica es importante en el estudio epidemiológico de diarreas causadas por *E. coli* debiéndose confirmar la las categorías patogénicas mediante la detección de factores de virulencia. (Arias & Huguet, 2006).

En La Universidad Nacional del Nordeste Sargento Cabral en Argentina, se realizó un estudio para adaptar la técnica de PCR múltiple para la identificación de EHEC, ETEC, EPEC y EIEC, obteniendo muy buenos resultados comparados con ELISAS realizados para su detección (Esquivel, Lifschitz, Meana, Jorge, & Meno, 2006).

Se realizó otro estudio con niños menores de 3 años con diarrea acuosa provenientes de Bolivia y Bangladesh, donde se realizó un PCR múltiple con 19 diferentes factores de colonización de ETEC y ambas toxinas, este método resulto ser rápido (3-4 horas), sensible para poder ser utilizado con fines epidemiológicos (Rodas C, 2011).

F. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

El método de PCR es una técnica que permite la amplificación *in vitro* de una región específica de ADN que está delimitada por dos regiones de secuencia conocida (Olsvick & Strockbine, 1993) (Sambrook, Fritsh, & Maniatis, 1989) (Harris E. , 1998). La amplificación de ADN por PCR se lleva a cabo usando iniciadores que son moléculas de ADN de hebra simple complementarios a los extremos de una secuencia definida del ADN molde. Los iniciadores para PCR, sintetizados químicamente, son polimerizados en dirección 5' a 3' sobre la hebra simple de ADN molde desnaturalizado, mediante una ADN polimerasa, en condiciones de reacción adecuadas. Esto da como resultado la síntesis de nuevas hebras de ADN complementarias a las hebras del molde. Estas hebras forman nuevas moléculas de ADN de doble hebra. La síntesis de las hebras puede ser repetida sólo después

que el ADN de doble hebra se vuelva a desnaturalizar por calor, se apareen los iniciadores al enfriar la mezcla y se extiendan estos iniciadores mediante la ADN polimerasa a una temperatura adecuada para esta reacción enzimática. Por lo tanto, cada repetición de la síntesis de una hebra debe entenderse como un ciclo de amplificación, de manera que la secuencia amplificada del ADN molde es amplificada selectiva, exponencial y específicamente ciclo tras ciclo (anexo 6) (Olsvick & Strockbine, 1993) (Sambrook, Fritsh, & Maniatis, 1989) (Harris E. , 1998) (Lobos & Seelenfreud, 1999).

1. Componentes del PCR:

a. ADN blanco:

El ADN blanco, es una secuencia específica de ADN que se quiere amplificar. Se puede emplear y amplificar moldes provenientes de fuentes muy diferentes y organismos distintos. En general se puede decir que con 10^5 - 10^6 moléculas de ADN molde es suficiente, es decir, 1 μ g de ADN genómico humano, 10 ng de ADN de levadura o 1 ng de ADN de *E. coli* (Unit, 1999) (Sambrook, Fritsh, & Maniatis, 1989).

b. Enzima:

La introducción de las ADN polimerasas termoestables fue uno de los principales avances tecnológicos para la técnica de PCR. Antes de ello las ADN polimerasas que se utilizaban eran el fragmento Klenow de *E. coli* o la ADN polimerasa del bacteriófago T₄, las cuales son lábiles al calor. Actualmente están disponibles comercialmente varias ADN polimerasas termoestables, como la Taq (*Thermus aquaticus*), Amplitaq (*T. aquaticus* / recombinante), Fragmento Stoffel (*T. aquaticus* /recombinante), Vent (*T. litoralis*/recombinante), Deep Vent (*Pyrococcus* GB-D/recombinante), Pfu (*Pyrococcus furiosus*), Tth (*Thermus thermophilus*) y UITma (*Thermotoga maritima*). Sólo las dos primeras poseen una débil actividad de transcriptasa reversa, con alta, pero diferente estabilidad térmica, siendo la Deep Vent la más estable con una vida media a 95°C de 1380 min. Sin embargo, la más usada y que posee mayor posesividad es la Taq polimerasa, lo que la hace la enzima de elección en la mayoría de los casos. El rango de concentración recomendada para la ADN Taq polimerasa está entre 1 y 2.5 U por reacción de 100 μ L cuando los demás parámetros son óptimos. Sin

embargo los requerimientos de la enzima pueden variar con respecto a determinados moldes o iniciadores. Si la concentración de la enzima es demasiado alta el trasfondo de productos no-específicos puede aumentar. Esta enzima inicia la síntesis de ADN complementario en el extremo 3' del "primer", debido a que este extremo presenta un grupo hidroxilo libre que es indispensable para que la polimerasa se pueda unir, extendiendo la nueva hebra en dirección 5' a 3' sobre la hebra molde. Estas polimerasas pueden replicar aproximadamente de 1 a 4 kilobases por minuto, dependiendo de la enzima que se utilice (anexo 7). La tasa de remoción varía entre las diferentes polimerasas y es controlada por la presencia de la actividad exonucleasa 3'™ 5' en la enzima, también llamada actividad correctora ("proofreading activity"), la cual permite que la enzima chequee los errores durante la polimerización, remueva la base errónea si esta es encontrada y que la reemplace por la correcta (Olsvick & Strockbine, 1993) (Harris E. , 1998) (Lobos & Seelenfreud, 1999).

c. Desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs):

Son los bloques en la construcción del edificio en la replicación del ADN durante el PCR. Cantidades equivalentes de cada uno de los cuatro dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) son incluidos en la reacción. Primeramente las soluciones madre deben ser preparadas para alcanzar una concentración de 10 mM de cada uno de los dNTPs, alicuotados y almacenados a -20°C. Las concentraciones finales recomendadas de los dNTPs están entre 50 y 200 µM de cada uno. Los cuatro dNTPs deben ser usados a concentraciones equivalentes para minimizar una incorporación errónea. Tanto la especificidad como la fidelidad del PCR aumentan al usar concentraciones menores de dNTPs, debido a que al reducir su concentración, se limita la cantidad de estos que se pueden unir para formar la nueva hebra de ADN, esto hace que se unan a la secuencia más específica. La estabilidad de los dNTPs después de 50 ciclos es aproximadamente un 50 por ciento (Olsvick & Strockbine, 1993) (Lobos & Seelenfreud, 1999) (Watson, 2006).

d. Cloruro de magnesio:

El magnesio es el catión que se une a la polimerasa, siendo un cofactor esencial para la polimerización. La concentración de magnesio puede tener un efecto muy profundo en los resultados de la amplificación, es por esto debe ser optimizada para cada experimento, ya que podría afectar los siguientes parámetros: apareamiento de los iniciadores, temperatura de disociación de las hebras molde, especificidad de los productos, etc. La *Taq* polimerasa requiere magnesio libre, en una concentración final entre 0.5 y 2.5 mM (Coleman & Tsongalis, 2006) (Harris E. , 1998).

e. Buffer de PCR:

El buffer de PCR recomendado debe tener entre 10-50 mM Tris HCl, pH 8.3 medido a 20°C y 25 a 50 mM KCl. Los buffers incluidos con la enzima pueden variar ligeramente su composición. El pH varía entre 8.2 y 9.0 (a 25°C). El pH del Tris, cuando aumenta la temperatura decrece en 0.03 unidades de pH por cada grado Celsius que aumente. Entonces un pH de 9.0 a 25°C se convierte en aproximadamente 7.6 a 72°C, un pH entre 7.0 y 7.5 es óptimo para la *Taq* polimerasa. La inclusión de detergentes no iónicos ayuda a estabilizar la enzima (Lobos & Seelenfreud, 1999) (Radstrom, Lofstrom, Lovenkler, R, & Wolffs, 2008).

f. Iniciadores:

Los iniciadores o cebadores son oligonucleótidos sintéticos, generalmente de 15 a 30 nucleótidos de largo, complementarios a la secuencia particular del genoma del organismo de interés. La secuencia de los iniciadores es lo que confiere la especificidad a la amplificación (Harris & Torres, 1999).

2. Fases del PCR:

a. Desnaturalización:

La causa más frecuente de falla de una reacción de PCR es la desnaturalización incompleta del ADN molde y/o del producto de PCR. Las condiciones de desnaturalización típicas son 95°C durante 30 segundos, o 97°C durante 15 segundos. Obviamente, los pasos de desnaturalización demasiado largos y/o temperaturas muy altas causan

una pérdida innecesaria de la actividad enzimática. La vida media de la *Taq* polimerasa es mayor de 2 horas a 92.5°C, 40 minutos a 95°C y 5 minutos a 97.5°C (Hansen & J, 2006) (Lobos & Seelenfreud, 1999).

b. Apareamiento de los iniciadores ("annealing"):

La temperatura y el tiempo requerido para el apareamiento de los iniciadores dependen de su composición de bases, longitud y concentración. Puesto que la *Taq* es activa en un amplio rango de temperaturas (20-85 °C), la temperatura de apareamiento no es un problema, siendo entre 55 y 72°C la que rinde los mejores resultados. El aumento de la temperatura de apareamiento puede tener un efecto dramático sobre el PCR, principalmente un aumento en la especificidad; este es el primer parámetro que debe optimizarse para cualquier reacción de PCR (Hansen & J, 2006) (Lobos & Seelenfreud, 1999).

c. Extensión:

El tercer último paso en un ciclo de amplificación, en este la polimerasa se extiende desde el "primer", en dirección 5' a 3', replicando la hebra de ADN. Depende de la longitud y concentración de la secuencia blanco. Tradicionalmente la extensión se realiza a 72°C debido a que esta temperatura es cercana a la óptima para la *Taq* polimerasa. Se estima que la velocidad de incorporación a 72°C es entre 35 a 100 nucleótidos por segundo, dependiendo de las demás condiciones (Hansen & J, 2006) (Lobos & Seelenfreud, 1999).

d. Número de ciclos:

El número óptimo de los ciclos depende primeramente de la concentración del ADN molde cuando los otros parámetros están optimizados. El error más común es ejecutar demasiados ciclos, lo que aumenta la cantidad y complejidad de productos no específicos. Sin embargo muy pocos ciclos dan como resultado un bajo rendimiento de productos (Hansen & J, 2006) (Lobos & Seelenfreud, 1999).

3. Detección de los productos de PCR:

El método más sencillo para la detección de los productos de amplificación, implica la separación por las cargas negativas de las moléculas de ADN en un campo eléctrico por la migración de estos de un polo negativo a uno positivo a través de una matriz de agarosa o poliacrilamida. Los fragmentos pequeños de ADN migran más rápidamente que los fragmentos grandes. El tamaño de los productos de PCR que interesan se determina fácilmente por comparación simultáneamente con marcadores de ADN de peso molecular conocido. Otro método implica un ligamiento cruzado del producto a una membrana de nylon o nitrocelulosa y la hibridación del producto capturado con sondas. Este procedimiento se puede hacer en reversa, atrapando primero la sonda complementaria en la membrana, luego se hibridiza con el producto de PCR marcado, se lava y se detecta la señal. Se obtienen resultados similares por la hibridación en solución en placas de microtitulación (PCR-EIA), donde las secuencias complementarias se pegan a los pozos y el procedimiento se asemeja a un EIA. Los productos de PCR, marcados con digoxigenina, por ejemplo, se hibridizan con las secuencias complementarias que están pegadas a los pozos de microtitulación, luego del lavado de los pozos y que el anticuerpo conjugado anti-digoxigenina para una enzima (fosfatasa alcalina o peroxidasa) es añadido, se agrega un substrato colorimétrico o quimioluminiscente para la enzima. Otros métodos complejos de detección incluyen la cuantificación fluorescente (Coleman & Tsongalis, 2006).

4. Prevención de la contaminación:

Contaminación en PCR, es la introducción de fragmentos de ADN exógenos o acarreo ("carry over") de ADN de las muestras positivas a algún tubo de reacción de PCR o de reactivos, obteniendo resultados falsos positivos; esta contaminación se puede dar por acarreo de una reacción de amplificación a otra, de una muestra de ADN a otra o de un producto a otro.

Una vez que ha ocurrido contaminación en un laboratorio de PCR, puede ser muy difícil, si no imposible, eliminarla. Por lo tanto, es aconsejable ejecutar los procedimientos rigurosos para impedir que la contaminación ocurra. Existen métodos eficaces y de bajo costo para la prevención del "acarreo" (anexo 8), es necesario adherirse estrictamente a estas prácticas

de laboratorio para la prevención de la contaminación cruzada de ADN (Harris E. , 1998) (Sambrook, Fritsh, & Maniatis, 1989).

5. Optimización del PCR:

Existe un gran número de pasos para optimizar una reacción de PCR. La concentración de magnesio tiene efectos significativos en la amplificación, en adición, la concentración de los iniciadores, dNTPs, polimerasa y muestra de ADN, también pueden ajustarse para optimizar la reacción. Las temperaturas del programa, especialmente la de hibridación y el tiempo de extensión, son unos de los principales factores para una reacción exitosa. El tiempo de rampa y el número de ciclos son variables bastante importantes en el protocolo a seguir (Radstrom, Lofstrom, Lovenkler, R, & Wolffs, 2008).

Una técnica comúnmente utilizada para aumentar la especificidad de la reacción es un inicio caliente ("hot start"). Este método previene la formación de productos no específicos a bajas temperaturas, particularmente los dímeros de iniciadores. Otro método simple es no agregar un ingrediente al inicio, la *Taq* polimerasa, se hace la mezcla maestra y se calientan los tubos hasta 85 °C, luego se agrega la enzima y se inicia el primer ciclo de desnaturalización a 94 °C. Otra práctica es la separación de algún ingrediente (por ejemplo los iniciadores) del resto de los ingredientes de la reacción, utilizando una perla de cera, que es derretida y re solidificada para formar una barrera impermeable entre las dos soluciones. Luego, cuando empieza la amplificación, se derrite aprovechando la temperatura de 94°C de la primera desnaturalización y por ende se mezclan las dos soluciones. Existen otras alternativas más sofisticadas incluyendo la adición de anticuerpos anti-*Taq* que neutralizan la polimerasa ante los anticuerpos que la pueden desnaturalizar a 94°C, manteniendo una enzima activada. Similarmente se puede utilizar una enzima modificada llamada AmpliTaq Gold™, que provee una forma inactiva; un precalentamiento pre-PCR (9-12 minutos a 95°C) sirve para activar la polimerasa al iniciar la amplificación (Harris E. , 1998).

La especificidad y sensibilidad del PCR puede ser incrementada por el método de amplificación anidada. En este procedimiento, luego de completar la amplificación primaria, el producto es reamplificado en un segundo PCR, utilizando iniciadores que hibridicen el primer producto. Esta técnica disminuye la posibilidad de amplificación de productos no

específicos, a partir de dos juegos de iniciadores que reconozcan diferentes regiones del ADN. Lógicamente, la sensibilidad se aumenta debido a que se utilizan dos amplificaciones sucesivas (Apte & Daniel, 2009).

6. Problemas que se pueden presentar en la amplificación:

Los problemas en la amplificación por PCR, se pueden dividir en tres categorías principales:

a. Parámetros químicos:

Puede ocurrir que en la amplificación no se produzcan los resultados esperados, el primer paso a seguir es repetir la amplificación. Es posible que accidentalmente se omita un ingrediente esencial de la mezcla de PCR. Si luego de este experimento no se producen los resultados deseados, se puede repetir el experimento con nuevas alícuotas de los reactivos (Harris E. , 1998) (Radstrom, Lofstrom, Lovenkler, R, & Wolffs, 2008).

Debe asegurarse que está utilizando el buffer de PCR recomendado por el fabricante para la polimerasa que se encuentra en uso, puede ser que la enzima no funcione óptimamente con otros buffers (Coleman & Tsongalis, 2006) (Olsvick & Strockbine, 1993).

Es probable que la concentración de los reactivos que se utilizan no sea la correcta, se debe verificar la concentración de cada reactivo y comprobar los cálculos utilizados para su preparación. La concentración de magnesio es particularmente crítica, una diferencia de solo 0.25mM en la mezcla de PCR puede alterar dramáticamente los resultados de la amplificación (Coleman & Tsongalis, 2006) (Watson, 2006) (Harris E. , 1998).

Es importante dejar descongelar los reactivos completamente, mezclar vigorosamente y centrifugarlos brevemente antes de utilizarlos. De lo contrario se pueden conseguir soluciones muy concentradas o muy diluidas (Harris & Torres, 1999) (Apte & Daniel, 2009).

Es muy importante homogenizar completamente la mezcla de PCR, particularmente luego de la adición de la enzima. Debido a que las enzimas están guardadas en un buffer con alto contenido de glicerol, el cual es viscoso y más denso que la mezcla de PCR y tiende a depositarse en el fondo del tubo. Por esta razón, la mezcla

de PCR debe homogenizarse pipeteando completa pero cuidadosamente, ya que las enzimas son sensibles a la fuerza del vortex y a las burbujas de aire (Watson, 2006) (Salyers & Whitt, 1994).

Se ha reportado que algunos lotes de aceite mineral pueden inhibir el PCR. Por lo tanto, cambiando el lote de aceite mineral se puede determinar si este es el responsable del problema de amplificación (Coleman & Tsongalis, 2006) (Harris E. , 1998).

Algunos reactivos pueden perder su actividad o descomponerse. Debido a esto, es necesario asegurarse de guardar adecuadamente todos los reactivos (Ej. Reactivos de PCR a -20°C , *Taq* polimerasa a largo plazo a -70°C). Es necesario que los congeladores estén conectados a un generador de emergencia en caso de interrupción de la energía eléctrica. Los reactivos que ya están vencidos, pueden ser funcionales si se prueban antes de utilizarlos. Las enzimas pueden perder su actividad en el transcurso del tiempo, se pueden utilizar en una mayor concentración en la mezcla del PCR (Olsvick & Strockbine, 1993) (Coleman & Tsongalis, 2006).

Las muestras deben de ser procesadas y analizadas lo más pronto posible y deben de ser guardadas en un congelador (el ADN a -20°C , y el ARN y muestras vírales a -70°C), porque pueden degradarse, especialmente los extractos crudos que se han preparado. Las muestras se pueden contaminar con nucleasas, por esto cada vez que se manipulen se debe de hacer con guantes para prevenir la contaminación con las nucleasas de la piel. Para conservar mejor los productos de PCR estos se deben almacenar a -20°C (Harris E. , 1998) (Lobos & Seelenfreud, 1999).

Los inhibidores de PCR se pueden originar de las muestras en sí o de de los reactivos utilizados en la preparación de la muestra. Algunas sustancias presentes en las muestras clínicas pueden ser inhibidoras del PCR, la bilirrubina y las sales biliares en las heces, metales pesados en el agua, el grupo hemo en la sangre completa, y nucleasas en las células lisadas. Los químicos usados en la extracción del ADN pueden inhibir la polimerasa si no se remueven completamente luego de utilizarlos. Estas sustancias incluyen el isotiocianato de guanidina, el sulfato dodecil de sodio (SDS), la

proteínasa K, el fenol, la heparina, el EDTA, entre otras (Coleman & Tsongalis, 2006) (Sambrook, Fritsh, & Maniatis, 1989).

b. Parámetros físicos:

i. El termociclador:

El funcionamiento del termociclador debe reevaluarse periódicamente. Esto se puede hacer llenando unas celdas del block del termociclador con aceite mineral, sumergir un termómetro en la celda y programar el termociclador a diferentes temperaturas para verificar la temperatura de las mismas (Harris & Torres, 1999) (Watson, 2006).

Un cambio en el termociclador ya sea de marca o de modelo puede tener efectos en los resultados de la amplificación. Termocicladores diferentes pueden generar diferentes resultados aunque el programa sea exactamente el mismo, esto se debe a las variaciones en el tiempo de rampa, precisión al alcanzar y mantener la temperatura proyectada y la eficiencia en transferir el calor a los tubos en las celdas del bloque metálico (Coleman & Tsongalis, 2006) (Harris E. , 1998).

ii. El programa:

Es posible que el programa de amplificación pueda tener cambios inadvertidos, entonces, es necesario revisar el programa antes de realizar la amplificación y observar los primeros ciclos para asegurarse que el programa está trabajando adecuadamente (Watson, 2006) (Hansen & J, 2006).

iii. Tubos:

- Algunos tubos no encajan apropiadamente en las celdas del block del termociclador. En este caso, se le puede agregar una gota de aceite mineral a la celda, para facilitar la adecuada transferencia de calor hacia el tubo.

- El espesor en la pared del tubo de PCR puede influir en la amplificación. Los tubos estándar pueden requerir una incubación más larga en cada temperatura que los tubos especializados de pared delgada.
- Según algunos reportes, existen tubos fabricados de material plástico, que pueden contener inhibidores de la amplificación por PCR (Lobos & Seelenfreud, 1999) (Harris & Torres, 1999).

iv. Pipetas ajustables:

Algunos inhibidores de PCR pueden ser aspirados hacia adentro de la pipeta durante la preparación de la muestra. Adicionalmente, el uso de una excesiva cantidad de cloro, enjuague insuficiente o un secado inadecuado de las barras de las pipetas durante la limpieza, también pueden interferir en la amplificación (Coleman & Tsongalis, 2006) (Radstrom, Lofstrom, Lovenkler, R, & Wolffs, 2008).

v. Puntas de pipeta:

Lo mejor es utilizar puntas de pipeta nuevas. Si las puntas de la pipeta son reutilizadas, estas deben de ser completamente desaguadas para remover cualquier remanente de detergente o de cloro, que puedan inhibir a la polimerasa. Además deben de ser esterilizadas antes de utilizarse (Coleman & Tsongalis, 2006) (Radstrom, Lofstrom, Lovenkler, R, & Wolffs, 2008).

vi. Guantes:

El polvo o talcos de algunos guantes pueden inhibir la reacción del PCR (Coleman & Tsongalis, 2006) (Radstrom, Lofstrom, Lovenkler, R, & Wolffs, 2008).

c. Parámetros térmicos:

Las condiciones de temperatura pueden ser ajustadas para una óptima amplificación. Por ejemplo, si el producto de amplificación no se observa:

- i. La temperatura de hibridación puede ser disminuida de 2 a 5°C.
- ii. La temperatura de desnaturalización puede ser aumentada en 1°C.
- iii. El tiempo de extensión puede ser aumentado.
- iv. El tiempo de desnaturalización puede ser aumentado.

Para poder reducir la amplificación de productos no específicos, se pueden implementar las modificaciones inversas a las anteriores. En el anexo 9, se indican que cambios se pueden realizar en orden para aumentar la astringencia y eliminar de la amplificación los productos no específicos o para disminuir la astringencia (Coleman & Tsongalis, 2006) (Harris & Torres, 1999) (Radstrom, Lofstrom, Lovenkler, R, & Wolffs, 2008).

IV. JUSTIFICACIÓN

En Guatemala, la diarrea es una de las principales causas de morbilidad y muerte en niños menores de 5 años. En estudios observacionales realizados entre los años 1985 y 1988 en el INCAP, se definió que ETEC está asociada con un 16.4 por ciento de los casos de diarrea en niños menores de 5 años de las áreas urbano marginales y con un 27.1 por ciento de los casos de diarrea en niños menores de 5 años del área rural (Cruz, Etiología de diarrea aguda en infantes de áreas marginales de Guatemala., 1986) (Cruz, Epidemiology of persistent diaorrhoea among Guatemala rural children, 1992). Sin embargo, no existen estudios epidemiológicos recientes que determinen la etiología de estas diarreas y definan qué cepas de *Escherichia coli* diarreogénicas están circulando en el país. Es por esta razón que se deben implementar métodos que puedan facilitar este tipo de estudios.

El diagnóstico de enfermedades gastrointestinales ha sufrido dramáticos cambios con la introducción de métodos moleculares en los laboratorios clínicos. Los métodos basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) han incrementado la sensibilidad, rapidez y exactitud en el diagnóstico comparado con los métodos tradicionales. Estos métodos han tenido aceptación principalmente en laboratorios de referencia y Salud Pública para poder identificar al agente causal al existir algún brote o epidemia de diarrea (Nataro & Kaper, Diarrheagenic *Escherichia coli.*, 1998) (Stacy-Phipps, Mecca, & Weiss, 1995) (Olsvick & Strockbine, 1993). Se ha demostrado en estudios epidemiológicos recientes realizados en países con condiciones socioeconómicas parecidas a las de nuestro país, que el diagnóstico de ETEC por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), puede ser utilizado satisfactoriamente, obteniéndose un diagnóstico sensible y específico a un bajo costo en menos de 24 horas después de realizar el cultivo (Echeverría, 1985).

Por tal razón, fue importante realizar la optimización y validación de esta prueba para poder tener una herramienta epidemiológica en Guatemala más factible, eficiente y rápida, que permita realizar estudios posteriores sobre la epidemiología de las diarreas en las diferentes regiones de nuestro país, y así poder contar en los laboratorios de microbiología del INCAP como un laboratorio de referencia para toda Centroamérica, con un método que en casos de epidemias puede servir para poder diagnosticar casos más rápida y eficientemente que con las pruebas tradicionales.

V. OBJETIVOS

A. General:

Disponer de un método sensible, rápido y específico para la detección de ETEC en un centro de referencia en Centro América.

B. Específicos:

1. Optimizar el método de PCR para la detección de ETEC bajo las condiciones del laboratorio de Biología Molecular del INCAP.
2. Instalar la prueba de PCR para la detección de ETEC en el laboratorio de Biología Molecular del INCAP.
3. Validar el método de detección de ETEC por el método de amplificación por PCR contra el método de EIA que actualmente se utiliza.

VI. HIPÓTESIS

Los métodos de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la detección de las toxinas lábil y estable de *E. coli* enterotoxigénica, son métodos sensibles y específicos comparados con el estándar de oro, método de EIA.

VII. MATERIALES Y MÉTODOS

A. Universo de trabajo

Para la optimización del método; se utilizaron las siguientes cepas de referencia:

1. *E. coli*, INCAP 34420 C (Toxina negativa)
2. ETEC CDC 10407* (contiene las toxinas LT y ST)
3. ETEC CDC 64111* (contiene solo la toxina ST)
4. ETEC CDC 28602* (contiene solo la toxina LT)
5. EPEC INCAP O55174*
6. EAEC INCAP 700156* (Adherente difusa y localizada),
7. EIEC, INCAP O144H35
8. *Vibrio cholerae* O1 INCAP C-6706* (toxigénico)
9. *Vibrio cholerae* O1 INCAP C-8353* (no toxigénico),
10. *Shigella flexneri* ATCC 12022
11. *Salmonella choleraesuis* ATCC 17076

Se utilizaron cepas de otros tipos de *E. coli* y otras bacterias diarreogénicas para descartar alguna reacción cruzada con la secuencia amplificada de las toxinas de ETEC.

Para la validación del método, del total de coprocultivos realizados de enero a mayo de 2000 como parte del estudio VTU-982; SBL-OEV114, se seleccionaron de forma ciega 200 muestras (100 cultivos provenientes de heces diarreicas y 100 de no diarreicas). De estos coprocultivos se tomaron las colonias de *E. coli* aisladas en agar MacConkey.

B. Recursos

1. Recursos humanos
 - a. Br. Juana Inés Pratdesaba Estrada (Investigador).
 - b. MSc. Olga Torres de Matute (Asesora)
 - c. Dra. Patricia Saravia (Colaboradora)
 - d. MSc. Jenniffer Kyle, Vaccine Testing Unit, Johns Hopkins University
 - e. Dr. Louis Bourgeois, Vaccine Testing Unit, Johns Hopkins University
 - f. MSc. Gudrun Wiklund, U. De Gotemburgo, Suecia
 - g. Dr. Ann-Mari Svennerholm, U. De Gotemburgo, Suecia

2. Recursos institucionales

Laboratorio de Microbiología y Virología Dr. Leonardo Matta, División de Nutrición e Infección, Instituto de Nutrición de Centroamérica y Panamá (INCAP).

2. Recursos físicos

a. Equipo

- i. Baño de María
- ii. Agitador vortex
- iii. Medidor de estándar de McFarland (lector de turbidez)
- iv. Pipetas ajustables de 1000 μ l, 200 μ l, 20 μ l y 10 μ l.
- v. Microcentrífuga
- vi. Congelador a -20°C
- vii. Termociclador
- viii. Incubadora
- ix. Mechero Bunsen.
- x. Refrigeradora
- xi. Balanza
- xii. Autoclave
- xiii. Estufa rotatoria
- xiv. Transluminador UV
- xv. Fuente de poder
- xvi. Aparato para electroforesis vertical.
- xvii. Cámara Polaroid con filtro naranja y campana.

b. Materiales de laboratorio

- i. Puntas descartables para pipetas automáticas de 0 a 10 μ l con filtro.
- ii. Puntas descartables para pipetas automáticas de 0 a 200 μ l con y sin filtro.
- iii. Puntas descartables para pipetas automáticas de 100 a 1000 μ l con y sin filtro.
- iv. Tubos Eppendorf de 0.5 ml.
- v. Tubos Eppendorf de 1.5 ml.
- vi. Gradillas para tubos de microcentrífuga.

- vii. Gradillas flotantes para tubos de microcentrífuga.
- viii. Servilletas de papel
- ix. Guantes
- x. Papel Parafilm
- xi. Cajas de Petrí
- xii. Asas bacteriológicas no calibradas.
- xiii. Hielera con hielo molido
- xiv. Molde para gel
- xv. Cámara de electroforesis (sistema horizontal)
- xvi. Peines para geles de agarosa en sistema horizontal.
- xvii. Calculadora
- xviii. Papel para pesar
- xix. Cinta adhesiva de color
- xx. Lentes protectores contra luz UV
- xxi. Película Polaroid 667
- xxii. Marcador permanente

c. Cristalería

- i. Erlenmeyer de 250 ml.
- ii. Probetas de 10, 200 y 1000 ml.
- iii. Beakers
- iv. Tubos de ensayo con rosca y tapadera.
- v. Botellas de vidrio con rosca y tapadera de 250, 500 y 1000 ml.
- vi. Balones aforados de 50, 100, 500 y 1000 ml.

d. Medios de cultivo

- i. Agar Mueller Hinton
- ii. Agar Mac Conkey

e. Reactivos

- i. Agua destilada
- ii. Estándar de McFarland 0.5 y 1.0
- iii. Agua destilada estéril o HPLC (ddH₂O)
- iv. Buffer de PCR 10X: 100 mM Tris HCL, 500 mM KCl, 15 mM MgCl₂, 0.1% (peso/volumen) gelatina.

- v. Desoxirribunucleótidos 12.5X (2.5 mM de dATP, 2.5 mM de dGTP, 2.5 mM de dCTP y 2.5 mM de dTTP).
- vi. TBE 10X:100mM tris-HCl, 500mM KCl, 15mM MgCl₂, 0.1% (P/V) gelatina.
- vii. Iniciador LTib-1 5' (TCTCTATGTGCATACGGAGC) 3'
- viii. Iniciador LTI-2 5' (CCATACTGATTGCCGCAAT) 3'
- ix. Iniciador STI-1 5' (TTAATAGCACCCGGTACAAGCAGG) 3'
- x. Iniciador STI-2 5' (CTTGACTCTTCAAAGAGAAAATTAC) 3'
- xi. Enzima AmpliTAQ (5U/μl; Perkin-Elmer Corp., Noorwalk, Conn. y Epicentre Technologies).
- xii. Agarosa ultrapura, grado electroforésis.
- xiii. Buffer de carga 10X: 0.5% sodio dodecil sulfato (SDS), 10mM EDTA, 50% glicerol, 0.1% azul de bromofenol, 0.1% xilen cianol.
- xiv. Bromuro de etidio (Solución Stock: 10mg/ml en agua)
- xv. Marcador de peso molecular de ADN: Amplisize DNA Estándar 50-2000 pb (BIO RAD) o escalera de ADN de 100 pares de bases (Gibco, BRL).

C. Metodología

1. Diseño experimental

El estudio se realizó en dos fases:

- a. Optimización del método: donde se utilizaron las siguientes cepas de referencia
 - i. E. coli, INCAP 34420 C (Toxina Negativa)
 - ii. ETEC CDC 10407* (contiene las toxinas LT y ST)
 - iii. ETEC CDC 64111* (contiene solo la toxina ST)
 - iv. ETEC CDC 28602* (contiene solo la toxina LT)
 - v. EPEC INCAP O55174*
 - vi. EAEC INCAP 700156* (Adherente difusa y localizada),
 - vii. EIEC, INCAP O144H35
 - viii. *Vibrio cholerae* O1 INCAP C-6706* (toxigénico)
 - ix. *Vibrio cholerae* O1 INCAP C-8353* (no toxigénico),
 - x. *Shigella flexneri* ATCC 12022
 - xi. *Salmonella choleraesuis* ATCC 17076

b. Validación del método

Del total de coprocultivos realizados de enero a mayo del 2000 como parte del estudio VTU-982; SBL-OEV114, se seleccionaron de forma ciega 200 muestras (100 cultivos provenientes de heces diarréicas y 100 de no diarréicas). De estos coprocultivos se tomaron las colonias de E. coli aisladas en agar Mac Conkey.

2. Método de selección de la muestra

- a. Para la fase de validación del método, se seleccionaron de forma ciega 200 muestras por conveniencia (100 cultivos provenientes de heces diarréicas y 100 de no diarréicas) del estudio VTU-982; SBL-OEV114.

3. Procedimiento

a. Optimización de las condiciones de PCR:

Se utilizaron las cepas de referencia, mencionadas anteriormente. Se realizó el PCR, según las condiciones recomendadas en la literatura (Olsvick & Strockbine, 1993). De acuerdo a los resultados encontrados, se variaron las condiciones del ensayo hasta lograr una amplificación sensible y específica.

b. Extracción de ADN

- i. Se realizó una suspensión de las siguientes cepas en agua destilada hasta llegar a un estándar de McFarland entre 0.5 y 1, donde se tienen alrededor de 10^5 a 10^8 colonias por mililitro en suspensión, para tener la cantidad necesaria de ADN de las cepas utilizadas.
- ETEC CDC 10407
 - ETEC CDC 64111
 - ETEC CDC 28602
- ii. Se transfirió asépticamente 1 ml de la suspensión a un tubo Eppendorf de 1.5ml.

- iii. Se colocaron las muestras en gradillas flotantes y se dejaron hervir por 30 minutos en baño de María, asegurándose que no le ingresara agua a las muestras.
- iv. Al terminar la ebullición, se colocaron inmediatamente las muestras en un recipiente con hielo para prevenir la degradación del ADN por nucleasas endógenas liberadas también durante la ebullición.
- v. Se procedió directamente al paso de la amplificación o se almacenaban los tubos a -20°C hasta su uso.

c. Análisis por PCR

- i. Se realizó un PCR diferente para cada toxina, utilizando los iniciadores específicos para cada una.
- ii. Se calculó la cantidad de mezcla maestra necesaria para el número deseado de reacciones, cada una contenía $48\ \mu\text{l}$ de la mezcla (anexo 10). Por cada 20 reacciones se agregó 1 volumen extra de mezcla maestra para compensar el volumen perdido durante el pipeteo.
- iii. Se identificaron los tubos que se utilizarán para cada muestra (Eppendorf de 0.5 ml).
- iv. Se descongelaron las alícuotas de cada reactivo.
- v. Se mezclaron bien los viales que contienen los reactivos con un vortex y luego se centrifugaron en una microcentrífuga por unos segundos para bajar el líquido de las paredes de los viales, manteniendo todos los reactivos y tubos sobre hielo.
- vi. Utilizando pipetas limpias (libres de ADN), se preparó la mezcla de PCR con todos los ingredientes excepto la TAQ polimerasa (anexo 10).
- vii. Se mezcló bien utilizando un agitador vortex.
- viii. Se agregó la enzima (TAQ polimerasa) y se mezcló con el vortex, luego de esto se centrifugó en una microcentrífuga por unos segundos para bajar el líquido de las paredes de los viales.
- ix. Se distribuyó en cada tubo de reacción $48\ \mu\text{l}$ de la mezcla maestra.

- x. Se agregaron tres gotas de aceite mineral estéril a cada tubo utilizando un gotero.
 - xi. Utilizando pipetas "grises", se agregó 2 μ l de la muestra o controles apropiados, a través de la capa de aceite mineral. Se utilizó una punta nueva con filtro para cada muestra.
 - xii. Se colocaron las muestras en el termociclador y se puso a funcionar con la programación respectiva (anexo 11)
- d. Detección de productos de PCR por electroforesis en gel de agarosa
- i. Se preparó un esquema mostrando el orden en que se pondrán las muestras en el gel (anexo 12).
 - ii. Se preparó un gel de agarosa al 3% de la siguiente manera:

Se pesaron 3.6g de agarosa.



Se agregaron 120ml de buffer TBE 1X.



Se calentó hasta disolver todos los cristales de agarosa.



Se dejó enfriar a aproximadamente a 55° C.



Se agregó 3 μ l de bromuro de etidio, por ser ésta una sustancia cancerígena, se manejo con mucho cuidado, utilizando guantes.



En un molde para geles de agarosa, se colocaron los peines necesarios según el número de muestras que se tenían, luego se vertió en el molde la solución de agarosa, evitando formar burbujas.



Se dejó solidificar por aproximadamente 1 hora.

- iii. Se cubrió una gradilla para tubos de centrifuga con un pedazo de parafilm. Haciendo depresiones en el parafilm

sobre los hoyos. Se marcó el número de las reacciones sobre el parafilm en el orden predeterminado. Se prepararon las muestras para el gel en el orden estipulado:

- ◆ 10 μ l del producto.
- ◆ 2 μ l de buffer de carga.

- iv. Se preparó el marcador de ADN: 5 μ l del marcador más 2 μ l del buffer de carga y 3 μ l de agua destilada.
- v. Se introdujo el gel en la cámara de electroforesis horizontal y se cubrió con buffer TBE 1X.
- vi. Se cargaron las muestras en el gel según el orden predeterminado.
- vii. Se dejó correr el gel aproximadamente a 100V hasta que el azul de bromofenol (colorante azul fuerte) migró aproximadamente 70-80% del largo del gel.
- viii. Utilizando guantes, se sacó el gel y se llevó al cuarto oscuro, donde se encuentra el transluminador de luz UV.
- ix. Con una máscara protectora contra luz U.V., se colocó el gel sobre el transluminador de luz UV, se observó y se tomó una fotografía utilizando la cámara con película Polaroid 667.
- x. El tamaño esperado de los fragmentos amplificados era de 322 pares de bases (pb) para LT y de 147pb para la ST (Olsvick & Strockbine, 1993).

4. Medición de la especificidad del método

La especificidad del método se determinó, por medio de tablas de dos por dos comparando los resultados del PCR con los del EIA.

Luego se observó si existía una buena amplificación para las cepas productoras de cada toxina y si existían reacciones cruzadas o inespecíficas con las cepas que no tienen los genes que expresan las toxinas de ETEC. Los resultados se compararon con los de EIA, considerado en este estudio como el estándar de oro.

5. Medición de la sensibilidad del método

La sensibilidad del método se determinó con tablas de dos por dos, utilizando los resultados del EIA como el estándar de oro (anexo 13).

6. Ajuste de las condiciones del PCR

Se procedió a ajustar las condiciones necesarias para que la prueba sea válida con los controles positivos y negativos, a la vez que las bandas obtenidas estuvieran bien definidas y que no presentara reacciones cruzadas o inespecíficas con otras bacterias ya que con las condiciones reportadas en la literatura, al realizar el análisis experimental se determinó que presentaba reacciones cruzadas con otras cepas de *E. coli*, de *Vibrio cholerae* y *Shigella flexneri* (cepas que se utilizaron como controles negativos para observar si presentaban alguna banda inespecífica). Las condiciones que se ajustaron fueron: la temperatura de hibridación, los tiempos y la cantidad de los ciclos y las concentraciones de los reactivos y de ADN.

7. Validación de la prueba

- a. Al terminar con la optimización de la prueba, se procedió a compararla con el "Estándar de Oro" (EIA).
- b. Se utilizaron 200 cajas de los coprocultivos en MacConkey realizados a las muestras de heces del estudio VTU-982; SBL-OEV114. Las muestras seleccionadas fueron 100 diarreicas y 100 no diarreicas, estas muestras han sido analizadas en el estudio mencionado anteriormente, por el método de EIA para detectar ETEC, tanto la toxina lábil como la estable., se picó con asa 5 colonias de *E. coli*, y a cada colonia se le realizó el EIA.
- c. Se tomó una asada de la caja tratando de abarcar por lo menos 20 colonias, incluyendo las 5 colonias ya picadas para realizar el EIA del estudio de vacunas. Se les extrajo el ADN, se analizaron por PCR para detectar la presencia de los genes que codifican las toxinas LT y ST de ETEC.
- d. Se consideró aceptable si la sensibilidad y la especificidad eran mayores del 85%.

8. Análisis de datos

Por el tipo de estudio se hizo uso de la estadística descriptiva: porcentajes de positivo/negativo por PCR.

Los resultados obtenidos por el método de EIA en el estudio VTU-982; SBL-OEV114, se compararon con los resultados de PCR y se midió su concordancia por medio de la prueba de Kappa a través de una tabla de contingencia de 2 por 2.

VIII. RESULTADOS.

A. Optimización de las condiciones del PCR

1. Toxina Termolábil (LT)

Se realizó el PCR con las condiciones iniciales (anexo 10), con las siguientes muestras:

- a. *E. coli*, INCAP 34420 C (Toxina negativa)
- b. ETEC CDC 10407* (contiene las toxinas LT y ST)
- c. ETEC CDC 64111* (contiene solo la toxina ST)
- d. ETEC CDC 28602* (contiene solo la toxina LT)
- e. EPEC INCAP O55174*
- f. EAEC INCAP 700156* (Adherente difusa y localizada),
- g. EIEC, INCAP O144H35
- h. *Vibrio cholerae* O1 INCAP C-6706* (toxigénico)
- i. *Vibrio cholerae* O1 INCAP C-8353* (no toxigénico),
- j. *Shigella flexneri* ATCC 12022
- k. *Salmonella choleraesuis* ATCC 17076

Con estas condiciones se obtuvo una amplificación muy débil, por lo que se realizó nuevamente aumentando al doble la concentración de las muestras, obteniéndose muy buena amplificación en los controles positivos; no se obtuvieron productos inespecíficos con los otros tipos de *E. coli* ni con las otras bacterias utilizadas como controles negativos (anexo 14).

2. Toxina Termoestable (ST)

Al igual que con la toxina Termolábil, se realizó el PCR con las condiciones iniciales (anexo 10) con las mismas muestras que la LT.

Con estas condiciones no se obtuvo amplificación del ADN, por lo que se aumentó al doble la concentración de los iniciadores y de las muestras, obteniéndose una banda muy débil.

Se aumentó el tiempo de extensión de 10 minutos a 20 minutos, obteniendo una buena amplificación pero muchos productos inespecíficos.

Para aumentar la sensibilidad se le agregó a la mezcla maestra un potenciador "Enhancer" (Master Amp 10x PCR), y se trabajó con las condiciones iniciales, obteniéndose una amplificación débil con el "enhancer" y ninguna amplificación con el otro tratamiento.

Se hicieron pruebas con diferentes concentraciones de cloruro de magnesio desde 0.5mM hasta 5.0 mM, observándose una mejor amplificación con 4mM, pero al realizar las pruebas con todas las muestras se observaron productos inespecíficos, por lo que se procedió a bajar la concentración del Cloruro de magnesio a 3 mM, siempre utilizando el enhancer. Con estos cambios en las condiciones de la reacción, se obtuvo una muy buena amplificación en los controles positivos; no se obtuvieron productos inespecíficos con las cepas utilizadas como controles negativos (anexo 14).

B. Validación del método

Para la comparación de los métodos (EIA vs. PCR), se realizó PCR de ambas toxinas a 225 coprocultivos del estudio VTU-982, SBL-OEV114, (110 cultivos provenientes de heces diarreicas y 115 de no diarreicas). De estos coprocultivos se tomaron las colonias de *E. coli* aisladas en agar MacConkey. Paralelamente se analizaron por medio de EIA que es el método de operación estándar para la detección de estas toxinas.

En cada corrida de PCR se incluyeron controles positivos y negativos.

Los resultados de PCR fueron comparados con los resultados del EIA en una tabla de dos por dos, donde se obtuvo sensibilidad (S), especificidad (SP), valor predictivo positivo (PPV), valor predictivo negativo (NPV) para ambas toxinas, los resultados obtenidos para la toxina termolábil se observan en las tablas 1 y 2.

TABLA 1. Toxina termolábil: Resultados de La LT por EIA vs. PCR.

DESCRIPCION	CANTIDAD	PORCENTAJE
Muestras positivas por EIA y positivas por PCR	8	3.6%
Muestras positivas por EIA y negativas por PCR	0	0%
Muestras negativas por EIA y positivas por PCR	17	7.6%
Muestras negativas por EIA y negativas por PCR	200	88.8%

Fuente: datos experimentales.

TABLA No.2. Tabla de dos por dos de los resultados de Validación de LT, EIA vrs. PCR.

		ELISA		
		LT +	LT -	
PCR	LT +	8	17	
	LT -	0	200	
TOTAL		8	217	225

Fuente: datos experimentales.

Sensibilidad: 100%

Especificidad:92.16%

Valor predictivo positivo:32%

Valor predictivo negativo:100%

Acuerdo Kappa: 0.4441 (Poco acuerdo)

De igual manera se obtuvieron resultados de sensibilidad, especificidad, PPV y NPV para la toxina termoestable, estos se observan en las tablas 3 y 4.

TABLA 3. Toxina termoestable: Resultados de la ST por EIA Vrs. PCR.

DESCRIPCION	CANTIDAD	PORCENTAJE
Muestras positivas por EIA y positivas por PCR	2	0.9%
Muestras positivas por EIA y negativas por PCR	17	7.6%
Muestras negativas por EIA y positivas por PCR	2	0.9%
Muestras negativas por EIA y negativas por PCR	204	90.6%

Fuente: datos experimentales.

TABLA No.4. Resultados de Validación de ST, EIA vrs. PCR.

		ELISA		
		LT +	LT -	
PCR	LT +	2	2	
	LT -	17	204	
TOTAL		19	206	225

Fuente: datos experimentales.

Sensibilidad: 10.52%

Especificidad:99.03%

Valor predictivo positivo:50%

Valor predictivo negativo:92.31%

Acuerdo Kappa: 0.1294 (No hay acuerdo)

D. Reevaluación de la validación del método

Por la gran cantidad de muestras negativas, se reevaluó el PCR para ST y LT usando nuevamente un set de muestras, 50 positivas y 50 negativas, previamente analizadas por EIA.

Nuevamente se realizaron pruebas de concordancia comparando los resultados del PCR con los de EIA para ambas toxinas con la prueba de Kappa, los resultados de la toxina labil se observan en las tablas 5 y 6.

TABLA 5. Resultados de La LT por EIA vrs. PCR.

DESCRIPCION	CANTIDAD
Muestras positivas por EIA y positivas por PCR	11
Muestras positivas por EIA y negativas por PCR	0
Muestras negativas por EIA y positivas por PCR	16
Muestras negativas por EIA y negativas por PCR	73

Fuente: datos experimentales.

TABLA No.6. Resultados de Reevaluación de la Validación de LT, EIA vrs. PCR.

		ELISA	
		LT +	LT -
PCR	LT +	11	16
	LT -	0	73

Fuente: datos experimentales.

Sensibilidad:100%

Especificidad:82.03%

Acuerdo Kappa: 0.4802 (Poco acuerdo)

Los resultados de la toxina lábil se observan en las tablas 7 y 8.

TABLA 7. Resultados de la ST por EIA Vrs. PCR.

DESCRIPCION	CANTIDAD
Muestras positivas por EIA y positivas por PCR	12
Muestras positivas por EIA y negativas por PCR	16
Muestras negativas por EIA y positivas por PCR	6
Muestras negativas por EIA y negativas por PCR	66

Fuente: Datos experimentales.

TABLA No.8. Resultados de Reevaluación de la Validación de ST, EIA vrs. PCR.

		ELISA	
		LT +	LT -
PCR	LT +	12	6
	LT -	16	66

Fuente: datos experimentales.

Sensibilidad: 42.86%

Especificidad: 91.67%

Acuerdo Kappa: 0.3789 (No hay acuerdo).

IX. DISCUSION DE RESULTADOS.

A. Optimización de las condiciones del PCR

En la optimización de las condiciones del PCR para la detección de la toxina lábil (LT), se trabajó con las condiciones descritas en la literatura (Olsvick & Strockbine, 1993)(anexo 10). Con estas se obtuvo una amplificación muy débil, y por lo tanto se conseguiría una baja sensibilidad del método. Se decidió aumentar la cantidad de muestra, para que de esta manera se aumentara la cantidad de ADN a amplificar, aumentando al doble la cantidad de muestra se consiguió una muy buena amplificación, además de no obtener productos inespecíficos al realizar el PCR. El riesgo de poner mucho ADN es el de inhibir el PCR.

Para estandarizar las condiciones del PCR para la detección de la toxina estable (ST), se inició con las condiciones descritas en la literatura como se hizo con la LT, sin tener ningún tipo de amplificación, como en este momento no se sabía cual era la razón por la cual no se logro una amplificación, se decidió empezar a realizar los cambios recomendados en la literatura para poder obtener una buena amplificación por lo que se aumento al doble la concentración de los iniciadores para aumentar la posibilidad de unión con la hebra de ADN molde; aumentando así sensibilidad. Con estas condiciones se obtuvo una amplificación muy débil, por lo que se procedió a aumentar la concentración de ADN inicial para que hubiera suficiente cantidad de ADN que se uniera a los iniciadores y lograr una mejor amplificación, además de aumentar el tiempo de extensión 10 minutos más de los iniciales para tratar de aumentar la sensibilidad. Al realizar estos cambios se aumentó la sensibilidad, pero se disminuyó la especificidad, ya que se obtuvieron muchas bandas inespecíficas con los otros tipos de *E. coli* que no presentan la toxina, debido a la gran cantidad de ADN e iniciadores presentes en la mezcla y el tiempo de extensión tan prolongado que provocaba que hubiera mayor posibilidad de unión a sitios no específicos y extensión de los mismos; por lo que se disminuyó nuevamente el tiempo de extensión. Agregando cloruro de potasio al buffer y BSA (2%) como coadyuvante tal como se demostró en el estudio de Yale en el 2009.

Se realizaron pruebas con un "enhancer", trabajando con las condiciones iniciales, a excepción de la adición de este nuevo reactivo, obteniéndose una

amplificación muy débil tal como lo realizó (Yale, 2009) que obtuvo resultados similares.

Siguiendo con las modificaciones a las condiciones, se realizaron pruebas con diferentes concentraciones de cloruro de magnesio (0.5 mM a 5.0mM) utilizando el enhancer, teniendo una buena amplificación en 3mM y 4mM, por lo que se decidió probar ambas concentraciones con los otros tipos de *E. coli*, encontrando productos inespecíficos con la concentración 4mM de cloruro de magnesio, por lo que se decidió trabajar con la concentración 3mM. El cloruro de magnesio es necesario para que la Taq polimerasa pueda trabajar, a veces la cantidad utilizada de esta sal es consumida por los dinucleótidos agregados y no queda disponible para que la polimerasa pueda trabajar adecuadamente, por esto se obtuvo una buena amplificación agregando una mayor concentración de esta sal, pero se obtuvieron productos inespecíficos a una concentración de 4 mM debido a que a mayor concentración de cloruro de magnesio se disminuye la astringencia del buffer utilizado y esto da lugar a los productos inespecíficos encontrados (Yale, 2009).

Se puede observar que la estandarización de la LT fue más fácil que la estandarización de la ST, esto se puede deber a que la ST es una molécula más pequeña.

Actualmente con todos los avances que se han logrado en biología molecular, existen nuevas herramientas que permiten evaluar la calidad de los iniciadores que se utilizan. Utilizando una de estas herramientas (programa en internet para evaluar iniciadores de PCR) (Onodera, 2007), se evaluaron los iniciadores utilizados en este estudio (anexo 15). En los iniciadores de la toxina LT, el tamaño de los iniciadores, está entre los parámetros ideales ya que tienen un largo de 20 y 19 pares de bases y lo ideal es pares que tengan menos de 30 pares de bases e idealmente que esté entre 18 y 25 pares de bases. La temperatura de fusión (T_m) debe de ser lo más parecida posible entre los iniciadores teniendo una diferencia como máximo de 5°C y en este caso si cumple con ello ya que tienen una T_m de 51.18°C y 50.34°C. El porcentaje de bases GC debe estar entre 40 y 60% y cumplieron con ello ya que tienen 50% y 47.37%, y no se forman horquillas entre ambos iniciadores, es decir que la cantidad de hebras complementarias entre ambos iniciadores es muy baja; lo que indica que según estos parámetros los iniciadores utilizados para LT fueron los adecuados.

En los iniciadores de la toxina ST, el tamaño de los iniciadores, está entre los parámetros deseables aunque no ideales ya que tienen un largo de 24 y 27 pares de bases y deben tener menos de 30 pares de bases e idealmente que esté entre 18 y 25 pares de bases. La temperatura de fusión (T_m) debe de ser lo más parecida posible entre los iniciadores teniendo una diferencia como máximo de 5°C y en este caso la diferencia es de 6.62° ya que tienen una T_m de 56.75°C y 50.13°C . El porcentaje de bases GC debe estar entre 40 y 60%, uno de los iniciadores tiene 50% de GC y el otro iniciador tiene 29.63% por lo tanto no cumple con esta condición, no se forman horquillas entre ambos iniciadores, es decir que la cantidad de hebras complementarias entre ambos iniciadores es muy baja. Además, debe evitarse repeticiones consecutivas de más de tres pares de bases iguales, y el iniciador reverso de ST presenta dos de estas repeticiones tal como se realizó en el estudio por Yale en el 2009.

Luego de esta evaluación de los iniciadores se puede observar que los iniciadores utilizados para la detección de la toxina LT son adecuados, no así los utilizados para la detección de la toxina ST.

La estandarización de este método, es válida únicamente para las condiciones del Laboratorio de Biología Molecular del Instituto de Nutrición de Centroamérica y Panamá (INCAP), debido a que al variar cualquier condición, termociclador, marca de reactivos, áreas e instrumentos de trabajo, puede sufrir variaciones físicas o químicas.

B. Validación de la prueba

Luego de haber estandarizado las condiciones del PCR para ambas toxinas, se procedió a comparar la prueba con los resultados obtenidos con el estándar de Oro (EIA), utilizando 225 muestras del estudio VTU-982; SBL-OEV114, de las cuales se seleccionaron 115 muestras no diarreicas y 110 diarreicas, ciegamente, a todas las muestras se les realizó el PCR para la detección de ambas toxinas. Luego se compararon los resultados del PCR con los resultados de EIA provenientes del estudio, con una tabla de dos por dos.

Debido a la gran cantidad de muestras negativas, se decidió analizar 100 muestras más, 50 positivas y 50 negativas, teniendo así datos más reales al momento de realizar la comparación.

Al comparar los resultados de PCR contra EIA, de las 50 muestras positivas y 50 muestras negativas, se puede observar lo siguiente:

1. Toxina termolábil (LT): Es bastante sensible (100%) y específico (82.03%), sin embargo se obtuvo un valor de Kappa también bajo (0.4802) que corresponde a poco acuerdo entre las pruebas. Lo anterior se puede deber a que el PCR detecta genes no expresados, estos resultados son esperados, ya que existen bacterias que aunque no expresen los genes para LT codificados en el plásmido aún tienen las secuencias reconocidas por este ensayo. Por el contrario el EIA detecta solamente las toxinas expresadas. Debido a ello, el PCR, sirve como una herramienta epidemiológica, ya que nos detecta las bacterias que presentan esta toxina aunque no esté expresada, y el EIA nos sirve como una herramienta diagnóstica ya que detecta las toxinas expresadas, es decir las que están provocando daño al paciente.

Debido a la sensibilidad y especificidad tan altas de este método, se evaluó si había alguna relación entre los positivos verdaderos y los falsos positivos con la presencia o ausencia de diarrea, para poder utilizar el método únicamente con las personas que presentan diarrea, pero no se pudo determinar ninguna relación.

2. Toxina termoestable (ST): Es muy poco sensible (42.86%), y aunque tiene una buena especificidad (91.67%), el valor de Kappa (0.3789), es muy bajo, reflejando que no hay acuerdo entre las dos pruebas; por lo que este método necesita ser mejorado, buscando otros juegos de "iniciadores", realizando un PCR múltiple y variando las condiciones del PCR, como se pudo observar al evaluar los iniciadores, principalmente los utilizados para esta toxina no eran los adecuados, como se discutió anteriormente pudo deberse a que no fuera tan efectivo este PCR. Además se puede observar que sucede lo mismo que con la comparación de la LT, el PCR detecta los genes no expresados y el EIA solamente los expresados.

X. CONCLUSIONES.

- A. Se logró estandarizar más fácilmente las condiciones para la detección de la toxina termolábil (LT) que las de la toxina termoestable.
- B. Los iniciadores utilizados para la toxina LT, cumplen con las condiciones que debe tener un iniciador eficiente.
- C. Los iniciadores utilizados para la toxina ST, no cumplen con las condiciones que debe tener un iniciador eficiente.
- D. El PCR para la detección de genes de LT es un método fácil, rápido, específico y sensible, pero presenta poco acuerdo al compararlo con el EIA. Esto se puede deber a que el PCR para LT detecta genes no expresados y EIA solamente detecta los genes expresados.
- E. Se debe buscar un nuevo juego de iniciadores para poder estandarizar y validar nuevamente el método de PCR para ST para aumentar su sensibilidad.
- F. El método de PCR para la detección de las toxinas de ETEC, es efectivo en términos epidemiológicos, no así en términos diagnósticos.

XI. RECOMENDACIONES.

- A. Debido a que se encontró que el PCR para la detección de genes de LT y ST no es lo suficientemente sensible, se recomienda seguir realizando pruebas, variando las condiciones del PCR o probando con unos iniciadores de mejor calidad.
- B. Realizar un PCR múltiple que pueda detectar la LT y ST simultáneamente o diferenciar las toxinas ST humana y ST porcina en un solo PCR.

XII. REFERENCIAS

- Acres, S. (1985). Enterotoxigenic *Escherichia coli* infections in newborn calves. *Reviews of Journal of Dairy Science* , 68:229-256.
- Agbonlahor, D., & Odugbermi, T. (1982). Enteropathogenic, enterotoxigenic and enteroinvasive *Escherichia coli* isolated from acute gastroenteritis patients in Lagos, Nigeria. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* , 76:265-267.
- Albert, M. (1995). Controlled study of *Escherichia coli* diarrheal infections in Bangladeshi children. *Journal of Clinical Microbiology* , 33:973-977.
- Alexa, P., Rychlik, I., Nejezchleb, A., & Hamrik, J. (1997). Identification of enterotoxin-producing strains of *Escherichia coli* by PCR and biological methods. *Veterinary Medicine* , 42:97-100.
- Anrén, C., & Jertborn, M. (1998). Intestinal immune responses to an inactivated oral enterotoxigenic *Escherichia coli* vaccine and associated immunoglobulin A responses in blood. *Infection and Immunity* , 66:3311-3316.
- Apte, A., & Daniel, S. (2009). *PCR primer design*. Cold Spring: Harbor protocols.
- Arias, I., & Huguet, J. (2006). Detección molecular de toxinas termoestable y termolabil de *E. coli* mediante hibridación. *Revista peruana de Medicina Experimental y Salud Pública* , 19-23.
- Begaund, E. (1993). Detection of diarrheogenic *Escherichia coli* in children less than ten years old with and without diarrhea in New Caledonia using seven acetylaminofluorene-labeled DNA probes. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* , 48:23-34.
- Benoit, V. (1994). Foodborne outbreaks of enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Rhode Island and New Hampshire* , 43.
- Bilge, S. (1993). mRNA processing independent of Rnase III and Rnase E in the expression of the F1845 fimbrial adhesin of *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* , 90:1455-1459.
- Bilge, S. (1993). Transcriptional organization of the F1845 fimbrial adhesin determinant of *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology* , 7:993-1006.
- Bolin, I., Wiklund, G., Qadri, F., Torres, O., Bourgeois, A., Savarino, S., et al. (2006). Enterotoxigenic *Escherichia coli* with ST_H and ST_P genotypes are associated with diarrhea both in children in endemic areas and in travelers. *Journal of Clinical Microbiology* , 8:30-39.
- Bourgeois AL, H. J.-M.-G. (2005). Protective efficacy of an oral killed vaccine (OKV) from enterotoxigenic *E. coli* (ETEC) in adult travelers to Guatemala (GU) and Mexico (MX). Baltimore: 45th Annual meeting of the interscience conference on antimicrobial agents and chemotherapy.

- Casey, T. (1998). Expression of heat-stable enterotoxin STb by adherent *Escherichia coli* is not sufficient to cause severe diarrhea in neonatal pigs. *Infection and Immunity* , 66:1270-1272.
- Ceiro, P., & DuPont, H. (1998). Management of travellers diarrhoea . *Drugs* , 56:73-81.
- Chapman, P., & Daly, C. (1993). Evaluation of non-radioactive trivalent DNA probe (LT, ST1a, ST1b) for detecting enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Journal of Clinical Pathology* , 46:309-312.
- Coleman, W., & Tsongalis, G. (2006). *Molecular diagnostics: For the clinical laboratorian*. New York: Humana Press.
- Cruz, J. (1992). Epidemiology of persistent diarrhoea among Guatemala rural children. *Acta paediatrica* , 381:22-26.
- Cruz, J. (1986). Etiología de diarrea aguda en infantes de áreas marginales de Guatemala. *Memorias III Congreso Nacional de Microbiología* (p. 23). Guatemala: .
- Deng, M. (1996). Enterotoxigenic *Escherichia coli* detected in foods by PCR and a Enzyme-linked oligonucleotide probe. *International Journal of Food Microbiology* , 30:217-229.
- Echeverria, P. (1985). Identification by DNA hybridization of enterotoxigenic *Escherichia coli* in a longitudinal study of villages in Thailand. *Journal of Infectious Diseases* , 151: 124-130.
- Echeverria, P., Taylor, D., Seriwatana, J., & Moe, C. (1987). Comparative study of synthetic oligonucleotide and cloned polynucleotide enterotoxin gene probes to identify enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Journal of Clinical Microbiology* , 25:106-109.
- Esquivel, P., Lifschitz, V., Meana, M., Jorge, G., & Meno, L. (2006). Puesta a punto de una técnica para la identificación de *Escherichia coli* diarreogénicas mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). *Universidad Nacional del Nordeste, Argentina, Comunicaciones científicas y tecnológicas* , M-019.
- Frech S, D. H.-G. (2008). Use of a patch containing heat-labile toxin from *Escherichia coli* against travellers' diarrhoea: a controlled field trial. *Lancet* , June 14:2019-2025.
- Gaastra, W., & Svennerholm, A. (1996). Colonization factors of human enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC). *Trends in Microbiology* , 4:444-452.
- Giron, J., Ho, A., & Schoolnick, G. (1991). An inducible bundle forming pilus of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Science* , 254:710-713.
- Goldberg, M., & Sansonetti, P. (1993). *Shigella* subversion of the cellular cytoskeleton: a strategy for epithelial colonization. *Infection and Immunity* . , 61:4941-4946.
- Gracey, M. (1994). Gastrointestinal infections in children. *Current Opinion in Gastroenterology* , 10:88-97.

- Graham, D., Estes, M., & Gentry, L. (1983). Double-blind Comparison of bismuth subsalicylate and placebo in the prevention and treatment of enterotoxigenic *Escherichia coli* induced diarrhoea in volunteers. *Gastroenterology* , 85:1017-1022.
- Griffin, P., & Tauxe, R. (1991). The epidemiology of infections caused by *Escherichia coli* O:157:H7, other enterohemorrhagic *E. coli*, and the associated hemolytic uremic syndrome. *Epidemiologic Reviews* , 13:60-98.
- Hansen, L., & J, J. (2006). *PCR amplification of highly GC- rich regions*. Cold Spring Harbor Protocols.
- Harris, E. (1998). *Low-cost approach to PCR: Appropriate transfer of biomolecular techniques*. New York: Oxford University Press.
- Harris, E., & Torres, O. (1999). Taller Transferencia de tecnología para el diagnóstico y epidemiología molecular de dengue, tuberculosis y enfermedades diarreicas. *Instituto de Nutrición de Centroamérica y Panamá* , 1-89.
- Hart, C., Batt, R., & Saunders, J. (1993). Diarrhea caused by *Escherichia coli*. *Annals of Tropical Paediatrics International Child Health* , 13:121-131.
- Helander, A., Grewal, H., Gaastra, W., & Svennerholm, A. (1997). Detection and characterization of the coli surface antigen 6 of enterotoxigenic *Escherichia coli* strains by using monoclonal antibodies. *Journal of Clinical Microbiology* , 35:867-872.
- Iruka, N. (2000). Characterization of *Escherichia coli* strains from cases of childhood diarrhea in provincial Southwestern Nigeria. *Journal of Clinical Microbiology* , 38:7-12.
- Jerse, A., & Kopecko, D. (1995). Molecular approaches to bacterial detection and species/subspecies characterization: the diarrheogenic *Escherichia coli* groups. *Current Opinion in Gastroenterology* , 11:89-95.
- Kim, K. (1989). Etiology of childhood diarrhea in Korea. *Journal of Clinical Microbiology* , 27:1192-1196.
- Knutton, S., Lloyd, D., & Mcneish, A. (1987). Adhesion of enteropathogenic *Escherichia coli* to human intestinal enterocytes and cultured human intestinal mucosa. *Infection and Immunology* , 55:69-77.
- Koike, N. (1997). Rapid and differential detection of two analogous enterotoxins of *Vibrio cholerae* and enterotoxigenic *Escherichia coli* by a modified Enzyme-Linked Immunosorbent assay. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* , 17:21-25.
- Lang, A. (1994). Multiplex PCR for detection of heat-labile toxin gene and shiga like toxin I and II genes in *Escherichia coli* isolated from natural waters. *Applied and Environmental Microbiology* , 60:3145-3149.
- Lehninger, A., Nelson, D., & Cox, M. (2006). *Principles of Biochemistry*. (4th ed., pp 783-785). Worth Publishers: New York 1013p.

- Levine, M. (1987). *Escherichia coli* that cause diarrhea: Enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic, and enteroadherent. *Journal of Infection Diseases* , 155:377-389.
- Li, P. (1987). Enzyme-liked oligonucleotide probes: non-radioactive detection of enterotoxigenic *Escherichia coli* in fecal specimens. *Nucleic Acids Reserch*, 15:5275-5287.
- Lindblom, G. (1995). *Campylobacter jejuni/coli* and enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) in faces from children and adults in Tanzania. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases* , 27:589-593.
- Lobos, S., & Seelenfreud, D. (1999). *Técnicas experimentales en genética molecular, Manual de laboratorio*. Chile: Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas.
- Lothiqius A, J. A. (2008). Enterotoxigenic *Escherichia coli* is detectable in water samples from an endemic area by real-time PCR. *Journal of Applied Microbiology* , Apr;104(4):1128-36.
- Lou, Q. (1997). Rapid and effective method for preparation of fecal specimens for PCR assays. *Journal of Clinical Microbiology* , 35:281-283.
- Luna, Z. (1980). Determinación de enterotoxinas producidas por cepas de *Escherichia coli* aisladas en niños con diarrea de edad pre-escolar en el área rural de Guatemala. *Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia: Universidad de San Carlos de Guatemala*.
- Merrit, E., Sarfaty, S., Feil, I., & Hol, W. (1997). Structural fundation for the desing of receptor antagonist targeting *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. *Structure* , 5:1485-1499.
- Mynott, T., Luke, R., & Chandler, D. o. (1995). Detection of attachment of enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) to human small intestinal cells by enzyme immunoassay. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* , 10:207-218.
- Nataro, J. (1995). Heterogeneity of enteroaggregative *Escherichia coli* virulence demostrated in volunteers. *Journal of Infectious Diseases* , 171:465-468.
- Nataro, J., & Kaper, J. (1998). Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reveys* , 11:142-201.
- Nicklasson, M., Klena, J., Rodas, C., AL, B., Torres, O., AM, S.(2010). Enterotoxigenic *Escherichia coli* multilocus secuence types in Guatemala and Mexico. *Emerging Infectious diseases Journal* , 16:347-356.
- Nutrition, Center for Food Safety & Applied. (1994). Enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Nutrition, Center for Food Safety & Applied* , 43.
- Olsvick, O., & Strockbine, N. (1993). PCR detection of heat-stable, heat-labile, and shiga-like toxin genes in *Escherichia coli* . (271-276). Diagnostic molecular microbiology - Principles and aplications. AMS, Washington DC. USA.641P.

- Onodera, K. (2007). *PCR primers design: Selection 3' - end triplets for PCR primers*. United States of America: Human Press.
- Oyoyo, B. (1996). Detection of enterotoxigenic *Escherichia coli*, *Shigella* and *Campylobacter* spp. by multiplex PCR assay. *Journal of Diarrhoeal Diseases Research* , 14:207-210.
- Pacheco, A. (1998). Clonal nature of enterotoxigenic *Escherichia coli* serotype O6:H16 revealed by Randomly Amplified Polymorphic DNA analysis. *Journal of Clinical Microbiology* , 36:2099-2102.
- Paniagua, M. (1997). Analysis of incidence of infection with enterotoxigenic *Escherichia coli* in a prospective cohort study of infant diarrhea in Nicaragua. *Journal of Clinical Microbiology* , 35:10404-1410.
- Parson, C., & Sansonetti, P. (1996). Invasion and the pathogenesis of *Shigella* infections. *Current Opinion in Microbiology* , 209:25-42.
- Patamaroj, U., Seriwatana, J., & Echeverria, P. (1983). Identification of enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from swine with diarrhea in Thailand by colony hybridization, using three enterotoxigenic gene probes. *Journal of Clinical Microbiology* , 18:1429-1431.
- Qadri, F., Saha, A., Ahmed, T., Altarique, A., Arabegum, Y., & Svennerholm, A. (2007). Diarrhoeal disease due to enterotoxigenic *Escherichia coli* in the first 2 years of life in urban community in Bangladesh. *Infection and Immunity* , 75:3961-3968.
- Rademaker, C. (1993). Frequency of enterovirulent *Escherichia coli* in diarrhoeal disease in The Netherlands. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* , 12:93-97.
- Radstrom, P., Lofstrom, C., Lovenkjer, M., R, K., & Wolffs, P. (2008). Strategies for overcoming PCR inhibition. *Cold Spring Harbor Protocols* , 101-108.
- Rodas C, M. R. (2011). Enterotoxins, colonization factors, serotypes and antimicrobial resistance of enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) strains isolated from hospitalized children with diarrhea in Bolivia. *Brazilian Journal of Infectious Diseases* , Mar-April, 15(2):132-7.
- Rudoy, R. (1975). Enteroinvasive and enterotoxigenic *Escherichia coli*. Occurrence in acute diarrhea of infants and children. *American Journal of Diseases of Children* , 129:668-672.
- Sack, D. (1977). Enterotoxigenic *Escherichia coli* diarrhoea of travelers: a prospective study of American peace corps volunteers. *Johns Hopkins Medical Journal* , 141:63-70.
- Sack, D. (1977). Enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated patients at a hospital in Dacca. *Journal of Infectious Diseases* , 135:275-280.
- Sack, D. (1998). *Evaluation of an oral vaccine to prevent traveler's diarrhea due to enterotoxigenic E. coli*. Baltimore: Johns Hopkins University. Doc tec. No. VTU982.

- Sack, D., Shimko, J., Torres, O., Bourgeois, A., Sanchez-Francia, D., Gustafson, B. (2007). Randomised, double-blind, safety and efficacy of a killed oral vaccine for enterotoxigenic *E. coli* diarrhoea of travelers to Guatemala and Mexico. *Vaccine* , 25:4392-4400.
- Sack, R. (1975). Enterotoxigenic *Escherichia coli* associated diarrheal disease in Apache children. *New England Journal of Medicine* , 292:1041-1045.
- Salyers, A., & Whitt, D. (1994). Bacterial pathogenesis, a Molecular Approach. *American Society of microbiology* , 418.
- Sambrook, J., Fritsh, E., & Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: A laboratory manual*. USA: Cold Spring Harbor Lab. Press.
- Savarino, S. (1996). Enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin is not restricted to enteroaggregative *E. coli*. *Journal of Infectious Diseases*, 173:1019-1022.
- Schultsz, C. (1994). Detection of enterotoxigenic *Escherichia coli* in stool samples by using no radioactively labeled oligonucleotide DNA probes and PCR. *Journal of Clinical Microbiology* , 2393-2397.
- Serichantalergs, O. (1997). Coli surface antigens associated with enterotoxigenic *Escherichia coli* strains isolated from persons with traveler's diarrhea in Asia. *Journal of Clinical Microbiology* , 35:1639-1641.
- Shaheen, H., Abdel Messih, I., Klena, J., Mansour, A., Wakkeelz, E., & Wierzba, T. (2009). Phenotypic and genotypic analysis of enterotoxigenic *Escherichia coli* in samples obtained from Egyptian children presenting to referral hospitals. *Journal of Clinical Microbiology* , 47:189-197.
- Smith, H. (1994). Isolates of *Escherichia coli* O44:H18 of diverse origin are enteroaggregative. *Journal of Infectious Diseases* , 170:1610-1613.
- Soher, I. (1993). Cloning and characterization of the bundle-forming pilin gene of enteropathogenic *Escherichia coli* and its distribution in *Salmonella* serotypes. *Molecular Microbiology* , 7:563-575.
- Soher, I. (1996). Enteropathogenic *Escherichia coli*: Identification of a gene cluster coding for bundle-forming pilus morphogenesis. *Journal of Bacteriology*, 178:2613-2628.
- Stacy-Phipps, S., Mecca, J., & Weiss, J. (1995). Multiplex PCR assay and simple preparation method for stool specimens detect enterotoxigenic *Escherichia coli* DNA during course of infection. *Journal of Clinical Microbiology* , 33:1054-1059.
- Stone, K. (1996). A cluster of fourteen genes from enteropathogenic *Escherichia coli* is sufficient for the BFP ultrastructure. *Molecular Microbiology* , 20:325-338.
- Strockbine, N. (1992). DNA probe analysis of diarrhoeagenic *Escherichia coli*: Detection of EAF-positive isolates of traditional enteropathogenic *E. coli* serotypes among Bangladesh in pediatric diarrhoea patients. *Molecular and Cellular Probes Journal*, 6:93-99.

- Thielman, N. (1994). Enteric *Escherichia coli* infections. *Current Opinion of Infectious Diseases* , 7:582-591.
- Toit, D., Victor, T., & Van Helden, P. (1993). Empirical evaluation of conditions influencing the polymerase chain reaction: Enterotoxigenic *Escherichia coli* is a test case. *European Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry*, 31:225-231.
- Trachman, J., & Mass, W. (1998). Temperature regulation of heat-labile enterotoxin (LT) synthesis in *Escherichia coli* is mediated by interaction of H-NS protein with the LT A-subunit DNA. *Journal of Bacteriology* , 180:3715-3718.
- Tsen, H., & Jian, L. (1998). Development and use of a multiplex PCR system for the rapid screening of heat labile toxin I, heat stable toxin II and shiga like toxin I and II genes of *Escherichia coli* in water. *Journal of Applied Microbiology*, 84(4):585-592.
- Unit, V. T. (1999). *Procedure for ST/LT testing ETEC isolated in clinical study OEV114/VTU982*. Baltimore: Johns Hopkins University.
- Watson, J. (2006). *Biología Molecular del gen*. Madrid: Médica Panamericana.
- Whittam, T. (1993). Clonal relationships among *Escherichia coli* strains that cause hemorrhagic and infantile diarrhea. *Infection and Immunity* . , 61:1619-1629.
- Wolf, M. (1997). Occurrence, distribution, and associations of O and H serogroups, colonization factor antigens, and toxins of enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews* , 10:569-584.
- Yale, I. M. (2009, agosto 23). *Info med Yale*. Retrieved octubre 09, 2013, from <http://info.med.yale.edu/genetics/ward/tavi/Trblesht.html>
- Yatsuyanagi, J. (1996). Characteristics of enterotoxigenic *Escherichia coli* and *E. coli* harboring enteroaggregative, *E. coli* heat-stable enterotoxin-1 (EAST-1) gene isolated from water-borne outbreak. *Journal of Clinical Microbiology*, 70:215-223.

ANEXOS

ANEXO 1

TABLA No. 1. SEROTIPOS CARACTERÍSTICOS DE LAS DIFERENTES CATEGORIAS DE *E. COLI* DIARREOGENICAS.

CATEGORIA	SEROGRUPO	ANTIGENO H ASOCIADO
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
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
	O11	H21
EIEC	O127	H2
	O281ac	NM
	O29	NM
	O112ac	NM
	O124	H30, NM
	O136	NM
	O143	NM
	O144	NM
	O152	NM
	O159	H2, NM
O164	NM	
	O167	H4, H5, NM

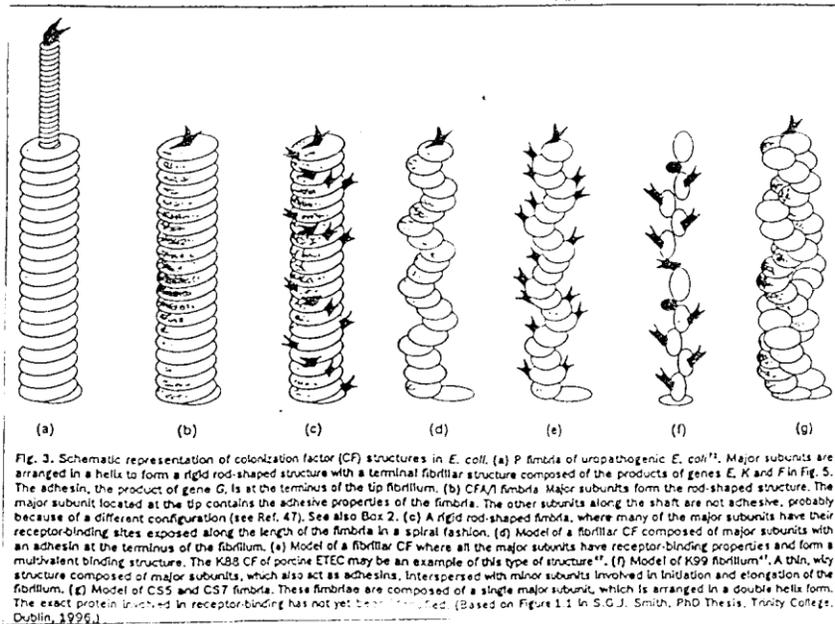
Nataro JP, Kaper JB. Diarrhegenic *Escherichia coli*. Clin Microbiol Rev 1998;11:142-201.

ANEXO 2

TABLA No. 2. CARACTERISTICAS DE LOS FACTORES DE COLONIZACION DE ETEC.

Table 1. Characteristics of human ETEC CFs*								
CF	CS	Morphology	Size (kD)	Regulation	Toxins	Serogroups	Refs	
CFA/Hike group								
CFA/I	CFA/I	F	7 nm	15.0	CfaR	ST+LT, ST	04, 07, 015, 020, 025, 063, 078, 0110, 0126, 0128, 0136, 0153, 0159	3
CS1	CS1	F	7 nm	16.5	Rns	ST+LT	06, 0139	4
CS2	CS2	F	7 nm	15.3	Rns	ST+LT	06	5
CS4	CS4	F	6 nm	17.0	CfaR-like	ST+LT	025	6
PCFO166	CS14	F	7 nm	15.5/17.0	CfaR-like	ST	020, 071, 098, 0166	7
CS17	CS17	F	7 nm	17.5	CfaR-like	LT	08, 015, 048, 0114, 0146	8
CS19	CS19	F	7 nm	16.0	CfaR-like	ST+LT	08	9
'CS5' group								
CS5	CS5	H	5 nm	21.0		ST	06, 029, 092, 0114, 0115, 0167	9
CS7	CS7	H	3-6 nm	21.5		ST+LT	015, 0103, 0114	10
PCFO9	CS13	F		27.0		LT	09, 0143	11
CS20	CS20	F	7 nm	20.8	CfaR-like	ST+LT	017	12
PCFO20	CS18	F	7 nm	25.0		ST+LT	020	13
Type-IV-like								
CFA/III	CS8	F	7 nm	18.0		LT	025	14
Longus	CS21	F	7 nm	22.0		ST+LT, ST, LT	02, 06, 08, 020, 025, 049, 0128, 0139, 0148	15
B786	CS15	nF		16.3		ST	0117	16
Distinct								
CS3	CS3	f	2-3 nm	15.1		ST	05, 09, 078, 080, 0115, 0128, 0139, 0168	17
CS6	CS6	nF		14.5/16.0		ST+LT, ST, LT	025, 027, 092, 0148, 0153, 0159	18
PCFO148	CS11	f	3 nm			ST+LT	0148	19
PCFO159	CS12	F	7 nm	19.0		ST+LT	0159	20
2230	CS10	nF		16.0		ST	025	21

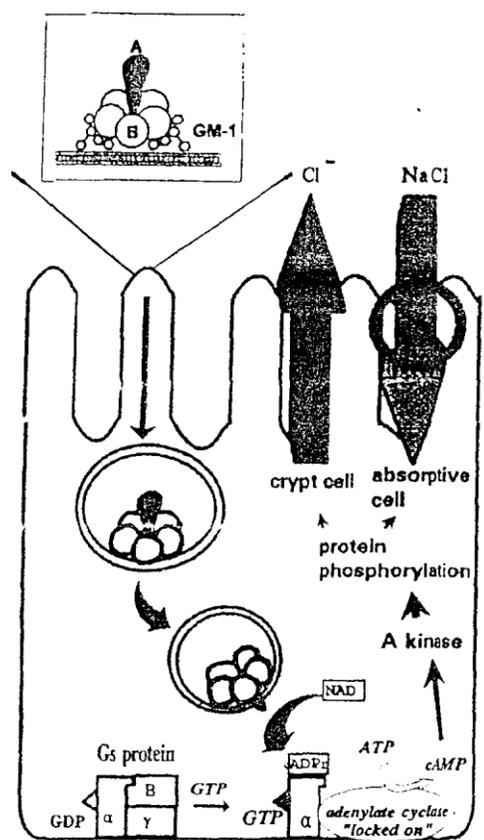
*Abbreviations: F, fimbriae; f, fibrillae; nF, nonfimbrial; H, helical; two fimbriae arranged in a helix; ETEC, enterotoxigenic *E. coli*; CFs, colonization factors; LT, heat-labile enterotoxin; ST, heat-stable enterotoxin.
 †H. M. S. Grewal, PhD Thesis, University of Bergen, Norway, 1995.
 ‡G. A. Clark and P. A. Manning (1993) *Proceedings of the Second Australian Conference on Molecular Analysis of Bacterial Pathogenesis*, Marysville, Victoria, Australia.
 ††N.B. The different CFs have been divided in four groups based on genetic and antigenic relationships. In this table we have given references containing detailed structural data on the various CFs and the operons encoding them. References to earlier literature first describing the various CFs were omitted because of space limitations and can be found in these references.



Serichantalergs O, et al. Coli Surface Antigens Associated with Enterotoxigenic *Escherichia coli* Strains Isolated from Persons with Traveler's Diarrhea in Asia. *J Clin Microbiol* 1997;35:1639-1641.

ANEXO 3

FIGURA No. 1. ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA TOXINA TERMOLABIL DE ETEC.



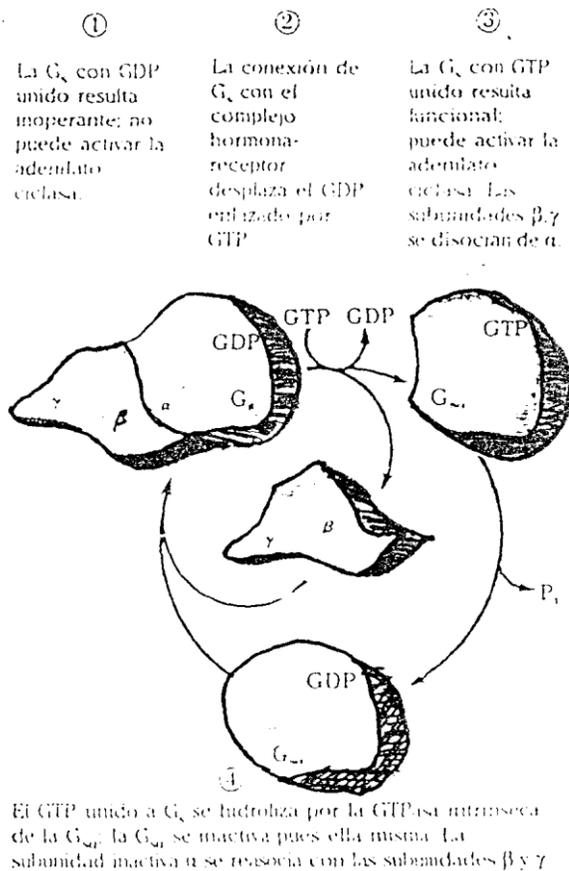
Mecanismo clásico de acción de la toxina labil. La halotoxina LT-1, contiene una subunidad A y 5 subunidades B, es internalizada por las células epiteliales de la mucosa del intestino delgado por endocitosis. La acción de la toxina dentro del enterocito, da como resultado una activación permanente de la adenilato ciclase de las células del epitelio intestinal con el consiguiente aumento del AMP_c que estimula la continua secreción de Cl⁻, HCO₃⁻ y agua a la luz intestinal, ocurriendo así una diarrea osmótica.

Nataro JP, Kaper JB. Diarrheagenic *Escherichia coli*. Clin Microbiol Rev 1998;11:142-201.

Lehninger AL, Nelson DL, Cox MM. Principles of Biochemistry. 4th. Edition. New York: Worth Publishers 2006,1013p (p 736-785).

ANEXO 4

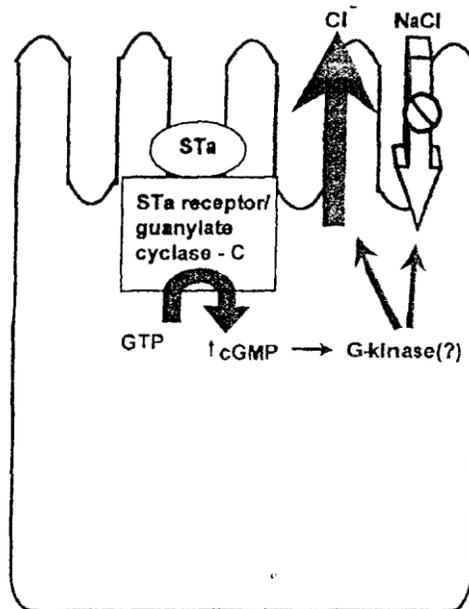
FIGURA No. 2. Actividad de la proteína Gs.



Lehninger, A., Nelson, D., & Cox, M. (2006). *Principles of Biochemistry*. (4th ed., pp 783-785). Worth Publishers: NewYork 1013p.

ANEXO 5

FIGURA No. 3. ACTIVIDAD ENZIMATICA DE LA TOXINA TERMOESTABLE DE ETEC.



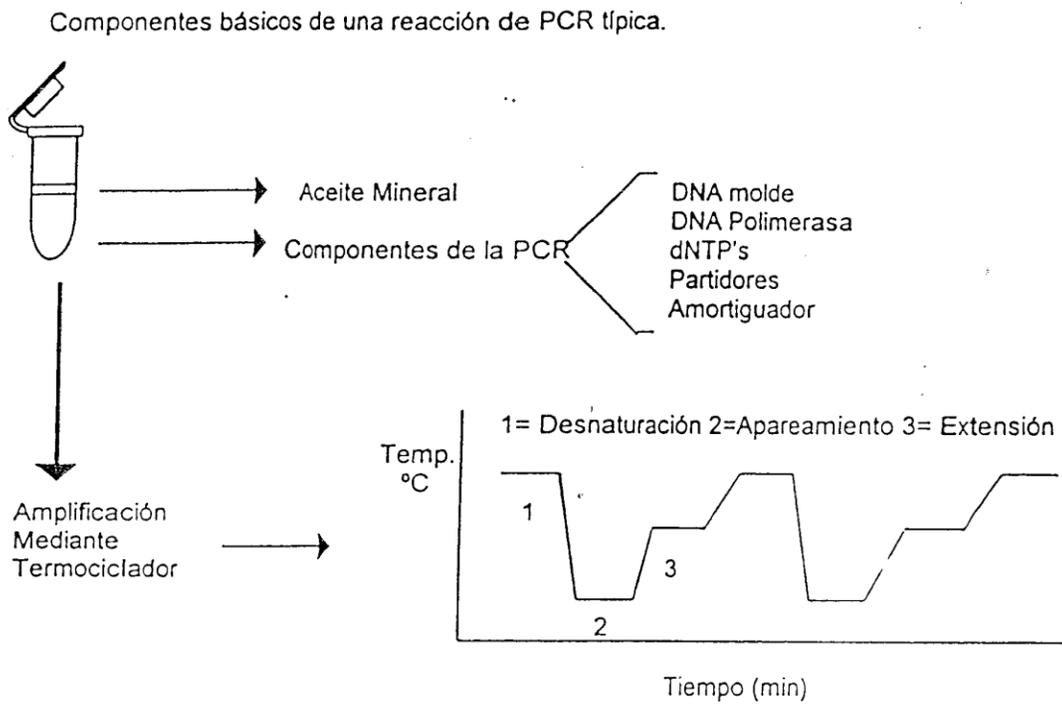
El mayor receptor de la STa es la guanilato ciclasa C (GC-C) que está situada en la membrana apical de las células epiteliales del intestino. Al unirse la STa a la GC-C estimula la actividad de la GC, logrando un incremento intracelular del guanosina-3',5'-monofosfato cíclico (GMPC). Esta actividad lleva por último a la estimulación de secreción de cloro y/o a la inhibición de la absorción de NaCl, resultando en una secreción de fluidos intestinales.

Benoit V, *et al.* Foodborne Outbreaks of Enterotoxigenic *Escherichia coli*. Rhode Island and New Hampshire, 1993. Morbidity and Mortality Weekly Report 1994;43.

Acres SD. Enterotoxigenic *Escherichia coli* infections in newborn calves: a review. J Dairy Sci 1985;68:229-256.

ANEXO 6

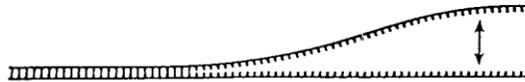
FIGURA No. 4. COMPONENTES BASICOS DE UNA REACCION DE PCR TIPICA.



Lobos S, Seelenfreud D. Técnicas Experimentales en Genética Molecular, Manual de Laboratorio. 5ta. Edición. Chile: Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, 1999.

Figura No. 5. DIAGRAMA ESQUEMATICO DE LA REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA.

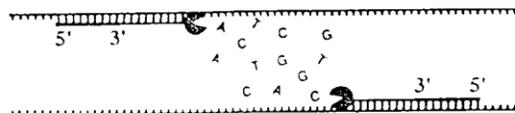
94°: DESNATURALIZACION



54°C: APAREAMIENTO DE LOS "PRIMERS"

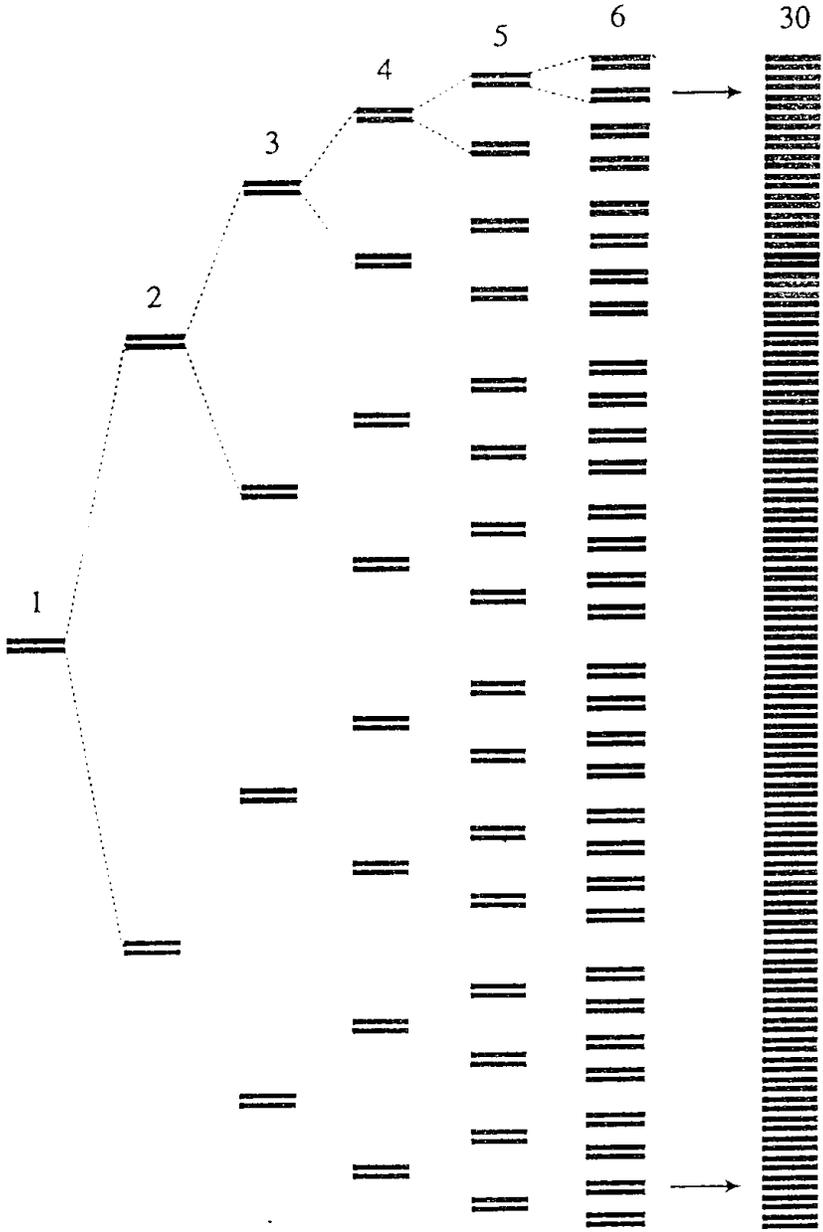


72°C: EXTENSION



Harris E. A Low-Cost Approach to PCR: Appropriate Transfer of Biomolecular Techniques. New York: Oxford University Press, 1998;304p

Figura No. 6. ACUMULACION DE PRODUCTOS DURANTE UNA AMPLIFICACION EXPONENCIAL DE ADN.



Harris E. A Low-Cost Approach to PCR: Appropriate Transfer of Biomolecular Techniques. New York: Oxford University Press, 1998;304p

ANEXO 7

TABLA No3. PROPIEDADES DE LAS POLIMERASAS TERMOESTABLES.

POLIMERASA	T_{1/2} 95°C	BACTERIA	ACTIVIDAD CORRECTORA	PROPIEDADES
<i>Taq</i>	40-90 min	<i>Thermus aquaticus</i>	No 3'→5'exo*	Alta progresividad
<i>Taq Stoffel fragment</i>	80 min	<i>Thermus aquaticus</i>	No 3'→5'exo	No 5'→3'exo Baja progresividad
<i>Ultma®</i>	40 min a 97.5°C	<i>Thermatoga maritima</i>	3'→5'exo	No 5'→3'exo Alta fidelidad Baja progresividad
<i>Vent®</i>	6.7 horas	<i>Thermococcus litoralis</i>	3'→5'exo	Alta fidelidad Baja progresividad
<i>Deep Vent™</i>	23.0 horas	<i>Pyrococcus</i>	3'→5'	Alta fidelidad Baja progresividad
<i>Pfu</i>	95% de actividad luego de 1 hora	<i>Pyrococcus furiosus</i>	3'→5'exo	Alta fidelidad Baja progresividad
<i>RTth</i>	20 min	<i>Thermus thermophilus</i>	No 3'→5'exo	ADN polimerasa RT** plus

- * exonucleasa
- ** Transcriptasa reversa

Harris E. A Low-Cost Approach to PCR: Appropriate Transfer of Biomolecular Techniques. New York: Oxford University Press, 1998;304p

ANEXO 8

PRACTICAS DE LABORATORIO PARA EVITAR LA CONTAMINACIÓN CRUZADA DE ADN EN LAS AREAS DE TRABAJO

A. Cloro

Utilice cloro (hipoclorito de sodio, diluido a una concentración final de 1.5%), para reducir el riesgo de la contaminación a partir de hebras de ADN contaminantes haciendo que no sean amplificables. También reduce el riesgo de una infección al matar a los microorganismos patógenos. Sin embargo, se debe ser cuidadoso de no usar cloro en exceso, porque también puede destruir el ADN molde, que esperamos amplificar. Además, el cloro es nocivo al ambiente (Harris E. , 1998) (Coleman & Tsongalis, 2006).

B. Áreas designadas codificadas por color

Las diferentes actividades para la realización del PCR que conllevan la extracción del ADN, la preparación de los reactivos y tubos de reacción, la amplificación de los productos y su detección; deben separarse físicamente, idealmente en diferentes habitaciones. Si esto no es posible, entonces las áreas deben estar separadas, preferentemente, por diferentes campanas de flujo laminar. Esto reduce al mínimo el riesgo de amplificación de ADN contaminante (Radstrom, Lofstrom, Lovenkler, R, & Wolffs, 2008) (Harris & Torres, 1999).

Para ello se han designado varias áreas identificadas por un color específico que se detallan a continuación:

1. El área "blanca": para preparar la reacción de PCR. Los únicos reactivos usados en esta área, son los ingredientes de la mezcla maestra de PCR. Si una habitación se ha designado como Área Blanca, siempre cierre la puerta de dicha habitación; si una campana extractora de flujo laminar se ha designado, baje el vidrio protector de la campana cuando no está en uso. Evite actividades innecesarias y/o tránsito en el Área Blanca. A esta área no entra ningún material o utensilio (guantes, pipetas, gradillas, etc.) que haya sido utilizado

en otras áreas, sin embargo los materiales de esta área se pueden utilizar en cualquiera de las otras áreas, siempre que no sean vueltos a utilizar en el área blanca (Lobos & Seelenfreud, 1999) (Harris E. , 1998).

2. El área "gris": para preparar ADN o ARN blanco y para agregar la muestra a los tubos de reacción de PCR antes de la amplificación (Olsvick & Strockbine, 1993). (Lobos & Seelenfreud, 1999) (Harris E. , 1998).
3. El área "negra": Para amplificar y analizar los productos de PCR (Lobos & Seelenfreud, 1999) (Harris E. , 1998).

Diferentes "juegos" de pipetas ajustables deben estar dedicados para cada área de trabajo codificada por color. Designar a cada área guantes, batas, gradillas, puntas de pipeta, tubos, cinta, marcadores permanentes, hieleras y otros materiales. Los reactivos para usarse en las diferentes actividades deben almacenarse en las áreas separadas también (Harris & Torres, 1999)(Harris E. , 1998).

Cuando se reciclan los tubos o las puntas de pipeta, el material del área blanca siempre debe reciclarse para uso de las áreas Blancas o Grises únicamente, además el material del área gris y negra siempre debe reciclarse para uso en el área negra, únicamente. Los guantes también pueden ser codificados por color y volverse a usar varias veces, mientras permanecen en el área designada de trabajo, aunque lo ideal es utilizarlo todo nuevo. Además los guantes que se originan en el área Blanca pueden usarse posteriormente en el área Gris y luego en el área Negra pero nunca en dirección opuesta (Harris E. , 1998) (Harris & Torres, 1999) (Lobos & Seelenfreud, 1999).

C. Utilización de controles

Para poder identificar rápido y fácilmente los problemas de contaminación en una reacción de PCR (resultados falsos positivos) o la inhibición de la amplificación (resultados falsos negativos), los siguientes controles deben ser incluidos en la amplificación, en el siguiente orden:

1. Control negativo del área blanca: consiste en agua "blanca", es un control de los reactivos del PCR en el área blanca.
2. Control negativo del área gris: consiste en agua destilada "gris", que es un control del agua y de la pipeta utilizada para la preparación de las muestras del ADN en el área gris.
3. Control negativo de extracción: Consiste en agua destilada, utilizada en lugar de una muestra durante el proceso de extracción, es un control de contaminación durante el proceso de preparación del ADN.
4. Muestra negativa: Es un control de la especificidad de la reacción.
5. Control negativo interpuesto: Consiste en agua destilada, utilizada como control cada quince a veinte muestras cuando son analizadas una gran cantidad de muestras.
6. Control de inhibición: Consiste en una muestra(s) representativa a la que se le ha agregado ADN purificado. Si este control no da el producto esperado y el control positivo si amplifica, esto indica que la muestra puede estar inhibiendo la amplificación.
7. Control positivo: Consiste en ADN puro o un lisado crudo del organismo de interés.
8. Control negativo final: Consiste en agua destilada adicionada al final de las muestras en el cuarto de amplificación, es un control del proceso de adición de las muestras (Radstrom, Lofstrom, Lovenkler, R, & Wolffs, 2008).

D. Manipulación de las muestras

1. No pase la mano o el brazo sobre los tubos abiertos.
2. Siempre cierre los tubos cuando no estén en uso, o al menos cúbralos con una toalla de papel limpia.
3. No ponga sus manos dentro de las jarras o bolsas estériles conteniendo tubos; más bien, saque los tubos invirtiendo el frasco abierto, sobre una toalla de papel limpia.
4. No toque la tapa del tubo; cierre los tubos con una toalla de papel limpia o apretándolos sobre una superficie limpia.
5. Abra los tubos con una toalla de papel limpia.
6. Si la punta de la pipeta toca algo que no debe tocar, siempre descarte la punta. Nunca toque las puntas de las pipetas con los

dedos, aun con los guantes puestos (Sambrook, Fritsh, & Maniatis, 1989) (Harris E. , 1998).

E. Formas de limpiar el material y áreas de trabajo

1. Limpie las áreas de trabajo diariamente con cloro diluido.
2. Remoje periódicamente la barra de la pipeta ajustable en cloro diluido durante 10 a 30 minutos, luego enjuague a fondo con agua destilada y seque completamente.
3. Limpie los guantes, tubos, cajas de puntas de pipeta, etc. con cloro diluido.
4. Entre la manipulación de cada muestra, limpie la punta y el émbolo de la pipeta ajustable con unas toallas de papel remojado en cloro, luego seque completamente con una toalla de papel seca y limpia.
5. Siempre descarte las puntas de la pipeta en un recipiente lleno de cloro diluido.

Harris E. A Low-Cost Approach to PCR: Appropriate Transfer of Biomolecular Techniques. New York: Oxford University Press, 1998;304P.

ANEXO 9

TABLA No. 4. FACTORES QUE AFECTAN LA ASTRINGENCIA DE UNA AMPLIFICACION.

FACTOR	ASTRINGENCIA	ASTRINGENCIA
	ALTA	BAJA
Temperatura de hibridización	Aumentar	Reducir
Concentración de magnesio	Reducir	Aumentar
Número de ciclos	Reducir	Aumentar
Tiempo de Extensión	Reducir	Aumentar
Concentración de Enzima	Reducir	Aumentar
Concentración de Nucleótidos	Reducir	Aumentar
Concentración de los Partidores	Reducir	Aumentar
Concentración del Templado de ADN.	Reducir	Aumentar
Concentración del cosolvente	Aumentar	Reducir

Harris E. A Low-Cost Approach to PCR: Appropriate Transfer of Biomolecular Techniques. New York: Oxford University Press, 1998;304p.

ANEXO 10

Tabla No. 5. MEZCLA MAESTRA DE PCR DE LA LITERATURA

Para la toxina termolábil (LT)

INGREDIENTE	DESCRIPCION	CONCENTRACION	μL/TUBO	CONC. FINAL
Agua destilada	Libre de endotoxinas	-----	37.75	-----
PCR buffer 10X	Con MgCl ₂	15 mM de MgCl ₂	5.00	1.5 mM de MgCl ₂
DNTPs	-----	2.5 mM de c/dNTP	4.00	200 μM de c/dNTP
Primer 1	LTib-1	100 μ M	0.50	1 μM
Primer 2	LTI-2	100 μ M	0.50	1 μM
MgCl ₂	Se agrego con el buffer	-----	-----	-----
Taq polimerasa	-----	5 U/μl.	0.25	1.25 U
Vol. Mezcla	-----	-----	48.00	-----
Vol. Muestra	-----	-----	2.00	-----
Vol. Total	-----	-----	50.00	-----

Para la toxina termoestable (ST)

INGREDIENTE	DESCRIPCION	CONCENTRACION	μL/TUBO	CONC. FINAL
Agua destilada	Libre de endotoxinas	-----	37.75	-----
PCR buffer 10X	Con MgCl ₂	15 mM de MgCl ₂	5.00	1.5 mM de MgCl ₂
DNTPs	-----	2.5 mM de c/dNTP	4.00	200 μM de c/dNTP
Primer 1	STI-1	100 μ M	0.50	1 μM
Primer 2	STI-2	100 μ M	0.50	1 μM
MgCl ₂	Se agrego con el buffer	-----	-----	-----
Taq polimerasa	-----	5 U/μl.	0.25	1.25 U
Vol. Mezcla	-----	-----	48.00	-----
Vol. Muestra	-----	-----	2.00	-----
Vol. Total	-----	-----	50.00	-----

Olsvick, O., & Strockbine, N. (1993). Diagnostic molecular microbiology: Principles and applications; PCR detection of heat-stable, heat-labile, and shiga-like toxin genes in *Escherichia coli*. *Mayo Foundation, New York*, 271-276.

ANEXO 11

Programación del termociclador para amplificación de la toxina labil y estable de *E. coli* enterotoxigénica:

El termociclador se programa para que realice lo siguiente:

1 ciclo:

95° C por 3 minutos. (Desnaturalización Inicial)

35 ciclos:

95° C. X 1 min. (Desnaturalización)

60° C. X 1 min. (Apareamiento de los partidores)

72° C. X 1 min. (Extensión)

1 ciclo:

72° C. X 10 min. (Extensión final)

4° C por tiempo indefinido.

ANEXO 12

ESQUEMA DEL ORDEN DE LAS MUESTRAS EN UN GEL DE AGAROSA:

TITULO: _____

FECHA: _____

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14

AGAROSA	%	V X	MIN	µl PRODUCTO	µl MARCADOR ()
---------	---	-----	-----	-------------	-----------------

ANEXO 13

ESQUEMA DE LA TABLA DE DOS POR DOS UTILIZADA PARA MEDIR LA SENSIBILIDAD DEL METODO:

		EIA	
		T +	T -
PCR	T +		
	T -		

T = Toxina termolábil o termoestable de ETEC.

Fleis Joseph. Statistical methods for rates and proportions. New York, 1981;223p.

ANEXO 14

**Tabla No. 6. MEZCLA MAESTRA DE PCR ESTANDARIZADA
Para la toxina termolábil (LT)**

INGREDIENTE	DESCRIPCION	CONCENTRACION	μL/TUBO	CONC. FINAL
Agua destilada	Libre de endotoxinas	-----	34.25	-----
PCR buffer 10X	-----	-----	5.00	-----
DNTPs	-----	2.5 mM de c/dNTP	4.00	200 μM de c/dNTP
Primer 1	LTib-1	100 μ M	0.50	1 μM
Primer 2	LTI-2	100 μ M	0.50	1 μM
MgCl ₂	-----	50 mM	1.50	1.5 mM
Taq polimerasa	-----	5 U/μl.	0.25	1.25 U
Vol. Mezcla	-----	-----	46.00	-----
Vol. Muestra	-----	-----	4.00	-----
Vol. Total	-----	-----	50.00	-----

Para la toxina termoestable (ST)

INGREDIENTE	DESCRIPCION	CONCENTRACION	μL/TUBO	CONC. FINAL
Agua destilada	Libre de endotoxinas	-----	22.75	-----
PCR buffer 10X	-----	-----	5.00	-----
DNTPs	-----	2.5 mM de c/dNTP	5.00	200 μM de c/dNTP
Primer 1	STI-1	100 μ M	0.50	1 μM
Primer 2	STI-2	100 μ M	0.50	1 μM
Enhancer 10X	-----	-----	10.0	-----
MgCl ₂	-----	50 mM	3.00	3 mM
Taq polimerasa	-----	5 U/μl.	0.25	1.25 U
Vol. Mezcla	-----	-----	47.00	-----
Vol. Muestra	-----	-----	3.00	-----
Vol. Total	-----	-----	50.00	-----

ANEXO 15

EVALUACIÓN DE LOS INICIADORES UTILIZADOS

Par de iniciadores LT

	Secuencia (5'→3')	Largo	Temperatura de fusión (T _m)	GC%	Hebras complementarias	Hebras complementarias 3'
Iniciador directo	TCTCTATGTGCATACGGAGC	20	51.18	50.00	6.00	4.00
Iniciador reverso	CCATACTGATTGCCGCAAT	19	50.34	47.37	9.00	9.00

Par de iniciadores ST

	Secuencia (5'→3')	Largo	Temperatura de fusión (T _m)	GC%	Hebras complementarias	Hebras complementarias 3'
Iniciador directo	TTAATAGCACCCGGTACAAGCAGG	24	56.75	50.00	5.00	1.00
Iniciador reverso	CTTGACTCTTTCAAAGAGAAAATTAC	27	50.13	29.63	10.00	3.00

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/primertool.cgi?ctg_time=1326284271&job_key=JSID_01_261174_130.14.18.128_9001&Check+Status=Check

Juana Inés de la Cruz Pratdesaba Estrada

Autora

MSc. Olga Torres de Matute

Asesora

MSc. Alba Marina de García

Revisora

Lic. Martín Gil

Revisor

MA. María Eugenia Paredes

Directora de Escuela

Ph. D. Oscar Cobar Pinto

Decano