

Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua, León
Facultad de Ciencias Médicas
Escuela de Bioanálisis Clínico



Tesis para optar al título de Licenciado en Bioanálisis Clínico.

Escherichia coli O157: Pasos hacia la
Optimización de un PCR Múltiplex para la
Detección e Identificación de cepas
Verocitotóxicas.

Autor: Br. Róger Paulino Ramírez Granados.

Tutor: Dr. Samuel Vilchez.

Profesor Titular Dpto. Microbiología.

Junio de 2011

A la libertad por la Universidad!

Al que dijo: Yo Soy El Camino, La Verdad y La Vida.

JESUCRISTO

Agradecimiento

Quisiera dar las gracias a las personas que directa o indirectamente contribuyeron a la realización de esta tesis:

Dr. Samuel Vílchez mi tutor y compañero durante este trayecto quien a pesar de su siempre apretada agenda, me permitió no solo su tiempo sino parte de su vasto conocimiento de años de trabajo y dedicación a la ciencia. Gracias teacher! por la paciencia y su gran apoyo!

Mis padres por haberme enseñado no solo con sus palabras sino con su ejemplo, la importancia de la adquisición de conocimientos no solo científicos sino también morales y espirituales para mi beneficio y el de otras personas a quienes pueda servir en el ejercicio de mi profesión.

Mi hermano y hermana los cuales me han inspirado a esforzarme y trabajar duro para alcanzar las metas que me proponga en la vida, siempre y cuando tenga confianza en Dios.

Docentes que laboran en el Campus Médico, por haber trabajado duro y esmeradamente para educar una generación de la cual he tenido el privilegio de ser parte.

Al responsable de haber puesto a todos los antes mencionados en mi camino y ser el autor intelectual no solo de este trabajo sino de cada una de los logros en mi vida: Mi Padre, “El Eterno”.

Resumen

A nivel mundial la enfermedad diarreica aguda (EDA), es un problema importante de salud pública, principalmente en niños de países en vía de desarrollo como Nicaragua. La *Escherichia coli* productora de verocitotoxinas (ECVT), cuyo serogrupo O157 es el de mayor relevancia médica pertenece a uno de los patotipos de *E. coli* asociados a EDA. A la par, ésta bacteria mediante la elaboración de citotoxinas puede causar otras patologías más complicadas como el Síndrome Urémico Hemolítico (SUH), Púrpura Trombocitopenia y Colitis Hemorrágica.

La ECVT O157 puede ser identificada mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), no obstante ésta técnica requiere una optimización precisa de las variables que condicionan el proceso. Así, el presente estudio se basa en una serie de experimentos en aras a la optimización de un PCR Múltiplex para la detección e identificación de cepas de ECVT O157. Se analizaron cepas de referencia ATCC de *E. coli* enterohemorrágica, enterotoxigénica, enteroagregativa 97R, *E. coli* sin factores de virulencia, 40 aislados clínicos de *E. coli* de terneros y 21 aislados de niños con diarrea empleando cebadores para los genes *vt1*, *vt2*, *eaeA* y *rfbO157*. El primer paso fue la amplificación del gen *rfbO157* a temperaturas de hibridación y concentraciones variadas de los cebadores, observándose los mejores resultados a 58 °C y a 0.2 µM. Posteriormente se procedió a mezclar los 4 pares de cebadores en un coctel Múltiplex obteniéndose buenos resultados. El límite de detección estimado, para lo cual se preparó una suspensión de bacterias para luego realizar una serie de diluciones que fueron ensayadas mostró ser de 12×10^6 UFC/mL para los genes *vt1* y *vt2*, 12×10^4 UFC/mL para *eaeA* y 12×10^3 UFC/mL para *rfbO157*. El último paso consistió en experimentar el método en aislados clínicos de *E. coli*. En terneros se logró observar un 50% de ECVT O157. En total 62.5% de las *E. coli* aisladas de terneros eran ECVT. Los aislados clínicos de *E. coli* de niños mostraron 4.8% de ECVT.

Lista de Abreviaciones

- **EDA:** Enfermedad Diarreica Aguda.
- **OMS:** Organización Mundial de la Salud.
- **ECD:** *Escherichia coli* Diarreagénicas.
- **ECET:** *Escherichia coli* Enterotoxigénica.
- **ECEP:** *Escherichia coli* Enteropatógena.
- **ECEI:** *Escherichia coli* Enteroinvasiva.
- **ECEA:** *Escherichia coli* Enteroagregativa.
- **ECAD:** *Escherichia coli* Adherente Difusa.
- **ECVT:** *Escherichia coli* productora de Verocitotoxinas.
- **SUH:** Síndrome Urémico Hemolítico.
- **CH:** Colitis Hemorrágica.
- **ETA:** Enfermedades Transmisibles por Alimentos.
- **PCR:** Reacción en Cadena de la Polimerasa (Polimerasa Chain Reaction).
- **BUN:** Nitrógeno Ureico en Sangre (Blood Ureic Nitrogen).
- **PTT:** Púrpura Trombótica Trombocitopenica.
- **Stx ϕ :** Bacteriófago de Toxina Shiga.
- **Stx:** Toxina Shiga.
- **kDa:** Kilo Dalton.
- **Gb3:** Globotriasilceramida.
- **LEE:** Locus de Borrado de Enterocito (Locus Enterocyte Effacement).
- **A/E:** Lesión de Ataque y Borrado (“Attaching and Effacing”).
- **ELISA:** Inmunoensayo Enzimático (Enzyme Linked Inmunoassay).
- **dNTPs:** Dinucleótidos Trifosfatos.
- **ATCC:** American Type Culture Collection.

Índice

1. Introducción.....	1
2. Planteamiento del Problema.....	3
3. Objetivos.....	4
4. Marco Teórico.....	5
5. Diseño Metodológico.....	29
6. Resultados.....	34
7. Discusión.....	38
8. Conclusiones.....	42
9. Recomendaciones.....	43
10. Referencias.....	44

1. Introducción

A nivel mundial la enfermedad diarreica aguda (EDA), es un problema importante de salud pública, afectando principalmente a la población infantil de los países en vía de desarrollo. Anualmente, 1.4 millones de muertes infantiles son atribuidas a esta enfermedad, lo que representa aproximadamente un 19% del total de muertes pediátricas, según la Organización Mundial de la Salud (OMS)⁽¹⁻²⁾.

Dentro de los patógenos bacterianos asociados a la EDA, se encuentran las *Escherichia coli* diarreagénicas (ECD) las cuales agrupan al menos 6 patotipos incluyendo la *Escherichia coli* Verocitotoxigénica (ECVT), en la cual el serotipo O157 es el de mayor importancia médica. Este ha emergido en las últimas décadas, como un patógeno capaz de causar diferentes complicaciones clínicas en el ser humano⁽³⁻⁶⁾.

La ECVT fue reconocida por primera vez como patógeno humano en 1982 durante dos brotes de Colitis Hemorrágica (CH) ocurridos en Oregón y Michigan, EE.UU, atribuidos al consumo de hamburguesas en restaurantes de una cadena de comidas rápidas⁽⁷⁾. Las cepas de ECVT O157 producen toxinas casi idénticas a la producida por *Shigella dysenteriae*, la cual es la responsable de la severidad de la gastroenteritis entre leve a sanguinolenta y colitis hemorrágica⁽⁸⁻¹¹⁾. Además, algunos de los pacientes con diarrea con sangre, especialmente los niños pueden llegar a desarrollar Síndrome Urémico Hemolítico (SUH), el cual es una enfermedad muy grave y es la causa más frecuente de insuficiencia renal aguda en la población infantil⁽¹²⁻¹⁸⁾. Dicho síndrome fue descrito por primera vez por Gagger en Suiza, en el año 1957 y fue en Argentina donde Carlos Gianantonio, publicó la primera casuística de 66 casos en el año 1962⁽¹⁹⁾. Se sabe que el SUH puede llegar a ser letal hasta en un 10%, y un 30% de los infantes pueden quedar con secuelas graves tales como insuficiencia renal crónica e hipertensión arterial⁽¹²⁻¹⁸⁾.

En Nicaragua, la EDA es la segunda afectación más importante de la población infantil, y la insuficiencia renal aguda es un problema de salud pública de mayor relevancia en el Occidente del país⁽²⁰⁾. En Nicaragua información acerca de la circulación de ECVT fue

demostrada por primera vez por *Vílchez y col.*, en el 2009 ⁽²¹⁾. Además, este estudio, fue el primero en Nicaragua, en emplear un método molecular optimizado para la detección de *E. coli* patógenas. Sin embargo, en el estudio no se investigó los serogrupos de las ECVT circulantes. No obstante, esta bacteria es de reporte obligatorio al MINSA, el cual en su manual de diagnóstico bacteriológico describe un método para el aislamiento sospechoso de *E. coli* O157:H7 basado en ensayos de aislamiento y aglutinación para la detección de los antígenos ⁽²²⁾. Cabe resaltar, que este último método aparte de presentar el problema de posibles reacciones cruzadas producto de determinantes epítopes con otros antígenos bacterianos, no incluye la detección de las verocitotoxinas que son la principal arma virulenta de la bacteria. Además, no todas las *E. coli* O157 producen las verocitotoxinas, por ende algunas de ellas no son virulentas. También, el flagelo H7 no siempre está presente en los aislados de estas *E. coli* ⁽²³⁻²⁵⁾.

En base a lo anterior, se hace no solamente necesario, sino urgente contar con un método molecular que permita realizar estudios epidemiológicos y que pueda ser utilizado localmente en el diagnóstico confirmatorio, que nos permitan apreciar el verdadero impacto de las infecciones asociadas a la ECVT O157.

Una técnica molecular confiable para concretizar la idea anteriormente planteada es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) la cual es una técnica *in vitro* ideada por Kary B. Mullis en 1986, es sencilla, sensible y relativamente rápida para amplificar secuencias conocidas de ADN, tales como los genes *rfbO157*, *eaeA*, *vt1* y *vt2* de ECVT O157. No obstante, ésta requiere una optimización precisa de las variables que condicionan el proceso, para así poder obtener resultados confiables. ⁽²⁶⁻²⁹⁾

2. Planteamiento del Problema

¿Cuáles son las condiciones óptimas experimentales de Concentración de Cebadores y Temperatura de Hibridación para tener a punto un PCR múltiplex utilizando PureTaq Ready-to-go PCR beads, para la detección de *Escherichia coli* productora de verocitotoxinas O157?

3. Objetivo General

- a. Determinar las condiciones óptimas experimentales de Concentración de Cebadores y Temperatura de Hibridación para un PCR múltiplex utilizando PureTaq Ready-to-go PCR beads, en la detección de *Escherichia coli* productora de verocitotoxinas O157.

3.1 Objetivos Específicos

- a. Determinar la Concentración y Temperatura óptima experimental de Hibridación de la mezcla de cebadores para los genes *vt1*, *vt2*, *eaeA* y *rfbO157*.
- b. Estimar el Límite de Detección del método optimizado.
- c. Experimentar el método optimizado con aislados clínicos de terneros y humanos.

4. Marco Teórico

4.1 *Escherichia coli* productora de Verocitotoxinas O157

Actualmente existen seis categorías principales de la bacteria *Escherichia coli* que produce gastroenteritis en el hombre. Entre ellas está la *E. coli* productora de verocitotoxinas (ECVT), cuyo principal serogrupo es el O157 responsable de entre el 50 y 80% de los casos atribuidos a esta bacteria. Su nombre se origina del antígeno somático O157 codificado en el gen *rfbO157* y el séptimo antígeno flagelar H que se encuentra solo en especies móviles ⁽³⁻⁶⁾.

ECVT O157 fue reconocida por primera vez como patógeno humano en 1982 durante dos brotes de Colitis Hemorrágica (CH) ocurridos en Oregón y Michigan, EE.UU, atribuidos al consumo de hamburguesas en una cadena de restaurantes de comidas rápidas ⁽⁷⁾. El serogrupo O157 es una rara variedad de *E. coli* que produce grandes cantidades de potentes toxinas que causan severos daños a la mucosa intestinal. Estas toxinas están muy relacionadas a las toxinas que produce la *Shigella dysenteriae* tipo 1 ⁽⁸⁻¹¹⁾.

La *E. coli* O157 puede sobrevivir en ambientes ácidos que son letales para otros organismos patógenos, tales como alimentos fermentados (por ejemplo, salchichas), jugo de manzanas, mayonesas y quesos. El tiempo de supervivencia de estos organismos es mayor a temperaturas de refrigeración (32°F-40°F) que a temperatura ambiente ⁽³⁰⁻³¹⁾.

La enfermedad aguda causada por la bacteria *Escherichia coli* O157 se denomina Colitis Hemorrágica. Las infecciones de Colitis Hemorrágica no son muy comunes, pero esto quizás no refleje su verdadera frecuencia. Probablemente aquellas personas que presentan síntomas inequívocos (diarreas profusas con sangre, por ejemplo) buscan atención médica, mientras que los casos menos severos, que pueden ser más numerosos, conforman un subregistro ⁽³²⁻³⁵⁾.

La ECVT O157 es un agente zoonótico, que tiene un reservorio animal amplio, entre ellos bovinos, porcinos, venados, constituyendo el ganado bovino el reservorio de mayor

impacto epidemiológico. Esta bacteria habita el intestino de estos animales, sin ocasionarles en la mayoría de los casos trastorno alguno. Se ha demostrado que el 75% del ganado lechero y el 63% de ganado vacuno de engorde son positivo para *E. coli* O157⁽³⁵⁻³⁷⁾.

La infección en los seres humanos generalmente ocurre por la ingestión de alimentos contaminados. La mayoría de los brotes están asociados al consumo de productos cárnicos contaminados e insuficientemente cocidos sobre todo hamburguesas, ya que la carne puede contaminarse durante el proceso de sacrificio por contacto fecal⁽³⁴⁻³⁹⁾.

Las bacterias presentes en la ubres de las vacas o en los equipos de ordeño pueden también contaminar la leche por lo cual la leche cruda o no pasteurizada también ha estado involucrada en algunos casos de enfermedad. Asimismo tanto el agua y vegetales fertilizados con material orgánico contaminado puede ser fuentes de la infección^(33-35, 40-42).

Otros modos de transmisión menos comunes pero que puede darse es de persona a persona por la ruta fecal-oral o por contacto directo del hombre con los animales, ya que la dosis infecciosa mínima es usualmente de 10 a 100 células para el desarrollo de la enfermedad. La mayoría de las personas expulsan ECVT O157 durante aproximadamente 7 a 9 días; una minoría puede excretar el organismo durante 3 semanas o más luego del comienzo de los síntomas. En pocos casos la excreción puede continuar durante varios meses. Los niños tienden a eliminar el organismo más tiempo que los adultos⁽³²⁻³⁵⁾.

4.2 Manifestaciones Clínicas

4.2.1 Infección Asintomática y Diarrea sin Sangre

El período de incubación para la enfermedad causada por ECVT O157 es de 1 a 8 días. Aunque, la mayoría de las infecciones aparecen después de 3-4 días. Los casos de infección asintomática por *E. coli* O157 han sido detectados ocasionalmente en diversos brotes, aunque ha resultado complicado estimar su incidencia, debido a que las muestras fecales de las personas implicadas rara vez son recolectadas para su cultivo. Eventualmente, se han

reportado casos de diarrea sin sangre (10% del total de casos) que tienden a evolucionar a Colitis Hemorrágica. No obstante, los análisis microbiológicos practicados a evacuaciones sin sangre asociadas a brotes han demostrado que la frecuencia de *E. coli* O157 es relativamente pequeña. En general, los cuadros que cursan con diarrea no sanguinolenta presentan una menor severidad y pocas probabilidades de evolucionar a HUS o de provocar fallecimientos ⁽³²⁻³⁵⁾.

4.2.2 Colitis Hemorrágica

La Colitis Hemorrágica se presenta en el 90% de casos y es caracterizada por períodos de diarrea acuosa profusa con sangre visible luego de 1-2 días de iniciada la diarrea, acompañada por dolor abdominal normalmente más severo al aparecer la sangre, y en algunos casos, por calambres abdominales severos. Algunos pacientes (aprox. 50%) tienen una fiebre de bajo grado; en otros, la fiebre está ausente. Náuseas y vómitos pueden verse, y la deshidratación es posible. Algunos casos de Colitis Hemorrágica son limitados y se resuelven en aproximadamente una semana. La Colitis severa puede producir la necrosis intestinal, perforación o el desarrollo de estenosis colónica o prolapso rectal ⁽³²⁻³⁵⁾.

4.2.3 Síndrome Urémico Hemolítico (SUH)

El Síndrome Urémico Hemolítico ocurre en 5-15% de pacientes con Colitis Hemorrágica. Los niños menores de 5 años y los ancianos son los grupos más vulnerables. Esta enfermedad es la causa más frecuente de insuficiencia renal aguda en la infancia y la segunda de insuficiencia renal crónica a nivel mundial. El SUH fue descrito por primera vez por Gagger en el año 1957 y fue en Argentina donde Carlos Gianantonio, publicó la primera casuística de 66 casos en el año 1962 en un trabajo que ya es clásico a nivel mundial; desde entonces ese país ocupa el primer lugar en el mundo en incidencia del Síndrome que es alrededor de 400 casos por año, o sea 12 a 14 pacientes por cada 100.000 niños menores de 5 años ^(12-16, 19, 43-44).

El SUH se caracteriza por la tríada clínica: anemia hemolítica microangiopática, trombocitopenia (normalmente menos de 60–150,000/mm³) e insuficiencia renal aguda, que frecuentemente sucede a un período prodrómico de diarrea con sangre en los 5 a 7 días previos, conformando el cuadro clínico clásico. Las manifestaciones más comunes son: palidez, petequias, hematomas, oliguria o anuria, edema, hipertensión arterial.

Los análisis de laboratorio en estos pacientes suelen mostrar: anemia severa y trombocitopenia, cambios microangiopáticos en el frotis de sangre periférica (glóbulos rojos fragmentados o esquistocitos), aumento de reticulocitos, leucocitosis con predominio de neutrófilos (asociado a peor pronóstico). En el suero es común encontrar altos niveles de lactato deshidrogenasa (LDH) y hemoglobina libre, hiponatremia, hipercalcemia, hiperbilirrubinemia con predominio indirecto, prueba de Coombs negativa. La injuria renal aguda es evidenciada por hematuria, proteinuria, uremia mayor de 50 mg/dl en ausencia de deshidratación o creatinina mayor de dos desviaciones estándar respecto a la edad y sexo o aumento del 50% de los valores al inicio de la enfermedad. Además se puede acompañar de otros síntomas extra-renales como la afectación del sistema nervioso central (SNC), causando letargo e irritabilidad, paresis, apoplejía, edema cerebral o coma. Otras complicaciones extrarenales podrían incluir la pancreatitis y cardiomiopatías. Aproximadamente 65-85% de niños se recuperan de HUS sin daño permanente luego de 2-3 semanas de hospitalización. Además los casos recurrentes no son comunes. No obstante el riesgo de mortalidad es del 2 a 10 %. Algunos niños desarrollan insuficiencia renal crónica (5-12%), con requerimiento de diálisis o de trasplante, otros (30%) presentan secuelas a largo plazo como hipertensión, defectos en la capacidad de concentración en orina, proteinuria, o reducción del aclaramiento de la creatinina. ^(12-18,32-34, 45).

4.2.4 Púrpura Trombocitopénica Trombótica (PTT)

El 22% de pacientes con SUH desarrollan PTT. El cuadro suele presentarse con hemorragia diseminada, incluyendo petequias, equimosis y hemorragias retinianas y gastrointestinales. Adicionalmente, desde el punto de vista de sus trastornos neurológicos, éstos incluyen síndrome mental orgánico, paresia, disfasia, habla intermitente, cefalea, vértigo y crisis

convulsivas. Por lo que respecta a las alteraciones renales, por lo general éstas son progresivas y se caracterizan por hematuria, proteinuria y concentración elevada de nitrógeno ureico en sangre (BUN) ^(18,32-34).

En resumen, esta entidad clínica agrupa cinco síntomas: trombocitopenia, anemia hemolítica microangiopática, fiebre, daño renal agudo y alteraciones neurológicas; de hecho, representa la forma más extensa dentro del espectro de afecciones vasculares implicadas en el HUS. En concreto, la infección por *E. coli* O157 se ha asociado a algunos casos de PTT, ocurridos principalmente en adultos donde causa un alto grado de mortalidad cuando no es tratada. ^(18,32-34).

4.3 Patogenia y Factores de Virulencia

Se han definido varios factores de virulencia para ECVT, de los cuales la importancia de las verocitotoxinas en la patogenicidad de estas ha sido ampliamente reconocida. La ECVT O157 se caracteriza principalmente por poseer un gen insertado por un bacteriófago Stx ϕ en el cromosoma bacteriano que codifica una potente toxina denominada “toxina Shiga” (Stx) por su relación biológica y estructural con la toxina Shiga sintetizada por *Shigella dysenteriae* tipo I. También, se les llama verotoxinas por su actividad citotóxica sobre las células vero *in vitro*. La Stx constituye el principal factor de patogenicidad y la característica distintiva de ECVT ⁽⁸⁻¹¹⁾.

La familia de las toxinas Stx contiene 2 miembros principales que actúan como N-glicosidasas altamente específicas que no cruzan inmunológicamente, denominadas Stx1 y Stx2; una misma cepa de ECVT puede sintetizar una de ellas o ambas, e inclusive, múltiples variantes de Stx2 ⁽⁸⁻¹¹⁾.

Estas toxinas poseen la estructura de las holotoxinas, que consta de una subunidad A central la cual puede ser escindida proteolíticamente, produciendo un fragmento A1 de 28 kDa, y otro (A2) de 4 kDa, los cuales previo a la ruptura correspondiente permanecen

juntos a través de un puente disulfuro. Además, el péptido A1 es el que posee la actividad enzimática en tanto que, el A2, es responsable de la unión no covalente de la subunidad A al pentámero que integra la subunidad B la cual tiene un peso molecular de 7.500 Da y tiene la función de mediar la fijación de la toxina a las células blanco ⁽¹¹⁾.

La Stx1 es prácticamente idéntica a la toxina producida por *Shigella dysenteriae* tipo I, excepto en algunos casos en los que se aprecia un residuo de aminoácido de diferencia; los prototipos Stx1 y Stx2 manifiestan una homología de secuencia de 55 y 57% en las subunidades A y B respectivamente, mientras Stx1 es altamente conservada, existen variantes o subunidades en Stx2 designadas: Stx2c, Stx2d, Stx2e, Stx2f, etc., ⁽⁸⁻¹¹⁾.

La patogénesis involucra un proceso con múltiples pasos, con complejas interacciones entre la bacteria y el huésped. La etapa más temprana en el proceso de la enfermedad es la ingesta de alimento contaminado con ECVT, que es capaz de resistir la acidez gástrica. Este fenotipo es mediado por *rpoS* que codifica un factor sigma de fase estacionaria que le permite sobrevivir largos períodos (más de dos horas) a pH por debajo de 2.5; una vez que ha atravesado el estómago, ECVT se adhiere mediante el único potencial factor de adherencia de ECVT O157 demostrado, la intimina (ver más adelante) y posiblemente (ya que no se han demostrado los genes) por fimbrias (aunque se ha considerado también el LPS y las proteínas de membrana externa) codificadas cromosómicamente, a las regiones terminales del intestino en donde permanece limitada a la superficie de la mucosa (sin invadir de forma sistémica); esto para evitar su absorción por el flujo peristáltico y así poder colonizar y multiplicarse dentro del colon, desde donde secretan sus poderosas toxinas Shiga. Esta actúa directamente a través de la subunidad B uniéndose a su receptor específico, el glucolípido globotriasilceramida (Gb3), presente en la superficie celular de las células eucariontes y por razones desconocidas, presente en mayor cantidad en tejidos del epitelio renal, a lo cual puede ser atribuida la toxicidad renal de la toxina Shiga ^(3-4, 8-11, 30-31).

Si bien el receptor de la gran mayoría de las Stx es el glucolípido Gb3, el de la Stx2e es el Gb4; en este sentido, la Stx2e se relaciona con el edema en cerdos, más que con diarrea en humanos aunque, ocasionalmente, algunas cepas que expresan esta variante se han aislado a partir de pacientes con HUS o Enfermedad Diarreica. Una vez que la toxina se ha fijado a su receptor, es internalizada y transportada al aparato de Golgi (por un mecanismo de endocitosis) y posteriormente, hasta el retículo endoplásmico rugoso donde la subunidad A es internalizada y clivada en dos partes por una proteasa. El componente A1 luego se une al ribosoma e inactiva catalíticamente la subunidad ribosomal 60S al liberar un residuo específico de adenina en el rRNA 28S bloqueando de esta forma la síntesis proteica. Evidentemente esto conduce a la muerte de las células que poseen el receptor tales como las de epitelio intestinal y endotelio renal. Se han sugerido varias formas en que la toxina puede llegar al torrente sanguíneo y de aquí al riñón: por daño al epitelio intestinal, por mediadores inflamatorios, por espacios entre las células o incluso atravesando el epitelio intestinal intacto. El daño a las células endoteliales conduce al estrechamiento de la luz de los capilares, a esto se le suma el depósito de plaquetas y fibrinas que obstruyen la microvasculatura renal disminuyendo la tasa de filtración glomerular y fragmentando los eritrocitos ^(3-4, 8-11).

Aunque se cree que ambas toxinas Stx1 y 2 causan daño directo a las células glomerulares, cada vez hay más evidencia de que citocinas como las interleucinas y el factor de necrosis tumoral en asociación con LPS bacterianos pueden estar involucrados en el proceso. ^(3-4, 8-11).

Por otro lado, el solo hecho de que las cepas de ECVT produzcan estas toxinas es insuficiente para que el microorganismo cause la enfermedad, ya que se necesitan de otros factores complementarios que están relacionados a la patogenicidad de la bacteria, como los factores dependientes de la isla de patogenicidad denominada LEE (Locus Enterocyte Effacement), el cual es un fragmento cromosomal que codifica varias funciones entre ellas un sistema de secreción tipo III necesario para la secreción de proteínas entre las cuales se

encuentran las codificadas (en el mismo LEE) por los genes *EspA* y *EspB* encargadas de iniciar señales intracelulares ⁽⁸⁻¹⁰⁾.

El gen *eaeA* (se encuentra en el 100% de las ECVT O157 contra un 30% de ECVT no O157) presente en este locus, codifica para la proteína de membrana externa de 94kDa denominada intimina, la cual es una adhesina no fimbrial responsable de establecer un estrecho contacto o adherencia íntima y profunda de las bacterias a la membrana plasmática de las células intestinales y la desorganización de las microvellosidades. La región LEE codifica además la proteína Tir (receptor translocado de la intimina), que actúa como un receptor para la intimina ⁽⁸⁻¹⁰⁾.

El patrón histopatológico característico de las bacterias que contienen LEE es una hemorragia y edema en la lámina propia de las porciones ascendente y transversa del intestino grueso con infiltración de polimorfonucleares, provocada por cambios ultraestructurales incluyendo pérdida de microvellosidades de los enterocitos, la bacteria aparece íntimamente adherida a la célula sobre un pedestal o basamento que incluye actina polimerizada, a-actinina, talina, ezrina y cadenas ligeras de miosina con una alteración dramática del citoesqueleto de los mismo que resultan en la formación de pedestales reconocibles al microscopio electrónico fenómeno conocido de "pegado y raspado" ("attaching and effacing" A/E) ^(3, 8-11).

ECVT tiene además otros factores de virulencia poco comprendidos como el plásmido 60-MDa o pO157 el cual es un plásmido altamente conservado de aproximadamente 90 KDa que está presente en todas las ECVT O157 y en general en la mayoría de las ECVT aisladas de humanos. A este se le ha atribuido la presencia de genes que codifican fimbrias de adhesión intestinal, enzima catalasa-peroxidasa (*katP*), serina proteasa (*EspP*) y enterohemolisina (*ehxA*), no obstante su rol en la patogénesis es poco claro y ha sido conflictivo ^(3, 8-11).

Asimismo ECVT O157 cuenta con un gen llamado *chuA*, el cual codifica una proteína de membrana externa de 69 kDa lo cual se conoce como el sistema especializado de transporte

de hierro de esta bacteria en particular. Este sistema le permite utilizar el grupo hemo o la hemoglobina (obtenida principalmente de la lisis de eritrocitos) como fuente de hierro que estimule el crecimiento de dicha bacteria ^(3, 8-11).

Por último esta bacteria al igual que otras bacterias Gramnegativas contiene el Lipopolisacárido bacteriano (LPS), el cual consiste en una estructura de polímeros complejos con restos de ácidos grasos como parte lipófila y cadenas características de oligosacáridos y polisacáridos, que forman la parte mayoritaria de la membrana externa de bacterias Gramnegativas. En su conjunto, forman una capa protectora hidrófila en torno a la célula bacteriana que no puede ser atravesada por moléculas lipófilas.

El LPS bacteriano consta de 3 partes:

- a) El lípido A formado por un disacárido compuesto por dos unidades de N-acetilglucosamina unidas por enlace β a los carbonos 1 y 6, al que se le unen ácidos grasos mediante enlace éster; los ácidos grasos que se encuentran asociados comúnmente en el lípido A son el ácido caproico, ácido láurico, ácido mirístico, ácido palmítico y ácido esteárico.
- b) La región del Núcleo o Core, formado por una serie de monosacáridos de seis carbonos (hexosas) como la glucosa, ramnosa y galactosa, entre otros, y también formado por monosacáridos poco usuales como los didexosiazúcares, entre los que destacan la abecuesa, clitosa, paratosa o tivelosa.
- c) El antígeno somático O, el cual es una serie de cadenas específicas unidas al núcleo consisten en una secuencia repetida de unidades de trisacárido o pentasacárido lineal, o bien pueden ser polímeros de oligosacáridos ramificados de cuatro a seis azúcares.

Este último se encuentra codificado en el gen *rfbO157* para ECVT O157, y su importancia radica en que es el responsable de la clasificación de serogrupos de *E. coli*.

4.4 Tratamiento

La mayoría de las personas que se ven afectadas por esta bacteria se recuperan sin antibióticos u otro tratamiento específico en el lapso de 5 a 10 días. Los antibióticos son polémicos y normalmente se evitan ya que no existen evidencias de que mejoren el curso de la enfermedad ni que logren reducir síntomas, prevenir complicaciones o disminuir las evacuaciones; al contrario se piensa que el tratamiento con algunos de ellos puede aumentar el riesgo de desarrollar SUH. Los antidiarréicos como la Loperamida (Imodium) también deben evitarse. El tratamiento de Colitis Hemorrágica puede incluir fluidos y una dieta blanda mientras que el Síndrome Urémico Hemolítico usualmente se trata en una unidad de cuidados intensivos. La evolución del mismo depende de la magnitud del daño microvascular sistémico. La mayoría de los casos de SUH requieren hospitalización en una unidad de cuidados intensivos en la fase aguda, para el control de los parámetros bioquímicos y hematológicos, ya que el tratamiento es fundamentalmente de soporte. A menudo requiere transfusiones de sangre y diálisis, los pacientes que desarrollan falla renal irreversible pueden necesitar un trasplante del riñón. El 91 % de los niños con PTT causada por SUH sobreviven con cuidados médicos de apoyo, sin necesidad de tratamiento con plasma ^(12-13,16-17,32-33,46-47).

4.5 Diagnóstico de Infecciones por ECVT

Los métodos actualmente disponibles utilizados para detectar este patógeno en muestras clínicas son ⁽²²⁻²³⁾:

4.5.1 Métodos Presuntivos:

a) Aislamiento de ECVT en deposiciones utilizando el medio de cultivo selectivo MacConkey

En dicho medio las colonias son lactosa positiva 2-4mm, convexas con bordes regulares y una depresión umbilical en el centro de la colonia se observan de color rosado intenso

rodeadas de un halo de color rosado menos intenso formado por la precipitación de las sales biliares.

b) Pruebas Bioquímicas

A partir del aislamiento en este medio el siguiente paso sería las pruebas bioquímicas correspondientes las cuales darán las siguientes reacciones características de las cepas de *Escherichia coli* en general ^(22-23, 48-49):

Tabla No. 1 Principales Características Bioquímicas de *Escherichia coli*:

PRUEBA	TSI	LIA	M O V I L I D A D	I N D O L	O R N I T I N A	U R E A	C I T R A T O	M A L O N A T O
REACCION	A/AG	K/Kg	+	+	+	-	-	-

c) Aislamiento de ECVT en deposiciones utilizando el medio de cultivo selectivo MacConkey Sorbitol (SMAC)

Este medio permite diferenciar cepas de *E. coli* fermentadoras de sorbitol de las no fermentadoras. La *E. coli* fermenta el sorbitol en menos de 24 horas a excepción del serogrupo O157 que no lo hace, por lo cual este análisis bioquímico presuntivo es recomendado para aislar específicamente ECVT O157. En la placa de SMAC las ECVT O157 desarrollan colonias pequeñas, incoloras y translúcidas. ^(22-23, 50)

En la sensibilidad del cultivo influye el período de la infección, cuando la muestra de heces es tomada dentro de los dos primeros días del comienzo de la diarrea, la recuperación del

agente es del 100%, disminuye a 91.7% dentro de los 3 a 6 días y a 33% después de los 6 días. Cuando el SUH se manifiesta, la ECVT O157 se encuentra presente sólo en el 30 a 50 % de los casos. ^(22-23, 50)

d) Serotipificación de los aislados

La caracterización de ECVT O157:H7 se basa en la comprobación de antígeno somático O157 del LPS bacteriano de la pared celular, el cual se encuentra codificado en el gen *rfbO157* y también del antígeno flagelar H7. Esto es llevado a cabo siguiendo 3 pasos ^(22-23,51).

1. Verificación de las características lisas de la UFCs: se comprueba que la cepa no es autoaglutinable en solución salina sobre una lámina de lo contrario posiblemente sea una cepa rugosa no apta para la caracterización serológica.
2. Serotipificación polivalente somática: se observa la formación de grumos homogéneos en menos de 1 minuto al someter un pequeño inóculo de cepa fresca a una gota del antisuero O157.
3. Caracterización del antígeno flagelar H: este paso tiene como requisito previo la siembra de la cepa en estudio en el medio Craigy para luego tomar una colonia de este medio y realizar la aglutinación en lámina con el antisuero H7 observándose para ECVT O157:H7 una aglutinación en grumos finos.

4.5.2 Métodos confirmatorios:

Estos incluyen una gran diversidad de técnicas orientadas a identificar los genes de virulencia descritos para ECVT O157 entre los cuales se mencionan ^(23, 34, 52):

- a) Hibridación con sondas genéticas para el gen *hly*, sonda para *stx1* y *stx2* y sonda *eaeA*.
- b) Detección de genes *vt1*, *vt2*, *hly* y *eaeA* por PCR.
- c) Ensayo de citotoxicidad en cultivo de tejidos utilizando las líneas celulares Vero y HeLa.
- d) Técnica inmunoenzimática (ELISA/EIA) para detección de cepas de *E. coli* que están expresando la producción de las citotoxinas, usando anticuerpos específicos y un sistema de detección.

4.6 PCR Convencional (Reacción en Cadena de la Polimerasa)

En 1986, Kary B. Mullis, junto a un equipo de científicos investigadores de la Corporación Cetus, inventó un método para lograr la multiplicación *in vitro* de fragmentos definidos de ADN. Se trata de la Reacción en Cadena de la Polimerasa, ya muy conocida como PCR, siglas provenientes del inglés Polymerase Chain Reaction. Gracias a su trabajo de PCR se le otorgó el Premio Nobel en química en 1993. En los últimos años este método se ha convertido en la herramienta diagnóstica más popular en microbiología debido a su especificidad, sensibilidad, rapidez, detección y selectividad ⁽²⁶⁻²⁹⁾.

La PCR tiene como objetivo obtener un gran número de copias de un fragmento de ADN particular, partiendo de un mínimo, es decir amplifica un fragmento de ADN. Esta amplificación se produce de forma exponencial, lo cual nos permite a partir de una sola molécula obtener más de un millón de moléculas, luego de 30 ciclos de termociclado. Su utilidad es que, tras la amplificación, resulta mucho más fácil identificar con una muy alta probabilidad virus o bacterias causantes de una enfermedad, identificar personas (cadáveres) o hacer investigación científica sobre el ADN amplificado. Estos usos derivados de la amplificación han hecho que se convierta en una técnica muy extendida ⁽²⁶⁻²⁹⁾.

4.6.1 En su forma más básica, cada ciclo de PCR consta de tres pasos ⁽²⁶⁻²⁹⁾:

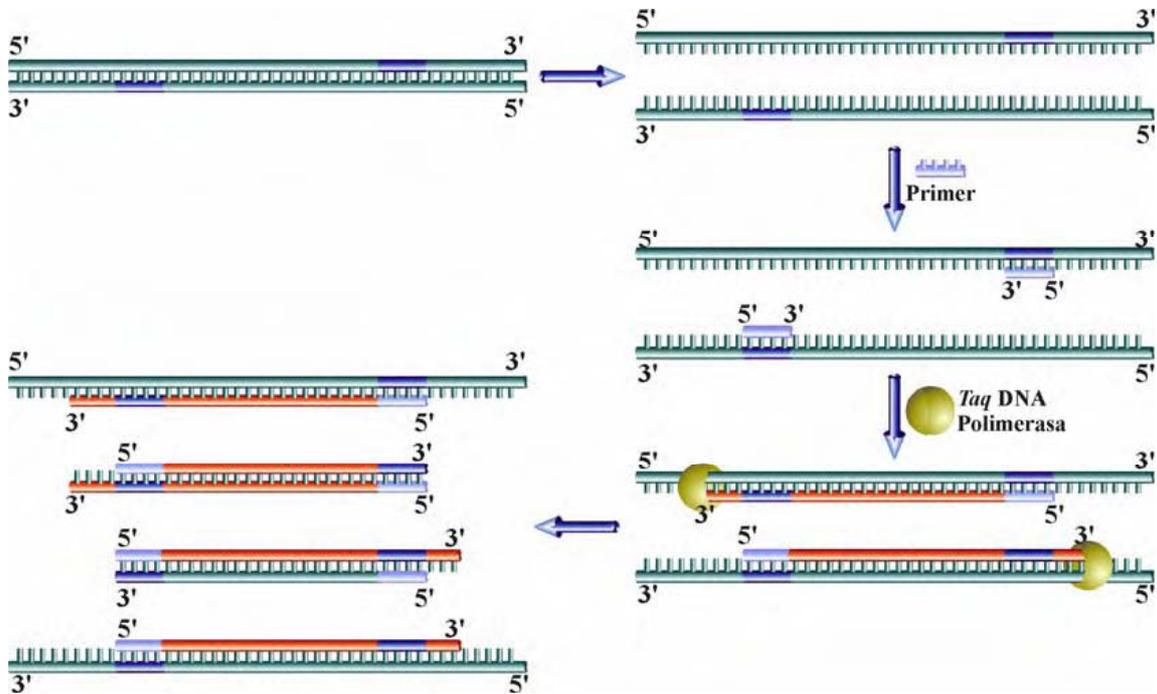
- a) Etapa de Desnaturalización:** En ella, el ADN diana se incuba a elevada temperatura ($\pm 94^{\circ}\text{C}$) de tal manera que las hebras se separan quedando accesibles a la hibridación de los cebadores.

- b) Etapa de Hibridación:** En ella, la mezcla de reacción se enfría ($\pm 55 - 65^{\circ}\text{C}$) para permitir que los cebadores hibridicen en dirección 5' - 3' (los extremos 3' de ambos cebadores quedan enfrentados) con la secuencia complementaria.

- c) Etapa de Extensión:** Se suele realizar a $\pm 72^{\circ}\text{C}$ y en ella los cebadores se extienden a partir del extremo 3' (es decir en dirección 5' - 3') mediante una ADN polimerasa, utilizando el ADN diana como molde, realizándose entre 30 y 40 ciclos en cada PCR.

El resultado neto después del primer ciclo de amplificación es dos copias "degeneradas" (de diferente longitud) del ADN original. El proceso se repite un número determinado de veces (ejemplo: 30 ó 35), consiguiendo un aumento o amplificación exponencial de copias del fragmento de ADN molde ⁽²⁶⁻²⁹⁾.

Figura No. 1 Representación esquemática del proceso de la PCR.



4.6.2 Optimización de la Técnica del PCR

La optimización de un PCR radica en el ajuste de una serie de parámetros que incluyen el diseño de los cebadores, las condiciones de amplificación (Temperaturas y Tiempos de Desnaturalización, Hibridación de cebadores y Extensión y el Número de Ciclos) junto a las concentraciones de los componentes de la reacción (ADN, Taq Polimerasa, $MgCl_2$, dNTPs, Cebadores, y posibles Aditivos) entre otras cosas con el fin de obtener patrones nítidos y reproducibles de los productos de la PCR. De lo contrario se presentara algunos problemas que incluyen: ningún producto detectable o un bajo rendimiento del producto deseado, la presencia de bandas de un segundo plano no específica debido a mala hibridación o mala extensión de los cebadores, la formación de "Dímeros de Cebadores" que compiten para la amplificación con el producto deseado, y las mutaciones o heterogeneidad, debido a mala incorporación. Dado que no existe un protocolo apropiado

para todas las situaciones, cada aplicación de PCR nuevo requiere de su optimización. (26,-29,53-59).

4.6.2.1 Diseño de Cebadores

La elección de los cebadores es un elemento crítico y hay que tener en cuenta muchas consideraciones para diseñarlos (27-29, 54-56, 59-61):

- a) **Longitud del Cebador:** Los cebadores usados para la reacción de amplificación varían entre 15 y 30pb; los cebadores más cortos pueden no proporcionar la adecuada especificidad y los más largos no incrementan la especificidad y son más caros de sintetizar.
- b) **Secuencia:** La composición de nucleótidos de los cebadores utilizados en el protocolo de amplificación determina directamente la temperatura de hibridación. Para ello hay que tener en consideración algunos puntos importantes:
 1. El contenido en G + C debe aproximarse o superar ligeramente al contenido de G+C de la diana (aprox. del 50% del contenido), ya que los cebadores deficientes en G+C que flanquean dianas ricas en G+C pueden no competir efectivamente por la unión, lo que origina una baja eficiencia de amplificación.
 2. La relación máxima de purinas/pirimidinas será 60-40%.
 3. Deben evitarse las repeticiones largas (más de tres) del mismo nucleótido, ya que pueden disminuir la especificidad de la diana.
 4. Deben evitarse las repeticiones largas de dos nucleótidos (ej: ATATATAT).
 5. Hay que tener en consideración muy especialmente el extremo 3' de los cebadores, ya que es el extremo que reconocen las polimerasas. Una elevada proporción de residuos G+C en el extremo 3' puede originar una baja especificidad por la diana debido a la tendencia de estas regiones a proporcionar uniones muy estables con secuencias inespecíficas (no pertenecientes a la diana). También se ha demostrado en la literatura que los cebadores que terminan en un residuo de T3' son más tolerantes a la incorporación de errores que otros nucleótidos. De igual manera debe

evitarse el auto-hibridación (formación de horquillas o lazos) así como la formación de Dímeros de Cebadores ya que esto reduce la concentración efectiva de los cebadores al producirse una competencia entre la unión de los cebadores entre sí y a la diana a concentración efectiva del mismo.

4.6.2.2 Concentración de Cebadores

Entre 0.1- 0.5 μM generalmente son óptimas. Si la concentración de cebadores es baja puede ocasionar un pobre rendimiento de la reacción. Si es demasiado alta puede ocasionar una disminución de la especificidad al promover mal ordenamiento que se manifiesta por un incremento en los productos de amplificación inespecíficos; además, puede favorecer la formación de dímeros de cebadores ^(28, 30, 53-59).

4.6.2.3 Desoxinucleótidos Trifosfatos (dNTPs)

De forma general, la concentración de dNTPs varía entre 20 y 200 μM , teniendo en cuenta que concentraciones demasiado elevadas pueden originar una menor especificidad y concentraciones demasiado bajas pueden provocar un bajo rendimiento de los productos de amplificación. Tanto la especificidad y la fidelidad de la PCR se incrementan mediante el uso de concentraciones más bajas dNTPs. Las concentraciones bajas de dNTPs minimizan la mala hibridación en sitios que no son objetivos reduciendo la probabilidad de extender nucleótidos mal incorporados. Los cuatro dNTPs se deben utilizar en concentraciones equivalentes para minimizar los errores de mala incorporación. La concentración óptima de dNTPs debe determinarse empíricamente y conjuntamente con la concentración de Mg^{2+} . Los dNTPs pueden captar Mg^{2+} , por lo que las concentraciones de ambos componentes deben guardar siempre la misma relación. No debemos variar ninguno de ellos de manera independiente. Se aconseja que la concentración de Mg^{2+} sea 0.5-1.0 mM superior a la concentración de dNTPs ^(27,29, 53-58).

4.6.2.4 Concentración de la Enzima

Las concentraciones de las polimerasas utilizadas en la PCR varían significativamente, pero para la Taq polimerasa varía entre 1.0 y 2.5U por cada 25 μ L de reacción. Cuando la concentración de enzima es muy elevada se produce la unión inespecífica de los cebadores y cuando es demasiado baja se obtiene una baja eficiencia de amplificación^(27,29, 54-58).

4.6.2.5 Muestra de ADN

Existen dos aspectos muy importantes para que el DNA molde no sea un problema en la reacción^(27,29, 54-58):

- a) **Calidad del ADN:** debe tener integridad, es decir no puede estar fragmentado en trozos más pequeños de lo que queremos amplificar, por otro lado la muestra no debe llevar agentes quelantes (como el EDTA) que reducen la concentración de iones de Mg²⁺ en la disolución. Tampoco debe haber determinados factores sanguíneos, fenol, detergentes etc. que inhibirían la actividad de la polimerasa.
- b) **Cantidad de la Muestra:** si se dispone de suficiente cantidad para la amplificación de ADN genómico se usan cantidades de 100-500 ng. En el caso de zonas repetidas se puede reducir esta cantidad a 10-50 ng. El mínimo oscila entre 10-100 ng. y el máximo entre 400-500 ng.

4.6.2.6 Tampón de la Reacción

Los nucleótidos se diluyen en el agua, la solución debe ser amortiguada de lo contrario, un pH ácido promoverá la hidrólisis de dNTPs en dNDPs y dNMPs, los cuales darían rendimientos inútiles para la PCR. Por lo general está formado por: 10 mM de tris-HCl (pH=8.4- 9.0 a T^a ambiente), Tris es un tampón dipolar iónico de un pKa de 8,3 a 20 ° C, y

un pKa de -0,021 / ° C. Por lo tanto, el pH real de Tris 20 mM (pH 8,3) a 20 ° C varía entre 7,8 y 6,8 en las condiciones típicas de termociclado ^(27,29, 53-58).

4.6.2.7 Sales

Es de gran importancia la concentración de dos cationes que son añadidos en forma de sales ya sea incluido en el tampón o por separado ^(27,29, 53-58).

- a) **Cloruro de Magnesio (MgCl₂):** El aumento de la concentración de Mg²⁺ tiene el efecto neto de disminuir la severidad de la unión de los cebadores y por lo tanto, una baja especificidad de la reacción; las bajas concentraciones de Mg²⁺ pueden originar una pobre eficiencia de la reacción. La concentración de Mg²⁺ debe calcularse como función de la concentración de nucleótidos; para la mayoría de protocolos 1.5 mM MgCl₂ es una concentración óptima, sin embargo debe probarse un rango de concentración de Mg²⁺ entre 0.5 y 3.0mM por encima de la concentración de nucleótidos.

- b) **Cloruro Potásico (KCl):** Influye en la desnaturalización del ADN. Elevadas concentraciones del ión K⁺ favorece la desnaturalización de secuencias cortas de ADN. Bajas concentraciones de K⁺ ayudan a la desnaturalización de secuencias largas de ADN. Hasta 50 mM de KCl puede ser incluido en la mezcla de reacción para facilitar la hibridación del cebador.

4.6.2.8 Otros Componentes

Algunos autores recomiendan el uso de adyuvantes, los cuales ayudarían en la práctica a aumentar la especificidad y fidelidad de la Reacción en Cadena de la Polimerasa. El dimetilsulfóxido (DMSO) añadido al buffer de la reacción en un 10% contribuye a la disminución de la estructura secundaria del ADN. También se pueden usar detergentes no iónicos como el tween 20, laureth 12 (0.1%) o Tritón 10X, que ayudan a estabilizar la enzima. Existen también protocolos que incorporan polietilenglicol (PEG), glicerol,

formamida, seroalbúmina bovina (BSA) etc., aunque no son en ningún caso imprescindibles^(27,29, 53, 55-57).

4.6.2.9 Temperaturas y Tiempos de los Ciclos

El tiempo, la temperatura y el número de ciclos son factores determinantes en los resultados de la PCR, por lo tanto modificándolos podemos optimizar la reacción.

a) **Desnaturalización.**

Se trata de una etapa crítica y es quizás la causa más probable del fracaso de la técnica del PCR por la desnaturalización incompleta del ADN blanco o de los productos de PCR lo cual reduce el rendimiento de la reacción ya que es muy importante que el ADN molde se desnaturalice completamente, para lograrlo de manera adecuada se recomiendan temperaturas de 94°C durante 30 segundos a 1 minuto, 95°C por 30 segundos, o si la muestra tiene alto contenido de G+C se puede aumentar el tiempo o la temperatura a 97°C por 15 segundos. Sin embargo los pasos de desnaturalización que son demasiado altos y/o por mucho tiempo llevan a la pérdida innecesaria de la actividad enzimática (La vida media de la actividad de Taq DNA polimerasa es más de 2 horas, 40 minutos y 5 minutos a 92,5, 95, y 97,5 ° C, respectivamente). Por lo cual a estas temperaturas o superiores es aconsejable disminuir el tiempo de incubación. En la práctica se suele añadir un período de desnaturalización antes de comenzar los ciclos para asegurarnos que se produce a lo largo de toda la muestra de ADN. Esta etapa suele ser de 5 minutos a 94°C.^(27-30, 54-58, 61)

b) **Temperatura de Fusión del Cebador.**

Se define la temperatura de fusión (T_m) de un cebador unido a su ácido nucleico diana como la temperatura a la cual el 50% de los cebadores están unidos y el 50% están en solución. La T_m es dependiente de la concentración de los cebadores, la composición de la secuencia y de la composición del solvente. Los cebadores pequeños tienen una T_m inferior que los grandes aun teniendo la misma composición; sin embargo, cuando el tamaño de los cebadores se aproxima a las 20-

25pb el efecto de la longitud sobre la T_m disminuye, por lo que en los cebadores normalmente utilizados en la amplificación, el principal efecto sobre la T_m viene dado por la composición del cebador. Los valores de T_m calculados para los cebadores usados en la amplificación deberían ser lo más próximos posible, para evitar la "unión asimétrica" de los mismos, es decir, que una de los cebadores se una a su secuencia diana con mayor afinidad que el otro bajo las mismas condiciones de hibridación. ^(27,29, 54-58, 61)

Existen en la literatura numerosas fórmulas para el cálculo de la T_m ^(27,29, 54-58, 61-63). Un método para calcularla se basa en la Teoría Termodinámica:

$$T_m (\text{oK}) = [\Delta H / \Delta S + R \ln (C)], \text{ o } T_m (\text{oC}) = [\Delta H / \Delta S + R \ln (C)] - 273.15 \text{ donde:}$$

ΔH (Kcal/mole): es la variación de la Entalpia, (la cantidad de energía caliente que poseen las sustancias). Es obtenida por la adición de todos los pares de nucleótidos.

ΔS : es la variación en la Entropía (la parte de la energía que no puede utilizarse para producir trabajo). También es obtenida por la adición de todos los pares de nucleótidos. Una sal se añade como corrección adicional (1M Na + buffer), de la siguiente manera:

$$\Delta S (\text{corregida}): \Delta S (1M NaCl) + 0.368 \times N \times \ln([Na+]) \text{ donde:}$$

N: es el número de pares de nucleótidos en el Primer.

[Na+]: es la sal equivalente en mM.

[Na+]: concentración del ion monovalente +4 x Mg^{2+} Libre.

Si el cebador es menor o igual a 20 pb, la temperatura de fusión (T_m), se calcula en base a la siguiente fórmula:

$$T_m = 4 (G+C) + 2(A+T)$$

c) Temperatura de Hibridación:

La temperatura de hibridación es uno de los parámetros más importantes que es necesario ajustar en la reacción de PCR. Es la temperatura a la cual se logra una estabilidad entre ADN-ADN Híbrido. La temperatura y tiempo requerido para la hibridación de los cebadores dependerá de 3 factores relacionados con los cebadores: la composición, el tamaño y la concentración de las bases nitrogenadas. Un aumento de temperatura o del tiempo favorece la especificidad ya que disminuye las uniones incorrectas de los cebadores con la hebra molde. No obstante si esta temperatura es demasiado alta produce una hibridación insuficiente, resultando en una PCR de bajo rendimiento. Además como la polimerasa tiene una reducción en su actividad entre 45 y 65°C (intervalo más elegido para la temperatura de hibridación), tiempos excesivamente largos de hibridación (más de 3 minutos) pueden incrementar la posibilidad de obtener productos de amplificación inespecíficos. Bajas temperaturas de hibridación da como resultado una baja especificidad al provocar la amplificación de productos inespecíficos (Debido a que la DNA polimerasa Taq es activa en un amplio rango de temperaturas, la extensión del cebador se producirá a temperaturas bajas, incluyendo el paso de hibridación) que se observan en los geles como bandas de pesos moleculares superiores o inferiores a los esperados ^(27,29, 54-58, 61-63).

La T^a de hibridación de los cebadores ha de ser similar en ambos y se puede calcular con diferentes fórmulas, como la siguiente:

$$T_a = 0.3 \times T_m (\text{cebador}) + 0.7 \times T_m (\text{Producto}) - 14.9 \text{ Donde:}$$

T_m (Cebador) = Temperatura de Fusión de los cebadores.

T_m (Producto) = Temperatura de Fusión del Producto.

La temperatura óptima de Hibridación para un determinado protocolo a menudo es diferente a las predichas por las fórmulas matemáticas. No obstante el método más fácil consiste en calcular la T_m y luego experimentar unos pocos grados debajo de esta. En

general suele suceder que la temperatura de hibridación óptima es entre 5-7 °C por debajo de la T_m . En la práctica, la temperatura de hibridación puede oscilar entre 45°C y 65°C, durante un tiempo comprendido entre 30 segundos y 1 minuto ^(27,29, 54-58, 61-63).

d) Elongación:

El tiempo de extensión depende de la longitud y concentración de la secuencia a amplificar. En la mayoría de las reacciones, la etapa de extensión se realiza a 72°C durante 1 minuto. Teóricamente esta temperatura puede variar entre 70-72°C. En la práctica es normal que al final de todos los ciclos se realice una última elongación de 5 minutos a 72°C ^(27, 29, 54-58, 61-63).

4.6.2.10 Número de Ciclos

También adquiere gran relevancia a la hora de optimizar una PCR el número de ciclos que se utilizan. Este número depende de la cantidad de ADN que existe en la muestra una vez que el resto de factores han sido optimizados. Es importante no realizar un número alto de ciclos ya que la tasa de error (productos no deseados originados por hibridaciones no específicas) es proporcional al número de estos ^(27,29, 54-58).

Hay que tener en cuenta que la reacción está producida por una enzima que sufre el efecto meseta que describe la atenuación en la tasa de la acumulación del producto. Después de un número determinado de ciclos la amplificación deja de producirse de manera exponencial y llega a una fase estacionaria. Generalmente cuando el efecto meseta se produce, la cantidad de ADN sintetizado es suficiente para su posterior utilización. Por supuesto, muy pocos ciclos dan como resultado productos de bajo rendimiento. Normalmente el número de ciclos utilizado es de 25-35 ^(54, 56, 58).

4.6.2.11 Precauciones para evitar la Contaminación en la PCR

La Reacción en Cadena de la Polimerasa es una técnica muy sensible, por lo que es de gran importancia evitar contaminaciones, ya que es posible que el ADN no deseado (aunque se encuentre en una cantidad muy pequeña) se amplifique y obtengamos un resultado que no es real. Vemos entonces que una de las mayores ventajas de la técnica, se convierte a la vez en el principal inconveniente ^(54, 56, 58).

Existen una serie de normas que ayudan a evitar las contaminaciones ^(54, 56, 58):

- a)** Lugar físico exclusivo para realizar la PCR.
- b)** Uso de instrumental exclusivo para la PCR.
- c)** Utilización de reactivos y tubos estériles.
- d)** Uso de guantes por el manipulador.
- e)** Realización de controles de blanco (se añade agua en lugar de ADN, no debe existir amplificación).

5. Diseño Metodológico

5.1 Tipo de Estudio: Experimental Optimización de Método Molecular.

5.2 Área de Estudio: El presente estudio se llevó a cabo en el Departamento de Microbiología de la Facultad de Ciencias Médicas, UNAN-León.

5.3 Población de Estudio: Cepas de *Escherichia coli* diarreagénicas y no diarreagénicas.

5.4 Muestra: Se emplearon para el análisis tres cepas de referencia ATCC de *Escherichia coli* enterohemorrágica (ATCC 933, 43889 y 43890), una *Escherichia coli* enterotoxigénica (ATCC 35401), una *Escherichia coli* enteroagregativa 97R (Referencia local), una *Escherichia coli* sin factores de virulencia (ATCC 11775), 40 aislados clínicos de *Escherichia coli* de terneros y 21 aislados clínicos de *Escherichia coli* de niños con diarrea de la ciudad de León.

Tabla No. 2 Cepas de Referencia.

Genes objetivos	Tamaño (pb)	Tipo	Cepa de Referencia	Serotipos
-	-	ECET	ATCC 35401	O78:H11
-	-	ECEA	97R	-
-	-	E. coli	ATCC 11775	O1:K1:H7
<i>vt1</i>	130	ECVT	ATCC 43890/933	O157:H7
<i>vt2</i>	298	ECVT	ATCC 43889/933	O157:H7
<i>eaeA</i>	376	ECVT	ATCC 43890/43889/933	O157:H7
<i>rfbO157</i>	339	ECVT	ATCC 43890/43889/933	O157:H7

5.5 PCR Múltiplex para *E. coli* productora de Verocitotoxinas O157

Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

5.5.1 Extracción de ADN Total: La extracción del ADN de las cepas de *E. coli* se realizó empleando el método básico de extracción de ADN total en crudo, en el cual las cepas se sembraron en platos de Agar Macconkey-Sorbitol durante 18-24h a 37°C. Posterior, se tomó una azada para hacer una suspensión en PBS 1X a una densidad MacFarland 4 ($\sim 12 \times 10^8$ UFC/ml). Luego se hirvió por 20 min, centrifugándose por 5 min a 2,500 x g y se conservó el sobrenadante a -20°C hasta el día de su uso.

5.5.2 Concentración de dNTPs, Sales, Tampón y Polimerasa: las concentraciones de estos reactivos no fueron modificadas puesto que se utilizó PureTaq Ready-To-Go PCR Beads (GE Healthcare UK), la cual contiene Tris/HCl (pH=9) a 10mM, KCl a 50 mM, MgCl₂ a 1.5 mM, dNTPs a 200µM cada uno, DNA Polimerasa 2.5U. Estas beads fueron resuspendidas hasta un volumen final de 25µl agregándoseles 15 µL agua libre de nucleasas, 8 µL totales de los cebadores y 2µL del extracto de ADN.

5.5.3 Optimización de la Concentración de Cebadores y la Temperatura de Hibridación: se utilizaron los cebadores descritos en la tabla No.3 y se realizó el ensayo propuesto en la tabla No.4 con el programa de termociclado de la fig. No 2 para el cebador *rfb*O157 tomando en cuenta que la Temperatura de Hibridación óptima experimental según la literatura suele estar entre 5-7°C por debajo de la T_m, la cual fue calculada, para el par de cebadores O157.

Posteriormente se procedió a la mezcla de cebadores para la optimización del Multiplex basándose en el estudio de *Vilchez y col.* en el cual los cebadores *vt1*, *vt2* y *eaeA* mostraron una Temperatura de Hibridación óptima experimental de 58 °C ⁽²²⁾.

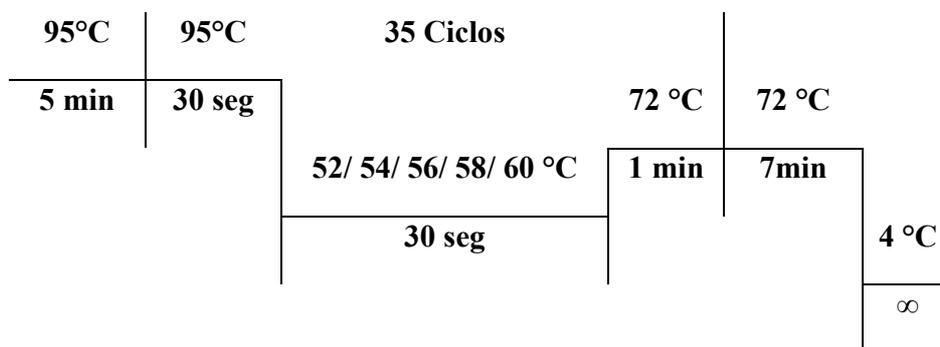
Tabla No. 3 Secuencia de cebadores utilizados.

Cebadores	Secuencia (5' → 3')	Estudios
<i>vt1</i>	GAA GAG TCC GTG GGA TTA CG AGC GAT GCA GCT ATT AAT AA	<i>Vilchez y col., 2009</i>
<i>vt2</i>	ACC GTT TTT CAG ATT TT ^G _A CAC ATA TAC ACA GGA GCA GTT TCA GAC AGT	<i>Vilchez y col., 2009</i>
<i>caeA</i>	CAC ACG AAT AAA CTG ACT AAA ATG AAA AAC GCT GAC CCG CAC CTA AAT	<i>Vilchez y col., 2009</i>
<i>rfbO157</i>	AGC CGA TGT TCG ATG CAA TT CAT GAT TCC AAG CCT TGT GC	<i>Tzu- Ming Pan y col., 2002</i>

Tabla No. 4 Ensayo para la Optimización de la Concentración y Temperatura de Hibridación de los cebadores O157.

[Cebadores]	Temperatura de Hibridación				
	52°C	54°C	56°C	58°C	60°C
0.2 μM	√	√	√	√	√
0.3 μM	√	√	√	√	√

Figura No. 2 Condiciones de amplificación para lo cual se empleó un termociclador de la compañía Applied Biosystems modelo 2770.



5.6 Electroforesis en Gel de Agarosa: Los productos de PCR (10 μ l) fueron evaluados en gel de Agarosa (UltraPure Agarosa; Invitrogen Life Technologies) teñido con Bromuro de Etidio haciendo una corrida de 1h:10 min a 100V usando un Marcador Molecular (TrackIt 100bp DNA Ladder; Invitrogen Life Technologies). Luego las bandas de ADN fueron visualizadas usando luz UV y fotografiadas.

5.7 Estimación del Límite de Detección: Se preparó una suspensión de 1 asada de bacterias de la Cepa de Referencia ATCC 933 en 3ml de PBS la cual se igualó a una solución MacFarland 4 (12x10⁸ UFC/ml) comparando las densidades ópticas en un espectrofotómetro. Una vez igualada se procedió a realizar la siguiente serie de diluciones:

1. 12x10⁸ UFC/mL
2. 12x 10⁷ UFC/mL
3. 12x 10⁶ UFC/mL
4. 12x 10⁵ UFC/mL
5. 12x 10⁴ UFC/mL
6. 12x 10³ UFC/mL
7. 12x 10² UFC/mL
8. 12x 10¹ UFC/mL
9. 12x 10⁰ UFC/mL
10. 0 UFC/mL

Posteriormente, a todas las diluciones se les extrajo el ADN y se ensayó utilizando las condiciones experimentales del PCR múltiplex determinadas en los ensayos anteriores.

5.8 Ensayo con Muestras Clínicas del PCR Múltiplex Optimizado: Se analizaron un total de 61 aislados clínicos de *E. coli*, de terneros y de niños con diarrea (Obtenidas de un proyecto de vigilancia de diarrea infantil en León, previamente aprobado por el comité de ética). Estas bacterias fueron aisladas utilizando el medio selectivo y diferencial para *E. coli* O157 cefixima telurato sorbitol MacConkey (CT-SMAC) ⁽⁵⁹⁾.

Tabla No. 5 Operacionalización de Variables.

Variable	Definición	Indicador	Valor
Temperatura de Hibridación	Es la temperatura a la cual los cebadores se adhieren a sus secuencias diana a amplificar	Grados Celcius	52 °C 54 °C 56 °C 58 °C 60 °C
Concentración de Cebadores	Es la relación molar entre los Cebadores disueltos y su disolvente	Molaridad	0.2 μM 0.3 μM 0.4 μM
Limite de Detección	Cantidad mínima detectada por el método diagnóstico	UFC/ ml	12x10 ⁸ UFC/mL 12x 10 ⁷ UFC/mL 12x 10 ⁶ UFC/mL 12x 10 ⁵ UFC/mL 12x 10 ⁴ UFC/mL 12x 10 ³ UFC/mL 12x 10 ² UFC/mL 12x 10 ¹ UFC/mL 12x 10 ⁰ UFC/mL 0 UFC/mL

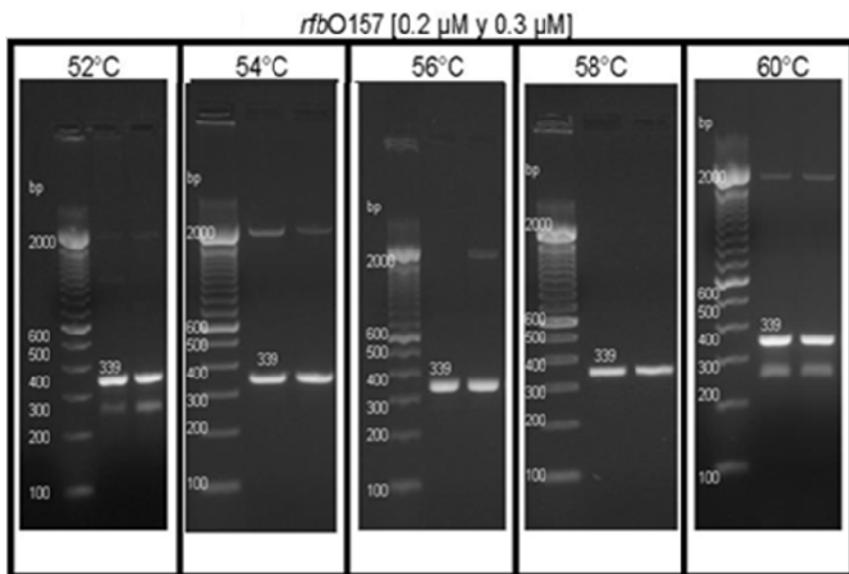
6. Resultados

En Nicaragua, las *E. coli* diarreagénicas han sido investigadas y asociadas a la enfermedad diarreica aguda por diferentes investigadores ^(21, 64-65), no obstante no se ha profundizado en la determinación específica de ECVT y sus serogrupos, principalmente el O157. A pesar de que en el país, se cuenta con un manual de diagnóstico bacteriológico de referencia, en el cual se incluye la detección de *E. coli* O157 ⁽²²⁾ no existen datos oficiales sobre la circulación de esta bacteria. Probablemente esto se debe a que la metodología empleada en dicho manual es costosa, laboriosa y requiere de personal técnico altamente calificado. En este estudio se realizaron una serie de experimentos en aras de optimizar un método molecular para la detección de *E. coli* O157 utilizando la técnica de PCR, en principio menos laborioso y más barato en costos, los cuales condujeron a los siguientes hallazgos:

6.1 Temperatura de Hibridación y Concentración de los Cebadores.

Con el fin de determinar la Temperatura de Hibridación y la Concentración experimental óptima de los Cebadores para el gen *rfbO157* se realizaron los experimentos, cuyos hallazgos se resumen en la siguiente figura.

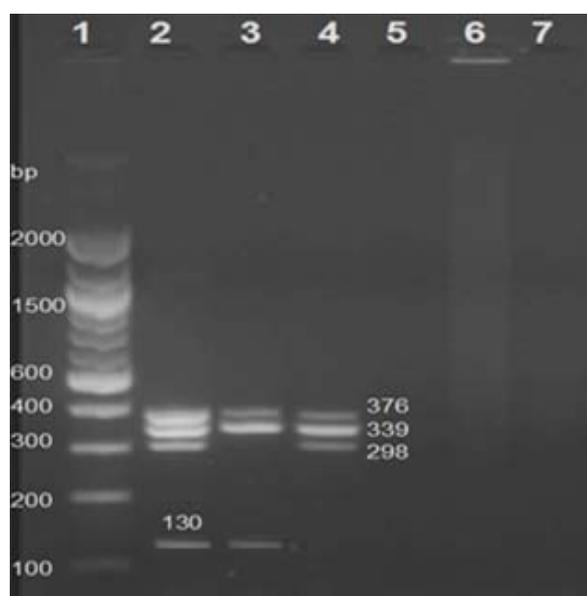
Figura No 3. Amplificación de los productos de PCR del gen *rfbO157* de la cepa de referencia ATCC 933, en un rango de Temperatura de Hibridación de 52°C a 60°C, y Concentraciones de Cebadores de 0.2 μ M y 0.3 μ M.



Una vez obtenidos estos resultados se procedió a mezclar los cebadores *vt1*, *vt2* y *eaeA* con *rfbO157* basados en que los primeros tres habían sido usados por Vilchez y col.,⁽²²⁾ y mostraron dar buenos resultados usando una temperatura de hibridación de 58°C y a concentraciones de 0.2µM para *vt2* y *eaeA*, y 0.4 µM para *vt1*.

La siguiente figura muestra los resultados de dicha coctel:

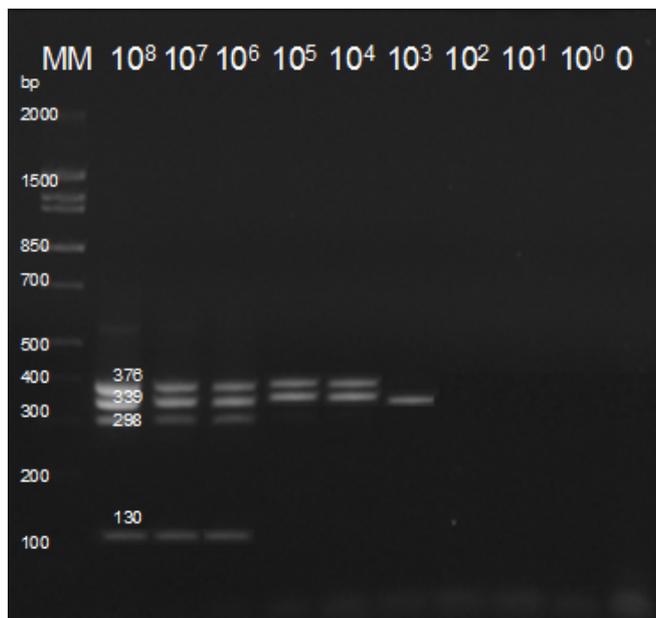
Figura No 4. Amplificación de los productos de PCR múltiplex de los genes *rfbO157*, *eaeA*, *vt2* y *vt1* de tres cepas de referencia. Carriles: 1. Marcador Molecular; 2. ECVT ATCC 933; 3. ECVT ATCC 43890; 4. ECVT ATCC 43889; 5. 97R; 6. ECET ATCC 35401; y 7. *E. coli* ATCC 11775.



6.2 Limite de Detección del Método

El ensayo para estimar el Límite de Detección del método mostró que la cantidad mínima de bacterias que pueden ser identificados por el mismo es de 12×10^6 UFC/mL para los cebadores *vt1* y *vt2*, 12×10^4 UFC/mL para los cebadores *eaeA* y 12×10^3 UFC/mL para los cebadores *rfbO157* utilizando una cepa ATCC 933 (Fig. 5).

Figura No 5. Amplificación de los productos de PCR Múltiplex para estimar el límite de detección del método. Marcador Molecular (Carril 1) y ECVT ATCC 933 diluciones desde 12×10^8 a 0 UFC/mL (Carriles del 2 al 11).



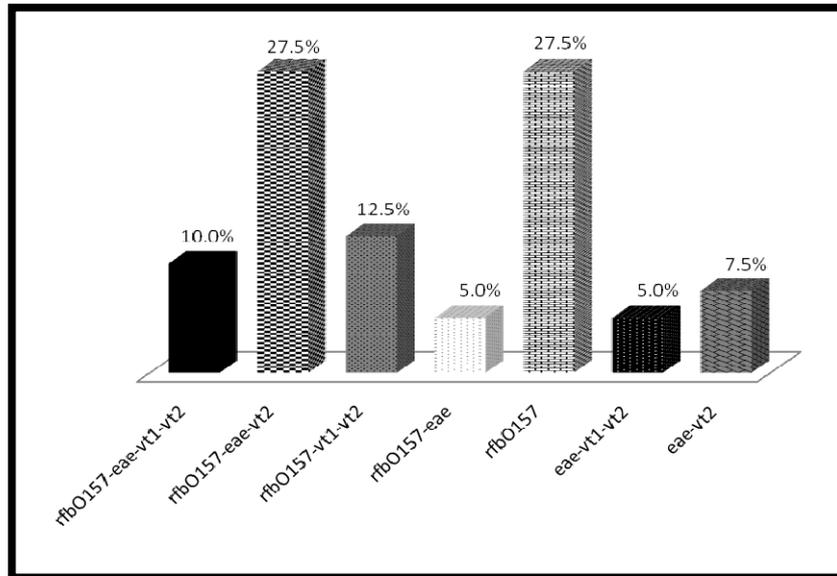
6.3 Ensayo del método

El método optimizado se experimentó en un total de 61 aislados clínicos de *E. coli*, de los cuales 40 eran de terneros y 21 de niños con diarrea.

6.3.1 Ensayo en Terneros

En las muestras de terneros se logró observar un alto porcentaje de cepas de *Escherichia coli* que contienen el gen *rfbO157* (82.5%), seguidos por el gen *vt2* (62.5%), luego el *eaeA* (55%) y por último el *vt1* (27.5%) como se ve en la figura No. 6, donde se puede observar la frecuencia de genes encontrados solos o en combinación.

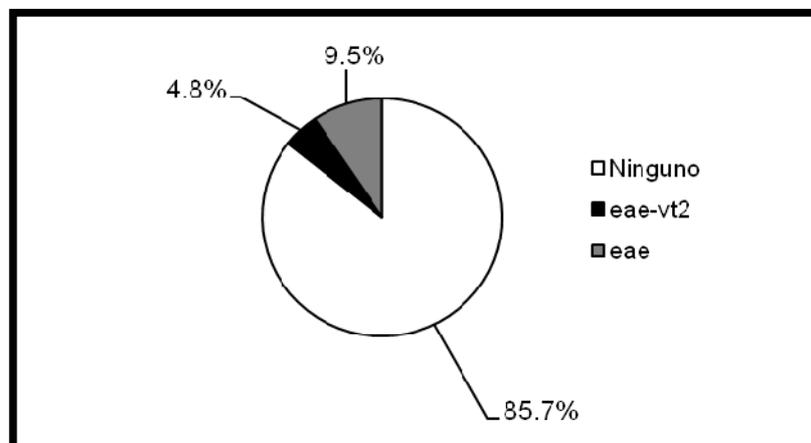
Figura No 6. Distribución de genes encontrados solos o en combinación.



6.3.2 Ensayo en Niños

Los aislados clínicos de *Escherichia coli* de niños con diarrea sometidas al método optimizado mostraron que solamente 3 de ellas tenían factores de virulencia; una tenía los genes *eaeA* y *vt2* mientras que la otras dos mostraron el gen *eaeA* únicamente, no observándose la presencia de los genes *rfbO157* y *vt1*.

Figura No. 7 Distribución de genes encontrados solos o en combinación en los aislados de *E. coli* de niños con diarrea.



7. Discusión

El estudio más reciente realizado en Nicaragua en el 2009 por *Vilchez y col.* reveló que la *E. coli* productora de verocitotoxinas estaba asociada al 2.1% de los casos de diarrea de una población leonesa infantil estudiada. Este estudio, es el primero en el país, en el cual se reporta la circulación de las ECVT, empleando métodos moleculares (PCR múltiplex) para su detección⁽²²⁾. Sin embargo, en el estudio no se investigaron los serogrupos de las ECVT circulantes.

La PCR múltiplex es una técnica molecular de amplificación de ADN muy sensible y específica. No obstante los estudios que usan dos o menos pares de cebadores no son específicos para demostrar que cepas de *E. coli* O157 verocitotóxicas están circulando en una determinada población de estudio, por el hecho de que una cepa de *E. coli* al presentar por ejemplo el gen que codifica para el antígeno somático O157 no significa que sea virulenta. Para esto se tiene que sumar en un mismo procedimiento los cebadores para amplificar e identificar los genes que codifican para las dos diferentes citotoxinas y para el gen *eaeA*, sin olvidar el ya antes mencionado *rfbO157*^(3,10). Además se ha reportado que las cepas de *Escherichia coli* ECVT O157 pueden ser precisamente identificadas usando únicamente cuatro pares de cebadores sugiriendo que una mayor cantidad de los mismos son innecesarios y difíciles de desarrollar por el problema de competencia de cebadores⁽⁶⁶⁾.

Por otro lado, se hace necesario planificar estrategias para evaluar y experimentar los parámetros más importantes que rigen el buen funcionamiento del método de PCR Múltiplex, así como estimar la concentración mínima detectable por dicho método entre otras cosas, para poder estar seguros de su sensibilidad, especificidad y confiabilidad de los resultados.

7.1 Temperatura de Hibridación y Concentración de los Cebadores: La figura No. 3 muestra la amplificación del gen *rfbO157* a temperaturas de hibridación variadas en 2 °C durante cada experimento cubriendo un rango de 8 °C y comenzando con 52 °C hasta terminar con 60 °C. Esta muestra una mejor resolución al ir en aumento, lo cual concuerda con la literatura debido a la desaparición de bandas de peso molecular superiores e inferiores a las esperadas (bandas inespecíficas) hasta llegar a 58 °C^(27-29, 54, 61-63). Esta

última fue la Temperatura óptima experimental de Hibridación determinada en este estudio. Puesto que a 60 °C no se observó resultados favorables debido a una reaparición de bandas inespecíficas sin disminución del rendimiento de la PCR ^(27-29, 54, 61-63).

La temperatura óptima experimental de hibridación determinada en este estudio para los cebadores *rfbO157* difiere con la utilizada en el estudio realizado por *Tzu- Ming Pan y col.*, 2002 de donde se extrajeron dichos cebadores ⁽⁶⁷⁾. No obstante en este estudio se utilizó además de los cebadores *rfbO157*, otros cebadores diferentes a los usados en el presente trabajo y también se incluyó 2 pares de cebadores más lo cual tiende a aumentar la Temperatura de Hibridación debido a la mayor competencia de cebadores ^(27-29, 54, 61-63). Al mismo tiempo que se varió esta temperatura se varió también la Concentración de los Cebadores *rfbO157* de 0.2 - 0.3 μM obteniéndose una Concentración experimental del mismo a 0.2 μM . No obstante a 0.3 μM se obtuvieron resultados no muy distantes a los de 0.2 μM . Por otro lado, la figura No. 4 muestra la mezcla de Cebadores *eaeA*, *vt1* y *vt2* con *rfbO157* en el PCR múltiplex; los Cebadores *eaeA*, *vt1* y *vt2* usados en el presente estudio son los mismos utilizados por *Vilchez y col.* 2009 ⁽²²⁾, el cual muestra como temperatura experimental la misma encontrada en este estudio para el gen *rfbO157*, lo que permitió adicionar el par de cebadores para dicho gen en la metodología y obtener resultados comparables. Cabe señalar que la concentración de 0.2 μM para los cebadores *eaeA* y *vt2* y de 0.4 μM para los *vt1* también concuerdan con estudios de *Vilchez y col.* 2009 ⁽²²⁾. En dicha figura además se logra observar claramente la discriminación de otras cepas de referencia las cuales no contienen los genes a amplificar, esto permite conocer la especificidad de dicho método.

7.2 Limite de Detección del Método: La ECVT O157 se vale de pequeñas dosis infectivas de 10 a 100 células para llegar a producir una enfermedad severa al ser humano ⁽³³⁻³⁵⁾. No obstante la mayoría de los casos se diagnostican luego de la aparición de los síntomas, principalmente de la presencia de sangre en las heces. Este hecho ocurre aproximadamente a los 3 días luego de la entrada de la bacteria en el huésped; tiempo suficiente para que la misma logre reproducirse. ^(10, 16, 17, 32-35). Por otro lado, el cultivo previo a la utilización de un método molecular ya sea en caso de diagnóstico clínico o de estudios epidemiológicos

permite obtener una cantidad de bacterias lo suficientemente superior a la cantidad mínima detectable del presente método, lo cual facilita la detección de ECVT O157 usando el mismo. Este hecho se puede apreciar en los resultados que refieren la figura No. 5, donde el Límite de Detección del método mostró que la cantidad mínima de bacterias que pueden ser identificados es de 12×10^6 UFC/mL utilizando como marcadores los Cebadores *vt1* y *vt2*, 12×10^4 UFC/mL para los Cebadores *eaeA* y 12×10^3 UFC/mL para los Cebadores *rfbO157*, utilizando una cepa ATCC 933. Sin embargo, cabe señalar que producto de la utilización de solo una cepa de referencia para la estimación del mismo introduce vacíos en esta determinación, ya que estos resultados pudiesen ser diferentes si este límite de detección hubiese sido estimado utilizando otras cepas de referencia puesto que el número de copias de ADN presente en las bacterias puede variar de una cepa a otra ⁽³⁾.

7.3 Ensayo con aislados de *E. coli* de Terneros: Con el presente método se pudo detectar la circulación de ECVT O157 en terneros provenientes de fincas aledañas a la ciudad de León lo cual demuestra que el método puede ser utilizado sin ningún problema figura No. 6. Es importante resaltar la alta frecuencia de *Escherichia coli* portadora del gen *rfbO157* en terneros, aunque el solo hecho de presentar este gen no significa que sea causante de enfermedad, permite conocer el serogrupo altamente peligroso el cual al estar asociado a la producción de citotoxinas y a la presencia del gen *eaeA* factores determinantes en la patogenicidad de la bacteria confirma el hallazgo de ECVT O157 ^(3,10). Por otro lado, cabe señalar que la citotoxina más frecuentemente encontrada es la *vt2* (35%) seguida de la combinación de ambas (*vt1* y *vt2*) con un 27.5%, sin observarse la *vt1* como única citotoxina, lo cual concuerda con estudios llevado a cabo por Blanco y col., así como Pradel y col. ⁽⁶⁸⁻⁶⁹⁾. Además, la figura No. 6 muestra también que la mayoría de los aislados de *E. coli* (27.5%) presentaron la combinación de los genes *rfbO157-eaeA-vt2*, los cuales podemos clasificar como verdaderas cepas ECVT O157, junto al 12.5% de aislados que mostraron la combinación *rfbO157-vt1-vt2* y a un 10% de los aislados que presentaron todos los genes aquí investigados para un total de 50% de ECVT O157. También, se detectó que un 7.5% y otro 5% de los aislados eran verdaderos ECVT, puesto que eran *eaeA-vt2* y *eae-vt1-vt2*, respectivamente, sin embargo, estos no pertenecían al serogrupo O157. En total 62.5% de las *E. coli* aisladas de terneros eran ECVT. A la par, tenemos

una alta frecuencia de aislados que solo portaban el gen *rfbO157*. Por último se observó la misma frecuencia (5%) para la combinación de *rfbO157-eaeA*, así como los aislados que no mostraron amplificación de ningún gen.

Esta alta prevalencia de ECVT en bovinos ha sido ampliamente confirmada por diversos estudios y es muy conocido en la literatura, no obstante es entre 10-25% aunque se han visto casos de hasta un 70% como el reportado en un estudio realizado en Francia por *Pradel N y col., 2000* ^(3,34-35, 68, 69).

7.4 Ensayo con aislados de *E. coli* de Niños con Diarrea: La figura No. 7 muestra una baja frecuencia (4.8%) de ECVT en las muestras clínicas de niños. Una frecuencia mayor que la reportada en el estudio llevado a cabo por *Vílchez y col.* quienes encontraron una frecuencia de ECVT del 2.1%, este hecho puede ser atribuido a que en el presente estudio se utilizó un medio de cultivo más selectivo y diferencial para cepas verocitotóxicas sospechosas que el empleado por el investigador antes mencionado. Sin embargo, ninguna de ellas fueron positivas para el gen *rfbO157*. A la par, estos resultados coinciden con la prevalencia informada para este tipo de bacterias en los países en vías de desarrollo generalmente (1-3 %). ^(3, 33-35, 70-71).

8. Conclusiones

En este estudio enfocado a dar los primeros pasos en aras de optimizar un método de PCR múltiplex utilizando PureTaq Ready-to-go PCR beads, para la detección de *Escherichia coli* productora de verocitotoxinas O157, se obtuvieron resultados que permiten concluir lo siguiente:

1. La Temperatura de Hibridación óptima experimental para la mezcla de los cebadores *vt1*, *vt2*, *eaeA* y *rfbO157* en el PCR múltiplex del presente trabajo fue de 58 °C.
2. La Concentración de Cebadores a la cual se observan los mejores resultados fue de 0.2 µM para los cebadores *vt2*, *eaeA* y *rfbO157* y de 0.4 µM para los *vt1*.
3. El Límite de Detección estimado para dicho método es de 12×10^6 UFC/mL para los Cebadores *vt1* y *vt2*, 12×10^4 UFC/mL para los cebadores *eaeA* y 12×10^3 UFC/mL para los cebadores *rfbO157*.
4. El presente método fue útil para detectar la circulación de ECVT O157 en terneros provenientes de fincas aledañas a la ciudad de León así como de niños con diarrea de la misma ciudad.

9. Recomendaciones

1. Seguir trabajando para lograr la optimización completa de todas las variables del método, para que pueda utilizarse en estudios epidemiológicos y porque no el diagnóstico local de las infecciones causadas por ECVT O157.
2. Considerar los resultados obtenidos en la detección de ECVT O157, para desarrollar test que determinen otros factores de virulencia de este grupo, e informar a las autoridades del MINSA en especial a los responsables de detección de enteropatógenos del Centro Nacional de Diagnóstico y Referencia (CNDR).
3. Divulgar este estudio como un aporte de salud pública que puede contribuir de manera directa, si es empleado en conjunto con otras metodologías para investigar el verdadero impacto que tienen la circulación de estas cepas ECVT en especial del serogrupo O157 en la salud de la población Nicaragüense.

10. Referencias

1. **Boschi-Pinto C, Velebit L, Shibuya K.** Estimating child mortality due to diarrhoea in developing countries. *Bull World Health Organ* 2008; 86:710–717.
2. **Bryce J, Boschi-Pinto C, Shibuya K, Black R & WHO Child Health Epidemiology Reference Group.** WHO estimates of the causes of death in children. *Lancet* 2005; 365:1147-1152.
3. **Nataro J & Kaper J.** Diarrheagenic *Escherichia coli*. A comprehensive review of the pathogenesis, epidemiology, diagnosis and clinical aspects of diarrhoeagenic *E. coli*. *Clin Microbiol Rev* 1998; 11:142–201.
4. **Kaper J, Nataro J & Mobley H.** Pathogenic *Escherichia Coli*. *Nat Rev Microbiol* 2004; 2:123-140.
5. **Mattar S, Visbal J & Arrieta G.** *E. coli* O157:H7 enterohemorrágico, un agente etiológico de diarrea y zoonosis en Colombia subestimado. Parte I. *MVZ-Cordova* 2001; 6:15-23.
6. **Weintraub A.** Enteroagregative *Escherichia coli*: epidemiology, virulence and detection. *J Med Microbiol* 2007; 56: 4–8.
7. **Riley L, Remis R, Helgerson S, McGee H, Wells J, Davis B, Hebert R, Olcott E, Johnson L, Hargrett N, Blake P, Cohen M.** Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. *N Engl J Med* 1983; 308: 681-685.
8. **Croxen M. & Finlay B.** Molecular Mechanisms of *Escherichia coli* Pathogenicity. *Nat Rev Microbiol* 2010; 8:26-38.
9. **Law D.** Virulence factors of *Escherichia coli* O157 and other Shiga toxin producing *E. coli*. *J Appl Microbiol* 2000; 88: 729–745.
10. **Paton J & Paton A.** Pathogenesis and diagnosis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. *Clin Microbiol Rev* 1998; 11: 450-479.
11. **O'Brien A, Tesh V, Donohue-Rolfe A, Jackson M, Olsnes S, Sandvig K, Lindberg A & Keusch G.** Shiga toxin: biochemistry, genetics, mode of action, and role in pathogenesis. *Curr Top Microbiol Immunol* 1992; 180:65–94.

12. **Noris M & Remuzzi G.** Hemolytic Uremic Syndrome. *J Am Soc Nephrol* 2005; 16: 1035-1050.
13. **Ibarra C, Goldstein J, Silberstein C, Zotta E, Belardo M & Repetto H** Síndrome urémico hemolítico inducido por *Escherichia coli* enterohemorrágica: actualización. *Arch Argent Pediatr* 2008; 106:435-442.
14. **Blanco J, Blanco M, Escribano A, Blanco J, Alonso M, Marín J & Hernández R.** *Escherichia coli* verotoxigénicos y el síndrome urémico hemolítico. Aspectos clínicos y microbiológicos. *Anal Esp Pediatr* 1995; 42:95-106.
15. **Rivero M, Padola N, Etcheverria A & Parma A.** *Escherichia coli* enterohemorrágica y Síndrome Urémico Hemolítico en Argentina. *Art Esp Med* 2004; 64: 352-356.
16. **Chamorro L.** Síndrome Urémico-Hemolítico por *E. coli* enterohemorrágica O157:H7 Stx2: Primer Caso Descrito en Paraguay. *Pediatr. Asunc* 2009; 36: 131-137.
17. **Gadea M, Varela G, Bernadá M, Sirok A, Mota M, Sabelli R, Grotiuz G, Schelotto F, Chinen I, Chillemi G, Rivas M.** Primer aislamiento en Uruguay de *Escherichia coli* productora de toxina Shiga del serotipo O157:H7 en una niña con síndrome urémico hemolítico. *Rev Med Urug* 2004; 20:79-81.
18. **Kaplan B.** Hemolytic-uremic syndrome and thrombotic thrombocytopenic purpura. *Marcel Dekker* 1992; 23:213-225.
19. **Gianantonio C, Vitacco M, Mendilaharzu F, Ruty A & Mendilaharzu J.** Hemolytic Uremic Syndrome. *J Pediatr* 1964; 64:478-491.
20. **MINSANIC 2006.** Indicadores de morbilidad por SILAIS, Nicaragua año 2005. http://www.minsa.gob.ni/planificacion/estadisticas/ind2006/images/ind_morbilidad.jpg.
21. **Vílchez S, Reyes D, Paniagua M, Bucardo F, Möllby R & Weintraub A.** Prevalence of diarrhoeagenic *Escherichia coli* in children from León, Nicaragua. *J Med Microbiol* 2009; 58:630-637.
22. **CNDR/MINSA.** Manual de Procedimientos de Bacteriología Médica. Edición 2004. MINSA. Managua. pag. 213-223.

23. **WHO Global Salm Surv Rivas M, Miliwebsky E & Deza N.** Manual de Procedimientos Diagnóstico y caracterización de *Escherichia coli* O157 productor de toxina Shiga a partir de especímenes clínicos. Departamento Bacteriología Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas ANLIS “Dr Carlos G Malbrán”. Centro Regional de Referencia del WHO Global Salm Surv para América del Sur. 2007. pag. 6-25.
24. **Rice E, Sowers E, Johnson C, Dunnigan M, Strockbine N & Edberg S.** Serological cross-reactions between *Escherichia coli* O157 and other species of the genus *Escherichia*. *J Clin Microbiol* 1992; 30: 1315–1316.
25. **Lior H & Borczyk A.** False positive identification of *Escherichia coli* O157. *Lancet* 1987; 1:333.
26. **Fredricks D & Relman D.** Application of polymerase chain reaction of the diagnosis of infectious diseases. *Clin. Infect. Dis* 1999; 29:475–488.
27. **González F.** Ensayos Médicos sobre Genética. La Genética Molecular en la Medicina Ecuatoriana Nuevas Técnicas Moleculares en Genética Médica y Forense. 2006. <http://www.doctorfabricio.com>.
28. **Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G & Erlich H.** Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: The polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol* 1986; 51:263-273.
29. http://www.cultek.com/aplicaciones.asp?p=Aplicacion_PCR&opc=introduccion. Amplificación de ácidos nucleicos in vitro.
30. **Benjamin M & Datta A.** Acid Tolerance of Enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* 1995; 61: 1669-1672.
31. **Cheville A, Arnold K, Buchrieser C, Cheng C & Kaspar C.** rpoS Regulation of Acid, Heat, and Salt Tolerance in *Escherichia coli* O157:H7. *Appl Environ Microbiol.* 1996; 62: 1822–1824.
32. **Karch H, Tarr P & Bielaszewska M.** Enterohemorrhagic *Escherichia coli* in Human Medicine. *Int J Med Microbiol* 2005; 295:405-418.
33. **Karmali M.** Infection by Shiga Toxin-Producing *Escherichia Coli*. *Mol Biotechnol* 2004; 26:117-122.

34. **Tarr P.** *Escherichia coli* O157:H7: Clinical, Diagnostic and Epidemiological aspects of Humans Infections. *Clin Infect Dis* 1995; 20:1-10.
35. **Griffin P & Tauxe R.** The epidemiology of infections caused by *Escherichia coli* O157:H7, other enterohemorrhagic *E. coli*, and the associated hemolytic uremic syndrome. *Epidemiol Rev* 1991; 13:60–98.
36. **Oquendo Rodríguez M.** Incidencia de *Escherichia coli* serotipo O157:H7 en carne proveniente de ganado bovino de mataderos de Puerto Rico. Tesis sometida en cumplimiento parcial de los requisitos para el grado de Maestro en Ciencia y Tecnología de Alimentos. Universidad de Puerto Rico. Recinto Universitario de Mayaguez. 2006.
37. **Cicuta M, Deza N, Roibón W, Arzú O & Barceló M.** *Escherichia coli* productor de toxina Shiga en carnes molidas y chacinados embutidos de Corrientes, Argentina. *Rev Vet* 2009; 20:11–14.
38. **Marzocca M, Marucci P, Sica M & Álvarez E.** Detección de *Escherichia coli* O157:H7 en carne picada fresca y hamburguesas congeladas. *Rev Arg Microbiol* 2006; 38: 38-40.
39. **Bravo V & Villalobos B.** *Escherichia coli* enterohemorrágica en productos cárnicos comercializados en el mercado municipal de Cumaná, Venezuela. *Rev. Soc. Ven Microbiol* 2002; 22:119-121.
40. **Rubeglio E & Tesone S.** *Escherichia coli* O157 H7: presencia en alimentos no cárnicos. *Com Arch Argent Pediatr* 2007; 3:193-194.
41. **Center For Disease Control.** Outbreaks of *Escherichia coli* O157:H7 infections associated with eating alfalfa sprouts - Michigan and Virginia. *Morbidity and Mortality Weekly Rep* 1997; 46: 741-744.
42. **Olsen S, Miller G, Breuer T, Kennedy M, Higgins C, Walford J, McKee G, Fox K, Bibb W & Mead P.** A waterborne Outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections and Hemolytic Uremic Syndrome: implications for rural water system. *Emerg Infect Dis.* 2002; 8: 370–375.
43. **Organización Panamericana de la Salud. Organización Mundial de la Salud (OPS/OMS).** IV Reunión de la Red de Vigilancia de Enfermedades Emergentes

- Infecciosas del Cono Sur. Asunción, Paraguay 2001. Disponible en: <http://www.paho.org>.
44. **Comité de Nefrología.** Incidencia del Síndrome Urémico Hemolítico (SUH) en la República Argentina. *Arch Arg Pediatr* 1995; 93: 407- 411.
 45. **Andreoli S, Trachtman H, Acheson D, Siegler R & Obrig T.** Hemolytic uremic syndrome: epidemiology, pathophysiology and therapy *Pediatr Nephrol* 2002; 17: 293–298.
 46. **Cimolai N, Carter J, Morrison B & Anderson J.** Risk factors for the progression of *Escherichia coli* O157:H7 enteritis to the hemolytic uremic syndrome. *J Pediatr* 1990; 116: 589-592.
 47. **Wong C, Jelacic S, Habeeb R, Watkins S Tarr P.** The risk of the hemolytic-uremic syndrome after antibiotic treatment of *Escherichia coli* O157:H7 infections. *N Engl J Med* 2000; 342: 1930-1936.
 48. **Koneman E.** Diagnóstico Microbiológico. Texto Atlas a color. *Ed Méd Panamer*, Cap 2, Buenos Aires, Argentina. 1999.
 49. **Brooks J, Geo F, Butel S, Janet S, Ornston L & Nicholas L.** Microbiología médica de Jawetz, Melnick y Adelberg. 17^a ed. Cap 16. *El Manual Moderno*, México, D.F. 1998.
 50. **March S & Ratnam S.** Sorbitol-MacConkey medium for detection of *Escherichia coli* O157:H7 associated with hemorrhagic colitis. *J Clin Microbiol* 1986; 23: 869–872.
 51. **Ratnam S, March S, Ahmed R, Bezanson G & Kasatiya S.** Characterization of *Escherichia coli* serotype O157:H7. *J Clin Microbiol* 1988; 10: 2006-2011.
 52. **Bennett A, MacPhee S & Betts R.** The isolation and detection of *Escherichia coli* O157 by use of immunomagnetic separation and immunoassay procedures. *Lett Appl Microbiol* 1996; 22:237–243.
 53. **Markoulatos P, Siafakas N & Moncany M.** Multiplex Polimerasa Chain Reaction: A Practical Approach. *J Clin Lab Anal* 2002; 16: 47-51.
 54. **Manual de las Beads GE Healthcare UK Limited.** ilustratm pureTaq Ready-to-Go PCR Beads.2003-2007.

55. **Henegariu O, Heerema N, Dlouhy S, Vance G & Vogt P.** Multiplex PCR: critical parameters and step-by-step protocol. *BioTech* 1997; 23:504-511.
56. **Williams J,** Optimization strategies for the polymerase chain reaction. *BioTechniques* 1989; 7: 762–769.
57. **Elnifro E, Ashshi A, Cooper R & Klapper P.** Multiplex PCR: Optimization and Application in Diagnostic Virology *Clin Microbiol Rev* 2000; 13: 559–570.
58. **Cha R, & Thilly W.** Specificity, efficiency, and fidelity of PCR. *PCR Meth Appl.* 1993; 3: S18–S29.
59. **Edwards M, & Gibbs R.** Multiplex PCR: advantages, development, and applications. *PCR Methods Appl* 1994; 3: S65–S75.
60. **Dieffenbach C, Lowe T & Dveksler G.** General concepts for PCR primer design. *PCR Meth Appl* 1993; 3: S30–S37.
61. **Wu D, Ugozzoli L, Pal B, Qian J & Wallace R.** The effect of temperature and oligonucleotide primer length on the specificity and efficiency of amplification by the polymerase chain reaction. *DNA Cell. Biol* 1991; 10: 233–238.
62. **Rychlik W, Spencer W & Rhoads R.** Optimization of the annealing temperature for DNA amplification *in vitro*. *Nucl Acid Research* 1990; 18: 6409-6412.
63. **Ishii K, & Fukui M.** Optimization of Annealing Temperature To Reduce Bias Caused by a Primer Mismatch in Multitemplate PCR. *Appl Environ Microbiol* 2001; 67: 3753–3755.
64. **Mayatepek E, Seebass E, Hingst V, Kroeger A & Sonntag H. G.** Prevalence of enteropathogenic and enterotoxigenic *Escherichia coli* in children with and without diarrhoea in Esteli, Nicaragua. *J Diarrh Dis Res* 1993; 11:169-171.
65. **Paniagua M, Espinoza F, Ringman M, Reizenstein E, Svennerholm A & Hallander H.** Analysis of incidence of infection with enterotoxigenic *Escherichia coli* in a prospective cohort study of infant diarrhea in Nicaragua. *J Clin Microbiol* 1997; 35:1404-1410.
66. **Paton A & Paton J.** Detection and Characterization of Shiga Toxigenic *Escherichia coli* by Using Multiplex PCR Assays for *stx1*, *stx2*, *eaeA*,

- Enterohemorrhagic *E. coli* *hlyA*, *rfbO111*, and *rfbO157*. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 598–602.
67. **Tzu-Ming Pan, Li-Ming Chen & Yuan-Chi Su.** Identification of *Escherichia coli* O157:H7 by multiplex PCR with primers specific to the *hlyA*, *eaeA*, *stx1*, *stx2*, *fliC* and *rfb* genes. *J Formos Med Assoc* 2002; 101: 661-664.
68. **Blanco M, Blanco J E, Blanco J, Gonzalez E, Mora A, Prado C, Fernández L, Rio M, Ramos J & Alonso M.** Prevalence and characteristics of *Escherichia coli* serotype O157:H7 and other verotoxin-producing *E. coli* in healthy cattle. *Epidemiol. Infect* 1996; 117: 251-257.
69. **Pradel N, Livrelli V, De Champs C, Palcoux J, Reynaud A, Scheutz F, Sirot J, Joly B & Forestier C.** Prevalence and Characterization of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Isolated from Cattle, Food, and Children during a One-Year Prospective Study in France. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 1023–1031.
70. **Brown J, Echeverria P, Taylor D, Seriwatana J, Vanapruks V, Lexomboon U, Neill R & Newland J** Determination by DNA hybridization of Shiga-like-toxin-producing *Escherichia coli* in children with diarrhea in Thailand. *J Clin Microbiol* 1989; 27: 291–294.
71. **Strockbine N, Faruque S, Kay B, Haider K, Alam K, Alam A, Tzipori S. & Wachsmuth I.** DNA probe analysis of diarrhoeagenic *Escherichia coli*: detection of EAF-positive isolates of traditional enteropathogenic *E. coli* serotypes among Bangladeshi paediatric diarrhoea patients. *Mol Cell Probes* 1992; 6: 93–99.

