



UNIVERSIDAD DE PANAMÁ
VICERRECTORÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSTGRADO
PROGRAMA DE MAESTRÍA EN MICROBIOLOGÍA AMBIENTAL
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y
TECNOLOGÍA

**Detección molecular de los serogrupos de
Escherichia coli aisladas de muestras ambientales
y humanas de Panamá**

Jackeline Sánchez

Tesis presentada como uno
de los requisitos para optar
al grado de Maestro en
Microbiología Ambiental

PANAMÁ, REPÚBLICA DE PANAMÁ

2018



Título de la Tesis:

"Detección molecular de tres patotipos de Escherichia coli aisladas de muestras ambientales y humanas de Panamá"

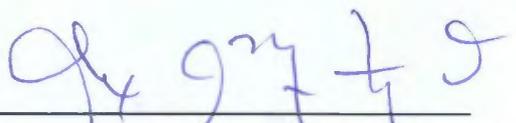
TESIS

Sometida para optar al título de Maestría en Microbiología Ambiental

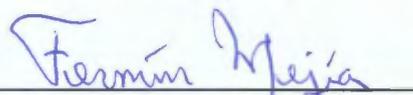
Vicerrectoría de Investigación y Postgrado

Facultad de Ciencias Naturales, Exactas y Tecnología

APROBADO POR:



Doctor Alex Martínez
Presidente

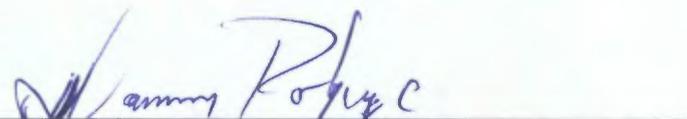


Mgter. Fermín Mejía
Miembro



Mgter. Humberto Cornejo
Miembro

REFRENDADO POR:



**REPRESENTANTE DE LA VICERRECTORÍA
DE INVESTIGACIÓN Y POSTGRADO**

FECHA:

8 AGO 2018

Wagner

51

AGRADECIMIENTO

Primeramente agradecer a Dios por darme la fortaleza necesaria y la oportunidad de cumplir otra meta en mi vida

Agradezco a los profesores asesores Alex O Martinez Torres Fermin Mejia Humberto Cornejo y Sara Ahumada por brindarme sus conocimientos apoyo y constante motivacion

Al Dr Cristian Perez del Hospital Nacional de Niños de Costa Rica por su colaboracion en este proyecto y de igual manera al Licdo Julio Nieto del Hospital del Niño de Panama

A mis padres familiares y amigos por sus palabras de animo en cada momento y su presencia incondicional en cada etapa de mi vida

DEDICATORIA

A Dios quien me ha sostenido en cada epoca de mi vida para cumplir cada anhelo guardado en mi corazon

A mis padres Jackeline Landecho y Alcibiades Sanchez quienes desde niña me han llevado de la mano a lograr meta tras meta brindandome siempre el apoyo y las palabras necesarias para lograrlas

Al cuerpo de Profesores asesores como fruto del esfuerzo hecho y que hoy vemos culminado

A todos mis familiares y amigos que junto a mí celebran cada logro

Gracias

INDICE

INDICE DE FIGURAS	I
INDICE DE CUADROS	II
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN	3
REVISION BIBLIOGRÁFICA	6
1 <i>Escherichia coli</i>	8
Patotipos de E coli	11
E coli Enteropatogenica (ECEP)	12
E coli Enterotoxigenica (ECET)	13
E coli Enteroinvasiva (ECEI)	15
E coli Enteroagregativa (ECEA)	17
E coli Adherente difusa (ECAD)	18
E coli Enterohemorragica (ECEH)	19
2 Metodos Moleculares	27
2 1 Aislamiento de ADN	30
2 2 La Reaccion en cadena de la polimerasa PCR	30
2 2 1 PCR Multiple	32
2 3 Electroforesis en gel de agarosa	33
OBJETIVOS	35
MATERIALES Y METODOS	37
1 Cepas de E coli	38
1 1 Obtencion de cepas de E coli	38
1 2 Reactivacion de cepas de E coli	38
1 3 Identificacion de E coli Enterohemorragica (ECEH)	38

1 4 Conservacion de cepas de E coli	38
1 5 Extraccion de ADN	39
2 PCR Uniple	39
2 1 PCR Multiple	40
3 Electroforesis en gel de agarosa	41
RESULTADOS	42
Estandarizacion de la PCR Uniple	43
Estandarizacion de la PCR Multiple	43
Deteccion de patotipos de E coli	44
DISCUSIÓN	49
CONCLUSIONES	54
RECOMENDACIONES	56
BIBLIOGRAFÍAS	58

INDICE DE FIGURAS

Figura 1 Microfotografía electrónica de <i>E. coli</i>	9
Figura 2 Esquema patogénico de <i>E. coli</i> diarréicas	10
Figura 3 Ciclos de amplificación en una PCR	31
Figura 4 Fuentes de plantillas de ácidos nucleicos para PCR y métodos analíticos derivados	32
Figura 5 Esquema de la migración de las moléculas de ADN lineales de doble cadena en geles de agarosa	34
Figura 6 Resultado de la electroforesis en gel de agarosa al 1.5% después de realizar la PCR para los controles positivos	43
Figura 7 Fotografía de corrida electroforética en gel de agarosa que muestra los productos de la PCR múltiple de los controles positivos	44
Figura 8 Fotografía de corrida electroforética en gel de agarosa que muestra los productos del ensayo de PCR múltiple para la identificación de ECEA, ECEP, ECAD	45
Figura 9 Porcentaje de prevalencia de patotipos aislados de <i>E. coli</i>	45
Figura 10 Prevalencia de los patotipos entre los aislados de <i>E. coli</i> de acuerdo al tipo de muestra	40
Figura 11 Distribución de los patotipos entre los aislados de <i>E. coli</i> muestras clínicas y ambiental	48

INDICE DE CUADROS

Cuadro 1 Características de los grupos de <i>E coli</i> causantes de diarrea	22
Cuadro 2 Cebadores utilizados en la PCR múltiple	40
Cuadro 3 Distribución de los patotipos entre los aislados de <i>E coli</i>	46
Cuadro 4 Distribución de los patotipos entre los aislados de <i>E coli</i> de acuerdo al tipo de muestra	47
Cuadro 5 Distribución de los patotipos entre los aislados de <i>E coli</i> muestras clínicas y Ciudad el Niño	47
Cuadro 6 Distribución de los patotipos de <i>E coli</i> de muestras clínicas en Costa Rica por Pérez <i>et al</i> (2010)	48

RESUMEN

Las *Escherichia coli* (*E coli*) patogenicas son agentes causantes de enfermedades diarreicas en las personas especialmente en niños de países en desarrollo poseen diferentes mecanismos de patogenicidad y se clasifican en *E coli* Enterotoxigenica (ECET) *E coli* Enteropatogenica (ECEP) *E coli* Enteroinvasiva (ECEI) *E coli* Enteroagregativa (ECEA) *E coli* Enterohemorrágica (ECEH) y *E coli* Difusa Adherente (ECDA) En base a esto se trabajó con 50 aislamientos de *E coli* procedentes de heces de animales (cerdo gallina y vaca) y humanos y aguas de la Ciudad de Nino distrito de La Chorrera provincia de Panama Oeste (Colección del Laboratorio de Microbiología Experimental y Aplicada LAMEXA) Además 11 muestras clínicas del Laboratorio Central de Referencia LCRSP Instituto Conmemorativo Gorgas de Estudio de la Salud ICGES con el propósito de detectar tres patotipos distintos (ECEP ECEA y ECDA) empleando la técnica de PCR múltiple De las 50 muestras analizadas el 30% (15 de 50) resultaron positivas para *E coli* patógenas de los patotipos analizados y de estas 26% eran muestras ambientales (Ciudad del Nino) y 4% (2 de 50) eran muestras clínicas También se obtuvo que el 4% (2 de 50) de las muestras analizadas pertenecían a ECEA 4% (2 de 50) pertenecían a ECEP y 22% (11 de 50) pertenecían a patotipos mixtos De las muestras analizadas se encontró presencia de ECEP y ECEA con igual prevalencia y con mayor prevalencia los patotipos mixtos (ECEA con ECEP) No se detectaron patotipos de ECAD Al evaluar los resultados se pudo observar que ECEA se presentó en 9% de las muestras clínicas (1/11) y en 11% de humanos (1/9) y en ECEP hubo la misma prevalencia mientras que los patotipos mixtos se encontraron en 44% de las muestras de cerdo (4 de 9) en 30% de gallina (3 de 10) y en 44% de humanos (4 de 9) Con este estudio ya el país cuenta con información valiosa en cuanto a fuentes de infección y mecanismos de transmisión a nivel ambiental de los diferentes patotipos además de un protocolo de PCR múltiple para la identificación de tres patotipos de *E coli*

Palabras claves *E coli* patotipos patógenos ambiente PCR múltiple

Abstract

Escherichia coli (*E. coli*) pathogenic, causative agents of diarrheal diseases in people especially children in developing countries, have different mechanisms of pathogenicity and are classified as Enterotoxigenic *E. coli* (ETEC), Enteropathogenic *E. coli* (EPEC), Enteroinvasive *E. coli* (EIEC), Enteroagregative *E. coli* (EAEC), Enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC), and Diffusely Adherent *E. coli* (DAEC). Based on this, we worked with 50 isolates of *E. coli* from feces of humans, animals (pigs, chickens and cows) and water from Ciudad del Niño, district of La Chorrera, Province of Panamá Oeste (Collection of the Laboratory of Experimental and Applied Microbiology - LAMEXA). In addition, 11 clinical samples were taken of the Central Reference Laboratory - LCRSP, The Gorgas Memorial Institute for Health Studies (GMIHS), with the purpose of detecting three different pathotypes (EPEC, EAEC, and DAEC) using multiple PCR technique. Of the 50 samples analyzed, 30% (15 out of 50) were positive for pathogenic *E. coli* of the pathotypes analyzed, and of these, 26% were environmental samples (Ciudad del Niño) and 4% (2 of 50) were clinic samples. It was also obtained that 4% (2 of 50) of the samples analyzed belonged to EAEC, 4% (2 of 50) belonged to EPEC and 22% (11 of 50) belonged to mixed pathotypes. Of the samples analyzed, EPEC and EAEC were found with equal prevalence; and with higher prevalence, mixed pathotypes (EAEC with EPEC). No DAEC pathotypes were detected. When evaluating the results, it could be observed that EAEC was presented in the 9% of clinical samples (1/11) and in 11% of humans (1/39), and EPEC with the same prevalence, while the pathotypes mixed samples were found in 44% of pig samples (4 of 9), in 30% of chicken (3 of 10) and in 44% of humans (4 of 9). With this study, the country has very valuable information regarding the forms of infection and the environmental transmission mechanisms of the different pathologies, as well as a Multiplex PCR protocol for the identification of three *E. coli* pathotypes.

Key words: *E. coli*, pathotypes, pathogens, environment, multiple PCR.

INTRODUCCIÓN

Las *Escherichia coli* (*E. coli*) patogénicas, son agentes causantes de enfermedades diarreicas en las personas, especialmente en niños de países en vía de desarrollo, las cuales poseen diferentes mecanismos de patogenicidad y se clasifican como *E. coli* Enterotoxigénica (ECET), *E. coli* Enteropatógena (ECEP), *E. coli* Enteroinvasiva (ECEI), *E. coli* Enteroagregativa (ECEA), *E. coli* Enterohemorrágica (ECEH) y *E. coli* Entero Difusa Adherente (ECDA) (Zambrano, 2012).

Para poder comprender el comportamiento de las *E. coli* patogénicas a nivel ambiental y así determinar su epidemiología, distribución y prevalencia, es necesario realizar estudios donde se identifiquen la presencia de estos diversos serogrupos o patogrupos (Zambrano, 2012).

Para ello, es de vital importancia el análisis microbiológico junto con la investigación a nivel molecular, la cual es, una técnica con una alta sensibilidad y especificidad. La conexión entre la biología molecular y la microbiología clínica, es esencial para dar respuesta rápida a las personas afectadas (Zambrano, 2012).

Por lo tanto, en este estudio se desarrollará un protocolo de PCR múltiple para la identificación de tres patotipos de *E. coli* (ECEA, ECEP y ECAD) provenientes de muestras ambientales (aguas) y heces de animales (cerdo, gallina y vaca) y humanos de una comunidad de la provincia de Panamá Oeste (Ciudad del Niño).

La PCR múltiple ofrece una gran ventaja, al poder amplificar varias secuencias simultáneamente y además, que el diagnóstico es rápido, confiable y preciso (Zambrano, 2012). Aún con la utilidad que nos brinda ésta técnica, no forma parte de los diagnósticos de rutina, por no contar con protocolos estandarizados ni optimizados en nuestro país.

Con éste estudio, el país contará con información valiosa en cuanto a fuentes de infección y mecanismos de transmisión a nivel ambiental. Al implementar ésta

técnica, se contribuirá a detectar rápida y específicamente por técnicas moleculares, de los diferentes patotipos de *E. coli* aisladas de muestras ambientales o clínicas, y además, de beneficiar a las entidades de salud con un protocolo para obtener resultados de rutina de manera más rápida y confiable, a nivel ambiental y clínico.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

La enfermedad diarreica aguda (EDA) en niños menores de 5 años es una de las causas más importantes de mortalidad en países en vía de desarrollo en África y el Sudeste Asiático (Boschi *et al.*, 2008; O`Ryan *et al.*, 2005). La EDA afecta a las poblaciones marginadas no solo de África, Asia y Latinoamérica, sino también en países industrializados (Brockerhoff, 2000; Montenegro *et al.*, 2006).

Entre 0.8 a 2 millones de niños menores de 5 años mueren en el mundo a causa de la EDA, siendo esta la segunda causa única de muerte después de las infecciones respiratorias (Black *et al.*, 2008). La EDA es también una de las causas más importantes de morbilidad en países en vía de desarrollo y países industrializados. Se estima que mil millones de episodios de diarrea ocurren anualmente en niños en el mundo (Thapar *et al.*, 2004).

Los agentes infecciosos asociados a la alta morbilidad y mortalidad de la EDA incluyen virus, bacterias y en menor proporción, parásitos (Huilian *et al.*, 1991). Dentro de las causas virales de EDA, la más importante es el rotavirus asociado a aproximadamente 440 mil muertes anuales, de las cuales 82% ocurren en los países más pobres del mundo (Reyna *et al.*, 2012; Parashar *et al.*, 2003).

Las causas bacterianas de EDA ocupan un segundo lugar en frecuencia siendo las *E. coli* enteropatógenas las más importantes, seguido de *Salmonella spp.*, *Shigella spp.*, *Campylobacter jejuni* y *Vibrio cholerae* (O`Ryan *et al.*, 2005).

En los últimos años, las muertes de niños menores de cinco años de edad, han disminuido; no obstante, las cifras aún son alarmantes. Entre las primeras causas de muerte por infecciones se encuentran la neumonía, seguida por diarrea y malaria (Black *et al.*, 2010; Lanata *et al.*, 2013). Datos obtenidos de análisis sistemáticos, demostraron que entre los años 2010 y 2011 se presentaron entre 7.6 y 6.9 millones de muertes de niños menores de cinco años de edad, respectivamente. El 9.9% de esas muertes fue a causa de la diarrea (Liu *et al.*, 2012). Rotavirus, calicivirus, *Escherichia coli* enteropatógena y *E. coli*

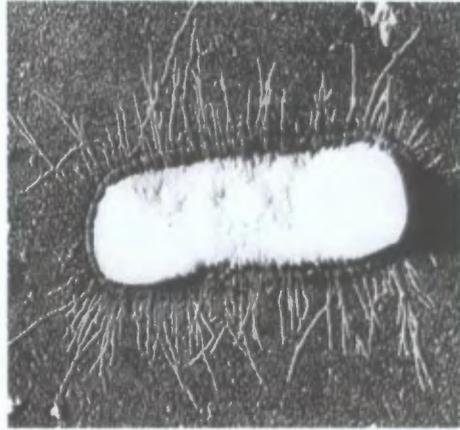
enterotoxigénica causaron más de la mitad de los casos (Liu *et al.*, 2012; Lanata *et al.*, 2013).

La lactancia materna es de gran valor en la lucha contra la diarrea, por lo que es necesario hacer esfuerzos para evitar las tendencias hacia el destete temprano. Esto es particularmente importante en países menos desarrollados, como el nuestro, donde el medio ambiente ofrece amplias oportunidades para infecciones intestinales infantiles continuas (Vergara *et al.*, 1996).

- ***Escherichia coli***

La *E. coli* fue aislada por primera vez en 1885 por el pediatra alemán *Theodore Escherich*, quien la denominó bacteria *Coli Comune* para indicar su aparición universal en el intestino de individuos sanos (Fernández *et al.*, 2010).

La *E. coli* es un bacilo Gram negativo, anaerobio facultativo, que pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*. Esta bacteria coloniza el intestino del hombre pocas horas después del nacimiento, la cual se le considera un microorganismo de la flora normal del individuo, pero hay cepas que pueden ser patógenas y causar daño, produciendo diferentes cuadros clínicos, entre ellos diarrea (Rodríguez, 2002). La *E. coli* productora de diarrea es aquella con características de virulencia que le permite lesionar las células intestinales o alterar la función del intestino (Winsor y Cleary, 1996).

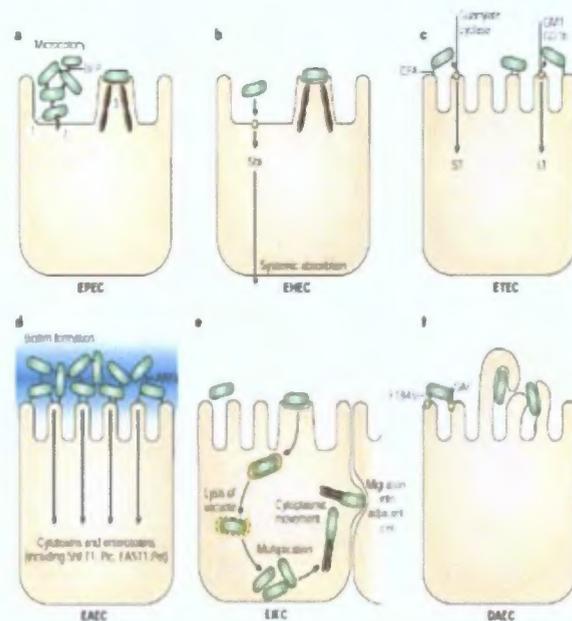


Fuente: Johnson, 1991.

Figura 1. Microfotografía electrónica de *E. coli* (Tomado de Johnson, 1991).

Las cepas de *E. coli* patógenas son agentes causantes de enfermedades diarreicas en las personas, especialmente en niños de países en vías de desarrollo y las mismas, poseen diferentes mecanismos de patogenicidad (Zambrano, 2012).

La primera evidencia de que ciertas cepas de *E. coli* podrían causar enfermedad, se obtuvo al desarrollar los primeros esquemas de serotipados en los años 30 y 40 del siglo pasado, y de hecho, modificaciones de estos esquemas se siguen utilizando aún. En la actualidad, se han definido seis clases de patotipos de *E. coli* que causan enfermedades intestinales en humanos, si bien cabe destacar que existe una cierta superposición entre ciertos patotipos diarreicos. No obstante, cada patotipo posee una única combinación de determinante de virulencia que da lugar a mecanismos de patogenia bien diferenciados (Blanc, 2007).



Fuente: Nataro & Kaper, 2004.

Figura 2. Esquema patogénico de *E. coli* diarreicas (Tomado de Nataro y Kaper, 2004).

En epidemiología, es muy importante la identificación no solo del microorganismo en cuestión, sino que muchas veces, la identificación a nivel de cepas o patotipo ayuda a: 1. determinar el causante del brote infeccioso, 2. detectar la transmisión cruzada de patógenos, 3. determinar la fuente de infección, 4. reconocer cepas particularmente virulentas de organismos y 5. monitorear los programas de vacunación (Olive y Bean, 1999). En el área clínica y en la agricultura, la base para un tratamiento efectivo y cura de un paciente, animal o planta, es el diagnóstico rápido de la enfermedad y su agente causal (Reischl, 1996).

Cada año, 12 millones de personas viajan desde un país industrializado a un país en desarrollo en los trópicos o subtrópicos. Estos viajeros experimentan una alta tasa de diarrea causada por una amplia variedad de patógenos entéricos adquiridos por la ingestión de alimentos o agua contaminados. Uno o más patógenos se pueden encontrar en las heces de la mayoría de los individuos enfermos. Las *E. coli* Enterotoxigénicas generalmente son los patógenos identificados con mayor frecuencia, habiéndose encontrado en una mediana del

42% de los episodios de diarrea de los viajeros en estudios en América Latina, 36% en África y 16% en Asia (Negro, 1990).

En Panamá, en el estudio realizado por Halpenny *et al.* (2012), sobre predicción de la salud infantil por densidad de hogares e índices basados en activos en pueblos indígenas empobrecidos en zonas rurales de Panamá, se encontró *E. coli* en el 98% de las muestras de agua del hogar.

La diarrea sigue siendo una de las principales fuentes de morbilidad y morbilidad en el mundo de hoy y una gran proporción es causada por *E. coli* diarrenogénica (Clarke, 2001).

La prevalencia de *E. coli* diarreogénicas en la diarrea infantil y el papel de los alimentos contaminados en la transmisión de enfermedad en Colombia son en gran parte desconocidos (Rúgeles *et al.*, 2010).

- **PATOTIPOS DE *E. coli***

Si bien existen muchas características comunes que estos patotipos emplean para colonizar la mucosa intestinal y causar enfermedades, el curso, el inicio y las complicaciones varían significativamente. Los brotes son comunes en los países desarrollados y en desarrollo, y a veces tienen consecuencias fatales. Muchos de estos patotipos son un importante problema de salud pública, ya que tienen bajas dosis infecciosas y se transmiten a través de medios ubicuos, incluidos alimentos y agua (Croxen *et al.*, 2013).

La gravedad de la *E. coli* patógena se ejemplifica mediante programas de vigilancia nacional e internacional dedicados que monitorean y rastrean los brotes; desafortunadamente, esta vigilancia a menudo no existe en los países en desarrollo. Si bien no todos los patotipos tienen el mismo perfil de salud pública, todos tienen un enorme potencial para causar enfermedades y continúan presentando desafíos para la salud humana (Croxen *et al.*, 2013).

Se han descrito seis categorías de *E. coli* diarrenogénica que difieren en sus factores de virulencia (Nataro y Kaper, 1998).

- ***E. coli* ENTEROPATOGENICA (ECEP)**

La ECEP fue el primer grupo que se identificó serológicamente y se asoció con casos de diarrea en infantes, siendo la adherencia su principal factor de patogenicidad. El proceso de adherencia íntima entre la bacteria y la membrana de las células del epitelio intestinal (enterocitos), seguida de la destrucción de la microvellosidad, con polimerización de actina, que lleva a la alteración del citoesqueleto en el sitio de la unión de la bacteria, debido al aumento de los niveles de calcio intracelular y de la proteína quinasa C, ha sido denominado adherencia y esfacelamiento (A/E). La adherencia está mediada por pilis o fimbrias rizadas que se llaman Bfp (*bundle-forming pilus*), cuya información genética está codificada por un plásmido de 50-70 MDa denominado EAF (*adherence factor*) y de algunos genes cromosomales (Rodríguez, 2002). En la adherencia es necesaria la síntesis de una proteína de membrana externa de 94 kDa denominada intimina, codificada por el gen cromosomal *eae* y que sirve como señal en A/E (Nataro y Kaper, 1998).

Las cepas de ECEP se consideran típicas cuando tienen los genes *eae* para la síntesis de la proteína intimina, que participa en la A/E, y el plásmido EAF que codifica para el Bfp; y se dice que son atípicas, cuando sólo presentan los genes *eae* pero no el plásmido EAF (Baldini *et al.*, 1983; Donnenberg *et al.*, 1992; Rodríguez, 2002; Scaletsky *et al.*, 2005; Trabulsi, 2002).

En los países desarrollados, la ECEP atípica es aislada con mayor frecuencia en casos de diarrea con ECEP típica. Por esta razón, en países desarrollados esta cepa tiene un papel importante como agente etiológico de enfermedades diarreicas (Kaper *et al.*, 2004; Regua *et al.*, 2004). Las cepas atípicas de *E. coli* Enteropatógenas (a ECEP) son cada vez más reconocidas como un patotipo emergente responsable de la diarrea infantil en muchos países (Afset *et al.*, 2004;

Araujo *et al.*, 2007; Nguyen *et al.*, 2006; Robins *et al.*, 2004). Aunque las cepas atípicas de *E. coli* Enteropatógenas (a EPEC) con frecuencia están implicadas en la diarrea infantil en los países en desarrollo, no se sabe mucho sobre sus propiedades de adherencia (Scaletsky *et al.*, 2010).

La ECEP puede ocasionar brotes o casos aislados de diarrea. Este grupo afecta principalmente a niños entre seis meses y dos años. Causa frecuentemente brotes epidémicos en lugares cerrados como guarderías y hospitales (Farfán, *et al.*, 2016). También, puede aislarse en adultos enfermos y sanos, principalmente cuando hay un factor de predisposición como la diabetes. La forma de transmisión de la enfermedad es fecal-oral, principalmente a través de las manos contaminadas de manipuladores de alimentos. Los reservorios de ECEP pueden ser niños y adultos con o sin síntomas (Rodríguez, 2002). En el año 2010 se notificaron 121455 muertes por este patotipo (Pires *et al.*, 2015).

El cuadro clínico que produce la ECEP se manifiesta con diarrea aguda, la cual puede ser leve o grave, con vómito, fiebre baja y mala absorción. La enfermedad puede ser moderada a grave y se ha asociado a alta mortalidad (10-40%), principalmente en los países en vías de desarrollo (Chen y Frankel, 2005; Farfán, *et al.*, 2016). La importancia mundial de una EPEC como causa de la patogénesis de la diarrea es incierta (Asfet *et al.*, 2006; Trabulsi *et al.*, 2002).

El diagnóstico de la ECEP incluye ensayos *in vitro* en cultivos celulares y métodos moleculares, adherencia localizada en células Hep-2 y HeLa, plásmido EAF, hibridación (EAF, Bfp) y PCR (EAF, Bfp) (Rodríguez, 2002).

- ***E. coli* ENTEROTOXIGÉNICA (ECET)**

Las ECET son definidas como cepas de *E. coli* que producen al menos una de las dos enterotoxinas: enterotoxina termoestable (ST) o enterotoxina termolábil (LT), codificadas por los genes ST1 y LT1, respectivamente (Rebello, 2012).

La ECET es uno de los patotipos más estudiados, asociado con morbilidad en niños menores de 5 años y en los adultos, puede ser asintomática, poco frecuente o puede provocar la denominada diarrea del viajero (Rodríguez, 2002; Qadri *et al.*, 2005; Hill; Daley *et al.*, 2007; Goldsmild *et al.*, 2007 y Beeching, 2010). Es la principal causa de diarrea en turistas de países desarrollados y en recién nacidos. No produce cambios histológicos aparentes, más que una ligera inflamación que suele ir acompañada de náuseas (Blanc, 2007).

Las ECET son importantes en lactantes, principalmente en niños menores de dos años y en particular, durante los primeros seis meses de vida. La frecuencia de aislamiento de éste grupo patógeno de *E. coli* en niños con diarrea es de 10 a 30% (Rodríguez, 2002).

El cuadro clínico se caracteriza por diarrea aguda, generalmente sin sangre, sin moco, sin pus y en pocos casos, se presenta fiebre y vómito. La diarrea producida por ECET puede ser leve, breve y autolimitada, pero también, puede ser grave. La contaminación fecal de agua y alimentos, es la principal fuente de infección, siendo la dosis infectiva de 10⁸ unidades formadoras de colonias (UFC) en un corto periodo de incubación (14 – 50 h) (Rodríguez, 2002; Rebello, 2012).

La ECET se asocia generalmente con dos síndromes: "diarrea del niño destetado" entre los niños de países en desarrollo y la "diarrea del viajero" (Koneman *et al.*, 2008).

Se diagnostica por medio de la prueba de asa ligada de conejo y efecto citopático (ECP) en células CHO, VERO y Y1 para ECET LT, y en Ratón lactante y Radioinmunoensayo (RIA) para ECET ST. Además de ELISA, Hibridación en fase sólida (*colony blot*) con sondas específicas y PCR para ECET ST y LT (Rodríguez, 2002).

Aproximadamente, cada año se presentan 280 millones de infecciones por ECET en niños bajo 4 años, de los cuales entre 300000 a 500000 mueren y se cree que más de 40 millones son asintomáticos (Anonymous, 2006).

La ECET son las principales causas de diarrea infantil en países de bajos y medianos ingresos, como Colombia y Sudamérica (Guerra *et al.*, 2014).

El desarrollo de vacunas para la ECET depende de una comprensión profunda de la distribución del factor de colonización y la toxina (FQ) (Isidean *et al.*, 2011). Se ha demostrado que las vacunas de ECET oral atenuada son seguras e inmunogénicas en voluntarios humanos y proporcionan un enfoque viable para proporcionar protección contra este importante agente patógeno (Turner *et al.*, 2011).

Se han explorado varios enfoques diferentes para desarrollar una vacuna efectiva contra ECET dirigidos a una o ambas clases de factores determinantes de la virulencia (enterotoxinas y factores de colonización), tal como se revisó recientemente (Walker *et al.*, 2007).

Es interesante el hecho de que, de todos los grupos de *E. coli* patógeno, ECET sea el grupo bacteriano que se encuentra más frecuentemente relacionado con brotes y problemas gastrointestinales. La razón de esto no es clara, tal vez ETEC sea más resistente al medio ambiente, y por lo tanto, se encuentre en mayor proporción, o que su capacidad para colonizar sea más efectiva (Cortés *et al.*, 2002).

- ***E. coli* ENTEROINVASIVA (ECEI)**

La ECEI está relacionada genéticamente con *Shigella* spp. Taxonómicamente son indistinguibles a nivel de especies (Kaper *et al.*, 2004; Rodríguez, 2002). Se caracteriza por causar diarrea y disentería, gracias a un complicado mecanismo de patogenia que comienza con la invasión de células epiteliales y su posterior

expansión a sus adyacentes, provocando una fuerte reacción de inflamación y ulceración (Blanc, 2007).

La fase temprana de patogenicidad incluye la penetración de la célula epitelial, seguida por lisis de la vacuola. De esta manera, la ECEI invade el epitelio del colon y se adhiere a la mucosa requiriendo de dos proteínas, mucinasas y adhesinas, para entrar por endocitosis a la célula, multiplicándose dentro de ella y diseminándose a las células sanas adyacentes (Rodríguez, 2002; Nataro y Kaper, 1998).

La invasión y la supervivencia de tipo patógeno depende de los genes contenidos en el plásmido *pinv*, que contienen todos los genes implicados en la invasión, por lo tanto, la pérdida de este plásmido hace cepas ECEI no virulentas (Rebello, 2012).

Las infecciones intestinales causadas por ECEI, son más frecuentes en los niños mayores de dos años y en adultos. La transmisión de este enteropatógeno se produce por la ingestión de alimentos y agua contaminados (Martínez, 2008). La infección puede manifestarse en forma de diarrea acuosa indistinguible de la causada por ECET. En algunas personas, se observa la evolución del cuadro de disentería, que se caracteriza por fiebre y colitis. Los síntomas de la infección de este tipo patógeno son de urgencia, y presentan heces que contienen sangre, moco y leucocitos (Koneman, 2008).

La detección se puede realizar por la prueba de Sereny en cobayo, invasividad en células HeLa, captación de rojo congo, extracción de plásmido de 140 MDa, ELISA para el gen *ipaC* (necesario para la invasión), hibridación por sondas derivadas del plásmido *pinv* y PCR para genes *ial*, *ipaH* (Rodríguez, 2002).

- ***E. coli* ENTEROAGREGATIVA (ECEA)**

La ECEA se caracteriza por su patrón de agregación y adherencia a las células epiteliales y por la producción de la toxina EAST-1 (Blanc, 2007). Se cree que la patogénesis de la EAEC comprende la colonización intestinal seguida de la liberación de enterotoxinas y citotoxinas (Boisen *et al.*, 2009).

La EAEC son cepas enteropatógenas identificadas por el patrón de adhesión agregativa (AA) que comparten la capacidad de formar biopelículas. La *Citrobacter freundii* se considera clásicamente como una especie intestinal autóctona que se asocia esporádicamente a la diarrea (Pereira *et al.*, 2010).

Se considera un patógeno intestinal emergente responsable de causar diarrea persistente y la desnutrición en los niños, y en las personas infectadas por VIH, en los países en desarrollo. También, es reconocida como la segunda causa de "diarrea del viajero" en los países desarrollados como en vías de desarrollo (Harrington *et al.*, 2006; Huang, 2006; Huang *et al.*, 2007 Croxen y Finlay, 2010).

La patogenia de cepas de ECEA es compleja y los componentes de este grupo son extremadamente heterogéneos. A pesar de esto, se ha propuesto un modelo de tres etapas de su patogenia. En la primera etapa de la infección, las bacterias se adhieren a la mucosa intestinal y a la capa de moco por las fimbrias de agregación de adherencia (AAF) y factores de adhesión. En la segunda etapa, las bacterias continúan multiplicándose en la capa de moco y estimulan su hipersecreción y la formación de un biofilm bacteriano. Por último, la tercera etapa, se caracteriza por la producción de toxinas y el desarrollo de un proceso inflamatorio que resulta en el daño de la mucosa intestinal. El daño causado a las microvellosidades y la presencia de biofilms bacteriano, generan una mala absorción de los líquidos y solutos que desencadenan la diarrea (Elias y Gomes, 2008; Huang, 2006).

La diarrea causada por la ECEA es típicamente acuosa, pero puede en algunos casos también contener sangre o moco (Croxen y Finlay, 2010).

El sitio blanco de daño de la ECEA puede ser la mucosa del intestino grueso y delgado, con un periodo de incubación de menos de ocho h y puede durar hasta 18 o 20 días. Esta bacteria puede causar brotes o casos aislados de diarrea persistente. En niños puede manifestarse con diarrea líquida, de color verde, con moco, sin sangre, y en ocasiones, puede llegar a ser severa y requerir rehidratación intravenosa. Algunas veces, el cuadro clínico se presenta como diarrea con moco con o sin sangre, vómito y sin o con poca fiebre (Nataro y Kaper, 1998; Cobejic *et al.*, 1996; Cravioto *et al.*, 1991).

El diagnóstico puede darse por una prueba de adherencia agregativa en células Hep-2 y HeLa, hibridación con sondas y PCR (Nataro y Kaper, 2004; Baudry *et al.*, 1990).

- ***E. coli* ADHERENTE DIFUSA (ECAD)**

Las ECAD no forman microcolonias cuando se adhieren a células Hep-2. Se sabe poco de su mecanismo de patogenicidad pero se ha caracterizado una fimbria de superficie conocida como F1845, que está involucrada en el fenómeno de adherencia difusa. Los genes que codifican para esta fimbria, se pueden encontrar en el cromosoma o en un plásmido. El grupo de ECAD, se puede aislar tanto de personas sanas como de personas con diarrea, siendo más importante en niños de 4 a 5 años. Los principales síntomas que se presentan son diarrea acuosa sin sangre y sin leucocitos (Rodríguez, 2002).

Sobre la base de su adherencia difusa a células HEp-2 y HeLa, la detección de operones *afa / dra / daa* que codifican este fenotipo de adherencia y la movilización del factor de aceleración de la descomposición, las cepas comensal y patogénica pueden clasificarse como aislado Afa / Dr ECAD. Además, las cepas asociadas con enfermedades diarreicas y cepas que causan infecciones

extraintestinales también se pueden identificar como cepas Afa / Dr ECAD. Aunque se han notificado varios eventos de señalización celular que ocurren después de que las células epiteliales han sido infectadas por Afa / Dr ECAD, no se conocen completamente los procesos fisiopatológicos que permiten el desarrollo de infecciones intestinales y extraintestinales. Esta revisión se centra en la organización genética de los operones relacionados con afa / dra / daa y en los factores de virulencia que desencadenan respuestas celulares, algunas de las cuales son perjudiciales para las células huésped (Le Bouquéneq y Servin, 2006).

En una serie de estudios epidemiológicos, las cepas de *E. coli* con adhesión difusa se han asociado con enfermedades diarreicas en diferentes áreas geográficas (Baqui *et al.*, 1992; Girón *et al.*, 1991; Gunzburg *et al.*, 1993; Jallat *et al.*, 1993). Sin embargo, los marcadores de virulencia de *E. coli* con adhesión difusa asociados con la diarrea aún no se han aclarado (Lopes *et al.*, 2005).

Estudios realizados en México, Chile, Nueva Caledonia y Perú, reportan un mayor porcentaje de ECAD aisladas de muestras diarreicas que de muestras control en niños. No obstante, estudios realizados en Francia y Brasil, no encontraron una asociación entre adherencia difusa y la presencia de diarrea. Esta controversia probablemente incluye a clones patogénicos y no patogénicos. Este sexto grupo, ahora reconocido dentro del grupo de las *E. coli* diarrenogénicas, es un grupo heterogéneo que actualmente está siendo investigado para dilucidar sus mecanismos de patogenicidad (Riveros *et al.*, 2011).

Entre los métodos de diagnóstico están adherencia difusa en células Hep-2 y HeLa, hibridación con sonda para la fimbria F1845 y PCR (Rodríguez, 2002; Riveros *et al.*, 2011).

- ***E. coli* ENTEROHEMORRÁGICA (ECEH)**

Las cepas de éste tipo, además de producir histopatología AE (*attaching and effacing*), sintetizan una potente citotoxina (toxina Shiga). La serovariedad más

predominante es la O157:H7. Además, se conocen más de 200 serovariedades de *E. coli* productoras de toxina Shiga, aun cuando la mayoría de ellas no son patógenas y no contienen otros factores de virulencia (Nataro y Kaper, 1998).

Las cepas ECEH no-O157, no tienen una característica bioquímica que las diferencie del resto de *E. coli*. La O157:H7 no fermenta sorbitol y no posee actividad β -glucuronidasa (Rivas *et al.*, 2007).

Las ECEH son altamente infecciosas para los seres humanos, se estima que para el patotipo O157:H7 menos de 100 células son suficientes para causar una infección (Guth, 2008; Caprioli *et al.*, 2005). Una infección por éste patotipo es adquirida por el consumo de alimentos o agua contaminada, o en algunos casos, por contacto próximo de persona a persona (Guth, 2008). Las manifestaciones clínicas tienen un amplio espectro, pudiendo comprender cuadros asintomáticos hasta síntomas como colitis hemorrágica (CH), síndrome hemolítico urémico (SHU), apendicitis y anormalidades neurológicas (Caprioli *et al.*, 2005).

La infección O157: H7 en Colombia es alta; por lo tanto, una detección y vigilancia más activa mejorar la detección de casos, comprensión epidemiológica infección por *E. coli* O157: H7 y SUH, y podría conducir a intervenciones terapéuticas más específicas (Mattar y Vásquez, 1998).

Ciertos patotipos no son exclusivos de humanos, sino que pueden encontrarse también en animales, por ende, puede producir zoonosis. Así, las cepas ECET son responsables de diarrea en varias especies de animales, mientras que las ECEH pueden infectar asintóticamente a varias especies animales, por lo que éstos, son reservorios de éste tipo de cepas (Nataro y Kaper, 1998).

Las pruebas moleculares como RFLP, hibridación, electroforesis de campo pulsado, PCR y RAPD-PCR, pueden detectar hasta 10² UFC/0.1 g de materia

fecal además que permiten realizar una subtipificación con fines epidemiológicos de este grupo de bacterias (Rodríguez 2009)

Cuadro 1 Características de los grupos de *E coli* causantes de diarrea por Rodríguez (2002)

Características de los grupos de *Escherichia coli* causantes de diarrea

<i>Grupo</i>	<i>Sintomas clínicos</i>		<i>Epidemiología</i>	<i>Serogrupos y serotipos más comunes</i>			<i>Factores de patogenicidad</i>														
ETEC	Diarrea acuosa	aguda	Niños menores de dos años y del viajero	O8 H9	O15 H11	O20 H	O25 H	O27 H7	O78 H12	O148 H28	O159 H20	ST Y LT	CAF								
EHEC	SUH	CH	diarrea sin sangre abdominal vomito	dolor	fiebre	Niños y adultos que la adquieren por comer carne cruda o mal cocida	O157 H7	O26 H11	O103 H2	O113 H21	O119	O128	O145	STX	A/E	Intimina	pO157				
EIEC	Diarrea con moco y sangre o acuosa		diarrea también se presenta cuadro disenterico	Niños menores de seis meses	O28 H	O112acH	O144 H	O152 H	164 H	O167 H			Invasividad	Plasmido de 140MDa							
EPEC	Diarrea dolor vomito	aguada abdominal fiebre baja	Niños menores de seis meses hasta dos años	O55	O86	O142	O111 H	O127					A/E	BFP	Plasmido EAF De 50 70 MDa						
EAEC	Diarrea verde con sangre persistente hasta 20 dias	liquida sin diarrea	Recien nacidos y niños menores de dos años	O44	H18								Fimbria	AAFI	II	EASTI	Proteinas Pet y Pic	OMP	Plasmido de 60 MDa	Citotoxina	
DAEC	Diarrea acuosa sin sangre		Niños de 1 a 5 años	O126	H27								Fimbria	F1845				OMP			
LT=	ST=	CAF=	factor	BFP=	EAF=	factor	OMP=	STX=	EAST=	toxina											
toxina termo labil	toxina termo estable	colonizacion antigenico		pili forma rizada	adherencia EPEC		proteina membrana externa	toxina shiga	toxina enteroagrativas												

En estudios previos realizados *Diarrheogenic E Coli in children from Costa Rica* ademas de los seis patotipos conocidos se encontraron biotipos mixtos. Un total de 40 (77%) cepas identificadas como *E coli* patogena se aislaron de enfermedades diarreicas de los servicios ambulatorios de salud y se distribuyeron de la siguiente manera: 22% EIEC (9 de 40), 20% (8 de 40) biotipos mixtos, 15% (6 de 40) EAEC y EPEC, 12% (5 de 40) ECEH, 10% (4 de 40) DAEC y 5% (2 de 40) ETEC. Ademas se identificaron 12 cepas (13%) de pacientes hospitalizados: 42% (5 de 12) EPEC, 17% (2 de 12) ETEC y CEEA, y 8% ECEH, EIEC y biotipos mixtos (1 de 12). No se detectaron patotipos ECAD para este subconjunto de cepas (Perez 2010).

En el tracto gastrointestinal de los animales y en el medio ambiente es posible encontrar una amplia variedad de cepas de *E coli* patogena que causan enfermedades transmitidas por los alimentos en los seres humanos. Algunos animales o especies de animales pueden ser portadores asintomaticos (FAO 2008).

Entre los ultimos brotes por *E coli* registrados esta el ocurrido en Alemania en el 2011. El brote es inusual por su desarrollo muy rapido y por afectar a un elevado numero de adultos (el 86% de los casos son mayores de 18 anos) sobre todo mujeres (67%) y no a los grupos de alto riesgo habituales que son los ninos pequenos y los ancianos. No obstante tambien ha habido casos en ninos en edad escolar (OMS 2011).

Nuestros hallazgos sugieren que el intercambio genetico horizontal permitio la aparicion de la cepa *E coli* O104 H4 altamente virulenta productora de toxinas Shiga que causo el brote aleman en el 2011. En terminos mas generales estos hallazgos resaltan la forma en que la plasticidad de los genomas bacterianos facilita la aparicion de nuevos patogenos (Rasko *et al* 2011).

Los seres humanos pueden contraer una infección con cepas patógenas mediante el consumo de alimentos y agua directamente contaminados con heces o contaminados como consecuencia de la contaminación cruzada con otras fuentes alimentarias. Además, existe la posibilidad de contaminación a partir del contacto humano directo durante la preparación de los alimentos (FAO 2008)

Las hortalizas frescas pueden resultar contaminadas por la *E. coli* por medio de las heces de los animales y los seres humanos que pueden ingresar en los agroecosistemas a través del estiércol inadecuadamente preparado, el uso de aguas grises y residuales no tratadas para el riego, la utilización de semillas contaminadas, las plagas de insectos y animales silvestres y los nematodos (FAO 2008)

Las evidencias sugieren que se han producido cambios importantes en el genoma de *E. coli* durante la diversificación de la especie, permitiendo que los factores de virulencia asociados con la diarrea aguda severa lleguen a la población. Por lo tanto, el genoma de *E. coli* parece estar formado por un fondo ancestral y derivado, cada uno responsable de la adquisición y expresión de diferentes factores de virulencia (Escobar *et al.* 2004)

La *E. coli* tiene la capacidad de intercambiar material genético por medio de elementos genéticos móviles, tales como plásmidos y bacteriófagos, como respuesta de adaptación a entornos nuevos y adversos. Se cree que estos elementos genéticos contribuyen a la aparición de agentes patógenos con mayor virulencia, supervivencia ambiental y persistencia en los sistemas alimentarios. La *E. coli* puede sobrevivir en suelos contaminados hasta por 20 meses (FAO 2008)

Si bien los agentes etiológicos y sus mecanismos de patógenesis han sido elucidados, la información sobre la prevalencia de estos agentes en los países en desarrollo es en gran parte desconocida. Los ensayos para la identificación de estos patógenos están limitados a laboratorios de investigación y los ensayos de

identificación asequibles no están disponibles comercialmente. La mayoría de los datos epidemiológicos sobre patógenos diarreicos de países en desarrollo están dispersos y generalmente no incluye *E. coli* como agente causal ya que no hay disponible un sistema de prueba aprobado para la identificación de las seis cepas de *E. coli* diarreicas conocidas (Reither *et al.* 2007)

El único método disponible en la mayoría de los países en desarrollo para la detección de patógenos bacterianos diarreicos es el cultivo bacteriano convencional de las heces. Este método requiere un mínimo de 48 h para la identificación de *E. coli* y especies no *E. coli*. No puede discriminar entre cepas de *E. coli* no patógenas y patógenas. Además no existen métodos comercialmente disponibles para diferenciar entre los seis patotipos de *E. coli* diferentes asociados con la diarrea (Levine 1987)

Es necesaria una prueba sensible, específica y asequible para la identificación rápida de la diarrea bacteriana para determinar el impacto de los agentes patógenos bacterianos diarreicos en la morbilidad y mortalidad infantil en los países en desarrollo. Este método puede ser instrumental para la vigilancia epidemiológica de las enfermedades diarreicas, la evaluación de los alimentos y el agua para el consumo humano y posiblemente para el diagnóstico rápido de la diarrea grave (Gomez *et al.* 2009)

La futura investigación sobre enfermedades diarreicas debe enfocarse en ampliar el repertorio de patógenos buscados en las encuestas epidemiológicas para incluir múltiples categorías de *E. coli* diarreogénicas al mismo tiempo que desarrolla la capacidad para detectar estos patógenos en los laboratorios de referencia locales (Okeke 2009)

Más estudios son necesarios para evaluar los mecanismos de transmisión, el impacto en la epidemiología de la enfermedad diarreica aguda y las pautas de manejo y prevención de estos patógenos que afectan la población (Gomez 2014)

Lejos estaria de imaginar Theodore Escherich bacteriologo aleman descubridor de la *E coli* (Shulman *et al* 2007) que este microorganismo se convertiria en la primera causa de infeccion nosocomial y la segunda comunitaria pero mucho menos de pensar que con el de cursar del tiempo un patogeno tan sensible frente multiples antibioticos iria a tomar una relevancia importante por sus niveles de multirresistencia antimicrobiana (Morejon 2013)

La resistencia antimicrobiana plantea una amenaza grave y cada vez mayor para la salud publica e involucra cada dia nuevas especies bacterianas y nuevos mecanismos de resistencia El uso excesivo y con frecuencia empirico de los antimicrobianos para el tratamiento de diferentes situaciones clinicas provoca modificaciones de la ecologia bacteriana y el surgimiento de microorganismos resistentes a estos compuestos Las bacterias Gram negativas constituyen uno de los principales grupos bacterianos entre los que se observa un incremento de la resistencia antimicrobiana (Cires 2002 Chandran *et al* 2008)

En los ultimos años se observa un aumento de la resistencia de *E coli* frente a los principales antibioticos de uso clinico como ampicilina sulfametoxazol/trimetoprim ciprofloxacina tetraciclina y estreptomina tanto en cepas de origen clinico animal como ambiental (Laroche *et al* 2010 Aguila *et al* 2007)

La OMS ha lanzado multiples llamados sobre la importancia de promover y adoptar estrategias en la prevencion y el control de las infecciones por esta especie bacteriana (OMS 2007)

En las ultimas decadas el ascenso de la circulacion de cepas de *E coli* ambientales y sobre todo en el medio acuatico asi como el incremento de infecciones intestinales y extraintestinales asociadas a esta bacteria suscita un interes creciente por establecer el riesgo que representa para la salud publica y conocer las características de la resistencia antimicrobiana de aislados ambientales de esta especie (Chandran *et al* 2008 Ram *et al* 2009)

METODOS MOLECULARES

En la actualidad existe gran variedad de metodos moleculares que estan siendo aplicados para la deteccion de microorganismos que van desde el mas sencillo como lo es la cuantificacion de guanina y citosina presente en una muestra de ADN a traves de espectrometria hasta los mas modernos como las tecnicas de hibridacion y PCR y sus variedades. No se debe dejar de mencionar tecnicas como microarreglos, microchips, secuenciacion y microsatelites, las cuales abriran nuevas puertas a la investigacion cientifica (Rodriguez *et al* 2009).

Tecnicas basadas en hibridacion de ADN se desarrollaron a partir del conocimiento de que dos cadenas sencillas de acido nucleico que tengan secuencias complementarias se pueden unir o hibridar para formar una cadena doble. Las cadenas sencillas pueden ser de ADN o ARN o bien una de ADN y otra de ARN (Rodriguez *et al* 2009).

Dentro de las tecnicas de hibridacion mas utilizadas esta el polimorfismo de fragmentos largos de restriccion (RFLP s) que consiste en extraer el ADN de un cultivo puro de un microorganismo o bien de una muestra infectada y digerir el ADN con enzimas de restriccion (enzimas que cortan el ADN en sitios especificos). Posteriormente estos fragmentos de ADN son separados en un gel de agarosa utilizando la electroforesis (Rodriguez *et al* 2009).

Tambien se puede mencionar la transferencia por aplastado (*squash blot*). En esta tecnica la muestra a analizar se aplasta contra un soporte solido originando una huella. La muestra se fija utilizando alcohol o exponiendola a UV. Se hibridiza con una sonda especifica para el microorganismo en cuestion. Tiene la ventaja de ser una tecnica rapida que puede ser utilizada en campo o fuera de laboratorio. El ARN de cadena doble es otra tecnica que se utiliza principalmente para detectar celulas infectadas con un virus que tenga como material genetico ARN (retrovirus) (Rodriguez *et al* 2009). Tecnicas basadas en PCR se basa en la amplificacion

enzimática *in vitro* de un segmento de ADN específico del microorganismo blanco. Ésta es la técnica más utilizada para la detección de microorganismos; se caracteriza principalmente por realizar millones de copias de un segmento de ADN específico de un microorganismo. La RT-PCR (amplificación de un segmento de ADN previamente formado a partir de ARN) es una de las técnicas más utilizadas para identificar microorganismos cuyo material genético es ARN (retrovirus, otros virus de ARN y viroides) (Rodríguez *et al.* 2009).

La PCR anidada (amplificación enzimática de un segmento de ADN interno de un segmento de ADN previamente amplificado) es una técnica que se utiliza principalmente cuando un microorganismo se encuentra en muy bajas cantidades o bien cuando se quiere identificar si en una muestra existen microorganismos de un determinado grupo y después determinar que especies de microorganismos de ese grupo están presentes. La RAPDs o polimorfismo del ADN amplificado al azar en este caso se realiza una reacción de PCR con un solo iniciador el cual tiene un tamaño de 8 a 12 bases con secuencia arbitraria. En la etapa de hibridación del iniciador se emplean temperaturas bajas entre 37 a 40°C para asegurar que el iniciador se una a diferentes regiones del genoma del microorganismo que se desee identificar (Rodríguez *et al.* 2009).

Inmuno-PCR (unión de un microorganismo a un soporte sólido utilizando un anticuerpo y una posterior amplificación de ADN por PCR) es una técnica que combina las ventajas de las técnicas inmunológicas (ELISA) y de las técnicas moleculares (PCR) para que las ventajas combinadas disminuyan o eliminen las desventajas de ambas técnicas (Rodríguez *et al.* 2009). PCR Inmunomagnético (similar a la anterior; en este caso el soporte es una esfera magnética la cual es removida de la muestra con un imán y posteriormente se realiza la PCR). En esta técnica un anticuerpo primario se encuentra unido a perlas metálicas las cuales se colocan dentro de la muestra a analizar; se deja incubar para que ocurra la unión antígeno-anticuerpo; posteriormente se extraen estas perlas metálicas con un imán; se lavan y se colocan en un tubo en el cual se realiza la PCR.

PCR multiple permite la detección de diferentes moléculas o microorganismo de interés en una sola reacción (Rodríguez *et al* 2009)

Identificación de microorganismos altamente emparentados Rep PCR esta técnica esta basada en la amplificación simultánea de diferentes regiones con secuencias repetidas Se ha utilizado preferentemente en bacterias amplificando las regiones BOX ERIC y Rep En este caso se obtienen varios fragmentos de diferentes tamaños los cuales son amplificados simultáneamente permitiendo distinguir dos microorganismos altamente emparentados al comparar los patrones de amplificación de estos microorganismos PCR RFLP técnica que consiste en amplificar por PCR un segmento específico de un microorganismo y posteriormente digerir el ADN amplificado con enzimas de restricción esto permite determinar diferencias entre los patrones de bandas amplificadas y/o entre los patrones de los fragmentos resultantes de la digestión del ADN (Rodríguez *et al* 2009)

AFLP s polimorfismo de fragmentos largos de amplificación se basa en la amplificación de un subgrupo de fragmentos de ADN generados por la digestión con enzimas de restricción El ADN de los microorganismos es aislado purificado y sometido a digestión con las enzimas de restricción por ej Eco RI y Mse I (Rodríguez *et al* 2009)

La electroforesis en geles con gradiente desnaturizante DGGE es capaz de separar secuencias altamente relacionadas por su diferente movilidad en gradientes desnaturizantes (Kowalchuk *et al* 1997) Electroforesis en geles con gradiente de temperatura TGGE similar al DGGE sin embargo en este caso el gradiente se crea incrementando gradualmente la temperatura durante la electroforesis (Rodríguez *et al* 2009)

Futuro de la detección de microorganismos PCR en tiempo real con esta podemos cuantificar el número de moléculas de ADN del microorganismo presente

en la muestra en cuestion Microarreglos o microchips esta tecnica consiste de un arreglo ordenado de cientos o miles de secuencias de ADN (oligonucleotidos ADNc etc) depositados sobre una superficie solida para la deteccion de microorganismos (Rodriguez *et al* 2009)

La secuenciacion es uno de los metodos con mas futuro dado que se puede solo amplificar por PCR el gen ribosomal 16S o 18S separar las bandas amplificadas secuenciar o mandar a secuenciar las bandas encontradas y posteriormente comparar esas secuencias con las secuencias depositadas en los bancos de genes y poder llegar a identificar el o los microorganismos presentes en una muestra (Rodriguez *et al* 2009) El metodo de Sanger o secuenciacion de primera generacion termino imponiendose por su sencillez y precision posteriormente se desarrollo la segunda generacion o de alto rendimiento capaz de generar cientos de miles de reacciones de secuencias de manera mas rapida y economica sin embargo es la secuenciacion de tercera generacion la que lleva al limite los avances de la nanotecnologia (Suarez 20017)

2 1 AISLAMIENTO DE ADN

En un analisis molecular es fundamental realizar primero una extraccion de ADN para separarlo de todos los componentes celulares proteinas ARN lipidos iones inorganicos entre otros sin alterar fisicamente y quimicamente la molecula Con un correcto aislamiento se obtiene un ADN de buena calidad integro puro y concentrado Aunque existen diferentes metodos para el aislamiento los pasos esenciales para un buen aislamiento y purificacion son la lisis celular remocion de proteinas y ARN concentracion del ADN y la determinacion de la concentracion y pureza (Surzycki 2000)

2 2 LA REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA PCR

La reaccion en cadena de la polimerasa conocida como PCR por sus siglas del ingles *Polymerase Chain Reaction* fue desarrollada por Kary Mullis en los años 80

del pasado siglo y su objetivo es obtener un gran número de copias de un fragmento de doble cadena de ácido desoxirribonucleico (ADN) (Díaz *et al* 2013)

La PCR se fundamenta en la propiedad natural de las ADN polimerasas para replicar hebras de ADN. Mediante esta reacción se logra multiplicar el número de copias de un fragmento específico del ADN a lo cual se le denomina amplificación. La reacción se lleva a cabo mediante la repetición sucesiva de un ciclo de tres pasos: cada uno a temperatura diferente. En cada paso o cambio de temperatura ocurre un proceso que en su conjunto complementan la PCR. Primeramente la desnaturalización del ADN o separación de la doble cadena, luego la unión de los oligonucleótidos o cebadores a las cadenas simples de ADN y por último la extensión o polimerización donde la ADN polimerasa cataliza la formación de doble cadena de ADN a partir de la cadena molde (Bartlett *et al* 2003, Coleman *et al* 2006). La complementariedad exclusiva de los oligonucleótidos a los extremos del fragmento que se quiere amplificar garantiza la especificidad de la reacción (Díaz *et al* 2013).

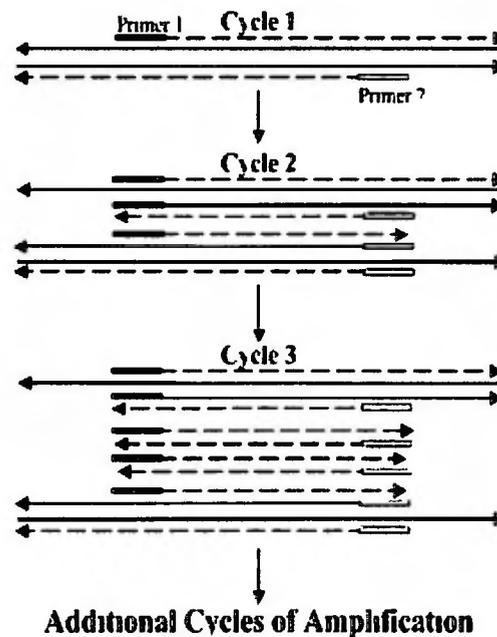


Figura 3 Ciclos de Amplificación en una PCR (Tomado de Coleman 2006)

El uso de técnicas para la detección de ácidos nucleicos como la PCR ha tenido un gran impacto en el diagnóstico microbiológico ocupando un lugar importante en el laboratorio clínico. La mayoría de las técnicas en uso han sido diseñadas para la detección específica de un microorganismo. Sin embargo, también es posible identificar el agente etiológico aunque se desconozca la especie o el género utilizando cebadores universales para amplificar el ADN de bacterias y hongos y luego secuenciar para identificar la especie (PCR universal o de amplio espectro). Esta metodología se aplica en cultivos difíciles de clasificar por técnicas fenotípicas, pero también se ha comenzado a utilizar directamente en muestras clínicas en las que la detección e identificación del agente infeccioso por técnicas tradicionales resulta difícil o no es posible. Estas nuevas herramientas no solo representan un aporte al establecer la etiología de una infección en casos que la microbiología tradicional no lo logre, sino que ayuda al clínico a seleccionar o adecuar el tratamiento antibiótico correcto (Poggi *et al.* 2009).

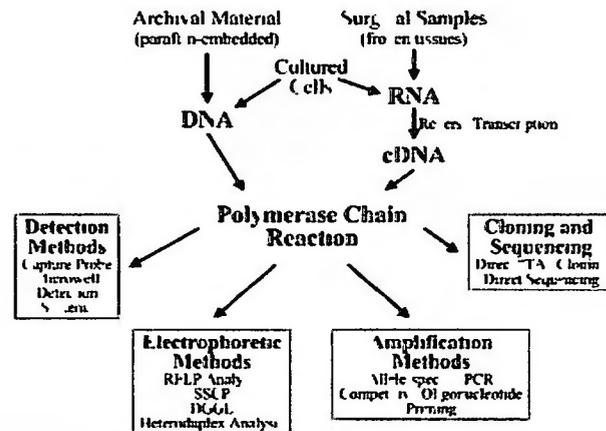


Figura 4 Fuentes de plantillas de ácido nucleico para PCR y métodos analíticos derivados (Tomado de Coleman 2006)

2.2.1 PCR MULTIPLE

Consiste en la amplificación de varias secuencias de ADN a la vez. De esta forma se reduce el gasto de reactivos y tiempo invertido, especialmente cuando se analiza un gran número de muestras. Se han descrito amplificaciones múltiples de

decenas de secuencias. Una de las desventajas de esta variante es su puesta a punto ya que se realiza empíricamente. Así, al añadir o eliminar una pareja de cebadores de una PCR múltiple se pueden alterar los rendimientos previos del resto de secuencias amplificadas. Por ello se recomienda hacer la optimización incluyendo desde el inicio todas las secuencias que se deseen amplificar (Innis *et al.* 1999). Esta tecnología debería evaluarse en estudios más amplios controlados y prospectivos de diarrea humana y en estudios microbiológicos de alimentos para establecer la epidemiología actual de estos patógenos, incluidas las cepas emergentes (Lopez *et al.* 2003).

2.3 ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA

Una PCR convencional requiere de la visualización de los amplicones. Para ello la electroforesis en gel de agarosa es una técnica rápida y simple que consiste en la separación de moléculas a través de una matriz tamponada. La agarosa es un polisacárido compuesto de 400 unidades aproximadamente de agarobiosa; su peso molecular es de 120 000 daltons (Da) (Surzycki 2000).

Es un método bastante utilizado para separar, identificar y purificar fragmentos de ADN (Sambrook y Russell 2001). Dado que el ADN está cargado negativamente debido a los grupos fosfato de la molécula, la migración en la cámara de electroforesis ocurre del polo negativo al polo positivo (Puerta y Ureña 2005).

Entre los factores que afectan la tasa de migración del ADN en los geles de agarosa se incluyen el tamaño del fragmento, concentración de agarosa, la conformación del ADN, voltaje aplicado y tampón utilizado (Puerta y Ureña 2005).

Las moléculas de ADN de 50 pares de bases (pb) a varias megabases en longitud pueden ser separadas en geles de agarosa de varias concentraciones y configuraciones. Fragmentos pequeños de ADN (50 – 20 000 pb) son separados en geles de agarosa corridos en configuración horizontal en un flujo eléctrico de fuerza y dirección constante. Bajo estas condiciones, la velocidad de los

fragmentos de ADN decrece a medida que incrementa la longitud de estos y es proporcional a la fuerza del flujo electrico (Sambrook y Rusell 2001)

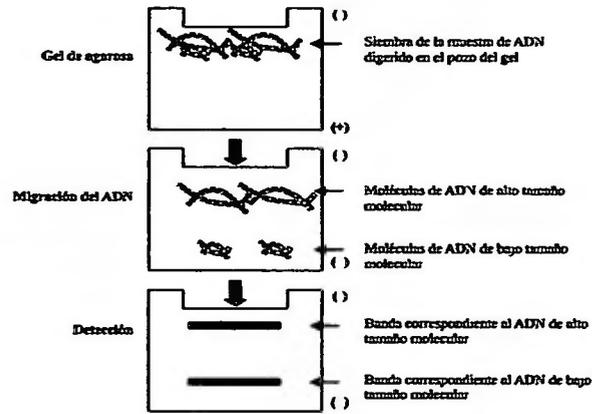


Figura 5 Esquema de la migración de las moléculas de ADN lineales de doble cadena en geles de agarosa. Notese como el ADN migra del polo negativo hacia el polo positivo y como sus moléculas se separan de acuerdo al tamaño molecular (Puerta Urena 2005)

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Clasificar en tres patotipos diferentes las *E coli* aisladas de muestras de heces de animales y humanas y de agua proveniente de la Ciudad del Nino provincia de Panama Oeste

OBJETIVOS ESPECIFICOS

Estandarizar un protocolo de PCR multiple para la identificacion de tres diferentes patotipos de *E coli*

Identificar molecularmente los diferentes patotipos de *E coli* mediante la PCR multiple estandarizada

MATERIALES Y MÉTODOS

CEPAS DE *E COLI*

1 1 OBTENCION DE CEPAS de *E coli*

Las muestras fueron colectadas inicialmente de heces de vacas cerdos y gallinas de heces de personas residentes y de agua de fuentes cercanas al area de colecta por Batista y Yee (2010)

En este trabajo se utilizaron 50 cepas de *E coli* aisladas de muestras de heces de animales (vaca cerdo y gallina) y humanos y de agua donde 39 procedian de la Ciudad del Nino distrito de La Chorrera provincia de Panama Oeste perteneciente a la coleccion del Laboratorio de Microbiologia Experimental y Aplicada (LAMEXA) y 11 muestras clinicas del Laboratorio Central de Referencia de Salud Publica (LCRSP) Instituto Conmemorativo Gorgas de Estudio de la Salud (ICGES)

1 2 REACTIVACION DE CEPAS *E coli*

Las cepas se reactivaron mediante la inoculacion en caldo Trypticasa y Soya e incubandolas a 37 C durante 24 h El caldo Trypticasa y Soya permite la recuperacion de toda clase de bacterias Gram positivas y Gram negativas aerobias y anaerobias facultativas

1 3 IDENTIFICACION DE *E coli* ENTEROHEMORRAGICA (ECEH)

Para la identificacion de la ECEH se sembraron las 50 cepas en agar Mac Conkey Sorbitol y se incubaron a 37°C durante 24 h La formula es similar al Agar Mac Conkey pero la lactosa ha sido remplazada por sorbitol cuyo resultado positivo para ECEH se evidencia con la presencia de colonias transparentes mientras que el resto de las *E coli* patogenas toman una coloracion rosada (Zambrano 2012)

1 4 CONSERVACION DE CEPAS DE *E coli*

Las cepas se conservaron en glicerol al 15% y luego fueron congeladas a -70°C El glicerol es un crioprotector que tiene como funcion proteger las celulas

bacterianas del dano que puedan sufrir durante la congelacion la cual es un metodo de conservacion a largo plazo que se debe llevar a cabo a temperaturas inferiores a cero grados centigrados (0°C) (Garcia y Uruburu 2000)

1 5 EXTRACCION DE ADN

En la extraccion de ADN se utilizo el metodo estandar de extraccion de ADN por precipitacion con sales detallado en el Manual de Laboratorio de Clonaje (Sambrook *et al* 2001) Para la extraccion de ADN se inocularon las cepas en 5 mL de caldo Trypticase y Soya y se incubaron a 37°C durante 24 h Luego se colocaron 1 5 ml de cada cepa en microtubos esteriles y se centrifugaron a 5000 rpm durante 5 min se eliminaron los sobrenadantes y se repitio el procedimiento una vez mas Despues se resuspendio el pellet en 200 µL de la solucion de lisis (40 mM Tris acetato pH 7 8 20 mM de acetato de sodio 1 mM de EDTA y 1 % de SDS) Seguido se anadio 66 µl de NaCl 5 M se mezclaron y se centrifugaron a 14000 rpm durante 5 min Luego se transfirio y cuantifico el sobrenadante a un tubo nuevo y se le anadio el mismo volumen de cloroformo mezclando por inversion varias veces Despues se centrifugo a 14000 rpm durante 5 min se extrajo y cuantifico el sobrenadante en un tubo limpio y se precipito el ADN con el doble de isopropanol frio Se centrifugo nuevamente a 14000 rpm durante 10 min se decanto el isopropanol se lavo con 500 µL de etanol 70% se seco el pellet a temperatura ambiente (TA) y por ultimo se disolvio en 25 a 50 µl de agua libre de nucleasas esteril dependiendo del tamano del pellet

PCR UNIPLE

Los controles positivos (cepa especificas de cada patotipo donadas por Cristian Perez Costa Rica) fueron analizadas utilizando una PCR uniple especifica para cada patotipo

Se realizo cada ensayo de PCR uniple en 25 µl de mezcla de reaccion que contiene 2 5 µl de buffer 10X (1X) 1 5 µl de MgCl₂ 25 mM (1 5 mM) 0 5 µl de desoxinucleosidotrifosfato (dNTP s) 25 mM (0 5 mM) 0 4 µl de cada cebador 25

μM (0.4 μM) 0.5 μl de Taq ADN polimerasa (2.5 U/ml) y 2.0 μl de ADN específico de cada patotipo (Cuadro 1). Las muestras se amplificaron a 94°C durante 3 min, 30 ciclos a 94°C durante 1 min, 54°C durante 1 min, 72°C durante 1 min y una extensión final a 72°C durante 7 min. Los productos de PCR se visualizaron por electroforesis en geles de agarosa al 2% tenidos con 0.5 μg/ml de bromuro de etidio.

2.1 PCR MULTIPLE

Luego de verificar la amplificación de cada patotipo específico se procedió a unir los cebadores de los tres patotipos en un solo tubo y a estandarizar la PCR múltiple para los tres patotipos. Después de la estandarización las cepas ambientales y clínicas fueron analizadas utilizando una PCR múltiple basado en la amplificación simultánea de más de una secuencia combinando dos o más pares de cebadores en un mismo tubo.

En resumen se realizó cada ensayo de PCR múltiple en 25 μl de mezcla de reacción que contiene 2.5 μl de buffer 10X (1X), 1.5 μl de MgCl₂ 25 mM (1.5 mM), 0.5 μl de desoxinucleosídotrifosfato (dNTPs) 25 mM (0.5 mM), 0.4 μl de cada cebador 25 μM (0.4 μM) (Cuadro 1), 0.5 μl de Taq ADN polimerasa (2.5 U/ml) y 2.0 μl de ADN. Las muestras se amplificaron a 94°C durante 3 min, 30 ciclos a 94°C durante 1 min, 54°C durante 1 min, 72°C durante 1 min y una extensión final a 72°C durante 7 min. Los productos de PCR se visualizaron por electroforesis en geles de agarosa al 2% tenidos con 0.5 μg/ml de bromuro de etidio.

Cuadro 2 Cebadores utilizados en la PCR Múltiple (Zambrano 2012)

Bacteria	Cebadores	Gen	Secuencia	Tamaño del Amplicon	T _m
ECEP	VTEC	<i>eae</i>	5 CACACGAATAAACTGACTAAAATG 3	376 pb	57.7 C
			5 AAAAACGCTGACCCGCACCTAAAT 3		62.9 C
ECEA	aggRks	<i>aggR</i>	5 GTATACACAAAAGAAGGAAGC 3	230 pb	56.7 C
			5 ACAGAATCGTCAGCA1CAGC 3		60.4 C
ECDA	Gen Da	<i>DA</i>	5 GCTGGGCAGCAAAGTATAACTCT 3	750 pb	64.6 C
			5 CATCAAGCTGTT1GTTTCGTCGCCG 3		67.9 C

- **ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA**

Para la electroforesis se utilizó el método estándar de electroforesis en gel de agarosa detallado en el (Sambrook *et al.*, 2001). Luego de preparar el gel de agarosa al 2%, se mezclaron 7 μ l de cada muestra y 1 μ l del marcador de peso molecular de 100 pb, con 2 μ l de buffer de corrida (loading buffer), se cargó el gel colocando una muestra en cada pocillo y por último, se corrió a 120 V durante 1 h. Después, se observó el gel en un fotodocumentador con transiluminador de luz ultravioleta (UV), para confirmar que las muestras positivas correspondan con el tamaño de amplicón esperado y tomarle la foto (Figura 1).

RESULTADOS

Estandarización de la PCR Úniple

Antes de la estandarización de la PCR múltiple, primero se realizó la estandarización de la PCR úniple para cada patotipo, utilizando cada cepas controles con los genes AggR, Da, eae (Fig. 6), para conocer las concentraciones de los cebadores y temperaturas de hibridación de cada par de cebadores adecuada, y para observar la amplificación de todos los pares de cebadores ya que tenían diferentes temperaturas de melting (T_m).



Figura 6. Resultado de la electroforesis en gel de agarosa al 1,5% después de realizar la PCR para los controles positivos. 1: ECEA (AggR); 2, 4, 6, 8, 10, 12: Control -; 3: ECEI (ipaH); 5: ECAD (Da); 7: ECEP (eae); 9: ECET (elt B); 11: ECEH (vt); M: Marcador Molecular de 100 pb.

Estandarización de la PCR múltiple para la detección de tres patotipos de *E. coli* en muestras de heces de animales (vaca, cerdo y gallina) y de humanos, y de agua.

Luego de amplificar cada patotipo, se procedió a estandarizar una PCR múltiple para detectar tres patotipos distintos en un solo tubo (Fig. 7), de aislamientos de *E. coli* procedentes de heces de algunos animales (cerdo, gallina y vaca) y humanos y aguas, del sitio de colecta de este estudio y muestras clínicas.



Figura 7. Fotografía de corrida electroforética en gel de agarosa al 2% que muestra los productos de la PCR múltiple de los Controles Positivos. 3, 4: ECEA (AggR), ECAD (Da), ECEP (eae); 5: Control -; M: Marcador Molecular de 100 pb.

Detección de los patotipos de *E. coli* aisladas de muestras de heces de animales (vaca, cerdo y gallina) y de humanos, y de agua.

Como resultado se encontró entre las muestras analizadas los patotipos ECEP y ECEA con igual prevalencia, patotipos mixtos (ECEA junto con ECEP) y no se detectó el patotipo ECAD. De las 50 muestras analizadas, un total de 30% (15/50) de los aislamientos fueron positivos para los factores de virulencia relacionados con las *E. coli* diarrenogénicas analizadas (Fig. 8).



Figura 8. Fotografía de corrida electroforética en gel de agarosa al 2% que muestra los productos del ensayo de PCR múltiple para la identificación de ECEA, ECEP, ECAD. 4: ECEP (eae); 6: ECEA (AggR); M: Marcador Molecular de 100 pb; 21, Control +; 23, Control -.

Se obtuvo que el 4% (2/50) de las muestras analizadas pertenecen a ECEA, 4% (2/50) pertenecen a ECEP y el 22% (11/50) a patotipos mixtos (ECEA con ECEP) (Fig. 9; Cuadro 3).

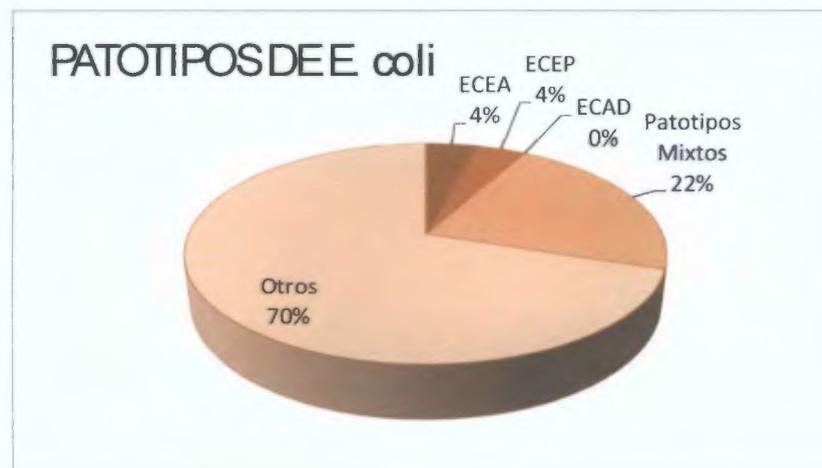


Figura 9. Porcentaje de prevalencia de Patotipos entre los aislados de *E. coli*.

Cuadro 3. Distribución de patotipos entre los aislados de *E. coli*.

Patotipo	Nº	%
ECEA	2/50	4%
ECAD	0/50	0%
ECEP	2/50	4%
Mixto	11/50	22%

Del 30% (15/50) de muestras positivas para *E. coli*, el 26% (13/50) son de muestras ambientales (Ciudad del Niño) y 4% (2 de 50) muestras clínicas (Fig. 10; Cuadro 4).

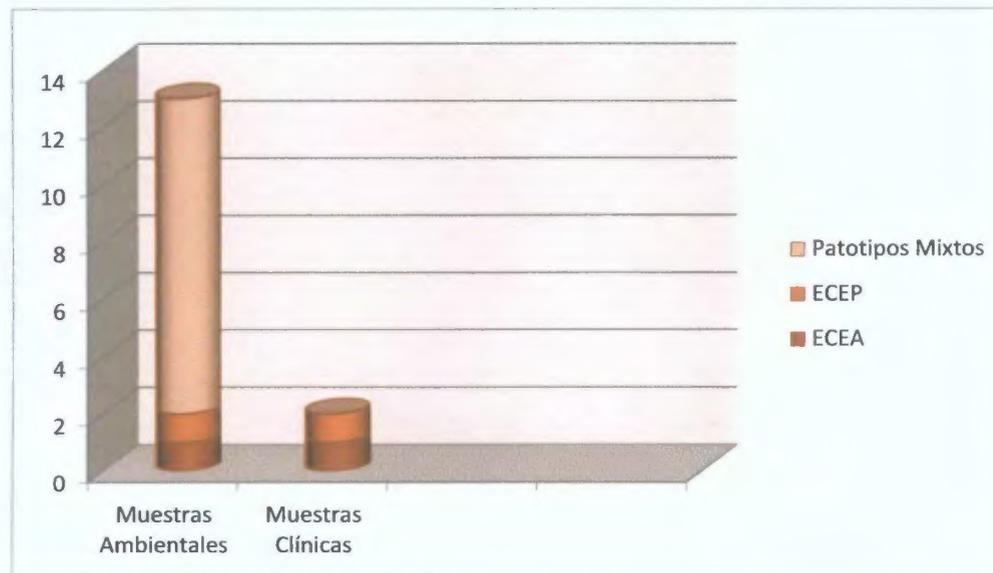


Figura 10. Prevalencia de los patotipos entre los aislados de *E. coli* de acuerdo al tipo de muestra.

Cuadro 4. Distribución de patotipos entre los aislados de *E. coli*, de acuerdo al tipo de muestra.

PATOTIPOS	MUESTRAS					
	CLÍNICAS		AMBIENTALES		TOTAL	
ECEA	1/11	9%	1/39	3%	2/50	4%
ECAD	0/11	-	0/39	-	0/50	-
ECEP	1/11	9%	1/39	3%	2/50	4%
Mixto	0/11	-	11/39	28%	11/50	22%
TOTAL	2/11	18%	13/39	33%	15/50	30%

NA: no analizado.

Al evaluar estos resultados, se pudo observar que ECEA se presentó en las muestras clínicas en un 9% (1/11) y en *E. coli* de heces de humanos en un 11% (1/39), al igual que ECEP con la misma prevalencia, mientras que los patotipos mixtos se encontraron en *E. coli* de heces de cerdo en un 44% (4/9), en *E. coli* de heces de gallina 30% (3/10) y en *E. coli* de heces de humanos en un 44% (4/9) (Cuadro 5). No se detectaron patotipos de ECAD en las muestras analizadas (Figura 11).

Cuadro 5. Distribución de patotipos entre los aislados de *E. coli*, muestras clínicas y de la Ciudad del Niño.

PATOTIPOS	MUESTRAS													
	CLINICAS		AGUA		CERDO		GALLINA		HUMANO		VACA		TOTAL	
ECEA	1/11	9%	0/9	-	0/9	-	0/10	-	1/9	11%	0/2	-	2/50	4%
ECAD	0/11	-	0/9	-	0/9	-	0/10	-	0/9	-	0/2	-	0/50	-
ECEP	1/11	9%	0/9	-	0/9	-	0/10	-	1/9	11%	0/2	-	2/50	4%
Mixtos	0/11	-	0/9	-	4/9	44%	3/10	30%	4/9	44%	0/2	-	11/50	22%
TOTAL	2/11	18%	0/9	-	4/9	44%	3/10	30%	6/9	67%	0/14	-	15/50	30%

NA: no analizado.

Cuadro 6. Distribución de patotipos y grupos filogenéticos entre aislados clínicos de *Escherichia coli* de niños en Costa Rica por Pérez *et al.* (2010).

Características	Grupo A		Grupo B1		Grupo B2		Grupo D		Total	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
Origen Patogénico	15/52	28.8	18/52	34.6	12/52	23.1	7/52	13.5	52	100
Paciente externo	12/40	30.0	15/40	37.5	9/40	22.5	4/40	10.0	40/52	77.0
Paciente Hospitalizado	3/12	25.0	3/12	25.0	3/12	25.0	3/12	25.0	12/52	23.0
Patotipo										
EPEC	2/11		2/11		7/11		0/11		11	
EHEC	1/6		3/6		0/6		2/6		6	
ETEC	1/4		2/4		0/4		1/4		4	
EIEC	2/10		7/10		1/10		0/10		10	
EAEC	4/8		2/8		2/8		0/8		8	
DAEC	2/4		0/4		1/4		1/4		4	
Mixtos	3/9		2/9		1/9		3/9		9	
No Patotipo	37/121	30.6	19/121	15.7	22/121	18.2	43/121	35.5	121	100
Total	52/173	30.0	37/173	21.4	34/173	19.6	50/173	28.9	173	

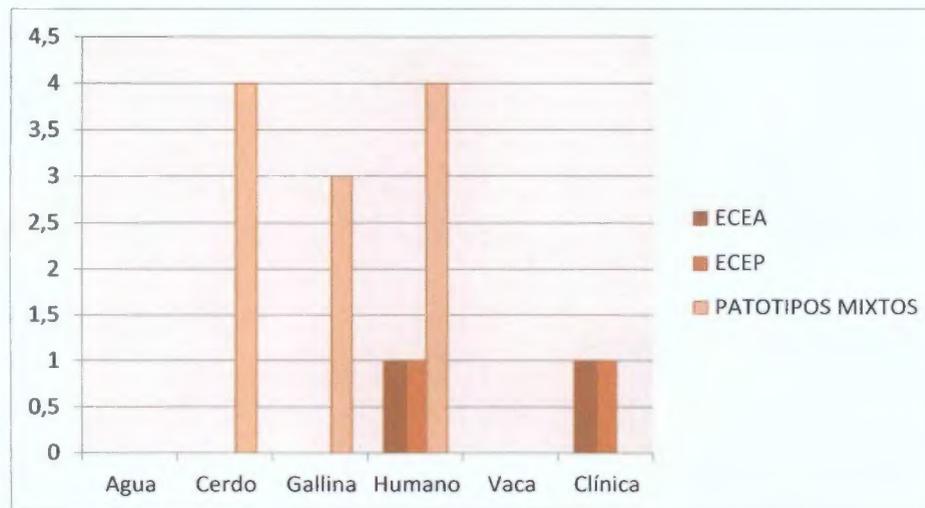


Figura 11. Distribución de patotipos entre los aislados de *E. coli*, muestras clínicas y ambientales, de acuerdo a la cantidad de muestras positivas para cada patotipo.

DISCUSIÓN

En los países en vía de desarrollado, las infecciones diarreicas representan la segunda causa de muertes en infantes, con un total de 1.5 millones de muertes cada año debido a agentes como *E. coli*, rotavirus, *Vibrio cholerae* y *Shigella* (Paniagua *et al.*, 2007).

La *E. coli* es una bacteria con potencialidad de virulencia para seres humanos, teniendo impacto significativo en salud pública, principalmente en países en desarrollo (Rebello, 2012).

En países como Argentina y Brasil, se han realizado estudios de la prevalencia de las diferentes categorías de *E. coli*, al igual que en Ecuador, aunque no se ha llevado a cabo la identificación de las seis categorías o patotipos. En Panamá, pese a que se refuerza la vigilancia sanitaria por los brotes en países de Europa y muertes a causa de la *E. coli*, en países como Alemania (OMS, 2011), no se han realizado estudios acerca de la identificación y prevalencia de las categorías de *E. coli* presentes a nivel ambiental.

Welch (2006), asegura que es fácil sembrar a la *E. coli* en los laboratorios clínicos, pero la detección de los diferentes genotipos patógenos requiere de métodos específicos y no todos los laboratorios están en la capacidad de identificarlos (Zambrano 2012).

Entre los métodos de diagnóstico clínico utilizados para la identificación de los patotipos de *E. coli*, se encuentra la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la cual es una técnica que nos ofrece resultados rápidos, confiables y con elevada especificidad y sensibilidad (Paniagua *et al.*, 2007).

En este trabajo se identificaron los genes de virulencia mediante la técnica de PCR múltiple, la cual ofrece una gran ventaja al poder amplificar varias secuencias simultáneamente, además, que el diagnóstico es rápido, confiable y preciso

(Zambrano, 2012). Se diseñó un sistema para identificar los genes AggR + ASTA para ECEA, Daae para ECAD y eae + bfp para ECEP.

Uno de los inconvenientes presentados en diversas investigaciones a la hora de estandarizar el protocolo de PCR múltiple es la temperatura de melting de los diferentes cebadores utilizados, por lo cual primero se calculó la temperatura de melting de los cebadores, para luego estandarizar el protocolo y así realizar el análisis de las muestras en estudio.

La PCR múltiple mostró sensibilidad y especificidad para las categorías más comunes de cepas de *E. coli* diarreogénicas de diferentes orígenes clínicos, genotipos y serotipos. Los resultados de este estudio, indican que es posible realizar la amplificación simultánea de los genes de virulencia a partir de cepas enterohemorrágicas, enterotoxigénica y enteropatógenas de *E. coli* diferenciadas y aplicar esta técnica al diagnóstico de pacientes con síndrome hemolítico-urémico, aquellos involucrados en brotes alimentarios y pacientes con enterocolitis esporádica (Vidal *et al.*, 2004).

De las 50 muestras analizadas, un total de 30% (15/50) de los aislamientos fueron positivos para los factores de virulencia relacionados con las *E. coli* diarreogénicas analizadas, coincidiendo con los estudios de Romeu (2012), Caracterización de cepas de *Escherichia coli* de importancia clínica humana aisladas de ecosistemas dulceacuícolas de la Habana, donde el 35% de las cepas de *E. coli* aisladas pertenecen a cinco de los grupos patógenos humanos” y a Paniagua *et al.* (2007), donde el 25.2% (n = 44) de las muestras de los niños con diarrea fue positivo para algún tipo de *E. coli*”.

En la Ciudad del Niño, provincia de Panamá Oeste, se obtuvo que 4% de las cepas analizadas pertenecen a ECEA, 4% son ECEP, 22% son patotipos mixtos y no se detectó ECAD. Estos resultados obtenidos muestran relación con estudios previos, ya que un total de 40 cepas identificadas como *E. coli* patógenas (77%),

fueron aisladas de las enfermedades diarreicas de los servicios ambulatorios de salud de Costa Rica y distribuidas de la siguiente manera: 22% ECEI, 20% patotipos mixtos, 15% ECEA y ECEP, 12% ECEH, 10% ECDA y 5% ECET. No se detectaron patotipos de DAEC para este subconjunto de cepas (Pérez, 2010).

Cuando el laboratorio reporte el aislamiento de *E. coli* como patógeno, en un cuadro de diarrea, se debe tener presente su importancia como agente causal de cuadros graves de diarrea, principalmente en niños menores de cinco años y no sólo considerarla como una bacteria de flora normal (Rodríguez, 2002).

En estudios realizados por Rodríguez (2002), se encontró que la presencia de *E. coli* es mayor durante los meses húmedos y calurosos, y afecta principalmente a niños menores de cinco años (Rodríguez, 2002). Lo que indica que nuestro clima al tener condiciones parecidas (humedad y calor) favorece la supervivencia de *E. coli* en el ambiente.

En otros estudios a nivel ambiental, sobre caracterización de cepas de *Escherichia coli* de importancia clínica humana aisladas de ecosistemas dulceacuícolas de la habana se demostró que las cepas de *E. coli* ambientales circulantes en estos ecosistemas, presentan características adherentes de las cuales el 84% de las cepas con esta propiedad, muestran patrón de adherencia difusa cuya patogenicidad implica un riesgo potencial para la salud humana y en edades pediátricas (Romeu, 2012)., concordado con nuestro estudio, ya que de los dos patotipos encontrados, ECEP, la adherencia es su principal factor de patogenicidad (Rodríguez, 2001), y ECEA, se caracteriza por su patrón de adherencia a las células (Blanc, 2007).

En estudios realizados por Ochoa *et al.* (2011), sobre Frecuencia y patotipos de *Escherichia coli* diarreogénicas en niños peruanos con y sin diarrea, la prevalencia promedio global de los principales patógenos en muestras de diarrea fue ECEA 9,9%, ECEP 8,5%, ECET 6,9% y ECAD 4,8%, concordando con nuestro estudio,

ya que obtuvimos una prevalencia uniforme entre ECEA y ECEP, y ausencia de ECAD, que fue la que presentó menor prevalencia en del estudio antes mencionado.

Este estudio proporcionó información relevante para la identificación molecular de tres diferentes patotipos de *E. coli* (ECEP, ECEA y ECAD) a nivel ambiental. Además de utilizarlo en la vigilancia epidemiológica de muestras ambientales para detectar los mecanismos de transmisión y riesgos de infección. También puede dirigir el diagnóstico rápido y regular las medidas de salud ambiental para la prevención de infecciones diarreicas.

CONCLUSIONES

Las muestras ambientales analizadas se clasificaron en tres patotipos diferentes de *E coli* (ECEP ECEA y ECAD) aisladas de muestras de heces de animales y humanas y de agua proveniente de la Ciudad del Niño provincia de Panama Oeste y muestras clinicas

Los patotipos ECEP y ECEA fueron encontrados tanto en muestras ambientales como en muestras clinicas La ECAD no se identifico en ningun tipo de muestra

Los patotipos mixtos se identificaron a nivel ambiental en muestras de cerdo gallina y humanos

La presencia de *E coli* patogenas a nivel ambiental puede causar enfermedades transmitidas a los seres humanos

Se logro estandarizar un protocolo de PCR multiple para la identificacion de ECEP ECEA y ECAD

RECOMENDACIONES

Realizar una investigación mas profunda sobre los mecanismos de transmision de *E coli* patogenas a nivel ambiental

Realizar un estudio para la identificacion de patotipos mixtos directamente de ADN total de muestras ambientales y clinicas

Optimizar un protocolo para la identificacion de los seis patotipos de *E coli*

Utilizar esta PCR multiple estandarizada para investigar un numero mas elevado de *E coli* provenientes de muestras ambientales y clinicas en estudios epidemiologicos

BIBLIOGRAFÍA

- AFSET, J., BEVANGER, L., ROMUNDSTAD, P., BERGH, K. 2004. Asociación de *Escherichia coli* Enteropatógena atípica (EPEC) en diarrea prolongada. *J Med Microbiol.* 53: 1137-1144.
- ÁGUILA, A., BERNEDO, R., LLOP, A., RAMÍREZ, M., BRAVO, L., FERNÁNDEZ, A., LEDO, Y. 2007. <Estudio de marcadores fenotípicos y de susceptibilidad antimicrobiana en cepas de *Escherichia coli* entéricas. *Rev Cubana Med Trop.* 59(2): 102-7.
- ANONYMOUS. 2006. Future directions for research on enterotoxigenic *Escherichia coli* vaccines for developing countries. *Wkly Epidemiol Rec.* 81:97-107.
- ARANDA, K., FAGUNDES, U., SCALETSKY, I. 2004. Evaluation of Multiplex PCRs for Diagnosis of Infection with Diarrheagenic *Escherichia coli* and *Shigella* spp. *J Clin Microbiol.* 42(12):.5849–5853.
- ARAUJO, J., TABARELLI, G., ARANDA, K., FABBRICOTTI, S., FAGUNDES, U., SCALETSKY, I. 2007. Los tipos típicos enteroagregativos y atípicos enteropatógenos de *Escherichia coli* son los patotipos diarreicos más frecuentes entre los niños brasileños. *J Clin Microbiol.* 45: 3396-3399.
- ASFET, J., BRUANT, G., BROUSSEAU, R., HAREL, J., ANDERSSSEN, E., BEVANGER, L., BERGH, K. 2006. Identificación de genes de virulencia vinculados con diarrea debida a *Escherichia coli* enteropatógena atípica por análisis de microarrays de ADN y PCR. *J Clin Microbiol.* 44 3703-3711.
- BAQUI, A., SACK, R., BLACK, R., HAIDER, K., HOSSAIN, A., ALIM, A., YUMUS, M., CHOWDHURY, H., SIDDIQUE, A. 1992. Enteropatógenos asociados con diarrea aguda y diarrea persistente en niños Bangladesh <5 años de edad. *J Infect Dis.* 166: 792-796.

- BALDINI, M., KAPER, J., LEVINE, M., CANDY, D., MOON, H. 1983. Adherencia medida por plásmidos en *Escherichia coli* enteropatógena. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2: 534-538.
- BARTLETT, J.M., STIRLING, D. 2003. A short history of the polymerase chain reaction. *Methods Mol Biol.* 226:3-6.
- BATISTA, G. y YEE, Y. 2010. Patrones de Resistencia Antimicrobiana en cepas de *Escherichia coli* procedentes de muestras fecales y de aguas. Tesis de Licenciatura, Universidad de Panamá, Panamá. P. 51.
- BAUDRY, B., SAVARINO, S.J., VIAL, P., KAPER, J.B., LEVINE, M.M. 1990. A sensitive and specific DNA probe to identify enteroaggregative *Escherichia coli*, a recently discovered diarrheal pathogen. *J Infect Dis.* 161:1249-1251.
- BLACK, R.E., COUSENS, S., JOHNSON, H.L., *et al.* 2010. Global, regional, and national causes of child mortality in 2008: a systematic analysis. *Lancet.* 375(9730):1969–1987.
- BLANC, V. 2007. Caracterización de Cepas y de Plásmidos de Enterobacteriaceae Portadores de β -Lactamasas de Espectro Extendido. Tesis de Doctorado, Universidad Autónoma de Barcelona, Barcelona. P. 8, 9.
- BOISEN, N., RUIZ, F., SCHEUTZ, F., KROGFELT, K., NATARO, J. 2009. Short report: high prevalence of serine protease autotransporter cytotoxins among strains of enteroaggregative *Escherichia coli*. *Am J Trop Med Hyg.* 80(2):294–301.
- BOSCHI, C., VELEBIT, L., SHIBUYA, K. 2008. Estimating child mortality due to diarrhoea in developing countries. *Bull World Health Organ.* 86(9):710–717.

- BROCKERHOFF, M., HEWETT, P. 2000. Inequality of child mortality among ethnic groups in sub-Saharan Africa. *Bull World Health Organ.* 78(1):30–41.
- CAPRIOLI, A., MORABITO, S., BRUGÉRE, H., OSWALD, E. 2005. Enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: emerging issues on virulence and modes of transmission. *Vet Res.* 36(3):289-311.
- CHANDRAN, A., MOHAMED, A., VARGUESE, S., MONY, K. 2008. Prevalence of multiple drug resistant *Escherichia coli* serotypes in a tropical estuary, India. *Microbes Environ.* 23(2):153-8.
- CHEN, H., FRANKEL, G. 2005. Enteropathogenic *Escherichia coli*: unravelling pathogenesis. *FEMS Microbiol Rev.* 29: 83–98.
- CIRES, M. 2002. La resistencia a los antimicrobianos, un problema mundial. *Rev Cubana Med Gen Integr.* 18(2):165-8.
- CLARKE, S. 2001. Diarrhoeagenic *Escherichia coli* an emerging problem?. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 41(3): 93-8.
- COBELJIC, M., MILIJKOVIC, B., PAUNOVIC, D., VELICKOVIC, Z., LEPSANOVIC, Z., SAVIC, D., *et al.* 1996. Enteroaggregative *Escherichia coli* associated with an outbreak of diarrhoea in a neonatal nursery ward. *Epidemiol Infect.* 117:11-16.
- COLEMAN, W.B., TSONGALIS, G.J. 2006. Molecular diagnostics for the clinical laboratorian. Human Press. P. 47-56, 65-74.

- CORTES I RODRIGUEZ G MORENO E TENORIO J TORRES B
MONTIEL E 2002 Brote causado por *Escherichia coli* en Chalco Mexico
Salud publica Mex 44 4
- CRAVIOTO A TELLO A VILLAFAN H RUIZ J DEL VEDOVO S NEESER
J R 1991 Inhibition of Localized Adhesion of Enteropathogenic *Escherichia coli* to HEp 2 Cells by Immunoglobulin and Oligosaccharide Fractions and Breast Milk *J Infect Dis* 163 (6) 1247 1255
- CROXEN M A y FINLAY B B 2010 Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity *Nature Rev Microbiol* 8(1) 26 38
- CROXEN M LAW R SCHOLZ R KEENEY K WLODARSKA M FINLAY B
2013 *Clin Microbiol Rev* 26(4) 822 80
- Daley A Randall R Darsley M *et al* 2007 Genetically modified enterotoxigenic *Escherichia coli* vaccines induce mucosal immune responses without inflammation *Gut* 56(11) 1550–1556
- DIAZ C GARROTE H AMOR A SUAREZ Y GONZALEZ R 2013 Cuantificación de ácido ribonucleico para la realización de la técnica de RT-PCR *Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter* 29(3) 298 303
- DONNENBERG M GIRÓN J NATARO J KAPER J 1992 Un gen fimbrial de Tipo IV codificado por plasmido de *Escherichia coli* enteropatógena asociada con adherencia localizada *Mol Microbiol* 6 3427 3437
- ELIAS W P y GÓMEZ T A T 2008 *Escherichia coli* Enteroagregativa (EAEC) *In* Trabulsi LR & Alterthum F editores *Microbiología* 5ª ed Sao Paulo Atheneu P 295 299

- ESCOBAR P CLEMONT O BLANC A BUI H LE C DENAMUR E 2004
A specific background is required for acquisition and expression of virulence factors in *Escherichia coli* *Mol Biol Evol* 21 1085 1094
- FARFAN A ARIZA S VARGAS F VARGAS L 2016 Mecanismos de virulencia de *Escherichia coli* enteropatógena *Rev Chilena Infectol* 33 (4) 438 450
- FERNÁNDEZ R RODRIGUEZ C RODRÍGUEZ I GOMEZ F 2003 *Rev Cubana Pediatr* 75 3
- GARCIA M URUBURU F 2000 La Conservación de Cepas Microbianas *Act SEM* 30(1) 12 16
- GIRÓN J JONES T MILLÁN F MUNOZ E ZARATE L FRY J FRANKEL G MOSELEY S BAUDRY B KAPER J SCHOOLNICK G RILEY L 1991 *Escherichia coli* de difusión difusa (DAEC) como causa putativa de diarrea en niños mayas en México *J Infect Dis* 163 507 513
- GOLDSMID J LEGGAT P 2007 El viajero devuelto con diarrea *Aust Fam Physician* 36(5) 322 327
- GOMEZ O BAI J NEWELL E 2009 Detection of *Escherichia coli* *Salmonella* spp *Shigella* spp *Yersinia enterocolitica* *Vibrio cholerae* and *Campylobacter* spp enteropathogens by 3 reaction multiplex polymerase chain reaction *Diagn Microbiol Infect Dis* 63 1 – 9
- GOMEZ O 2014 Enfermedad diarreica aguda por *Escherichia coli* patógenas en Colombia *Rev Chilena Infectol* 31(5) 577 586

- GUERRA J ROMERO Y ARZUZA O GÓMEZ O 2014 Phenotypic and Genotypic Characterization of Enterotoxigenic *Escherichia coli* Clinical Isolates from Northern Colombia South America *Biomed Res Int* 2014 236 260
- GUNZBURG S CHANG B ELLIOTT S BURKE V GRACEY M 1993 Patrones difusos y enteroagregativos de adherencia de *Escherichia coli* enterica aislados de niños aborígenes de la región de Kimberly en el oeste de Australia *J Infect Dis* 167 755 758
- GUTH B E C 2008 *Escherichia coli* Productora de Toxina Shiga (STEC) In Trabulsi LR & Alterthum F editores *Microbiología* 5ª ed Sao Paulo Atheneu P 289 293
- HALPENNY C KOSKI K VALDES V SCOTT M 2012 Predicción de la salud infantil por densidad de hogares e índices basados en activos en pueblos indígenas empobrecidos en zonas rurales de Panamá *Am J Trop Med Hyg* 86(2) 280 291
- HARRINGTON S DUDLEY E NATARO J 2006 Pathogenesis of enteroaggregative *Escherichia coli* infection *FEMS Microbiol Lett* 254(1) 12–18
- HILL D BEECHING N 2010 Travelers diarrhea *Curr Opin Infect Dis* 23(5) 481–487
- HUANG D B MOHAMED J A NATARO J P DUPONT H L JIANG Z OKHUYSEN P C 2007 Virulence characteristics and the molecular epidemiology of enteroaggregative *Escherichia coli* isolates from travellers to developing countries *J Med Microbiol* 56 1386–1392

- HUANG D B MOHANTY A DUPONT H L OKHUYSEN P C CHIANG T A
2006 Emerging enteric pathogen enteroaggregative *Escherichia coli* *J Med Microbiol* 55 1303 1311
- HUILAN S ZHEN L G MATHAN M M *et al* 1991 Etiology of acute diarrhoea among children in developing countries a multicentre study in five countries *Bull World Health Organ* 69(5) 549–555
- INNIS M GELFAND D SNINSKY J 1999 PCR applications protocols for functional genomics Academic Press Pp 74 76
- ISIDEAN S RIDDLE M SAVARINO S PORTER C 2011 A systematic review of ETEC epidemiology focusing on colonization factor and toxin expression *Vaccine* 29(37) 6167–6178
- JALLAT C LIVRELLI V DARFEUILLE A RICH C JOLY B 1993 Cepas de *Escherichia coli* implicadas en la diarrea en Francia alta prevalencia y heterogenicidad de cepas difusas adheridas *J Clin Microbiol* 31 2031 2037
- JOHNSON J 1991 Virulence factors in *Escherichia coli* urinary tract infection *Clin Microbiol Rev* 4 80 128
- KAPER J B NATARO J P MOBLEY H L 2004 Pathogenic *Escherichia coli* *Nat Rev Microbiol* 2(2) 123 40
- KONEMAN E W ALLEN S D DOWELL V R SOMMERS H M 2008 Diagnostico microbiologico texto y color Atlas 6^a ed Londres editorial Panamericana de Medicina Ltda Brasil P 1565
- KOWALCHUK G A GERARDS S WOLDENDORP J W 1997 Detection and characterization of fungal infections of *Ammophila arenaria* (Marran grass)

roots by denaturing gradient gel electrophoresis of specifically amplified 18S rDNA *Appl Environ Microbiol* 63(10) 3858–3865

LANATA C FISCHER C OLASCOAGA A TORRES C ARYEE M BLACK R 2013 Global causes of diarrheal disease mortality in children < 5 years of age: a systematic review *PLoS One* 8 e72788

LAROCHE E PETIT F FOURNIER M PAWLAK B 2010 Transport of antibiotic resistant *Escherichia coli* in a public rural karst water supply *J Hydrology* 392(1–2) 12–21

LE BOUGUENEC C SERVIN A 2006 Diffusely adherent *Escherichia coli* strains expressing Afa/Dr adhesins (Afa/Dr DAEC) hitherto unrecognized pathogens *FEMS Microbiol Lett* 256(2) 185–194

LEVINE M 1987 *Escherichia coli* que causa diarrea enterotogénica enteropatógena enteroinvasiva enterohemorrágica y enteroadherente *J Infect Dis* 155 377–389

LOPES L FABBRICOTTI S FERREIRA A KATO M MICHALSKI J SCALETSKY I 2005 Heterogeneity among strains of diffusely adherent *Escherichia coli* isolated in Brazil *J Clin Microbiol* 43 1968–1972

LÓPEZ C CERNA J VILLEGAS N THOMPSON R VELASQUEZ F TORRES J TARR P ESTRADA T 2003 Single multiplex polymerase chain reaction to detect diverse loci associated with diarrheagenic *Escherichia coli* *Emerg Infect Dis* 9 127–131

MATTAR S VÁSQUEZ E 1998 *Escherichia coli* O157:H7 infection in Colombia *Emerging Infect Dis* 4(1) 126–127

- MONTENEGRO, R. A; STEPHENS, C. 2006. Indigenous health in Latin America and the Caribbean. *Lancet*. 367(9525):1859–1869.
- MOREJON, M. 2013. *Escherichia coli* Multirresistentes. *Rev Cub Urol*. 2(1): 4-6.
- NATARO, J.P. y KAPER, J.B.1998. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev*. 11(2):142–201.
- NEGRO, R. E. 1990. Epidemiología de la diarrea del viajero y la importancia relativa de diversos patógenos. *Rev Infect Dis*. 12 : 73-79.
- NGUYEN, R., TAYLOR, L., TAUSCHEK, M., ROBINS, R. 2006. Infección por *Escherichia coli* enteropatógena atípica y diarrea prolongada en niños. *Emerg Infectar Dis*. 12:597-603.
- OCHOA, T., MERCADO, E., DURAND, D., RIVERA F., MOSQUITO, S., CONTRERAS, C., RIVEROS, M., LLUQUE, A., BARLETTA, F., PRADA, A., RUIZ, J. 2011. Frecuencia y patotipos de *Escherichia coli* diarrogénicas en niños peruanos con y sin diarrea. *Rev Perú med exp salud pública*. 28:1.
- OKEKE, E. 2009. Diarrheagenic *Escherichia coli* en el África Subsahariana: estado, incertidumbre y necesidades. *J Infect Dev Ctries*. 3(11): 814-42.
- OLIVE, D.M., BEAN, P. 1999. Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. *J Clin Microbiol*. 37(6):1661-1669.
- Organización Mundial de la Salud (OMS). 2007. Informe sobre la salud en el mundo. Un porvenir más seguro. Protección de la salud pública mundial en el siglo XXI. Disponible en: <http://www.who.int/whr/2007/es/index.html>

- Organización Mundial de la Salud (OMS). Alerta y Respuesta Mundiales (GAR). 2011. Brote de síndrome hemolítico urémico en Alemania. Disponible en: http://www.who.int/csr/don/2011_05_27/es/
- Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO). 2008. Boletín de enfermedades transfronterizas de los animales. Disponible en: <http://www.fao.org/3/a-i2530s/i2530s03.pdf>
- O'RYAN, M., PRADO, V., PICKERING, L.K. 2005. A millennium update on pediatric diarrheal illness in the developing world. *Semin Pediatr Infect Dis.* 16(2):125–136.
- PANIAGUA, G., MONROY, E., VACA, S. 2007. Fenotipos de resistencia a antibióticos en cepas de *Escherichia coli* diarreogénicas detectadas en infantes mediante reacción en cadena de la polimerasa multiplex. *Rev Med Hosp Gen Mex.* 70(4): 158-167.
- PARASHAR, U.D., HUMMELMAN, E.G., BRESEE, J.S., MILLER, M.A., GLASS R.I. 2003. Global illness and deaths caused by rotavirus disease in children. *Emerging Infect Dis.* 9(5):565–572.
- PEREIRA, A., SILVA, T., GOMES, A., ARAÚJO, A., GIUGLIANO, L. 2010. Diarrhea-associated biofilm formed by enteroaggregative *Escherichia coli* and aggregative *Citrobacter freundii*: a consortium mediated by putative F pili. *BMC Microbiol.* 10:57.
- PÉREZ, CRISTIAN, GÓMEZ, O. Y ARIAS, M. 2010. Diarreogénica *Escherichia coli* en los niños de Costa Rica. *Am J Trop Med Hyg.* 83(2): 292–297.

- POGGI H GUZMÁN A GARCÍA P LAGOS M 2009 PCR universal o de amplio espectro Un aporte a la detección e identificación de bacterias y hongos en la práctica clínica *Rev Med Chile* 137(8) 1122-1125
- PUERTA C Y URENA C 2005 *Prácticas de Biología Molecular: Protocolos* 1ra Edición Editorial Colección Biblioteca del Profesional Pontificia Universidad Javeriana Colombia
- QADRI F SVENNERHOLM A M FARUQUE A S SACK D A 2005 Enterotoxigenic *Escherichia coli* in developing countries: epidemiology, microbiology, clinical features, treatment and prevention *Clin Microbiol Rev* 18:465-483
- RAM S VAJPAJEE P SINGH R SHANKER R 2009 Surface water of a perennial river exhibits multi-antimicrobial resistant shiga toxin and enterotoxin-producing *Escherichia coli* *Ecotox Environ Safe* 72:490-5
- RASKO D WEBSTER D SAHL J *et al* 2011 Origins of the *E. coli* strain causing an outbreak of hemolytic uremic syndrome in Germany *N Engl J Med* 365(8) 709-717
- REBELLO R 2012 Características biogenéticas y resistencia al mercurio en *Escherichia coli* aisladas de los sistemas acuáticos en Río de Janeiro Tesis de Maestría Escuela Nacional de Salud Pública Sergio Arouca Río de Janeiro P 4-11
- REGUA A H GÓMEZ T A T VIEIRA M A M ANDRADE J R C IRINO K TEIXEIRA L M 2004 Frecuencia y características de *Escherichia coli* diarreogénicas aisladas de niños con y sin diarrea en Río de Janeiro *Braz J Infect Dis* 48:161-167

- MONTENEGRO, R. A; STEPHENS, C. 2006. Indigenous health in Latin America and the Caribbean. *Lancet*. 367(9525):1859–1869.
- MOREJON, M. 2013. *Escherichia coli* Multirresistentes. *Rev Cub Urol*. 2(1): 4-6.
- NATARO, J.P. y KAPER, J.B.1998. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev*. 11(2):142–201.
- NEGRO, R. E. 1990. Epidemiología de la diarrea del viajero y la importancia relativa de diversos patógenos. *Rev Infect Dis*. 12 : 73-79.
- NGUYEN, R., TAYLOR, L., TAUSCHEK, M., ROBINS, R. 2006. Infección por *Escherichia coli* enteropatógena atípica y diarrea prolongada en niños. *Emerg Infect Dis*. 12:597-603.
- OCHOA, T., MERCADO, E., DURAND, D., RIVERA F., MOSQUITO, S., CONTRERAS, C., RIVEROS, M., LLUQUE, A., BARLETTA, F., PRADA, A., RUIZ, J. 2011. Frecuencia y patotipos de *Escherichia coli* diarrogénicas en niños peruanos con y sin diarrea. *Rev Perú med exp salud pública*. 28:1.
- OKEKE, E. 2009. Diarrheagenic *Escherichia coli* en el África Subsahariana: estado, incertidumbre y necesidades. *J Infect Dev Ctries*. 3(11): 814-42.
- OLIVE, D.M., BEAN, P. 1999. Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. *J Clin Microbiol*. 37(6):1661-1669.
- Organización Mundial de la Salud (OMS). 2007. Informe sobre la salud en el mundo. Un porvenir más seguro. Protección de la salud pública mundial en el siglo XXI. Disponible en: <http://www.who.int/whr/2007/es/index.html>

Moleculares. Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Autónoma de Coahuila. Saltillo. Coahuila, México. *Acta Química Mexicana (AQM) Revista de Divulgación Científica*. 1(1) Disponible en: <http://www.postgradoeinvestigacion.uadec.mx/AQM/No.%25201/AQMmicroorganismos.html>. Consultado el 28-6-14

ROMEY, B. 2012. Caracterización de cepas de *Escherichia coli* de importancia clínica humana aisladas de ecosistemas dulceacuícolas de La Habana. Tesis de Doctorado, Universidad de La Habana, La Habana. P. 97.

RÚGELES, L., BAI, J., MARTÍNEZ, A., VANEGAS, M., GÓMEZ, O. 2010. Molecular characterization of diarrheagenic *Escherichia coli* strains from stools samples and food products in Colombia. *Int J Food Microbiol*. 138(3):282–286.

SAMBROOK, J.F. y RUSELL, D.W. 2001. *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. 3^{ra} Edición. Cold Spring harbor Laboratory Press. New York. USA. P 5.1-6.62.

SCALETSKY, I., ARANDA, K., SOUZA, T., SILVA, NEUSA. 2010. Factores de adherencia en cepas de *Escherichia coli* enteropatógenas atípicas que expresan el patrón de adherencia similar en células HEo-2. *J Clin Microbiol*. 48 (1): 302-306.

SCALETSKY, I., SILCA, M., TRABULSI, L. 1984. Patrones de adherencia de *Escherichia coli* enteropatógena a las células HeLa. *Inmun*. 45: 534-536.

SHULMAN, S., FRIEDMANN, H., SIMS, R. 2007. Theodor Escherich: The First Pediatric Infectious Diseases Physician?. *Clinic Inf Dis*. 45(8):1025-1029.

SUÁREZ, A., 2017. Microbioma y Secuenciación Masiva. *Rev Esp Quimioter*. 30(5): 3605-311.

- SURZICKI S 2000 Basic Techniques in Molecular Biology VIII Berlin Springer Verlag P 1 163
- THAPAR N SANDERSON I R 2004 Diarrhoea in children an interface between developing and developed countries *Lancet* 363(9409) 641–653
- TRABULSI L KELLER R TARDELLI T 2002 *Escherichia coli* enteropatogena típica y atípica *Emerg Infectar Dis* 8 508 513
- TURNER A STEPHENS J BEAVIS J *et al* 2011 Generation and characterization of a live attenuated enterotoxigenic *Escherichia coli* combination vaccine expressing six colonization factors and heat labile toxin subunit B *Clin Vaccine Immunol* 18(12) 2128 2135
- VERGARA M QUIROGA M GRENON S *et al* 1996 Prospective study of enteropathogens in two communities of Misiones Argentina *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 38(5) 337 347
- VIDAL R VIDAL M LAGOS R LEVINE M PRADO V 2004 Multiplex PCR for Diagnosis of Enteric Infections Associated with Diarrheagenic *Escherichia coli* *J Clin Microbiol* 42(4) 1787–1789
- WALKER R STEELE D AGUADO T 2007 Analisis de estrategias para vacunar a los bebes con exito en los paises en desarrollo contra E coli enterotoxigenica enfermedad (ETEC) *Vacuna* 25 2545 2566
- WELCH R 2006 The genus *Escherichia* The prokaryotes Volume 6 Springer New York P 60 71