



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
ESCUELA NACIONAL DE MEDICINA Y HOMEOPATÍA
SECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN**

MAESTRÍA EN CIENCIAS EN BIOMEDICINA MOLECULAR

**“Desarrollo de un método diagnóstico de tipo PCR múltiple para la
detección de patógenos causantes de gastroenteritis aguda en niños
mexicanos”**

TESIS
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRÍA EN
CIENCIAS EN BIOMEDICINA MOLECULAR

PRESENTA:

TOLENTINO RUÍZ MARÍA DEL ROCÍO

DIRECTORES DE TESIS:

DRA. MÓNICA ASCENCIÓN DE NOVA OCAMPO (PIBIOM)

DR. JUAN SANTIAGO SALAS BENITO (PIBIOM)



México D.F., A 17 DE ENERO DEL 2011

CÓMITE TUTORIAL:

Dra. María Del Consuelo Gómez García (PIBIOM)

Dra. Paula Figueroa Arredondo (PIBIOM)

Dra. Lorena Gutiérrez Escolano (Depto. Infectómica y Patogénesis Molecular
CINVESTAV Zacatenco)



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de México siendo las 10:00 horas del día 14 del mes de Diciembre del 2010 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de la Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de ENMyH para examinar la tesis titulada:

Desarrollo de un método diagnóstico de tipo PCR múltiple para la detección de patógenos causantes de gastroenteritis aguda en niños mexicanos.

Presentada por el alumno:

<u>Tolentino</u>	<u>Ruíz</u>	<u>María Del Rocío</u>
Apellido paterno	Apellido materno	Nombre(s)

Con registro:

B	0	8	1	9	7	3
---	---	---	---	---	---	---

aspirante de:

Maestría en Ciencias en Biomedicina Molecular

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA

Directores de tesis

Dra. Mónica Ascención De Nova Ocampo

Dr. Juan Santiago Salas Benito

Dra. Ana Lorena Gutiérrez Escolano

Dra. Paula Figueroa Arredondo

Dra. María Del Consuelo Gómez García



SECRETARÍA DE
EDUCACION PUBLICA
INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES
Y HOMEOPATIA
SECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO
E INVESTIGACION



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de México el día 14 del mes Diciembre del año 2010, el (la) que suscribe María Del Rocío Tolentino Ruíz alumno (a) del Programa de Maestría en Ciencias en Biomedicina Molecular con número de registro B081973, adscrito a ENMyH, manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de Dra. Mónica Ascención De Nova Ocampo y Dr. Juan Santiago Salas Benito y cede los derechos del trabajo titulado Desarrollo de un método diagnóstico de tipo PCR múltiple para la detección de patógenos causantes de gastroenteritis aguda en niños mexicanos, al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección roxtol@yahoo.com.mx. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

María Del Rocío Tolentino Ruíz

El trabajo experimental de esta tesis fue realizado en el laboratorio III de Virología bajo la dirección de los doctores Monica Ascención De Nova Ocampo y Juan Santiago Salas Benito de la Sección de Estudios de Posgrado e Investigación del Programa Institucional de Biomedicina Molecular de la Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía (ENMyH) del Instituto Politécnico Nacional (IPN), gracias a los fondos otorgados por la Secretaría de Investigación y Posgrado (SIP) y el Instituto de Ciencia y Tecnología del Distrito Federal (ICyTDF) como parte del proyecto (DF/2007183).

Se contó con beca de Maestría del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología CONACYT (270554/219933), así como beca del Programa Institucional de Formación de Investigadores (PIFI) del Instituto Politécnico Nacional (como parte del proyecto 20090206 y 20100054) y con beca Tesis del Instituto Politécnico Nacional (IPN).

DEDICATORIA

A mis padres:

Ma. de Jesús Ruíz García y Fernando Tolentino Arteaga , por todo el amor, cariño y apoyo que siempre me dieron, por ser el mejor ejemplo en mi vida porque gracias a ustedes estoy aquí cumpliendo mis sueños y aunque ya no estén conmigo siempre vivirán en mi corazón y en mi recuerdo.

A mi hermana Araceli :

Por tu cariño, comprensión y compañía en todos los momentos importantes en mi vida, por tus consejos y apoyo para volver a levantarme en las situaciones difíciles y por ser parte de mi vida y de mi familia.

A mi hermana Marbe:

Por tu paciencia, cuidados y comprensión, por apoyar mis sueños y compartírselos conmigo, por todas las noches de desvelo a mi lado, por tu animo para seguir adelante y por tu compañía y consuelo en los momentos de tristeza.

A mis sobrinitos:

Adri y Toño por su amor puro e incondicional , por enseñarme a ver lo dulce y divertido de la vida. Por ser la chispa de luz que ilumina mi camino todos los días.

A mi amor Ian

Por haber aparecido en mi vida y compartirla conmigo, por tu paciencia, amor y apoyo para ayudarme a lograr mis sueños, por tu cariño para compartir mis tristezas y alegrías y sobre todo por enseñarme lo maravilloso que es amar.

A mis amigos:

Bere y Beto por su invaluable amistad, por su cariño y comprensión incondicional de hermanos, por todos los momentos maravillosos a su lado y por estar siempre a mi lado en los momentos difíciles.

A mis amigos:

Adrian

Por brindarme tu amistad incondicional a lo largo del tiempo, por apoyarme en los buenos y malos momentos. Gracias por enseñarme a ver lo gracioso de las situaciones adversas.

Mile

Por brindarme tu amistad , por acompañarme y alegrarme en los momentos de tristeza y enseñarme a ver la vida de forma divertida.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Mónica De Nova Ocampo por dedicar su tiempo y brindarme sus conocimientos para desarrollar este proyecto, por la confianza y libertad que deposito en mi, por permitirme aprender a través de su experiencia y abrirme las puertas para cumplir una meta más en mi vida.

Al Dr. Juan Salas por apoyarme con sus sugerencias, comentarios y propuestas para el desarrollo de este proyecto.

A mis asesores la Dra. Ana Lorena Gutiérrez Escolano, Dra. María Del Consuelo Gómez García y la Dra. Paula Figueroa Arredondo por su apoyo, comentarios y sugerencias para el desarrollo de mi trabajo de investigación.

A Maty y Mariana por su gran paciencia para enseñarme y por su apoyo en los momentos difíciles y de duda.

A mis compañeras Tania, Wendy, Martha y Ana por todos los momentos vividos en el laboratorio, y por el apoyo para lograr nuestras metas.

CONTENIDO

RESUMEN.....	14
ABSTRACT.....	15
1 INTRODUCCIÓN.....	16
1.1 VIRUS ENTÉRICOS.....	16
1.2 BACTERIAS PRODUCTORAS DE DIARREA.....	18
1.3 PARÁSITOS ASOCIADOS A GASTROENTERITIS AGUDA.....	20
2 ANTECEDENTES.....	22
2.1 MÉTODOS DIAGNÓSTICOS PARA LA DETECCIÓN DE PATÓGENOS CAUSANTES DE DIARREA.....	23
2.1.1 ASTROVIRUS Y CALICIVIRUS.....	23
2.1.2 BACTERIAS CAUSANTES DE DIARREA.....	31
2.1.3 DETECCIÓN DE PARÁSITOS ASOCIADOS A GASTROENTERITIS AGUDA.....	37
3 JUSTIFICACIÓN.....	45
4 HIPÓTESIS.....	46
5 OBJETIVOS	46
5.1 OBJETIVO GENERAL.....	46
5.2 OBJETIVOS PARTICULARES.....	46
6 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	47
7 MATERIALES Y MÉTODOS.....	48
7.1 COLECTA DE MUESTRAS BIOLÓGICAS	48
7.1.1 CRITERIOS DE INCLUSIÓN.....	48
7.1.2 CRITERIOS DE EXCLUSIÓN.....	48

7.2 BANCO DE DATOS Y BANCO BIOLÓGICO.....	48
7.3 PROCESAMIENTO DE MUESTRAS.....	49
7.4 AISLAMIENTO DE ÁCIDOS NUCLEÍCOS DE VIRUS, BACTERIAS Y PARÁSITOS.....	49
7.5 DETECCIÓN DE ASTROVIRUS Y CALICIVIRUS POR RT- PCR.....	49
7.6 CLONACIÓN DE PRODUCTOS AMPLIFICADOS.....	52
7.7 DETECCIÓN DE BACTERIAS ENTERICAS POR PCR.....	53
7.8 DETECCIÓN DE <i>Entamoeba histolytica</i>	54
7.9 ENSAYOS DE ELISA PARA LA DETECCIÓN DE PATÓGENOS GASTROENTÉRICOS.....	56
7.10 ESTANDARIZACIÓN DE LA PCR MÚLTIPLE.....	56
8 RESULTADOS	59
8.1 BANCO DE DATOS Y BANCO BIOLÓGICO.....	59
8.2 IDENTIFICACIÓN DE ASTROVIRUS POR EL MÉTODO DE ELISA.....	62
8.3 IDENTIFICACIÓN DE ASTROVIRUS POR RT-PCR.....	64
8.4 DETECCIÓN DE CALICIVIRUS POR ELISA.....	67
8.5 IDENTIFICACIÓN DE CALICIVIRUS (NOROVIRUS) POR RT-PCR	69
8.6 CLONACIÓN DE PRODUCTOS AMPLIFICADOS POR RT-PCR.....	72
8.7 RESULTADO DE SECUENCIACIÓN DE LAS MUESTRAS POSITIVAS PARA ASTROVIRUS Y CALICIVIRUS.....	74
8.8 IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS PRODUCTORAS DE DIARREA (EPEC y EIEC).....	77
8.9 RESULTADO DE SECUENCIACIÓN DE LA MUESTRA POSITIVA	

PARA EIEC.....	83
8.10 DETECCIÓN DE <i>Entamoeba histolytica</i> por ELISA.....	84
8.11 IDENTIFICACION DE <i>Entamoeba histolytica</i> POR PCR.....	86
8.12 ESTANDARIZACIÓN DEL ENSAYO DE PCR MÚLTIPLE.....	90
9 DISCUSIÓN.....	97
10 CONCLUSIONES.....	106
11 PERSPECTIVAS.....	107
12 BIBLIOGRAFÍA.....	108
13 ANEXOS	118
13.1 MAPA DEL PLÁSMIDO p NV- 319.....	118
13.2 FICHA DE REGISTRO PARA LA IDENTIFICACIÓN DE LAS MUESTRAS	119
13.3 MAPA DEL VECTOR pJET 1.2.....	120

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	Comparación de métodos de detección para astrovirus y calicivirus en México	29
Tabla 2	Clasificación de <i>Escherichia coli</i> productoras de diarrea	32
Tabla 3	Prevalencia de <i>Entamoeba histolytica/dispar</i> en pacientes con HIV/SIDA	39
Tabla 4	Prevalencia de <i>E. histolytica</i> y <i>E. dispar</i> evaluada por PCR	40
Tabla 5	Análisis de PCR Múltiple y examen microscópico usando muestras de heces	43
Tabla 6	Oligonucleótidos para la identificación de astrovirus y Calicivirus.....	52
Tabla 7	Oligonucleótidos para la identificación de <i>Escherichia coli</i> (EPEC, ETEC, EIEC)	54
Tabla 8	Oligonucleótidos utilizados para identificar <i>Entamoeba histolytica/dispar</i>	55
Tabla 9	Kits seleccionados para los ensayos inmunoenzimáticos	56
Tabla 10	Análisis bioinformático con el programa Vector NTI Advance 11	57
Tabla 11	Total de muestras organizadas en relación al grupo de edad y sexo	59
Tabla 12	Comparación de los métodos ELISA vs RT-PCR para la detección de astrovirus y calicivirus.....	71
Tabla 13	Condiciones de Tm y concentración de oligonucleótidos para amplificar cada uno de los patógenos por PCR múltiple	91

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Micrografía electrónica de virus entéricos	18
Figura 2	Micrografías electrónicas de cepas de <i>Escherichia coli</i> productoras de diarrea	19
Figura 3	Microscopia electrónica de trofozoitos de <i>Entamoeba histolytica</i>	21
Figura 4	Identificación por RT-PCR múltiple de norovirus , sapovirus y astrovirus	31
Figura 5	PCR múltiple de variedades de <i>Escherichia coli</i>	34
Figura 6	Límite de detección de <i>E. histolytica</i> y <i>E. dispar</i> por PCR múltiple ..	43
Figura 7	Datos clínicos de los niños seleccionados para este estudio	61
Figura 8	Identificación de astrovirus por RT-PCR	65
Figura 9	Identificación de Astrovirus por RT-PCR con oligonucleótidos Mon 269 y Mon 270	67
Figura 10	Identificación de calicivirus por ELISA	68
Figura 11	Identificación de calicivirus por RT-PCR	70
Figura 12	Clonación de los productos amplificados de astrovirus y calicivirus	73
Figura 13	Secuenciación automática del plásmido pJET- Astro+	74
Figura 14	Secuenciación automática de los plásmidos pJET- Astro12 y pJet- Astro 13	75
Figura 15	Alineamiento múltiple de las secuencias de las muestras positivas a astrovirus	76
Figura 16.	Secuenciación automática del plásmido recombinante pJET-Calicivirus 12	77

Figura 17 PCR sobre colonia de cepas de <i>Escherichia coli</i> productoras de diarrea	79
Figura 18 Identificación de EIEC por PCR	81
Figura 19 Identificación de EIEC por PCR	82
Figura 20 Secuenciación automática de una muestra positiva para EIEC	83
Figura 21 Ensayo inmunocromatográfico para la detección de <i>Entamoeba</i>	85
Figura 22 Identificación de <i>Entamoeba histolytica</i> por PCR	87
Figura 23 Identificación de <i>Entamoeba histolytica</i> por PCR	89
Figura 24 PCR múltiple para la identificación de EIEC y <i>Entamoeba</i>	92
Figura 25 PCR múltiple para la identificación de astrovirus y calicivirus	94
Figura 26 Ensayo de PCR múltiple para la detección de virus, bacterias y parásitos a partir de heces	96

ÍNDICE DE GRÁFICAS

Grafica 1 Identificación de astrovirus por el método de ELISA	63
--	-----------

RESUMEN

La gastroenteritis aguda es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad infantil a nivel mundial, la etiología incluye virus, bacterias y parásitos, considerando a los virus la principal causa de diarrea aguda. Los más frecuentes son rotavirus, calicivirus, adenovirus y astrovirus humanos (HAstV); en la etiología bacteriana los principales agentes son *Escherichia coli* y *Shigella spp.*, y en la etiología parasitaria, se reconoce a *Entamoeba histolytica* como la principal causa a nivel mundial. El diagnóstico de estos patógenos es poco específico y sensible, se utiliza convencionalmente ELISA y actualmente métodos moleculares, sin embargo no existe un método molecular que los identifique simultáneamente, por lo que el objetivo del presente trabajo fue diseñar un método diagnóstico molecular altamente sensible y específico que permitiera la identificación simultánea en muestras de heces de patógenos entéricos (astrovirus, norovirus, *Entamoeba histolytica*, *Escherichia coli* enteroinvasiva) en niños menores de cuatro años. Se analizaron muestras de heces para identificar estos patógenos por ELISA y RT-PCR/PCR. Por RT-PCR se identificaron 4 muestras positivas para astrovirus (3.8%) y 4 para calicivirus (3.8%); por PCR 2 y 14 muestras positivas para *Entameoba histolytica* (10.5%) y EIEC (70%) respectivamente. Por ELISA únicamente se identificó una muestra positiva para norovirus (2.5%). Las muestras positivas secuenciadas correspondieron a astrovirus serotipo 1 y 8, virus Norwalk, y EIEC y se estandarizó la PCR múltiple con las muestras de heces positivas lográndose amplificar simultáneamente (astrovirus, EIEC y *Entamoeba histolytica*), lo que representa una herramienta útil en la identificación de patógenos en estudios de corte epidemiológico y puede servir de apoyo al diagnóstico de gastroenteritis aguda en niños lo cual representaría un gran impacto en el diagnóstico temprano y tratamiento y por ende un cambio epidemiológico importante.

ABSTRACT

Acute gastroenteritis is a major cause of childhood morbidity and mortality worldwide. The etiology are included viruses, bacteria and parasites, considering the viruses the leading cause of acute diarrhea, rotavirus, calicivirus, enteric adenovirus and human astrovirus (HAstV) are the most frequent, in the bacterial etiology the main agents are *Escherichia coli* and *Shigella spp.* and in the etiology parasitic *Entamoeba histolytica* is recognized as the leading cause worldwide. The diagnosis of these pathogens is very little specific and sensitive, its conventionally used ELISA and molecular methods currently. However, actually don't exists there is no a molecular method to identify them simultaneously, therefore the aim of this study was to design a molecular diagnostic method for highly sensitive and specific to allow the simultaneous identification in stool samples of enteric pathogens (astrovirus, norovirus, *Entamoeba histolytica* , enteroinvasive *Escherichia coli*) in children under four years. Stool samples were analyzed to identify these pathogens by ELISA and RT-PCR/PCR. For RT-PCR identified 4 samples positive for astrovirus (3.8%) and 4 for calicivirus (3.8%) were identified; while by PCR 2 and 14 samples positive for *Entameoba histolytica* (10.5%) and EIEC (70%) were identified respectively. By ELISA only one sample was positive for norovirus (2.5%). The sequences of the positive samples corresponded to serotype 1 and 8 for astrovirus, Norwalk virus, and EIEC strain. Multiplex PCR was standardized with positive stool samples, achieving simultaneously amplify (astrovirus, EIEC and *Entamoeba histolytica*), which is a useful tool in the identification of pathogens in epidemiological studies and may provide support to the diagnosis of acute gastroenteritis in children which would represent a major impact on early diagnosis and treatment and therefore a major epidemiological change.

1 INTRODUCCIÓN

La gastroenteritis aguda es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad infantil a nivel mundial (50), provocando aproximadamente dos billones de casos de diarrea en niños por año en todo el mundo (23), principalmente en países en vías de desarrollo donde la higiene escasa y el acceso limitado al uso de agua potable favorecen la presencia de ésta, siendo la desnutrición otro factor que contribuye a elevar la mortalidad por este padecimiento especialmente en niños (58).

Los responsables de la aparición de un cuadro de gastroenteritis aguda lo constituyen un amplio grupo de patógenos, tales como virus, bacterias y parásitos (58); en países en vías de desarrollo, los virus, son reconocidos como la principal causa de diarrea aguda (38), entre los más frecuentes están rotavirus, calicivirus, adenovirus entéricos y astrovirus humanos (HAstV) (**Fig.1**) (80). Las bacterias productoras de diarrea como *Escherichia coli* y *Shigella sp.* así como el parásito protozoario *Entamoeba histolytica* son considerados agentes etiológicos importantes en la gastroenteritis aguda a nivel mundial.

1.1 VIRUS ENTÉRICOS

Entre los virus que provocan diarrea se encuentra a astrovirus los cuales infectan principalmente a niños menores de 3 años de edad; su periodo de incubación es de 3-4 días y la vía de transmisión es de persona a persona (44). Las infecciones por estos presentan un comportamiento estacional semejante a rotavirus, la mayoría de ellas, son detectadas en los meses de invierno en regiones templadas y en los meses de lluvia en climas tropicales, el cuadro clínico se caracteriza por diarrea moderada (2 a 3 días) la cual generalmente se autolimita, puede provocar vómito, fiebre, anorexia, dolor abdominal, cefalea y deshidratación moderada que no requiere

hospitalización, sin embargo una proporción de estas infecciones son asintomáticas (44).

Los astrovirus son virus de RNA de cadena sencilla y polaridad positiva (RNAs+), icosaédricos (**Fig.1, panel C**) no envueltos y pertenecen a la familia *Astroviridae* la cual se divide en dos géneros: *Mamastrovirus* que incluye astrovirus que infectan mamíferos y el género *Avastrovirus* que incluye astrovirus que infectan aves y causan enfermedades intestinales y extraintestinales (39).

El genoma es de 6.8 kb (gRNA) y contiene un RNA subgenómico de 2.4 kb (sgRNA); el gRNA está organizado en tres marcos de lectura abiertos, dos localizados hacia el extremo 5' denominados ORF1a y ORF1b, que codifican para las proteínas no estructurales y un tercer marco de lectura localizado en el extremo 3', denominado ORF2 presente tanto en el gRNA como en el sgRNA, el cual codifica para las proteínas de la cápside (39).

Otro virus importante en la etiología de la gastroenteritis aguda son los calicivirus, cuyo genoma de 7.5 kb también es de RNAs+, icosaédricos (**Fig.1, panel D**) y pertenecen a la familia *Caliciviridae*, la cual se divide en cuatro géneros: Norovirus, Sapovirus (infectan humanos) y Vesivirus, Lagovirus (infectan animales) (6); son altamente infecciosos y el cuadro clínico que provocan es generalmente moderado y autolimitado, son igualmente frecuentes tanto en países en vías de desarrollo como países desarrollados (9).

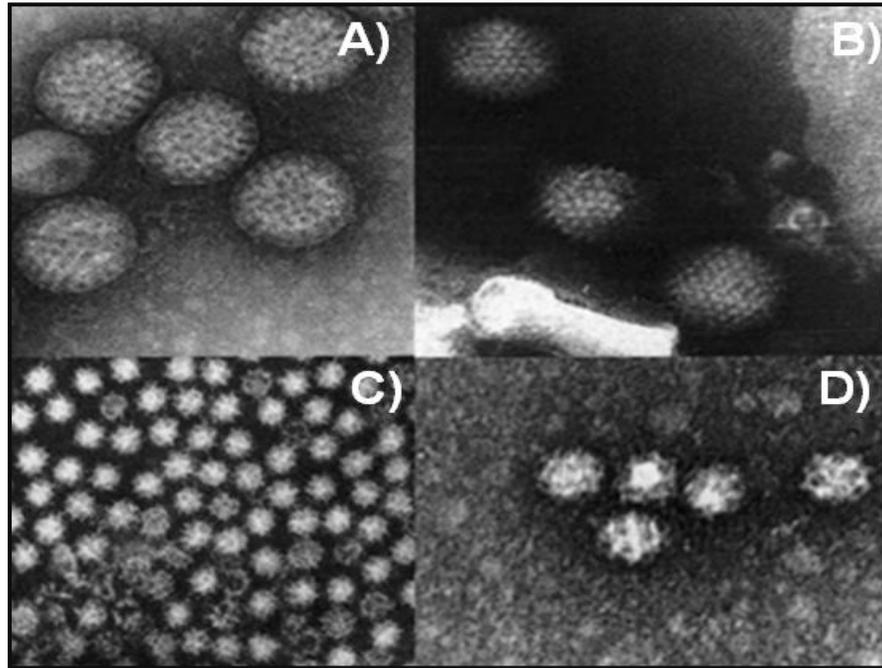


Figura 1.- Micrografía electrónica de virus entéricos: A) Rotavirus humano; B) Adenovirus entérico; C) Astrovirus; D) Calicivirus humano (Wilhelmi, et.al.2003).

1.2 BACTERIAS PRODUCTORAS DE DIARREA

En cuanto a la gastroenteritis aguda en niños de origen bacteriano, los principales agentes etiológicos son *Escherichia coli* y *Shigella spp.*, la primera representa un problema importante de salud pública en países en vías de desarrollo, ambos microorganismos causan un cuadro clínico moderado y de remisión espontánea, sin embargo cuando la infección involucra órganos extraintestinales se pueden presentar complicaciones serias y una enfermedad crónica (68). Se conocen cinco variantes de *E. coli* productoras de diarrea, una de ellas la enteropatogénica (EPEC) (**Fig. 2, panel A**) es considerada una de las principales causantes de diarrea en menores de 2 años de edad, además de considerarse como causante de diarrea persistente (50,57); la variante enterohemorrágica (EHEC) provoca un cuadro clínico caracterizado por vómito, diarrea que conduce a deshidratación moderada a severa, con una duración de 3 a 4 días, generalmente se autolimita y no provoca fiebre; es

común la coinfección de esta con otros patógenos entéricos llegándose a presentar en más del 40% de los casos, siendo comunes las infecciones mixtas con rotavirus y con otras bacterias como *V. cholerae*, *Campylobacter jejuni*, *Shigella spp.*, *Salmonella spp.*, y *Cryptosporidium*; la infección por ETEC es más frecuente en los periodos fríos del año (64). *Escherichia coli* enteinvásiva (EIEC) se considera un verdadero patógeno intracelular capaz de invadir y replicarse dentro de las células epiteliales y macrófagos. EIEC y *Shigella spp.*, son bioquímica, genética y patogénicamente semejantes, EIEC puede causar una colitis inflamatoria y ocasionalmente disentería y en la mayoría de los casos una diarrea acuosa indistinguible a la que provocan otras *Escherichia coli* patógenas (37).

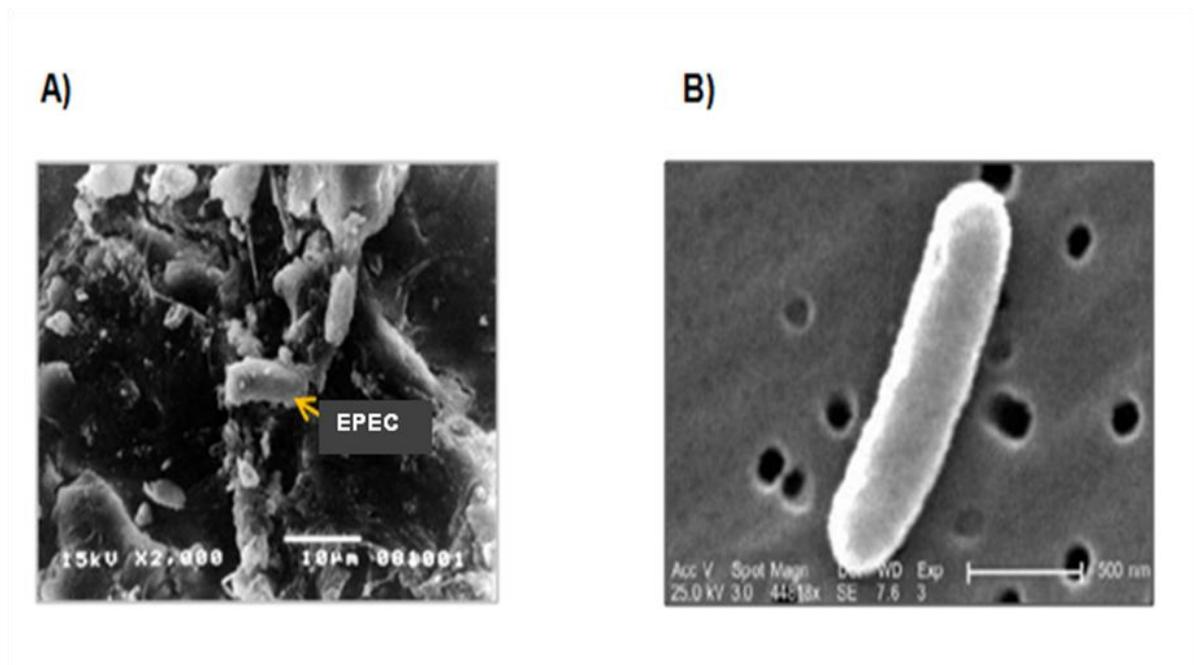


Figura 2.- Micrografía electrónica de cepas de *Escherichia coli* productoras de diarrea. A) *E. coli* enteropatogénica (EPEC) (1), B) *E. coli* enterotoxigenica (ETEC) (CDC/ Janice Haney CarrDC).

1.3 PARÁSITOS ASOCIADOS A GASTROENTERITIS AGUDA

Con respecto a la etiología de origen parasitario, se reconoce como la principal causa a nivel mundial a *Entamoeba histolytica* (**Fig. 3**), protozoo capaz de invadir la mucosa intestinal y otros órganos, principalmente el hígado, produce daño celular y tisular, es responsable de la amibiasis, cuya forma invasiva es más común en países en vías de desarrollo (14). En México representa un problema serio de salud pública, donde aún es endémica (60); esta infección es más frecuente en regiones tropicales, climas cálidos y templados, en áreas pobres y mal saneadas donde es común el hacinamiento y el mal manejo de excretas así como el acceso limitado al uso de agua potable (12). La manifestación de la enfermedad puede ir desde una infección asintomática hasta una enfermedad fatal diseminada, presentándose alguno de estos cuatro síndromes: colonización asintomática, colitis amebiana aguda caracterizada por dolor abdominal leve, heces con sangre y fiebre; colitis fulminante la cual ocurre frecuentemente en niños quienes presentan un cuadro de dolor abdominal difuso, diarrea sanguinolenta profusa y fiebre; y ameboma el cual se presenta como una lesión completamente asintomática o se acompaña de disentería sintomática, los síndromes diarreicos y disentéricos se presentan en el 90% de los casos de amibiasis intestinal (14).

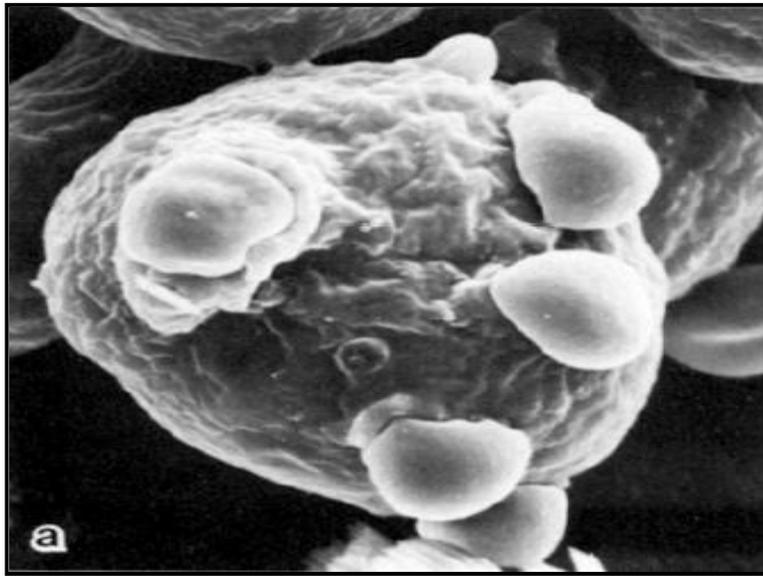


Figura 3.- Microscopia electrónica de trofozoitos de *Entamoeba histolytica* (Espinosa et.al. 2000).

2 ANTECEDENTES

La población infantil es un grupo altamente susceptible a las infecciones gastrointestinales agudas, las cuales representan un problema significativo de salud a nivel mundial (67). Dentro de los patógenos responsables de provocar este tipo de infecciones se hallan los virus, los cuales se consideran como los principales agentes etiológicos (38) y entre los más importantes se encuentran los astrovirus y calicivirus humanos (4).

Los astrovirus humanos (HAstV) fueron detectados por microscopía electrónica (EM) por Appleton y Higgins en 1975 en muestras de niños con diarrea en un brote identificado en una unidad de cuidados maternos (44), y son reconocidos como la segunda causa de gastroenteritis viral infantil a nivel mundial después de rotavirus motivo por el cual se consideran de gran importancia médica (67). En humanos se han identificado ocho serotipos (HAstV1 a HAstV8) siendo el serotipo 1 el más frecuente a nivel mundial y la distribución de estos varía por región (28).

Diversos estudios epidemiológicos realizados en todo el mundo han reportado una prevalencia de estos del 2 al 16% en niños hospitalizados con diarrea (77), más de 10% en casos esporádicos y de 0.5 a 15% de brotes de gastroenteritis (18,72); sin embargo en otros estudios se ha encontrado a norovirus como el principal patógeno causante de brotes de gastroenteritis aguda (78.1%) y a rotavirus, adenovirus y astrovirus en un 4.9%, 1% y 0.5% respectivamente (71). Los calicivirus humanos son considerados también una de las principales causas de gastroenteritis aguda a nivel mundial, son virus altamente infecciosos y responsables de brotes de gastroenteritis en comunidades cerradas, motivo por el cual ha incrementado el impacto de estos virus en la salud pública (25, 76). Se han identificado dos géneros en humanos:

Sapovirus y Norovirus considerando a este último como la principal causa de gastroenteritis epidémica en niños y adultos (72).

2.1 MÉTODOS DIAGNÓSTICOS PARA LA DETECCIÓN DE PATÓGENOS

CAUSANTES DE DIARREA

2.1.1 ASTROVIRUS Y CALICIVIRUS

Para la detección de virus en muestras de heces, se han desarrollado varios métodos, tales como microscopia electrónica, inmunofluorescencia y ELISA (80), dentro de ellos, el más comúnmente utilizado es la microscopia electrónica (EM), sin embargo tiene varias desventajas, entre ellas es que es un método cuya sensibilidad oscila de 10^6 a 10^7 partículas virales por gramo de heces, y en pacientes cuya excreción de partículas virales es menor esto representa un problema además de costoso y poco accesible, pues implicaría que cada laboratorio de análisis clínicos de los hospitales tendría que tener un microscopio electrónico para la identificación de partículas virales, sin dejar de mencionar que no es posible determinar el serotipo presente en la muestra analizada.

En estudios de corte epidemiológico se han empleado ensayos inmunoenzimáticos para la identificación de astrovirus (43,46,74) en los que se utiliza un anticuerpo monoclonal para capturar el antígeno viral y un antisuero policlonal para la detección del anticuerpo, donde un gran número de muestras pueden ser probadas, sin embargo recientemente la RT-PCR ha sido utilizada como un método extremadamente sensible para detectarlos en muestras de heces y para llevar a cabo este último, la mayoría de los estudios han utilizado como secuencias “blanco” la región no traducida 3' (RNT) o el ORF2 por ser una región altamente conservada (5) y ha demostrado ser más eficiente para la detección de infecciones subclínicas

(8); así mismo se ha empleado otra región localizada en el ORF1a también conservada entre los ocho serotipos, siendo esta la más utilizada por distintos grupos de investigación para serotipificar muestras provenientes de brotes o bien de casos aislados antes de realizar ensayos de genotipificación.

Por otro lado, la identificación de Calicivirus ha sido difícil debido a que son virus que no pueden ser cultivados en células (27) lo cual ha limitado los métodos de diagnóstico; por lo que se han utilizado diferentes métodos no moleculares tales como microscopia electrónica (EM) y técnicas inmunológicas (ELISA, ensayos de aglutinación), sin embargo se consideran poco sensibles y específicos (35). Actualmente se han propuesto ensayos moleculares tales como la RT-PCR y la hibridación tipo dot blot para la identificación de calicivirus basados en la secuencia genómica de estos virus y la mayoría utiliza como blanco a la secuencia del gen de la RNA polimerasa localizada dentro del ORF1 y las variaciones encontradas dentro de esta secuencia ha permitido clasificar a los Norovirus en dos grupos genéticos principales (Genogrupo I y II) (75). La mayoría de los ensayos de RT-PCR propuestos para la identificación de virus (astrovirus, norovirus) son monoplex, utilizan un solo par de oligonucleótidos y pueden detectar únicamente un virus blanco, por lo que este método, considerando que los virus gastroentéricos pueden causar cuadros clínicos similares se vuelve poco práctico además de ser altamente elevado en costo y tiempo; en contraste con los ensayos del tipo de RT-PCR múltiple, el cual incorpora diversos pares de oligonucleótidos en un mismo tubo permitiendo la amplificación simultánea de diferentes blancos en una sola reacción (71). Por lo que la utilización de un método molecular múltiple para la identificación de virus y otros microorganismos gastroentéricos, propuesta de nuestro trabajo, puede constituir una herramienta útil para el diagnóstico de estos microorganismos,

representando una disminución en costo y tiempo en comparación con los métodos utilizados convencionalmente.

Existen diversos estudios en México y otras partes del mundo que sustentan la utilización de métodos moleculares para la identificación de virus gastroentéricos, siendo uno de los primeros estudios el que llevaron a cabo Belliot y cols (4) en donde se utilizó la RT-PCR para la identificación de astrovirus y norovirus a partir de muestras de heces de niños y adultos con gastroenteritis, en este trabajo, las muestras de heces fueron analizadas inicialmente por el método de ELISA para identificar rotavirus y adenovirus encontrando un total de 617, de las cuales solo en 75 se corroboró la presencia de partículas virales por microscopía electrónica y estas fueron analizadas por RT-PCR. Los oligonucleótidos utilizados para la identificación de astrovirus fueron Mon- 340 y Mon- 348 que amplifican una secuencia de 289 pb conservada entre todos los serotipos localizada en el ORF1a ; la identificación de norovirus se llevó a cabo mediante la síntesis de cDNA usando el oligonucleótido SR33 y para la reacción de PCR los oligonucleótidos SR46 (GII) en combinación con SR48, SR50 y SR52 (GI) que amplifican un producto de 123 pb, del total de 75 muestras analizadas por RT-PCR 15 fueron positivas para astrovirus y 24 para norovirus, con lo que concluyen que a través de este método lograron la identificación de las cepas circulantes en el lugar del estudio y hacen referencia a la similitud encontrada con cepas en otras partes del mundo.

Al respecto, el trabajo realizado por Maldonado y cols (43) en población infantil Maya, en el cual estudiaron la prevalencia de astrovirus principalmente y otros microorganismos (rotavirus, adenovirus, *Salmonella*, *Shigella* y *Campylobacter*) y la asociación de estos con la presencia de síntomas gastrointestinales comunes, revelaron que la identificación de estos microorganismos por ELISA y su confirmación por RT-PCR, permitieron determinar que astrovirus fue el agente con

mayor prevalencia (7%) en niños con diarrea comparado con rotavirus o adenovirus, siendo incluso la prevalencia de astrovirus mayor a la publicada en estudios de otras partes del mundo (**Tabla 1**), así mismo encontraron a *Campylobacter* como segundo patógeno más prevalente en esta población, siendo este uno de los más frecuentemente identificado en infecciones mixtas junto con astrovirus (43), concluyendo que la discordancia entre ambos métodos se debía a que los resultados por ELISA indican la presencia de antígenos solubles y asociados a partículas virales mientras que el ensayo de RT-PCR detecta únicamente ácido nucleico en partículas virales intactas.

Otro estudio en el que se utilizó la RT-PCR para la identificación de astrovirus, fue el llevado a cabo en población infantil de la zona sur de la Ciudad de México (77) cuyo objetivo fue determinar la frecuencia de infección por astrovirus evaluada por RT-PCR y comparar la sensibilidad y especificidad de este con el ELISA durante el periodo de diarrea. Se analizaron 365 muestras de heces de niños con diarrea por RT-PCR y ELISA para determinar la prevalencia de astrovirus humanos así como la coinfección con otros patógenos entéricos, identificándose únicamente 69% del total de las muestras (18 positivas de 31 muestras) positivas para astrovirus por ELISA en comparación con el 84% por RT-PCR (26 positivas de 31 muestras) empleando los oligonucleótidos específicos Mon/340 y Mon/348 previamente reportados en la literatura (5,23,77) así como otros oligonucleótidos específicos para tipificar las muestras positivas por RT-PCR. Así mismo, lograron identificar coinfecciones con calicivirus, rotavirus, especies de *Shigella*, *Salmonella* y *Escherichia coli* enteropatógena (77) llegando a la conclusión de que la RT-PCR es un método más sensible y específico en comparación con el ELISA para la identificación de astrovirus y sugieren que la hipervariabilidad de los epitopes de astrovirus puede

contribuir a la baja sensibilidad de la tipificación por el método de ELISA en comparación con la RT-PCR.

Además de los trabajos antes mencionados, se publicó un trabajo el cual se llevó a cabo en cinco estados del país (San Luis Potosí, Tlaxcala, Mérida, Monterrey y D.F) el cual tuvo como objetivo establecer la prevalencia y diversidad genética de astrovirus humanos en niños con y sin diarrea, en el cual se analizaron dos grupos por ELISA y confirmada por microscopía electrónica, un grupo de 710 muestras de heces (355 diarreicas y 355 no diarreicas) negativas a rotavirus y el segundo conformado por 240 muestras (167 de niños sintomáticos y 73 de niños asintomáticos) positivas a rotavirus y se encontró que la prevalencia de astrovirus en las muestras negativas a rotavirus de niños sintomáticos fue de 5.4% (19 de 355) y de 2.5% (9 de 355) en los niños asintomáticos, mientras que en el caso de las muestras positivas a rotavirus de niños asintomáticos la prevalencia de astrovirus fue de 3% (5 de 167) y de 2.7% (2 de 73) en niños asintomáticos, en el mismo estudio, los autores determinaron el genotipo de las muestras positivas a astrovirus por RT-PCR usando oligonucleótidos que amplifican una región variable del ORF2, lo que les permitió definir los serotipos. Los resultados de la genotipificación mostraron la circulación en México de 7 de los 8 serotipos de astrovirus, presentándose una mayor prevalencia del serotipo 1 y 3 en niños con diarrea en algunos de los estados, mientras que el serotipo 8 se encontró únicamente en la Ciudad de México, Monterrey y Mérida (45). Los porcentajes encontrados en este estudio, probablemente ya han sufrido cambios a la fecha si se considera que la vacunación contra rotavirus en el sistema de salud es una práctica más común dentro de la población infantil debido a la incorporación de esta vacuna en el esquema de vacunación nacional, por lo que sería importante continuar con estudios de corte

epidemiológico que permitan establecer con más claridad la prevalencia de los serotipos circulantes en la población infantil mexicana .

Para la identificación de calicivirus también se ha propuesto el uso de métodos moleculares como la RT-PCR en diversos estudios, uno de ellos es el trabajo realizado por Farkas y cols (16) en población mexicana, cuyo objetivo fue determinar la incidencia de infección por calicivirus en niños y definir la identidad genética de las cepas. Los autores analizaron 115 muestras de heces (115 y 66 de niños con y sin diarrea respectivamente) por RT-PCR utilizando los oligonucleótidos p 289/290 (35) que identifica tanto norovirus como sapovirus y amplifica un producto de 319 pb y 331 pb respectivamente, encontrándose que 22 (19%) de las 115 muestras de niños con diarrea y 5 (7%) de las 66 muestras de niños sin diarrea amplificaron productos del tamaño esperado de 319 pb (norovirus) y 331 pb (sapovirus); estos productos fueron clonados y secuenciados y la comparación de las secuencias encontradas en niños mexicanos mostraron que 9 (60%) de las 15 muestras diarreicas y 3 (60%) de las 5 e muestras de heces no diarreicas corresponden a norovirus y 6 (40%) y 2 (40%) respectivamente a sapovirus; sin embargo al realizar el análisis filogenético, los autores reportan dos nuevas cepas en niños mexicanos que pueden ser asignadas a un nuevo grupo genético, llevándolos a concluir que el hallazgo continuo de nuevas cepas de calicivirus con identidades genéticas no reconocidas sugiere que este virus tiene una diversidad genética más amplia de lo que se predijo previamente; además la observación de que causa un gran número de infecciones asintomáticas lo hace aún más interesante ya que no se sabe si la inmunidad del huésped o la virulencia de la cepa juegue un papel importante en las manifestaciones clínicas.

AÑO DE ESTUDIO	POBLACIÓN EN DONDE SE REALIZÓ	MÉTODO	PREVALENCIA ASTROVIRUS /
		EMPLEADO	CALICIVIRUS
Maldonado., et.al.1998.	POBLACIÓN INFANTIL MAYA	RT-PCR	51-67% (ASTROVIRUS)
Walter, J.E., et.al. 2001.	SUR DE - CD. MÉXICO	ELISA	84% (HAstV- RT-PCR)
		RT-PCR	69%(HAstV- ELISA)
Méndez, T.M., et.al.2004	MÉXICO (D.F, TLAXCALA	ELISA	3% HAstV-MUESTRAS DIARREICAS
	MONTERREY, SAN LUIS POTOSÍ, MÉRIDA)	RT-PCR	
Jiang, X., et. al. 2000	CD. MÉXICO	RT-PCR	60% Norovirus, 60% Sapovirus
Yuen, W.K.L., et.al. 2001	AUSTRALIA	RT-PCR Múltiple	96.8% Norovirus
Belliot, G., et.al. 2000	FRANCIA	RT-PCR	HAstV (47%), Norovirus (37.5%)

Tabla 1. Comparación de métodos de detección para astrovirus y calicivirus en México.

Por otra lado, Yuen y cols. (82) desarrollaron un ensayo de RT-PCR múltiple semi-anidada capaz de detectar y diferenciar simultáneamente el genogrupo I y II de norovirus a partir de muestras de heces, los oligonucleótidos utilizados fueron diseñados para amplificar las regiones más conservadas del gen de la RNA polimerasa y los resultados obtenidos se compararon por microscopia electrónica (EM), para ello se analizaron 95 muestras de heces positivas para norovirus por EM y por RT-PCR. El ensayo de RT-PCR fue capaz de detectar norovirus en 92 (96.8%) de las muestras analizadas pero fallo para detectar 3 muestras positivas para norovirus por EM, sin embargo al analizar las 95 muestras por EM, únicamente 16 (16.8%) del total fueron positivas, con lo cual concluyeron que el ensayo de RT-PCR múltiple desarrollado fue aproximadamente seis veces más sensible que la EM, además de ser un método suficientemente específico para identificar ambos

genogrupos y un método rápido en comparación con la EM, por lo que este antecedente apoya fuertemente que la RT-PCR múltiple puede facilitar la identificación de norovirus y proveer información valiosa de la incidencia del virus en el marco de la salud pública.

Otro estudio similar al anterior y que permitió la identificación de norovirus y astrovirus, fue el realizado en Japón en el 2003 (75) cuyo objetivo fue el desarrollo de una RT-PCR múltiple de un solo paso para la detección simultánea de norovirus GI y GII, sapovirus y astrovirus en 377 muestras de heces recolectadas de pacientes pediátricos con datos clínicos de gastroenteritis aguda, en este estudio previamente las muestras fueron analizadas por ELISA, resultando negativas a rotavirus y adenovirus entéricos. En el estudio se utilizaron 4 pares de oligonucleótidos para la identificación de los virus de interés y los resultados permitieron la identificación de 62 muestras positivas, 42 a norovirus GII, 16 a sapovirus y 4 a astrovirus de las 377 y no se encontraron infecciones mixtas, por lo que los autores concluyeron que la RT-PCR es un método diagnóstico para la detección de virus RNA de mayor sensibilidad que la microscopia electrónica, ELISA y PCR anidada (**Fig. 4**).

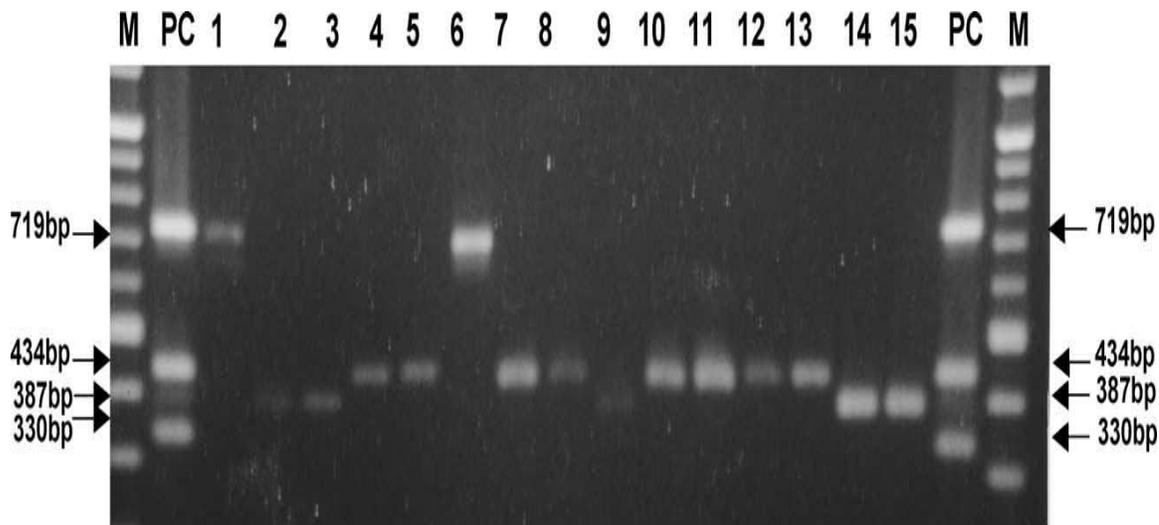


Figura 4.- Identificación por RT-PCR múltiple de norovirus, sapovirus y astrovirus.

Resultado de la RT-PCR múltiple para la identificación de muestras positivas a norovirus GII (carriles 2,3,9,14 y 15); sapovirus (carriles 4,5,7,8 y 10-13) y astrovirus (carriles 1y 6); el carril PC corresponde a la mezcla de norovirus GI (330 pb) y GII (387 pb), sapovirus (434 pb) y astrovirus (719 pb); (M) marcador de tamaño molecular (*Ushijima, et. al. 2003*).

2.1.2 BACTERIAS CAUSANTES DE DIARREA

En relación a las infecciones provocadas por bacterias, diversos estudios epidemiológicos han demostrado que el 20-50% de los casos de gastroenteritis aguda son causados por bacterias o parásitos (58), sin embargo ambos tipos de patógenos se han encontrado en coinfecciones con los principales virus causantes de gastroenteritis aguda (66). *Escherichia coli* productora de diarrea (DEC) es el principal agente etiológico de diarrea infantil y representa un problema de salud pública de gran importancia en países en vías de desarrollo como el nuestro; se conocen seis variantes principales en base a sus características moleculares, clínicas y patológicas las cuales se describen en la **Tabla 2**.

Diversos estudios epidemiológicos a nivel mundial han asociado cinco categorías de *Escherichia coli* con cuadros diarreicos (Scaletsky): la variedad enteropatogénica

(EPEC); enteroagregativa (EAEC); enterotoxigénica (ETEC); enteroinvasiva (EIEC) y la productora de la toxina Shiga (STEC), considerando la cepa enteropatogénica (EPEC) como la principal causa de diarrea infantil a nivel mundial en países en vías de desarrollo (21). Los mecanismos de virulencia que caracterizan estas categorías de *Escherichia coli* están genéticamente codificadas por DNA cromosomal, plasmidico y bacteriófagos y están representados por genes de patogenicidad que caracterizan cada una de las categorías (**Tabla 2**) (66).

TIPO	GEN DE PATOGENICIDAD	MECANISMO DE VIRULENCIA
<i>E. coli</i> enteroagregativa (EAEC)	<i>BfpA</i> ,	Adherencia enteroagregativa
<i>E. coli</i> enterohemorrágica (<i>E. coli</i> productora de toxina Shiga EHEC/STEC)	LT,ST; stx1, stx2	Toxina lábil, toxina estable, toxina Shiga
<i>E. coli</i> enteroinvasiva (EIEC)	<i>ipaH</i>	Mecanismo enteroinvasor
<i>E. coli</i> enteropatogénica (EPEC)	Eae, LEE	Adherencia
<i>E. coli</i> enterotoxigénica (ETEC)	ST,LT	Enterotoxina termoestable
<i>E. coli</i> adherente difusa (DAEC)	<i>bfpA</i> ,	Adherencia

Tabla 2. Clasificación de *Escherichia coli* productora de diarrea. Variantes de *E. coli* productoras de diarrea, sus genes de patogenicidad y mecanismos de virulencia que caracterizan a cada una de ellas (*kaper, et.al. 2004*).

La identificación de las variantes de *E. coli* productoras de diarrea generalmente se realiza en base a los diversos factores de colonización característicos de cada una de ellas, los diferentes métodos de identificación incluyen reacciones bioquímicas, serotipificación, ensayos fenotípicos basados en características de virulencia (50) algunos de estos métodos continúan siendo la prueba estándar para la identificación

de estos microorganismos, sin embargo en años recientes las sondas de DNA y actualmente la PCR han reemplazado a algunos de los métodos utilizados convencionalmente (57). La PCR se utiliza actualmente con frecuencia para la identificación de *Escherichia coli* y otras bacterias en diversos estudios epidemiológicos. El método de sondas de DNA es capaz de detectar los genes para toxinas y factores de colonización y tiene la ventaja de detectar ETEC en muestras con un largo periodo de almacenamiento, en las cuales pueden haber ocurrido cambios fenotípicos, sin embargo este procedimiento es difícil de adaptar en países en vías de desarrollo (50), otra desventaja es que requiere del uso de material radioactivo y demasiado tiempo para llevarlo a cabo, en cambio el uso de ensayos como la PCR múltiple ofrece una posibilidad práctica para la rápida identificación de *E. coli* productora de diarrea y especies de *Shigella*, pudiendo ser usada en el diagnóstico de rutina en el laboratorio, considerándose un método 100% sensible para la identificación de estos microorganismos (61).

Algunos estudios en los cuales se ha utilizado la PCR como un método para la identificación de *Escherichia coli* son el trabajo realizado por Scaletsky y cols (66) quienes desarrollaron dos métodos de PCR múltiple para identificar las cinco variedades de *E. coli* productora de diarrea así como *Shigella spp.*, en muestras de heces humanas (**Fig. 5**), y compararon los resultados por métodos de diagnóstico convencional como identificación bioquímica, serotipificación y hibridación con sondas de DNA específicas; siendo los blancos utilizados en este estudio para cada categoría: *eae* y *bfpA* para aislar EPEC, la sonda CVD432 para EAEC, *LT* y *ST* para ETEC, *stx1* y *stx2* para STEC y *ipaH* para EIEC y *Shigella spp.* Los autores, utilizaron dos métodos de PCR múltiple, en el primero se utilizaron tres pares de oligonucleótidos para identificar EPEC, EAEC y ETEC y en el segundo se utilizaron dos pares de oligonucleótidos para la identificación de ETEC, EIEC y *Shigella spp.*,

ambos métodos mostraron una especificidad y sensibilidad del 100% en comparación con los métodos convencionales para la detección de genes de virulencia, siendo efectivos para la detección directa de las diferentes variantes de DEC y *Shigella spp.*, y logrando la determinación correcta de los genes de virulencia de especies de *Shigella* y *E. coli diarreagenica* en todas las cepas analizadas (66).

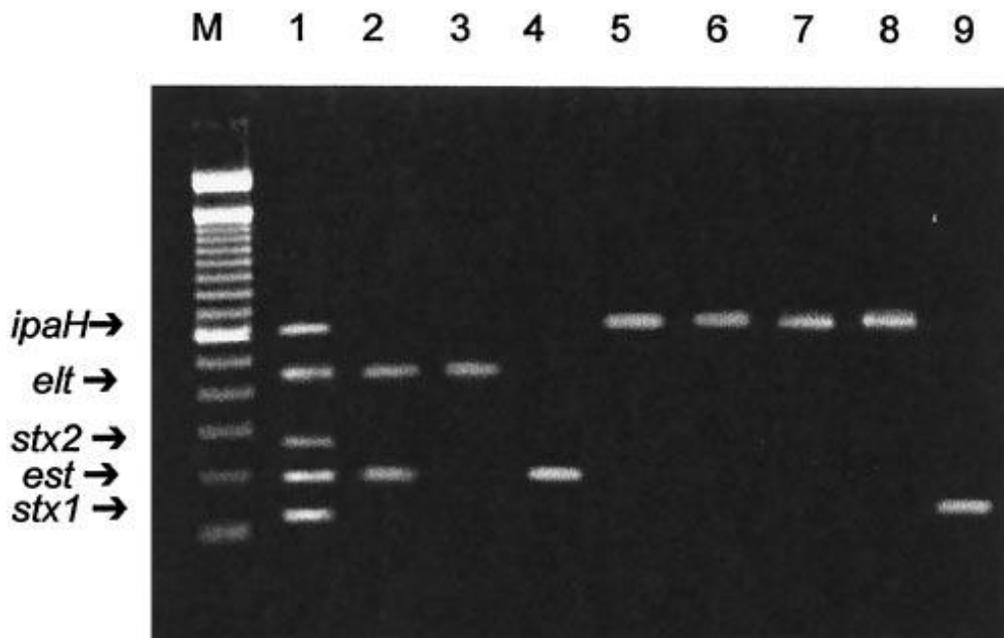


Figura 5.- PCR múltiple de variantes de *Escherichia coli*. PCR múltiple de cepas de referencia y heces de pacientes. Carril 1 ETEC (gen *LT* y *ST*), EIEC (*ipaH*) y STEC (*stx1* y *stx2*); Carril 2, ETEC (gen *LT* y *ST*); carril 3, ETEC (gen *LT*); carril 4, ETEC (gen *ST*); carril 5, EIEC (*ipaH*); carril 6, *S. flexneri* (*ipaH*); carriles 7-9, muestras de paciente 48 (*ipaH*), 75 (*ipaH*) y 127 (*stx1*) respectivamente. (Scaletsky, et.al. 2004).

Otro estudio en el cual se demuestra la utilidad del uso de la PCR, fue el realizado en Tanzania, en este, se utilizó la PCR múltiple para la identificación de las diferentes variedades de *Escherichia coli diarreagenica* (DEC) en muestras de heces de niños con diarrea aguda y crónica. Los oligonucleótidos utilizados en la reacción fueron dirigidos a amplificar la secuencia de genes que codifican para factores de

virulencia de cada una de las variantes (ETEC, EPEC, EHEC, EIEC y EAEC), lográndose la identificación de las diversas variantes de DEC; siendo la más prevalente EAEC (14.6%) de todos los casos de diarrea, EPEC fue la segunda variante más prevalente con un 4.6%, ETEC con 3.6% y no se identificó EIEC y EHEC. En base a los resultados obtenidos, los autores concluyeron que la PCR múltiple es un método molecular a través del cual se obtienen resultados rápidos y confiables con una alta sensibilidad y especificidad (50).

Por otra parte, Fujioka y cols (19) desarrollaron dos ensayos de PCR múltiple para detectar nueve genes asociados a virulencia de cinco categorías de *Escherichia coli* *diarreagenica* (DEC), haciendo un primer ensayo con cinco pares de oligonucleótidos y posteriormente un segundo ensayo con cuatro pares de oligonucleótidos más, con el que demuestran que los dos ensayos de PCR múltiple tienen una sensibilidad y especificidad del 100%, y comentan que el uso de una PCR convencional para la detección de los factores de virulencia para clasificar la cepa de *Escherichia coli* aislada en una de las cinco categorías es muy laborioso y consume tiempo, por lo que concluyen que el uso de la PCR múltiple reduce el costo de los reactivos y puede contribuir al diagnóstico de DEC en los laboratorios clínicos.

Un estudio en el cual se comparó el uso del método de PCR con métodos convencionales de diagnóstico como ELISA y cultivo en agar, fue el que llevaron a cabo Grys y cols (22) y que tuvo como objetivo la identificación de *Escherichia coli* *productora de toxina Shiga* (STEC) por estos métodos debido a que esta variante puede provocar desde una gastroenteritis hasta un síndrome urémico hemolítico y para su tratamiento está contraindicado el uso de antibióticos, por lo que el diagnóstico rápido es esencial, ellos propusieron un método altamente sensible y específico para la rápida identificación de este microorganismo, en el cual evaluaron el gen *St-x* a través de una PCR en tiempo real utilizando sondas de hibridación en

muestras de heces, las cuales también fueron analizadas por ELISA y cultivo en agar. Sus resultados mostraron una mayor identificación de STEC por PCR en comparación con los métodos convencionales, con lo que concluyen que el ensayo de PCR en tiempo real tuvo una sensibilidad y especificidad de 100% en comparación con los otros dos probados, además de tener la ventaja de que la identificación se llevó a cabo directamente de las muestras de heces y los resultados se obtuvieron el mismo día, por lo que proponen este método como una herramienta útil y altamente sensible y específica para un diagnóstico rápido.

Como ya se ha mencionado estos y otros estudios realizados en otras partes del mundo proponen a la PCR múltiple como un método molecular sensible, específico y rápido para la identificación de bacterias como *Escherichia coli* entre otras y han demostrado la enorme utilidad de este método en diversos estudios epidemiológicos y clínicos.

2.1.3 DETECCIÓN DE PARÁSITOS ASOCIADOS A GASTROENTERITIS AGUDA

El responsable de la amibiasis, *Entamoeba histolytica*, es considerado como otro de los patógenos responsables de diarrea en niños como se menciona anteriormente, y este es endémico en los países en vías de desarrollo (29), siendo una infección del tracto gastrointestinal humano (12) que es más letal en los extremos de la vida (11) y se considera la cuarta causa de muerte debida a un protozooario, después de malaria, enfermedad de Chagas y Leishmaniasis (12). Infecta aproximadamente al 10% de la población mundial con una elevada incidencia en países tropicales y subtropicales debido a las condiciones socioeconómicas y sanitarias poco favorables (11). En México, la amibiasis presenta una alta prevalencia ya que existen 16 millones de portadores, 1.3 millones de enfermos y ocurren de 10,000 a 30,000 muertes al año (12). Los grupos de riesgo incluyen viajeros, inmigrantes, individuos inmunocomprometidos y homosexuales (47), la forma infectante de *E. histolytica* es el quiste maduro tetranucleado, siendo la forma básica de infección la ingestión de estos a través de la vía ano-mano-boca, a través de agua o alimentos contaminados. *Entamoeba histolytica* es capaz de invadir la mucosa intestinal y puede invadir a otros órganos principalmente al hígado, y *Entamoeba dispar* una amiba morfológicamente similar a *E. histolytica* que coloniza el intestino humano ha sido recientemente reconocida como una especie separada con potencial no invasivo (14). La aceptación de ambas especies ha tenido un gran impacto en la forma de ver la amibiasis en particular en el manejo clínico y epidemiológico (60).

El diagnóstico clínico de amibiasis puede ser confirmado por identificación microscópica de los quistes o trofozoitos característicos en las heces (47); sin embargo el examen microscópico tienen alrededor de 60% de sensibilidad y puede dar falsos positivos debido a la identificación de especies de *Entamoeba* no patogénica, (10). Otro método diagnóstico es el examen de muestras fecales por

microscopía óptica, sin embargo este no es capaz de diferenciar *Entamoeba histolytica* de *Entamoeba dispar* a menos que se observe eritrofagocitosis (la presencia de eritrocitos ingeridos en los trofozoitos) considerada por algunos autores el criterio diagnóstico definitivo para *Entamoeba histolytica* (14).

La detección de anticuerpos ha sido otro método utilizado para el diagnóstico de *Entamoeba histolytica*, las pruebas serológicas para anticuerpos anti-amiba son positivas en aproximadamente 75% de pacientes con amibiasis colónica invasiva y en 90% de pacientes con absceso hepático amebiano. El método de ELISA es considerado la prueba serológica estándar de referencia para amibiasis, sin embargo en áreas de infección endémica, la elevada prevalencia de anticuerpos anti- amiba en la población en general reduce la utilidad de esta prueba serológica para el diagnóstico. (14). Aunque el método de ELISA ha sido la técnica utilizada como procedimiento diagnóstico de rutina y en estudios epidemiológicos, se prefiere actualmente el uso del método de PCR para la detección de *E. histolytica* y la diferenciación de especies patogénicas de las comensales por considerarse más sensible y específico que el método de ELISA (11). Sin lugar a duda la PCR resulta de gran utilidad para estudios epidemiológicos, por su gran sensibilidad, permite detectar casos que no son identificados por métodos convencionales, así como diagnosticar infecciones mixtas, lo que conlleva a una disminución de tratamientos innecesarios y la diseminación de formas infectantes en portadores asintomáticos (32). Existen diversos estudios en México y otras partes del mundo que proponen el uso de métodos moleculares como la PCR para la identificación de *Entamoeba histolytica/ dispar*, uno de ellos es un estudio que se llevó a cabo en el 2005 en la Ciudad de México en donde se determinó la frecuencia de la infección producida por *E. histolytica* y/o *E. dispar* en pacientes con HIV y SIDA comparando la PCR con el método diagnóstico convencional (EM). Los resultados por microscopía mostraron

que la incidencia de *E. histolytica* y/o *E. dispar* fue de 5.9%, en el grupo de pacientes con SIDA y de 2.9% en el grupo de HIV, mientras que por PCR fue de 25.3% y de 18.5 % respectivamente (**Tabla 3**) lo que demuestra que este método es mucho más sensible que el examen microscópico y puede existir en realidad una subestimación de la detección e incidencia de amibiasis (47).

INDIVIDUOS	EXAMEN MICROSCÓPICO	PCR
	<i>E. histolytica/E. dispar</i>	<i>E. histolytica/E.dispar</i>
SIDA	5.9%	25.3%
VIH	2.9%	18.5%

Tabla 3. Prevalencia de *Entamoeba histolytica/dispar* en pacientes con HIV/SIDA.

Comparación de los métodos de examen microscópico y PCR para la identificación de *E. histolytica* / *E. dispar* en pacientes con VIH/SIDA (Moran, et.al.2005).

Otro estudio en el cual se utilizó la PCR para la identificación de *Entamoeba histolytica/dispar*, fue el trabajo realizado por Ramos y cols., (60) en una población del estado de Morelos, que tuvo como objetivo establecer la prevalencia de *Entamoeba histolytica/dispar*; en este se analizaron un total de 290 muestras de heces para la identificación de ambas especies mediante PCR utilizando oligonucleótidos específicos (Psp5/3; NPsp5/3; SRPEh5/3, SRPEd5/3), los resultados reportan la identificación de *Entamoeba histolytica* en 33 de las 290 muestras (11.4%), *Entamoeba dispar* en 21 de las 290 muestras (7.2%) y ambas especies en 7 muestras (2.4%), concluyéndose que en esta comunidad existe una mayor prevalencia de *E. histolytica* en comparación con *E. dispar* (13.8 % vs 9.6%) (**Tabla 4**). Los trabajos mencionados previamente forman parte de los diversos

estudios realizados en México, que proponen un método molecular como la PCR para la identificación de ambas especies de *Entamoeba*.

PREVALENCIA DE <i>Entamoeba histolytica</i> y <i>Entamoeba dispar</i>	
PARÁSITO IDENTIFICADO	No. DE MUESTRAS (%)
Ninguno	94 (32.4%)
<i>E. histolytica</i>	33 (11.4%)
<i>E. dispar</i>	21 (7.2%)
<i>E. histolytica</i> y <i>E. dispar</i>	7 (2.4%)
Otros protozoarios	135 (46.6%)
Total	290

Tabla 4. Prevalencia de *E. histolytica* y *E. dispar* evaluada por PCR. Porcentaje de muestras analizadas por PCR para la identificación de *E. histolytica* y *E. dispar* (Ramos, et.al.2005).

Ahora bien, de los estudios realizados en otras partes del mundo que utilizan métodos moleculares para la identificación de las distintas especies de *Entamoeba* se encuentra el estudio realizado en el 2006 por Hamzah y cols. (29) en el cual se desarrolló un ensayo de PCR de una única reacción para la detección y diagnóstico diferencial de las tres especies de *Entamoeba* encontradas en humanos idénticas morfológicamente (*E. histolytica*, *E. dispar* y *E. moshkowskii*). Para la reacción de PCR se utilizó un oligonucleótido “sentido” basado en la secuencia de la región central del gen de la subunidad rRNA pequeña que es conservada en los tres tipos de especies y los oligonucleótidos “anti-sentido” basados en las secuencias específicas de la subunidad rRNA pequeña de cada una de las tres especies, los cuales generan un producto de 166 pb, 752 y 580 para *E. histolytica*, *E. dispar* y *E.*

moshkowskii respectivamente. La PCR se llevo a cabo combinando los oligonucleótidos en una sola mezcla de reacción, lográndose identificar 4 positivas para *E. histolytica* y 6 para *E. dispar* en un total de 10 de las 30 muestras clínicas analizadas concluyendo que el hecho de que solo un tercio del total de las muestras fueran positivas indica que pueden existir otras especies en ellas, por lo cual consideran importante el desarrollo de métodos de diagnóstico moleculares para otras especies comensales encontradas en humanos, a pesar de su explicación, demuestran que el ensayo es sensible detectando menos de 91 pg de DNA para *E. histolytica* y *E. dispar* y 9.5 pg para *E. dispar*.

Otro estudio importante como antecedente para este trabajo, fue el llevado a cabo en el 2008 por Stark y cols. (70) quienes realizaron una comparación de dos kits comerciales de ELISA (CELISA PATH y TechLab) con el método de PCR para el diagnóstico de infección por *Entamoeba histolytica* a partir de muestras de heces. Se analizaron un total de 279 muestras conteniendo el complejo (*E. histolytica*, *E. dispar* y *E. moshkowskii*), todas las muestras fueron probadas con ambos kits de ELISA y por PCR utilizando oligonucleótidos que amplifican una secuencia de la subunidad ribosomal pequeña. Los resultados obtenidos mostraron que cuando usaron como referencia la PCR, el kit CELISA PATH mostró 28% de sensibilidad y 100 % de especificidad y el TechLab no fue útil para la identificación de *Entamoeba histolytica* y no logro identificar una muestra positiva a *E. histolytica* por PCR además de mostrar reactividad cruzada en tres muestras. Los resultados cuantitativos de la PCR y ELISA evidenciaron que los kits de ELISA fueron 1000 a 10,000 veces menos sensibles y que no son útiles para la identificación de *Entamoeba histolytica* en muestras de heces en pacientes en regiones geográficas en donde este parasito no es endémico.

Carneiro y cols. en el 2007 (10), evaluaron el uso de la PCR para la detección y diferenciación de *E. histolytica/dispar* a partir de heces en comparación con el coproantígeno comercial de ELISA (Techlab, Inc., Blacksburg, VA); la PCR se basó en las secuencias de repetidos en tándem de los DNAs extracromosomales de *E. histolytica* y *E. dispar* utilizando oligonucleótidos específicos para cada una, cada grupo de oligonucleótidos fue usado para amplificar un fragmento de 132 pb de *E. histolytica* y un fragmento 96 pb de *E. dispar* (**Fig. 6**). En la estandarización se utilizó DNA de trofozoitos cultivados de ambos parásitos usando un mínimo de 5 trofozoitos o 40 fentogramos de DNA; las muestras de heces negativas por examen microscópico fueron positivas por PCR para *E. histolytica* y *E. dispar* confirmando la baja sensibilidad del examen microscópico en comparación con la PCR (11). Del total de 127 muestras de heces, 27 muestras fueron positivas (21%) para el complejo *E. histolytica/E. dispar* por examen microscópico de las cuales, únicamente 11 fueron positivas por PCR Múltiple, 9 identificadas como positivas para *E. dispar* y 2 para *E. histolytica* y no se encontraron coinfecciones (**Tabla 5**). De las muestras en las que no se identificó el complejo *E. histolytica/E. dispar* por examen microscópico, tres fueron identificadas como *E. dispar* y una como *E. histolytica* cuando fueron analizadas por PCR Múltiple.

EXAMEN MICROSCOPICO	PCR- MÚLTIPLE			Total
	<i>E. histolytica</i>	<i>E. dispar</i>	Negativo	
Complejo <i>E. histolytica</i>/<i>E. dispar</i>	02	09	16	27
Otros parásitos	01	03	34	38
Negativo	00	02	60	62
Total	03	14	110	127

Tabla 5. Análisis de PCR Múltiple y examen microscópico usando muestras de heces (Carneiro, et.al.,2007).

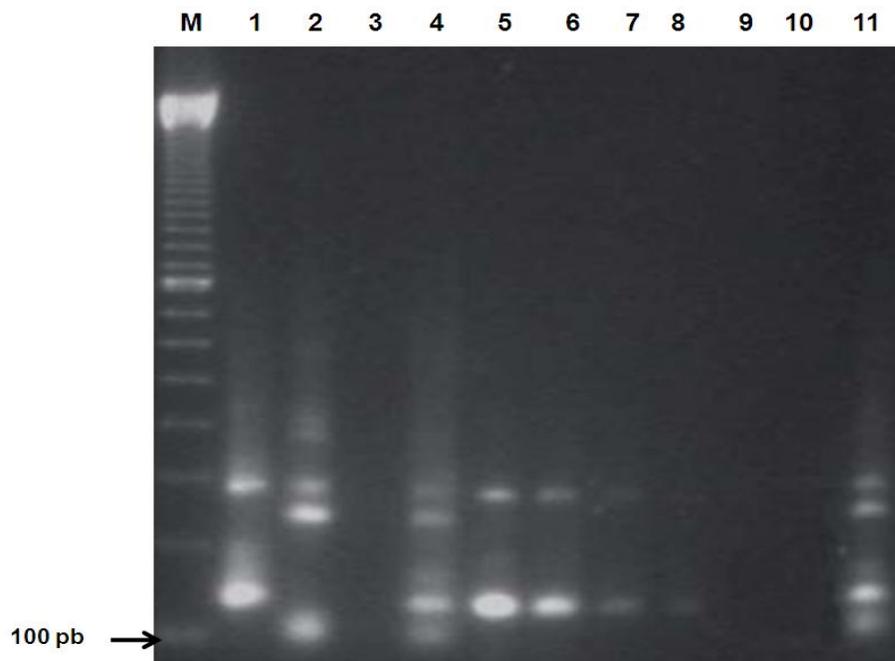


Figura 6.- Límite de detección de *E. histolytica* y *E. dispar* por PCR múltiple. Carriles 1 y 2, controles positivos de *E. histolytica* y *E. dispar* respectivamente; carril 3, control negativo; carril 4, control *E. histolytica* y *E. dispar*; carril 5, 2 ng de DNA; carril 6 a 9 DNA (400 fg ,80 fg, 40 fg ,4 fg respectivamente y carril 10 4 fg DNA; carril 11, control *E. histolytica* y *E. dispar* (Carneiro, et.al.2007).

Y tal vez, el estudio más importante como antecedente de este trabajo, fue el realizado por Haque y cols. (32) el cual tuvo como objetivo el diseño y evaluación de un ensayo de PCR múltiple para el diagnóstico simultáneo de tres parásitos protozoarios *Entamoeba histolytica*, *Giardia Intestinalis*, *Cryptosporidium spp.*, utilizando sondas específicas de especie. Los resultados se compararon con la PCR en tiempo real monoplex y un método estándar ELISA, en el cual se analizaron 129 muestras, en estas se había confirmado la presencia de los tres patógenos a identificar por PCR y ELISA. Para la reacción de PCR se utilizaron oligonucleótidos diseñados en base al gen de la subunidad ribosomal pequeña y sondas Taqman específicas para cada uno de los parásitos, los resultados mostraron que la PCR múltiple en tiempo real en comparación con el método estándar tuvo una sensibilidad del 86% (36/42) mientras que para el ensayo de PCR monoplex la sensibilidad fue de 95% (40/42) para la detección de *Entamoeba histolytica*. La sensibilidad de ambos ensayos fue de 98% y 99% respectivamente. Para *G. intestinalis* el ensayo de PCR múltiple y monoplex tuvo una sensibilidad del 89% y 91% respectivamente en comparación con el método estándar. Y la sensibilidad de ambos métodos fue de 97% y 99% respectivamente, para *Cryptosporidium spp.* la sensibilidad fue de 90 y 94% y la especificidad de 100% para la PCR múltiple y monoplex respectivamente, concluyéndose que la PCR múltiple en tiempo real para estos tres parásitos constituye una alternativa útil para el diagnóstico.

3 JUSTIFICACIÓN

Los estudios citados anteriormente han servido de base para comenzar a entender la importancia y diversidad de los patógenos gastrointestinales, sin embargo es necesario llevar a cabo estudios en diversas localidades geográficas con el fin de generar información epidemiológica que sirva de base para el desarrollo de estrategias preventivas. Esto es particularmente relevante para los estudios realizados con astrovirus, ya que la introducción en México de la vacuna Rotateq contra rotavirus ayudará a controlar las gastroenteritis causadas por estos, pero no se ha considerado el efecto que este evento podría causar en las enfermedades ocasionadas por otros virus gastrointestinales y la alteración que esta situación podría acarrear en el patrón epidemiológico de estos agentes. Tampoco se ha podido predecir el tipo de cambio sobre los porcentajes de estos patógenos en posibles infecciones mixtas, por lo que se hace necesario explorar la presencia de agentes patógenos causantes de gastroenteritis en infantes como astrovirus, calicivirus, bacterias del tipo *E. coli*, así como de *E. histolytica* en la Ciudad de México, en particular en algunas zonas de la ciudad con altos índices de pobreza e inadecuadas condiciones sanitarias, situación idónea para la aparición de cuadros diarreicos provocados por estos microorganismos. Estas razones hacen indispensable la aplicación de ensayos moleculares más sensibles que coadyuven a la identificación precisa de estos patógenos, lo cual facilitaría la realización de estudios de corte epidemiológico para la aplicación de medidas preventivas adecuadas que permitan controlar las enfermedades causadas por estos organismos, siendo esto uno de los objetivos que nos llevaron a proponer la siguiente hipótesis de trabajo.

4 HIPÓTESIS

Se identificarán los diversos patógenos causantes de gastroenteritis aguda en heces en la población infantil, a través de la implementación de una PCR Múltiple.

Para demostrar esta, nos planteamos los siguientes objetivos:

5 OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GENERAL

Desarrollar una PCR múltiple que permita detectar simultáneamente en muestras de heces, la presencia de patógenos entéricos, que pueda ser usada como herramienta diagnóstica.

5.2 OBJETIVOS PARTICULARES

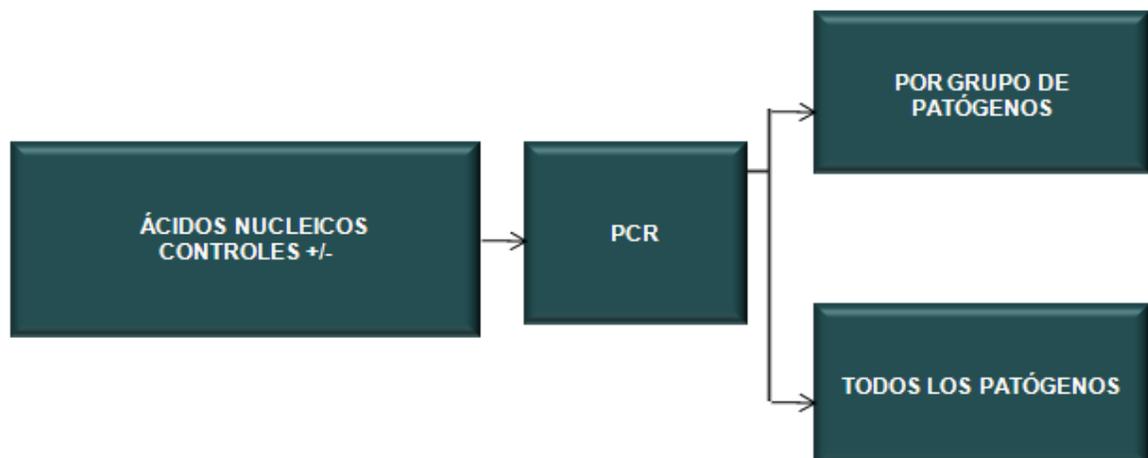
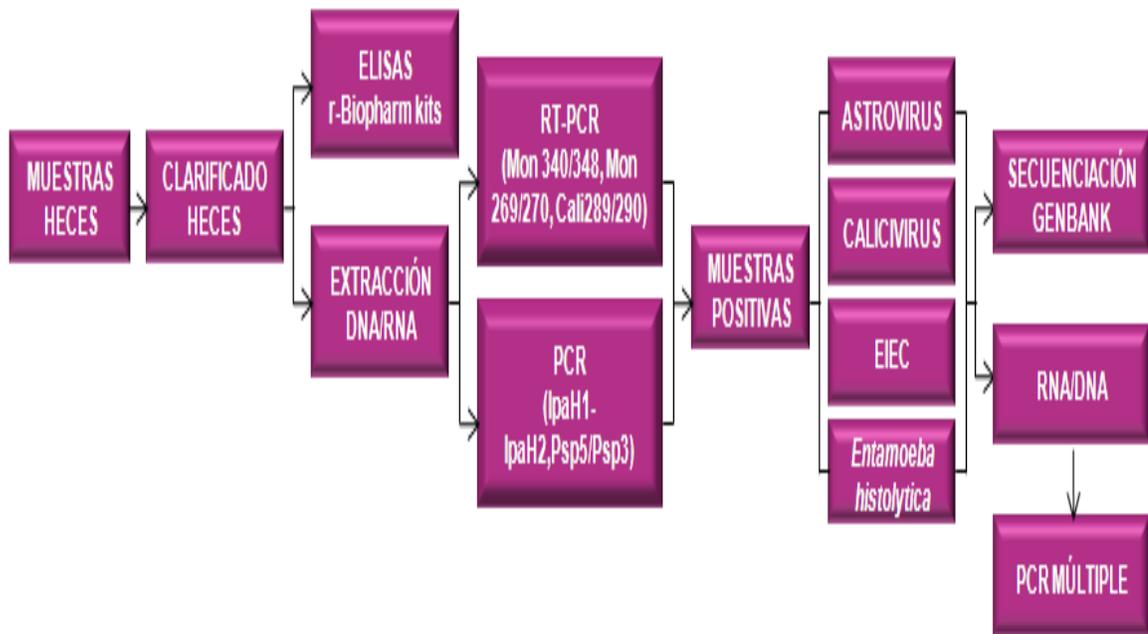
- ✚ Obtener muestras de heces de niños de 6 meses a 4 años de edad que cursen clínicamente con datos de gastroenteritis aguda.

- ✚ Determinar la presencia e identidad de los patógenos a estudiar en las muestras biológicas recolectadas.

- ✚ Establecer un método del tipo PCR múltiple para la detección de patógenos causantes de gastroenteritis aguda que pueda ser utilizado como herramienta diagnóstica y epidemiológica.

6 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

Para cubrir los objetivos planteados, se diseñó la siguiente estrategia experimental:



7 MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 COLECTA DE MUESTRAS BIOLÓGICAS

Se colectaron muestras de heces de niños que cursaron con síntomas de gastroenteritis aguda en diferentes áreas de la zona norte de la Ciudad de México durante dos años siguiendo las indicaciones descritas por la OPS (53) y contemplando los siguientes criterios de inclusión y exclusión:

7.1.1 CRITERIOS DE INCLUSIÓN

- Niños de ambos sexos
- Niños de 6 meses a 4 años de edad, cumplidos al momento del estudio
- Cursaran con datos clínicos de gastroenteritis aguda diagnosticada por el médico
- Carta de consentimiento del padre, madre o tutor

7.1.2 CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

- Más de cinco años de edad al momento del estudio
- Diarrea de más de 5 días
- Sin consentimiento del padre, madre o tutor
- Muestra biológica almacenada y/o tomada en condiciones inadecuadas para el estudio

7.2 BANCO DE DATOS Y BANCO BIOLÓGICO

Se diseñó una ficha de registro (ver anexo) en la cual se recabó información que fue utilizada para la elaboración del banco de datos a partir del cual se identificó de manera precisa cada una de las muestras y se integró un banco biológico con todas las muestras obtenidas.

7.3 PROCESAMIENTO DE MUESTRAS

Muestras de heces tanto de niños sanos como de niños con diarrea fueron procesadas según lo descrito por Yuen y cols. (82) y el manual de la OPS (55), estas se homogenizaron en PBS para obtener una suspensión homogénea, la cual se agitó vigorosamente y se centrifugó a 3,000 rpm, 15 minutos a temperatura ambiente. El sobrenadante se transfirió a un tubo limpio y se centrifugó nuevamente a 7,000 rpm durante 30 minutos a 4°C. El clarificado obtenido se separó en tres viales esterilizados etiquetados como stock, RNA y DNA respectivamente a cada vial se le agregaron 3 gotas de glicerol puro (Sigma) como crioprotector. Los viales “stock” se guardaron a -70 ° C, mientras que los etiquetados como RNA y DNA se guardaron a -20°C, para llevar a cabo los ensayos moleculares y ELISA.

7.4 AISLAMIENTO DE ÁCIDOS NUCLEÍCOS DE VIRUS, BACTERIAS Y PARÁSITOS

A partir de los clarificados se llevó a cabo la extracción de los ácidos nucleicos para cada patógeno (virus, bacterias y parásitos) empleando los kits comerciales QIAamp Viral RNA (Qiagen, Germany), ZR FECAL DNA (ZYMO RESEARCH) y QIAamp DNA Stool (Qiagen, Germany) respectivamente siguiendo las especificaciones de cada proveedor.

7.5 DETECCIÓN DE ASTROVIRUS Y CALICIVIRUS POR RT- PCR

La detección de virus en los clarificados se realizó mediante la extracción del RNA con el kit QIAamp Viral RNA (8,75,82,) la integridad del genoma se verificó por absorbancia previo a los ensayos de RT-PCR como lo sugiere el proveedor del kit. Para los ensayos de RT-PCR se empleo el kit One-Step RT-PCR (Qiagen,

Germany), en presencia de oligonucleótidos específicos para cada tipo viral previamente reportados en la literatura (**Tabla 6**) (4, 18,25, 35, 56,78).

La mezcla de reacción se preparó de la siguiente manera: Buffer 5X, dNTP's (0.4mM) (Qiagen) 100 pmoles de los oligonucleótidos Mon 340 y Mon 348 (astrovirus) y 50 pmoles de los oligonucleótidos p289 y p290 (calicivirus), 1ul de mezcla de enzima (Qiagen), 20 U RNasin (Promega) y 5 ul de RNA, la reacción se llevó a un volumen final de 25 ul con agua libre de nucleasas (Qiagen). La reacción de RT-PCR se llevó a cabo con un primer ciclo de 70°C,5 minutos, para desnaturalizar el RNA, 3 minutos en hielo, seguido de un ciclo de 50°C 30 minutos (RT), se separaron los híbridos RNA-cDNA a 95°C, 15 minutos y se continuo con el programa de amplificación a 94°C, 30 segundos, 55°C, 30 segundos, 72°C, 1 minuto durante 35 ciclos, un ciclo de extensión a 72°C, 7 minutos y un ciclo final a 4 °C, esto se realizó en un Mastercycler personal (Eppendorf).

La mezcla de reacción para la RT-PCR utilizando los oligonucleótidos Mon 269 y Mon 270 se preparó de la siguiente manera: Buffer 5x, dNTP's (0.4mM) (Qiagen), 10 uM de los oligonucleótidos Mon 269 y Mon 270 (astrovirus), 1ul de mezcla de enzima (Qiagen), 20 U RNasin (Promega) y 5 ul de RNA, la reacción se llevó a un volumen final de 25 ul con agua libre de nucleasas (Qiagen). La reacción de RT-PCR se llevó a cabo con un primer ciclo de 70°C,5 minutos, para desnaturalizar el RNA, 3 minutos en hielo, seguido de un ciclo de 50°C 30 minutos (RT), se separaron los híbridos RNA-cDNA a 95°C, 15 minutos y se continuo con el programa de amplificación a 94°C, 30 segundos, 55°C, 30 segundos, 72°C, 1 minuto durante 35 ciclos, un ciclo de extensión a 72°C, 7 minutos y un ciclo final a 4 °C, esto se realizó en un Mastercycler personal (Eppendorf).

Como control positivo para astrovirus se utilizó un clarificado positivo donado por el Dr. Ernesto Méndez Salinas (IBT, UNAM), mientras que para calicivirus se empleó el plásmido pNV- 319 que contiene una secuencia de 319 nucleótidos de la polimerasa del virus Norwalk, secuencia conservada en los genogrupos I y II de norovirus donado por la Dra. Ana Lorena Gutiérrez Escolano (Depto. de Infectómica y Patogénesis Molecular, CINVESTAV, México) este se usó como templado para amplificar por PCR este fragmento de 319 pb de la siguiente manera: Buffer de PCR 1X High Fidelity (Invitrogen), 2 mM MgSO₄, 0.4 mM dNTP's (Roche), 25 pmol de cada oligonucleótido (p289 y p290), 1 U de Taq Polimerasa High Fidelity (Invitrogen) y 5 ul de DNA, en un volumen final de 50 ul de agua libre de nucleasas. Las siguientes condiciones de amplificación fueron: un ciclo inicial de 94°C, 2 minutos, 94°C, 30 segundos, 56°C, 30 segundos, 72°C, 1 minuto durante 35 ciclos, un ciclo de extensión adicional de 72°C, 5 minutos y un ciclo final a 4°C, la reacción se realizó en un Mastercycler personal (Eppendorf).

Los productos amplificados se analizaron en agarosa al 2%, corridos en TBE 0.5X (89 mM Tris- Base, 89 mM ácido bórico, 2 mM EDTA) teñidos con bromuro de etidio. Estos se purificaron y clonaron en el vector de clonación pJET1.2 (Fermentas) para su secuenciación y verificación en el GenBank.

VIRUS	OLIGONUCLEOTIDO	SECUENCIA	PRODUCTO ESPERADO
Astrovirus	Mon 340	CGT CAT TAT TTG TTG TCA TAC T	289 pb
	Mon 348	ACA TGT GCT GCT GTT ACT ATG	
Astrovirus	Mon 269	CAA CTC AGG AAA CAG GGT GT	449 pb
	Mon 270	TCA GAT GCA TTG TCA TTG GT	
Calicivirus	p 289	GATTACTCCAAGTGGGACTCCAC	319 pb
	p 290	TGACAATGTAATCATCACCATA	

Tabla 6.- Oligonucleótidos para la identificación de astrovirus y calicivirus.

7.6 CLONACIÓN DE PRODUCTOS AMPLIFICADOS

Los productos amplificados para astrovirus y calicivirus se clonaron en el vector pJET1.2 (Fermentas) siguiendo las especificaciones del proveedor (ver anexo), previo a esto, los productos fueron purificados con el kit DNA Clean & Concentrator-5 (Zymo Research). Posteriormente se transformaron células DH5- α competentes con la mezcla de ligación y a partir de las colonias obtenidas se realizó una miniprep con el kit GeneJET Plasmid Miniprep (Fermentas) siguiendo las especificaciones del proveedor. La presencia de los insertos clonados se verificó por restricción enzimática con la enzima de restricción BglI (Invitrogen) y el resultado se analizó en un gel de agarosa al 1.5% corrido en TBE 0.5 X (89 mM Tris- Base, 89 mM ácido bórico, 2 mM EDTA) teñido con bromuro de etidio.

Se seleccionó una clona positiva para cada tipo viral y se secuenciaron en el Instituto de Fisiología Celular, UNAM. A partir de las secuencias obtenidas se realizaron alineamientos múltiples usando el programa Clustal W (2.1) de la base de datos de la súper computadora de la Universidad de San Diego, USA (SDSC, Biology Work Bench)

7.7 DETECCIÓN DE BACTERIAS ENTERICAS POR PCR

Para la búsqueda de *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), enterotoxigénica (ETEC) y enteropatógena (EPEC) en los clarificados, se purificó DNA con el kit ya mencionado y se realizaron los ensayos de PCR bajo las condiciones de amplificación y oligonucleótidos reportadas por Skaletski y cols (66), que amplifican los genes de patogenicidad de las bacterias ya mencionadas (**Tabla 7**).

Como control positivo para cada variante se utilizaron las cepas de referencia para EPEC, EIEC, ETEC donadas por el Dr. Carlos Eslova del Depto. de Salud Pública (UNAM). Las cepas se sembraron en placas de agar LB y se incubaron a 37°C durante 16 horas, a partir de estas se realizó una PCR (PCR sobre colonia) para cada cepa, se preparó la mezcla de reacción de la siguiente manera: Buffer PCR 1X High Fidelity (Invitrogen), 0.2 mM dNTP's (Roche), 2mM MgSO₄ (Invitrogen), 10 pmol de cada oligonucleótido (**ver tabla 7**), 1U Taq Platinum High Fidelity (Invitrogen), una colonia bacteriana, el volumen final fue de 20 ul.

Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: 95°C, 5 minutos para la desnaturalización y rompimiento de la colonia bacteriana, después un ciclo de 95°C, 40 segundos, 60°C, 1 minuto, 72°C, 2 minutos durante 40 ciclos y un ciclo de extensión de 72°C, 7 minutos y un ciclo final a 4°C. La reacción se llevó a cabo en un Mastercycler personal (Eppendorf), los productos amplificados se analizaron en agarosa al 1% corrido en TBE 0.5X y teñido con bromuro de etidio (17).

Posteriormente, 500 ng de DNA obtenido de los clarificados de heces se sometió al mismo programa de amplificación, los productos amplificados se purificaron y se secuenciaron como ya se menciona anteriormente.

OLIGONUCLEÓTIDO	SECUENCIA (5'-3')	TAMAÑO DEL PRODUCTO (pb)	SECUENCIA BLANCO (GEN -PATOGENICIDAD)
eae1	CTGAACGGCGATTACGCGAA	917	eae
eae2	CCAGACGATACGATCCAG		
LTf	GGCGACAGATTATACCGTGC	450	LT
LTr	CGGTCTCTATATCCCTGTT		
ipaH1	GTTCCCTTGACCGCCTTCCGATACCGTC	600	ipaH
ipaH2	GCCGGTCAGCCACCCTCTGAGAGTAC		

Tabla 7.- Oligonucleótidos para la identificación de *E. coli* (EPEC, ETEC y EIEC).

Secuencia de oligonucleótidos empleados para la amplificación de los genes de patogenicidad de cada variante.

7.8 DETECCIÓN DE *Entamoeba histolytica*

Para la detección de amibas en los clarificados de heces, se obtuvo el DNA con el kit QIAamp DNA Stool (Qiagen, Germany) siguiendo las especificaciones del proveedor. Con este se llevó a cabo una primera reacción de PCR con los oligonucleótidos RD3 y RD5 que amplifican un fragmento de la subunidad ribosomal pequeña 16S (srRNA) tanto de *E. histolytica* como de *E. dispar* (57) para determinar cuál de los clarificados era positivo para el género *Entamoeba* y después determinar la especie con otro set de oligonucleótidos (**Tabla 8**).

Para la amplificación con los oligonucleótidos RD5 y RD3 se preparó la siguiente mezcla de reacción: Buffer PCR 1X High Fidelity (Invitrogen), 2 mM MgSO₄ (Invitrogen), 0.2 mM dNTP's c/u (Roche), 1 U Taq Platinum High Fidelity (Invitrogen), 500 ng de DNA y 40 pmol de los oligonucleótidos RD5 y RD3, la reacción se llevó a un volumen final de 20 ul con agua libre de nucleasas. La mezcla

de reacción se sometió a las siguientes condiciones: 95°C, 10 minutos, seguido de 94°C, 1 minuto, 55°C, 1 minuto y medio, 72°C, 2 minutos durante 35 ciclos, un ciclo de extensión a 72 °C, 8 minutos y un ciclo final a 4°C, la reacción se llevó a cabo en un Mastercycler personal (Eppendorf). Para determinar la especie en las muestras positivas se realizó una segunda PCR con los oligonucleótidos Psp5 y Psp3 (*E. histolytica*) y NPsp5 y NPsp3 (*E. dispar*) (57). Los productos amplificados se analizaron en agarosa al 1%, y posteriormente se purificaron y secuenciaron para corroborar esta con lo reportado en el GenBank.

OLIGONUCLEOTIDO	SECUENCIA (5'-3')	PRODUCTO ESPERADO	PATÓGENO QUE IDENTIFICA
RD5	GGAAGC TTA TCT GGT TGA TCC TGC CAGTA	1950 pb	<i>Entamoeba</i>
RD3	GGG ATC CTG ATC CTT CCG CAG GTT CAC CTA C		
Psp5	GGC CAATTC ATT CAATGA ATT GAG	876 pb	<i>Entamoeba histolytica</i>
Psp3	CTCAGA TCT AGA AAC AAT GCT TCT C		
NPsp5	GGC CAATTT ATG TAA GTA AAT TGA G	876 pb	<i>Entamoeba dispar</i>
NPsp3	CTT GGA TTT AGA AAC AAT GTT TCT TC		

Tabla 8. Oligonucleótidos utilizados para identificar *Entamoeba histolytica/dispar*.

Secuencia de los oligonucleótidos RD5 y RD3 para identificar el género *Entamoeba*. Psp5 y Psp3 para identificar *Entamoeba histolytica* y NPsp5 y NPsp3 para identificar *Entamoeba dispar*.

7.9 ENSAYOS DE ELISA PARA LA DETECCIÓN DE PATÓGENOS GASTROENTERICOS

Se utilizaron los kits comerciales de la casa r-Biopharm (Germany), para la identificación de astrovirus, norovirus, rotavirus y *E. histolytica* por ELISA a partir de los clarificados de heces (46,74). El nombre, sensibilidad y especificidad de cada kit (**Tabla 9**) y los análisis se realizaron tal y como esta descrito en los manuales de procedimiento correspondiente a cada kit.

NOMBRE DEL KIT	SENSIBILIDAD	ESPECIFICIDAD	MÉTODO DE COMPARACIÓN
RIDA SCREEN Astrovirus (r-biopharm)	76.2%	100%	RT-PCR
RIDA SCREEN Rotavirus (r-biopharm)	100%	99.7%	MICROSCOPIA ELECTRONICA
RIDA QUICK Norovirus	77%	100%	RT-PCR
RIDA QUICK Entamoeba	84.8%	87.4%	EXAMEN MICROSCOPICO

Tabla 9.- Kits seleccionados para los ensayos inmunoenzimáticos.

7.10 ESTANDARIZACIÓN DE LA PCR MÚLTIPLE

La estandarización del ensayo de PCR múltiple se realizó siguiendo las condiciones reportada por Núñez y cols. (53) con las modificaciones necesarias para la amplificación de los genes de los patógenos seleccionados. Previamente, se realizó un análisis bioinformático con la secuencia de los oligonucleótidos para descartar posibles hibridaciones entre ellos y se calculó la temperatura de alineamiento (T_m) utilizando el programa Vector NTI Advance 11 (Invitrogen) (**Tabla 10**).

PATÓGENO	OLIGONUCLETOTIDO	Tm
Astrovirus	Mon 340, Mon 348	59°C
Astrovirus	Mon 269, Mon 270	50°C
Norovirus	p 289, p 290	64°C
EIEC	lpa H1, lpa H2	59°C
EPEC	eae 1, eae 2	87°C
Entamoeba	RD 3, RD 5	92°C
Entamoeba histolytica	Psp5, Psp3	53°C

Tabla 10. Análisis bioinformático con el programa Vector NTI Advance 11. Se utilizó la secuencia de los oligonucleótidos de cada patógeno (columna central) para la determinación de la temperatura de alineamiento (Tm) teórica y que se muestra en la columna de la derecha.

Para estandarizar las condiciones de amplificación para la PCR múltiple, se utilizaron los productos amplificados purificados a partir de las cepas de referencia de astrovirus, calicivirus, *Escherichia coli* y *Entamoeba* antes de utilizar los ácidos nucleicos purificados a partir de los clarificados. Se mezclaron en un solo tubo de reacción, los templados de PCR (virus, bacterias y parásitos), los oligonucleótidos para cada patógeno a las concentraciones probadas de manera individual: astrovirus (10uM), calicivirus (50 pmol), EIEC (20 pmol) y *E. histolytica* (40 pmol), y los componentes de reacción de la Taq Polimerasa Platinum High Fidelity ya descritas (Invitrogen).

La amplificación simultánea de astrovirus-calicivirus se realizó con la siguiente mezcla de reacción: Buffer PCR 1X Taq amplificasa (BIOGENICA), 1.5 mM MgCl₂ (BIOGENICA), 0.2 mM dNTP's (Roche), 1 U Taq amplificasa (BIOGENICA), 50

pmoles de cada oligonucleótido (**Tabla 6**) y 5 ul de DNA la reacción se llevó a 20 ul con agua libre de nucleasas. Los oligonucleótidos utilizados en esta reacción para la identificación de astrovirus fueron Mon 269 y Mon 270. La reacción se realizó bajo las siguientes condiciones de amplificación: 95°C por 15 minutos para desnaturalizar seguido de 94°C 30 segundos, 50°C 30 segundos, 72°C por 1 minuto durante 35 ciclos, un ciclo de extensión de 72°C 7 minutos y un ciclo final a 4°C. La reacción se corrió en un Mastercycler personal (Eppendorf).

Para la amplificación simultánea de *Escherichia coli* enteroinvasiva y *E. histolytica* se utilizó la siguiente mezcla de reacción: Buffer PCR 1X High Fidelity (Invitrogen), 2 mM MgSO₄ (Invitrogen), 0.5 mM dNTP's (Roche), 1 U Taq Platinum High Fidelity (Invitrogen), 20 pmol de cada oligonucleótido (**Tablas 7 y 8**) y 500 ng de DNA de la clona C2 de *E. histolytica* y DNA de EIEC; la reacción se llevó a un volumen final de 20 ul con agua inyectable. Las condiciones de amplificación fueron: 95°C durante 10 minutos para desnaturalizar seguido de 94°C 1 minuto, 55°C 1.5 minutos, 72°C por 2 minutos durante 35 ciclos, un ciclo de extensión de 72°C 8 minutos y un ciclo final a 4°C y la reacción se corrió en un Mastercycler personal (Eppendorf).

La amplificación de virus (astrovirus, calicivirus), bacterias (*Escherichia coli* enteroinvasiva) y parásitos (*Entamoeba histolytica*) en el mismo tubo de reacción, se llevó a cabo con la siguiente mezcla de reacción: Buffer PCR 1X (BIOGENICA), 1.5mM MgCl₂ (BIOGENICA), 0.2 mM dNTP's (Roche), 1 U Taq Amplificasa (BIOGENICA), 50 pmoles p289 y p290, 20 pmoles IpaH1 e IpaH2, 20 pmoles Psp5 y Psp3, 10 uM Mon 269 y Mon 270 y 30 ng de DNA de astrovirus, calicivirus, EIEC, *Entamoeba histolytica*; la reacción se llevó a un volumen final de 40 ul con agua inyectable. Las condiciones de amplificación fueron: 95°C durante 15 minutos para desnaturalizar seguido de 94°C 30 segundos, 50°C 30 segundos, 72°C por 1 minuto durante 35 ciclos, un ciclo de extensión de 72°C 7 minutos y un ciclo final a 4°C y la

reacción se corrió en un Mastercycler personal (Eppendorf). Los productos resultantes fueron analizados en geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio.

8 RESULTADOS

8.1 BANCO DE DATOS Y BANCO BIOLÓGICO

Con la finalidad de poder cumplir con los objetivos planteados en este trabajo integramos un banco biológico con las muestras recolectadas y preservarlas para proyectos futuros. Por otra parte elaboramos un banco con los datos obtenidos durante la recolección de las muestras y que nos permitió seleccionar las mismas en base a los datos clínicos y tratamiento recibido.

La base de datos y el banco biológico quedaron constituidos con 103 registros (Noviembre del 2008 a Noviembre 2010) de los cuales, el mayor número de muestras correspondió a niños de entre 6 meses y 1 año, siendo la mayoría del sexo masculino (**Tabla 11**).

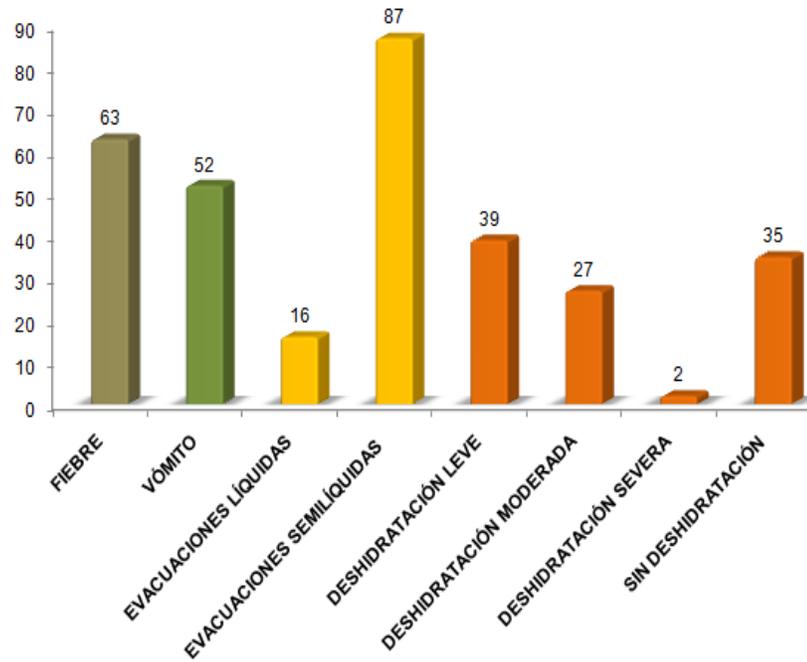
	GRUPO DE EDAD				SEXO	
	6-12 MESES	>1AÑO-2 AÑOS	>2AÑOS-3 AÑOS	>3AÑOS- 4AÑOS	FEMENINO	MASCULINO
NÚMERO DE MUESTRAS	27	37	15	24	48	55

Tabla 11.- Total de muestras organizadas en relación al grupo de edad y sexo.

Con la información recabada, se seleccionaron las muestras para la búsqueda de los patógenos de interés, astrovirus, calicivirus, bacterias (EPEC, EIEC) y parásitos (*E. histolytica*) en base a los datos clínicos de cada una, cuando se contaba con esta.

En el caso de la búsqueda de bacterias y parásitos solo se consideraron las muestras de niños que no hubieran recibido tratamiento previo con antibióticos o antiparasitario, así como los datos clínicos (fiebre, vómito, características de las evacuaciones así como el estado de hidratación) durante la toma de la misma. Un dato que se considero relevante durante la integración del banco de datos, fue la administración de la vacuna contra rotavirus (Rotateq) en los individuos seleccionados, esto con la finalidad de descartar que el cuadro diarreico fuese debido a la presencia de este virus y no por otro patógeno como astrovirus o calicivirus **(Fig.7)**

A)



B)

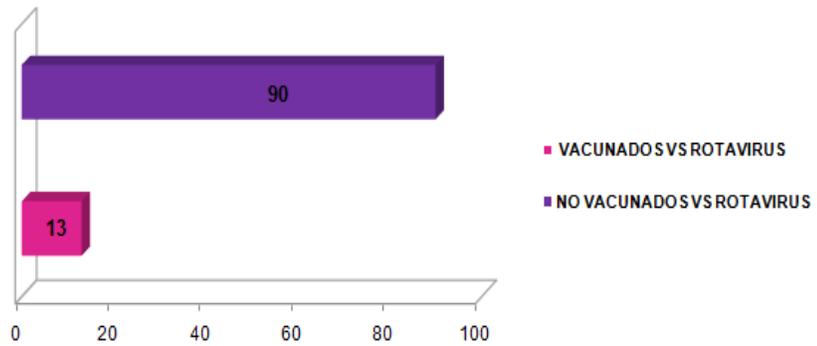


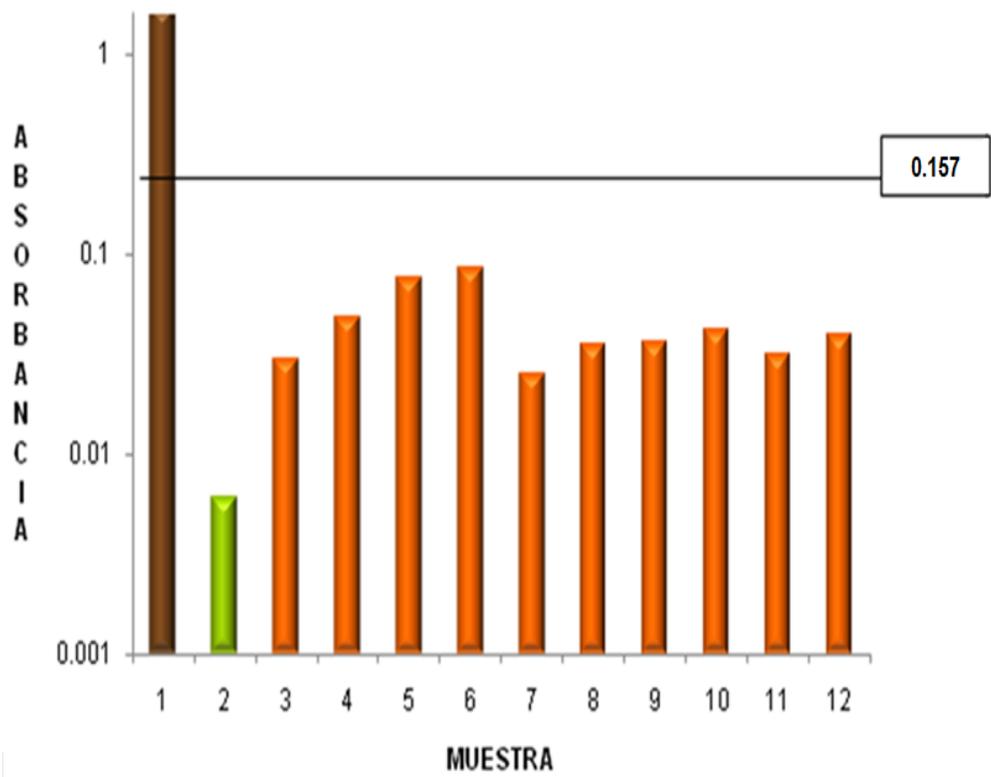
Figura 7.- Datos clínicos de los niños seleccionados para este estudio. Clasificación de las muestras biológicas en base a los datos clínicos seleccionados **(A)**. Distribución de los niños no vacunados y vacunados contra rotavirus **(B)**.

8.2 IDENTIFICACIÓN DE ASTROVIRUS POR EL MÉTODO DE ELISA

Como el objetivo más importante de este trabajo fue proponer un método de diagnóstico de tipo molecular más sensible que los métodos convencionales para la detección de patógenos gastroentéricos en heces, se considero pertinente evaluar estas muestras por ELISA. Para ello se analizaron los 103 clarificados con el kit RIDASCREEN Astrovirus (r-biopharm, Germany) el cual no permite definir el serotipo presente en las heces sino solo la presencia o ausencia de astrovirus en la muestra analizada y tiene una sensibilidad de 76.2% y una especificidad del 100%.

Los resultados obtenidos corresponden a un representativo de 10 del total de las 103 muestras (**Grafica 1**), aun cuando todas fueron graficadas y comparadas con los controles positivos y negativos incluidos en el kit , por lo que en base a los valores de corte descritos en el kit, barra verde (control negativo) y barra café (control positivo), se determinó que las 103 muestras analizadas por este método fueron negativas ya que todas ellas mostraron valores por debajo del valor límite calculado (recuadro naranja).

Los resultados que se han reportado en diversos estudios (27, 41, 43, 44,74) en donde se han utilizado tanto el ELISA como la RT-PCR para la identificación de astrovirus coinciden en que existe un mayor porcentaje de muestras positivas para astrovirus identificadas por el método de RT-PCR en comparación con el método de ELISA, concluyendo que existe una mayor sensibilidad y especificidad del mismo. Por lo que tomando en cuenta esto, los resultados obtenidos para las 103 muestras por ELISA son semejantes a los reportados en otras partes del mundo.



Valor límite= Valor control negativo + 0.15 = 0.157
 POSITIVAS > 10% del valor límite
 NEGATIVAS < 10% del valor límite

Grafica 1. Identificación de astrovirus por el método de ELISA. Resultado representativo de 10 de las 103 muestras analizadas por ELISA (RIDASCREEN Astrovirus). Barra de color café corresponde al control positivo barra verde corresponde al control negativo. El valor límite calculado según las especificaciones del kit se muestra en el recuadro negro (valor= 0.157). Se consideran como muestras positivas las que tienen un valor > de 10% del valor límite calculado y negativas las que tienen un valor < 10% del valor límite calculado.

8.3 IDENTIFICACIÓN DE ASTROVIRUS POR RT-PCR

A la par que se analizaron las muestras por ELISA, se extrajo el RNA de estas como se describió en materiales y métodos para la amplificación de una región genómica conservada entre los 8 serotipos de astrovirus descritos a la fecha (5, 43, 28) localizada en el ORF1a (nucleótidos 1182 a 1470). Para validar los resultados obtenidos por RT-PCR, se extrajo el RNA de una muestra de heces positiva para astrovirus donada por el Dr. Ernesto Méndez Salinas (IBT, UNAM) y poder usarla como control positivo, con este RNA se realizó un ensayo de RT-PCR con los oligonucleótidos Mon/340 y Mon/348 (**Tabla 6**) previo al análisis de los clarificados obtenidos.

El producto obtenido después de la amplificación fue un fragmento de 289 pb que corresponde al tamaño esperado, como control negativo se usó la mezcla de reacción pero sin RNA (**Fig. 8, panel A**). Una vez estandarizado el control positivo, se analizaron alrededor de 60 clarificados por RT-PCR con este par de oligonucleótidos, encontrándose tres muestras positivas para astrovirus (**Fig. 8, panel B, carriles 3-5**), sin embargo como la intensidad de los productos obtenidos fue baja, esto nos llevó a pensar que probablemente las muestras tenían baja carga viral, inhibidores presentes en el RNA o bien que se había usado poco RNA para el ensayo de RT-PCR por lo que se reamplificaron estas muestras para corroborar el resultado. Para ello, se usó el producto de PCR de las tres muestras sin purificar, el resultado obtenido mostró la reamplificación del producto de 289 pb corroborando la positividad de las tres muestras para astrovirus (**panel C, carriles 2 a 4**), estos productos se clonaron y se secuenciaron para determinar a qué serotipo correspondía (**Fig. 12, 13 y 14**).

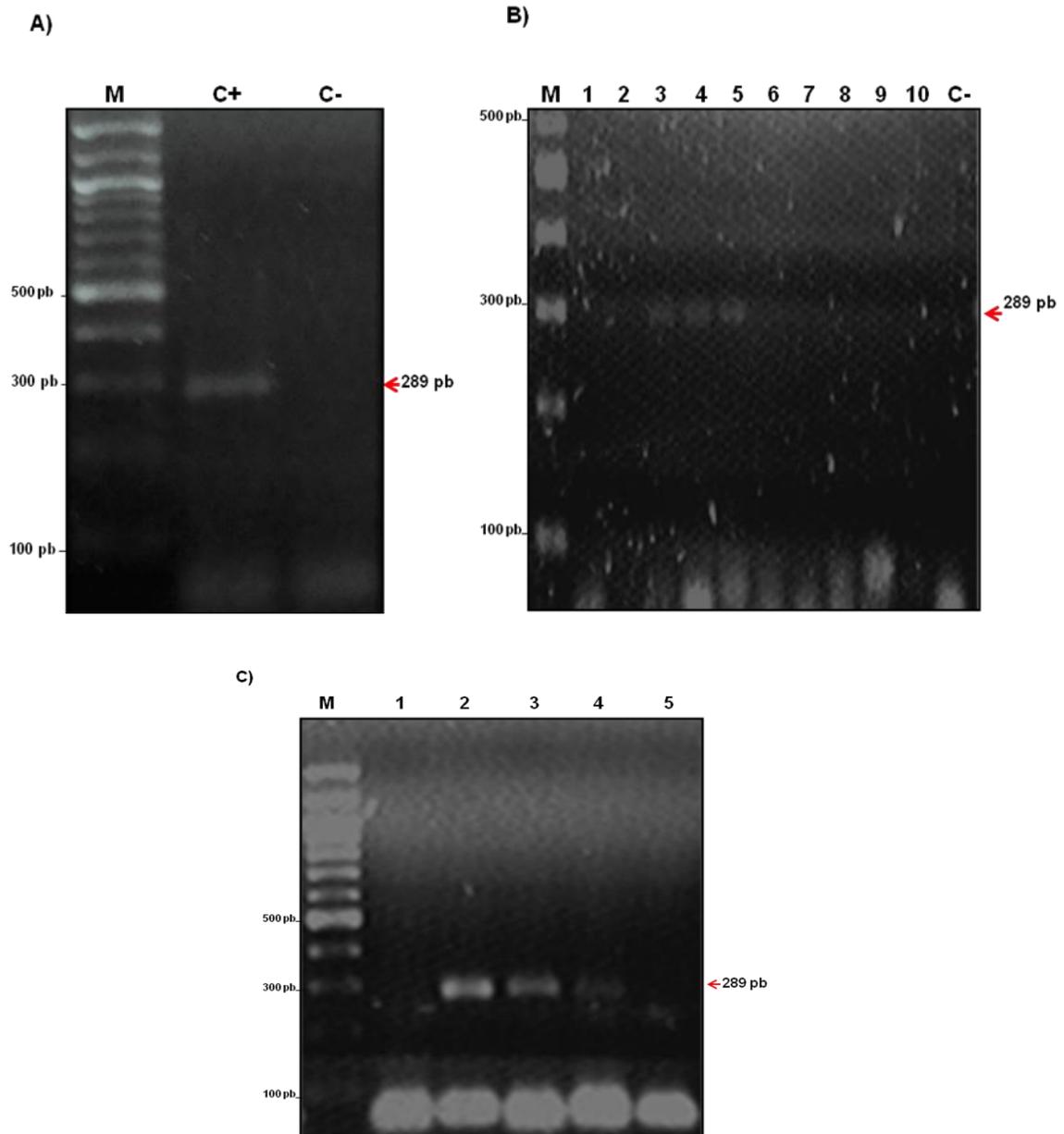


Figura 8.- Identificación de astrovirus por RT-PCR. A partir del RNA obtenido de los clarificados se realizó una RT-PCR con los oligonucleótidos Mon 340/ Mon 348. Control positivo para astrovirus (C+), carril C- corresponde a control negativo de la reacción **(A)**, amplificación de muestras 1 a 10, carril 11 corresponde al control negativo de la reacción, **(B)**; reamplificación de muestras positivas 2 a 6, carril 1 y 5, muestras negativas **(C)**. Los productos se analizaron en geles de agarosa al 1.5 %, teñidos con bromuro de etidio. (M) corresponde al marcador de peso molecular de 100 pb DNA Ladder (New England, Biolabs). Los productos amplificados son señalados con una flecha a la derecha de la figura.

Por otro lado, con la muestra de heces positiva donada, llevamos a cabo un ensayo de RT-PCR para obtener un producto de 449 pb con los oligonucleótidos Mon 269 y Mon 270 (**Tabla 6**) que amplifican una secuencia altamente conservada entre los 8 serotipos de astrovirus descritos a la fecha y que corresponde a la cápside viral con la finalidad de poder observar claramente la diferencia entre los tamaños de los productos de calicivirus (319 pb) y astrovirus (449 pb) en el ensayo de PCR múltiple, pues resultaba imposible distinguirlos utilizando los oligonucleótidos Mon 340 y Mon 348, ya que el producto amplificado con estos es 289 pb como se mencionó anteriormente.

El resultado con estos nuevos oligonucleótidos permitieron no solo la amplificación del producto del tamaño esperado de 449 pb (**Fig. 9 A**) sino que con este par de oligonucleótidos analizamos el resto de las muestras de RNA provenientes de heces con estos últimos encontrando una muestra más positiva a astrovirus (**Fig. 9 B**) además de las tres que ya se habían identificado con los oligonucleótidos Mon 340/348.

Por lo que resumiendo, los resultados obtenidos con los dos métodos utilizados mostraron que las 103 muestras analizadas por ELISA fueron negativas y cuatro de ellas resultaron positivas por RT-PCR utilizando los oligonucleótidos Mon 340/Mon 348, Mon 269/Mon270 (**Tabla 12**).

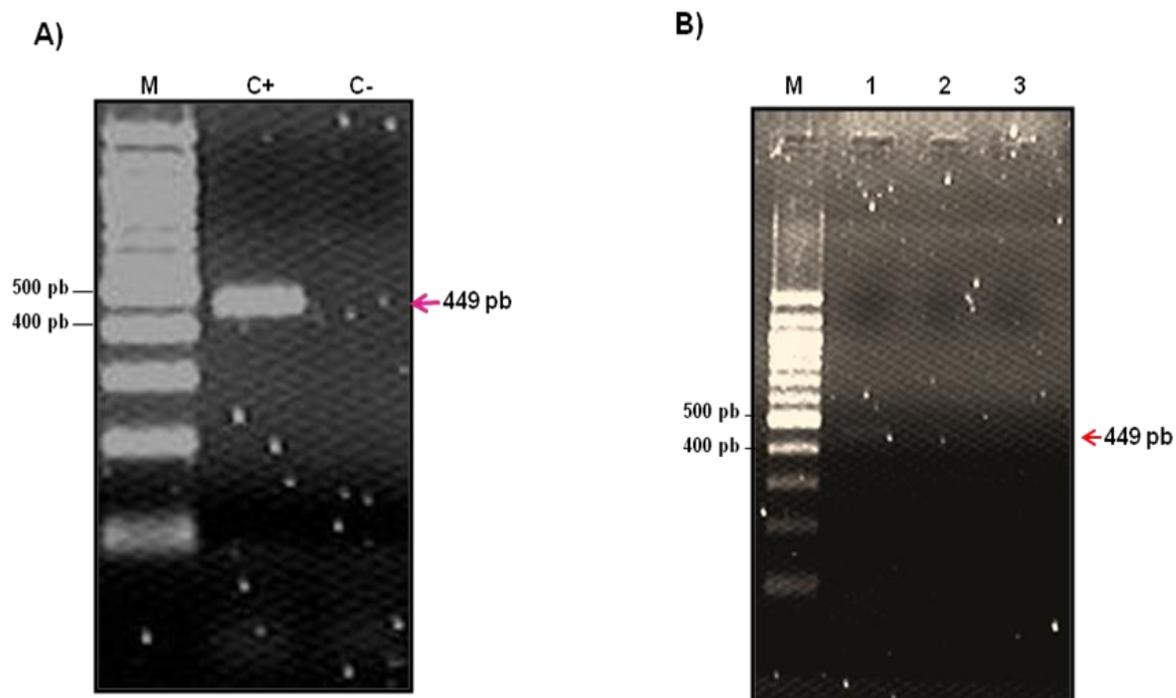


Figura 9.- Identificación de Astrovirus por RT-PCR con oligonucleótidos Mon 269 y Mon 270. A partir del RNA obtenido de la muestra utilizada como control positivo para astrovirus, se llevó a cabo una RT-PCR con los oligonucleótidos Mon 269 y Mon 270. C+, control positivo de la reacción; C-, control negativo de la reacción **A**); amplificación de muestras 91-93. Carril 1 muestra positiva a astrovirus se observa un producto amplificado de 449 pb **B**); Los productos se analizaron en geles de agarosa al 1.5 %, teñido con bromuro de etidio. Los productos amplificados se señalan con una flecha a la derecha de la figura. (M) corresponde al marcador de peso molecular de 100 pb DNA Ladder (New England, Biolabs).

8.4 DETECCIÓN DE CALICIVIRUS POR ELISA

Otro de los patógenos que se buscaron fueron los calicivirus debido a la importancia epidemiológica de estos como agentes productores de diarrea en niños, por lo que se analizaron 40 clarificados de los 103 (**Fig. 10, panel A**), con el kit RIDA-QUICK Norovirus Short Protocol (r-biopharm, Germany) que consiste en una prueba inmunocromatográfica cualitativa que detecta la presencia de antígenos de norovirus

tanto del genogrupo I como del genogrupo II a partir de muestras de heces con una alta sensibilidad (86%) y especificidad (94.6%). De las 40 muestras analizadas, se encontró una muestra positiva (**Fig. 10, panel B**), en donde fue clara la presencia de una segunda banda azul en la ventana superior del cassette (flecha rosa) en comparación con el resto de las muestras que resultaron negativas.

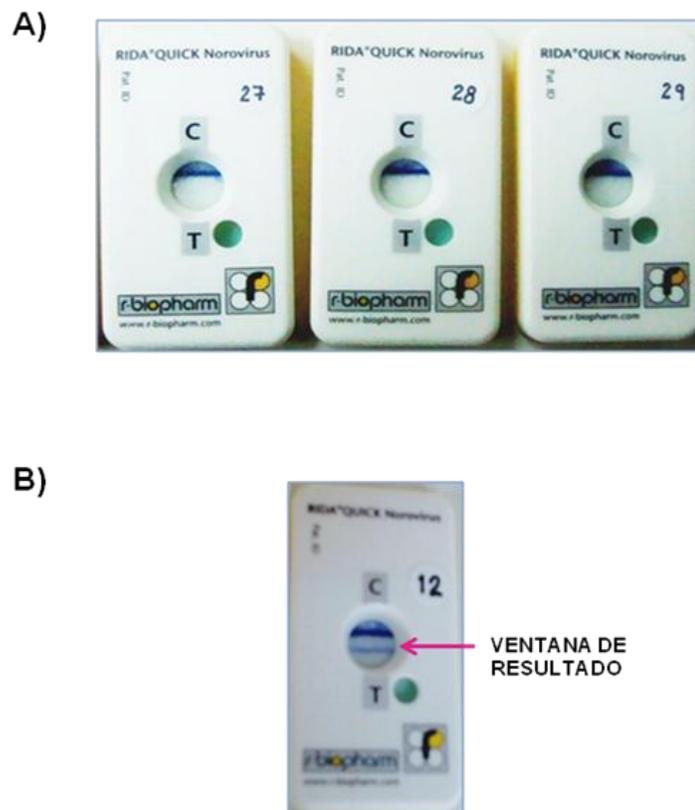


Figura 10.- Identificación de calicivirus por ELISA. Análisis de clarificados con el kit RIDA- QUICK Norovirus (r-biopharm, Germany). Muestras negativas representativas de los clarificados analizados (**A**). Muestra positiva a Norovirus (cassete 12) indicada con la flecha color rosa (**B**).

Con este resultado y considerando que el método inmunocromatográfico empleado aun cuando las especificaciones del proveedor indicaban que tiene una alta sensibilidad y especificidad, no se descarto la posibilidad de encontrar más muestras positivas, sobre todo tomando como base lo obtenido con astrovirus en donde se sospechó de baja carga viral de las muestras colectadas, pudiendo ser el mismo caso para calicivirus, por lo que se realizó el ensayo de RT-PCR con los oligonucleótidos específicos para calicivirus (**Tabla 6**).

8.5 IDENTIFICACIÓN DE CALICIVIRUS (NOROVIRUS) POR RT-PCR

Para la estandarización del control positivo para calicivirus no se contaba con un clarificado positivo para estos, sin embargo se contaba con el plásmido pNV 319 (donado por la Dra. Ana Lorena Gutiérrez Escolano, Depto. de Infectómica y Patogénesis Molecular, Cinvestav, México) que tiene clonado el cDNA que codifica para la RNA polimerasa del virus Norwalk (25) decidimos usarlo como templado para amplificar por PCR con los oligonucleótidos p-289 y p-290 (**Tabla 6**) (35) un producto de 319 pb que corresponde a una región altamente conservada de la RNA polimerasa viral de norovirus y sapovirus. El resultado mostró la amplificación del producto de 319 pb como se puede observar en el carril C+ (**Fig. 11, panel A**) y ningún producto en el carril C- que corresponde al control negativo de la reacción.

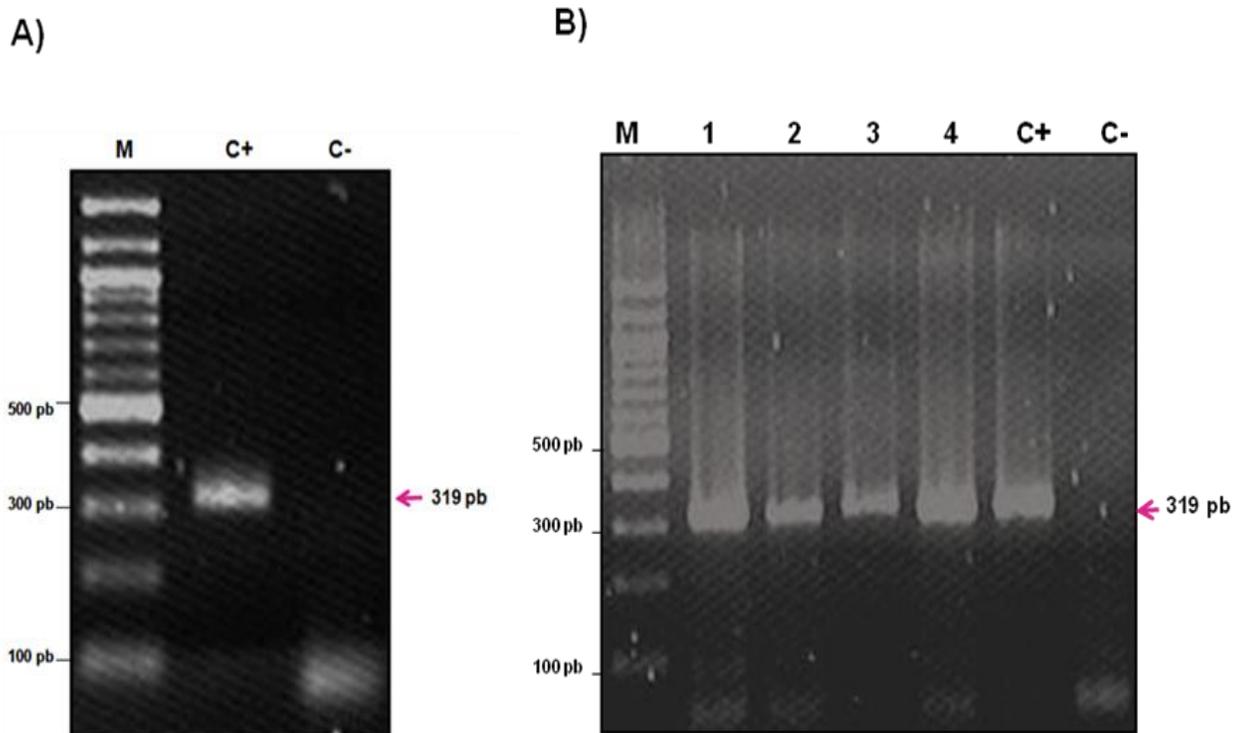


Figura 11.- Identificación de calicivirus por RT-PCR. A partir del plásmido pNV319 se amplificó por PCR el producto de 319 pb como control positivo (carril1); carril 2, control negativo de la reacción **(A)**. RT-PCR de los clarificados de 103 muestras, carriles1-4 muestras positivas a calicivirus, carril C+, control positivo; carril C- control negativo **(B)**. Las muestras fueron analizadas en geles de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio. Los carriles (M) corresponden al marcador de tamaño molecular de 100 pb DNA Ladder (New England *Biolabs*). La flecha indica el producto del tamaño esperado.

Estandarizadas las condiciones de RT-PCR para el control positivo, se analizaron las 103 muestras y el resultado mostró la presencia de un producto de 319 pb en cuatro muestras de las 103 (carriles 1 a 4) que fueron negativas por el método inmunocromatográfico y muy interesantemente, el producto del carril 1 correspondió al producto amplificado de la muestra 12 que resultó positiva por el método inmunocromatográfico utilizado **(Fig. 11, panel B)**; los carriles C+ y C- corresponden

a los controles positivo y negativo de la reacción respectivamente, por lo que de las 103 muestras analizadas por el método inmunocromatográfico y por RT-PCR, 99 fueron negativas y cuatro positivas (**Tabla 12**).

PATÓGENO IDENTIFICADO	ELISA		RT-PCR		PCR		TOTAL MUESTRAS ANALIZADAS	% MUESTRAS POSITIVAS
	+	-	+	-	+	-		
ASTROVIRUS	0	103	4	99	-	-	103	3.8
CALICIVIRUS	1	39	4	99	-	-	103	3.8

Tabla 12.- Comparación de los métodos ELISA vs RT-PCR para la detección de astrovirus y calicivirus. De 103 muestras analizadas por ELISA y RT-PCR, 4 fueron positivas por RT-PCR para astrovirus y ninguna por ELISA; para calicivirus, 40 muestras analizadas por ELISA y 103 por RT-PCR cuatro fueron positivas por RT-PCR y solamente una positiva por ELISA.

Resumiendo, los resultados obtenidos por ELISA y RT-PCR para la identificación de astrovirus y calicivirus son muy semejantes a lo reportado por distintos grupos (28,43,45,46,75) considerando que de las 103 muestras analizadas para astrovirus no hubo ninguna positiva por ELISA y se encontraron 3.8 % (4 de 103 muestras) positivas por RT-PCR, y de 40 muestras analizadas para la identificación de calicivirus por ELISA solo una fue positiva, mientras que estas mismas muestras analizadas por RT-PCR 3.8% fueron positivas (4 de 103).

8.6 CLONACIÓN DE PRODUCTOS AMPLIFICADOS POR RT-PCR

Con la idea de tener más información que nos permitiera conocer a que serotipos correspondían las muestras que habían resultado positivas a ambos tipos virales y darle un enfoque epidemiológico a estos resultados, los productos amplificados se clonaron en el vector de clonación pJET 1.2 (Fermentas) siguiendo las especificaciones del proveedor.

Después de transformar bacterias competentes de la cepa DH5- α se seleccionaron al azar varias colonias para verificar por restricción enzimática con la enzima Bgl II cuáles de ellas contenían el plásmido con el inserto correspondiente. El análisis de los plásmidos obtenidos para astrovirus, mostró la liberación del inserto de 289 pb en todos ellos correspondiente al tamaño esperado (**Fig. 12, panel A**) y dado que desconocíamos a que serotipo correspondía el control positivo para astrovirus se decidió clonar el producto amplificado de este y el resultado se muestran en el carril marcado con C+ que corresponde a una clona del plásmido que contienen el producto de la muestra de heces que utilizamos como control positivo para validar los resultados de RT-PCR.

En cuanto a los resultados obtenidos para los plásmidos obtenidos para calicivirus, de las dos clonas analizadas (C1, C2), solo una de ellas liberó el inserto de 319 pb que corresponde al tamaño esperado (**Fig. 12, panel B**).

Todos los plásmidos con los insertos correspondientes a cada patógeno se purificaron por columna y se secuenciaron automáticamente.

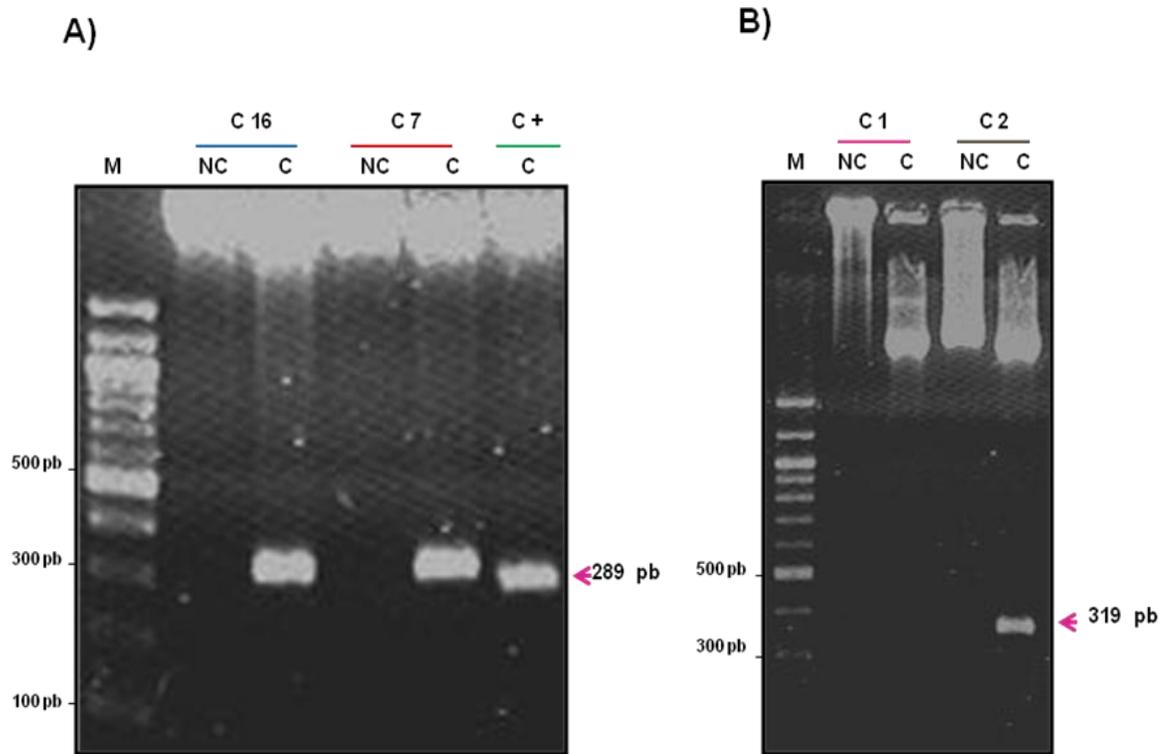


Figura 12.- Clonación de los productos amplificados de astrovirus y calicivirus. Restricción enzimática de los plásmidos recombinantes para astrovirus **(A)** y calicivirus **(B)** con la enzima Bgl II, carriles NC corresponde a los plásmidos no cortados y los carriles C corresponden a los plásmidos cortados. Clonas C16, C7 y C+ de astrovirus; carril C+ corresponde al inserto del control positivo de astrovirus. Clonas C1 y C2 de calicivirus. Carril M, corresponde al marcador de tamaño molecular de 100 pb DNA Ladder (New England, Biolabs). Los insertos liberados se señalan con una flecha a la derecha de cada panel.

8.7 RESULTADO DE SECUENCIACIÓN DE LAS MUESTRAS POSITIVAS PARA ASTROVIRUS Y CALICIVIRUS

Los plásmidos recombinantes obtenidos para astrovirus y calicivirus de cada muestra positiva se secuenciaron y el resultado de estas se compararon con las secuencias reportadas en el GenBank con la finalidad de determinar la identidad de estas.

El análisis de la secuencia obtenida del plásmido pJET- Astro⁺ y que tiene clonado el producto del control positivo, reveló que se trata de una muestra perteneciente al serotipo 8 como lo indica el resultado del GenBank (**Fig. 13**).

Sequences producing significant alignments:						
Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
FJ430552.1	Human astrovirus 8 isolate SewCIV/2007/Caracas/VEN nonstructural protein gene, partial cds	46.4	87.3	16%	0.097	100%
FJ430551.1	Human astrovirus 8 isolate SewCIII/2007/Caracas/VEN nonstructural protein gene, partial cds	46.4	87.3	16%	0.097	100%
FJ430561.1	Human astrovirus 8 isolate GuRVII/2008/Caracas/VEN nonstructural protein gene, partial cds	44.6	44.6	7%	0.34	100%
FJ430550.1	Human astrovirus 8 isolate SewCII/2007/Caracas/VEN nonstructural protein gene, partial cds	44.6	44.6	7%	0.34	100%
EF490429.1	Human astrovirus isolate Madagascar/DT1004/2004 similar to putative serine protease genomic sequence	44.6	44.6	7%	0.34	100%
EF490427.1	Human astrovirus isolate Madagascar/DR0034/2004 putative serine protease (ORF1a) gene, partial cds	44.6	44.6	7%	0.34	100%
EF490426.1	Human astrovirus isolate Madagascar/DR0075/2004 putative serine protease (ORF1a) gene, partial cds	44.6	44.6	7%	0.34	100%
EF490425.1	Human astrovirus isolate Madagascar/DG6013/2004 putative serine protease (ORF1a) gene, partial cds	44.6	44.6	7%	0.34	100%

Figura 13.- Secuenciación automática del plásmido pJET- Astro⁺. Análisis de la secuencia utilizada como control positivo, con el programa BLAST (NCBI) contenida en el GenBank.

Realizamos el mismo procedimiento para los otros plásmidos, el pJET- Astro12 (panel A) y pJet-Astro13 (panel B) y el análisis mostro que la muestra 12 pertenece al serotipo 8 y la muestra 13 al serotipo 1 (**Fig. 14**). La secuencia de la muestra que fue amplificada con los oligonucleótidos Mon269/ Mon 270 no pudo ser incluida debido a problemas técnicos con el equipo de secuenciación.

A)

Sequences producing significant alignments:						
Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
FJ430552.1	Human astrovirus 8 isolate SewCIV/2007/Caracas/VEN nonstructural protein gene, partial cds	48.2	89.1	16%	0.027	100%
FJ430551.1	Human astrovirus 8 isolate SewCIII/2007/Caracas/VEN nonstructural protein gene, partial cds	48.2	89.1	16%	0.027	100%
EF490429.1	Human astrovirus isolate Madagascar/DT1004/2004 similar to putative serine protease genomic sequence	48.2	140	26%	0.027	100%
EF490427.1	Human astrovirus isolate Madagascar/DR0034/2004 putative serine protease (ORF1a) gene, partial cds	48.2	140	26%	0.027	100%
EF490426.1	Human astrovirus isolate Madagascar/DR0075/2004 putative serine protease (ORF1a) gene, partial cds	48.2	140	26%	0.027	100%
EF490425.1	Human astrovirus isolate Madagascar/DG6013/2004 putative serine protease (ORF1a) gene, partial cds	48.2	140	26%	0.027	100%
GU732187.1	Human astrovirus 3 isolate Rus-Nsc08-3364 putative serine protease gene, complete cds; putative RNA-dependent RNA polymerase gene, partial cds; and capsid precursor protein gene, complete cds	46.4	221	38%	0.094	100%
GU223905.2	Human astrovirus 3 isolate Rus-Nsc03-H191 putative serine protease gene, complete cds; putative RNA-dependent RNA polymerase gene, partial cds; and capsid precursor protein gene, complete cds	46.4	221	38%	0.094	100%

B)

Sequences producing significant alignments:						
Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
FJ755404.1	Human astrovirus 1 Beijing/291/2007/CHN, complete genome	42.8	204	37%	0.038	100%
FJ755358.1	Human astrovirus 1 Beijing/110/2007/CHN nonstructural protein gene, partial cds	44.6	158	30%	0.011	100%
FJ430560.1	Human astrovirus 8 isolate GuRVI/2008/Caracas/VEN nonstructural protein gene, partial cds	44.6	83.7	15%	0.011	100%
AB325804.1	Human astrovirus ORF1 gene for nonstructural protein, complete cds, isolate: V1182	44.6	210	37%	0.011	100%
FJ430559.1	Human astrovirus 8 isolate GuRV/2007/Caracas/VEN nonstructural protein gene, partial cds	44.6	83.7	15%	0.011	100%
FJ430558.1	Human astrovirus 8 isolate GuRIV/2007/Caracas/VEN nonstructural protein gene, partial cds	44.6	83.7	15%	0.011	100%
FJ755361.1	Human astrovirus 1 Beijing/327/2007/CHN nonstructural protein gene, partial cds	41.0	153	30%	0.13	100%
FJ755360.1	Human astrovirus 1 Beijing/317/2007/CHN nonstructural protein gene, partial cds	41.0	153	30%	0.13	100%

Figura 14.- Secuenciación automática de los plásmidos pJET- Astro12 y pJet- Astro13.

Análisis de la secuencia obtenida de los plásmidos para la muestra 12 (A) y la muestra 13 (B) de astrovirus con el programa BLAST (NCBI) contenida en el GenBank.

Dado que la secuencia de los oligonucleótidos Mon340/ Mon348 fue diseñada a partir de la secuencia reportada para astrovirus 2, decidimos realizar un ensayo de alineamiento múltiple usando esta como cepa de referencia y la comparamos con las

secuencias obtenidas de las muestras positivas a astrovirus con la finalidad de conocer el posible patrón epidemiológico tomando como base lo reportado en la literatura. El alineamiento se realizó con el programa Clustal W (versión 2.1) a través de la base de datos de la súper computadora de la Universidad de San Diego (SDSC, Biology Work Bench) y el análisis mostro que todas las secuencias obtenidas están conservadas entre ellas y con la cepa de referencia (color blanco), algunas contienen residuos diferentes a la de referencia (color gris intenso).

```

ORFlA-HastV-2_M  -CGTCATTATTTGCTGTCATACTAACCTGTAGGTTCATACGTATGGCGACGGTTTTTATT
ORFlA-HastV-1   ACGTCATTGTTTGTGTCATACTAACCTGTAGGTTCATACGTATGGCAACGGTTTTTCATT
ORFlA-HastV-8_  --GTCATTATTTGTTGTCATACTAACCTGTAGGTTTATACGTATGGCAACAGTTTTTTATT
HastV-8_aislado
Muestra_13_Hast -CGTCATTGTTTGTGTCATACTAACCTGTAGGTTCATACGTATGGCAACGGTTTTTCATT
consensus       --gtcattat t t gctgtc atactaacctgt aggtt catacgtatggcgac-gtttttatt

ORFlA-HastV-2_M GGCACCAGATTTCGAGATCCGTGATGCTAATGGGAAGGTCTGGCCACGTACCAACTAGG
ORFlA-HastV-1   GGCACCAGGTTTCGAGATCCGTGACGCTAATGGGAAGGTGTGGCCACGTACCAACTAGG
ORFlA-HastV-8_  GGCAC TAGATTTCGAGATCCGTGATGCTAATGGGAAGGTGTGGCCACGTACCAACTAGG
HastV-8_aislado
Muestra_13_Hast GGCAC TAGATTTCGAGATCCGTGATGCTAATGGGAAGGTGTGGCCACGTACCAACTAGG
consensus       ggcaccagatttcgagatccgtgatgctaatgggaggttgtggccac-gtaccactagg

ORFlA-HastV-2_M ATCAAAAATGTTGCATTTGACTTCTTCCAGAAGCTAAAACAGTCAGGGGTGAGAGTTGGA
ORFlA-HastV-1   ATTA AAAATGTTGCATTTGACTTTTTTCCAGAAGCTGAAGCAGTCAGGGGTGGAGTTGGA
ORFlA-HastV-8_  ATCAAAAACGTTGCATTTGACTTCTTCCAGAAGCTGAAACAGTCAGGGGTGAGAGTTGGG
HastV-8_aislado
Muestra_13_Hast ATCAAAAATGTTGCATTTGACTTCTTCCAGAAGCTGAAGCAGTCAGGGGTGAGAGTTGGA
consensus       ATcAAAAtGTTGCaTTTGAcTTcTTcCAGAAGCTgAAaCAGTCAGGGGTGaGAGTTGga

ORFlA-HastV-2_M GTCAACGAATTCGTTGTTATAAAACCAGGTCATTATGTGTATAGACACCCCTGAAGGG
ORFlA-HastV-1   GTCAACGAATTCGTTGTCATAAAACCAGGTCATTATGTGTTATAGACACCCCTGAAGGG
ORFlA-HastV-8_  GTCAATGACTTCGTAGTTATAAAACCAGGTCATTATGCATTATAGACACCCCTGAAGGG
HastV-8_aislado
Muestra_13_Hast GTCAATGACTTCGTGTTATAAAACCAGGTCATTATGCATTATAGACACCCCTGAAGGG
consensus       GTCAAcGA-TTcGTTgTtATAAAaCCAGGTCATTaTgtgTtATAGACACCCCTGAaGGg

ORFlA-HastV-2_M AAAGGACAGGTTCTTTTCTGGCAATGACATAGTAACAGCAGCACATGTGT-----
ORFlA-HastV-1   AAAGGACAGGTTCTTTTCTGGCAATGACATAGTAACAGCAGCACATGTGT-----
ORFlA-HastV-8_  AAAGGACAGGTTCTTTTCTGGTAACGACATAGTAACAGCAGCACATGTGTG-AGCAC-
HastV-8_aislado
Muestra_13_Hast AAAGGACAGGTTCTTTTCTGGTAATGACATAGTAACAGCAGCACATGTGTGGCAAC
consensus       AAAGGAcAGGtTCTTTTCTGGcAAtGACATAGTAACAGCAGCACATGT-g-----

ORFlA-HastV-2_M -----
ORFlA-HastV-1   -----
ORFlA-HastV-8_  -----
HastV-8_aislado
Muestra_13_Hast AACACTTTTGTGAGTGTATGTTATGAGGGTTTGATGTATGAAGCGAA
consensus       -----

```

Figura 15.- Alineamiento múltiple de las secuencias de las muestras positivas a astrovirus. Comparación de la secuencia de astrovirus 2 (HastV2) con las secuencias obtenidas de las muestras positivas a astrovirus. El alineamiento se llevo a cabo con el programa Clustal W, versión 2.1. Residuos conservados (color blanco), residuos idénticos (color gris claro), residuos similares (color gris medio), residuos diferentes (color gris intenso).

En cuanto al resultado de la secuencia de una de las cuatro muestras positivas que se encontraron para calicivirus, se encontró que esta corresponde a un fragmento de una proteína no estructural del virus Norwalk en base al porcentaje de mayor identidad (98%) que mostró el análisis realizado (**Fig.16**), sin embargo otros resultados también indicaron que podría corresponder a norovirus genotipo 1

Sequences producing significant alignments:						
Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
M87661.2	Norwalk virus nonstructural polyprotein, 58 kd capsid protein, and orf3 genes, complete cds	527	527	95%	1e-146	98%
AB005564.1	Norovirus isolates gene for RNA-dependent RNA polymerase, partial cds, isolate: G89-107F	374	374	95%	2e-100	87%
L23832.1	Norwalk virus (Sa-1283/84/J) RNA polymerase mRNA, partial cds	365	365	95%	9e-98	86%
AF312510.1	Human calicivirus NLV/Tiefwareensee 305/1999/DE RNA-dependent RNA polymerase gene, partial cds	363	363	95%	3e-97	86%
DQ486865.1	Norovirus Hu/GI.1/Dhaka234/2000/BGD non-structural polyprotein gene, partial cds	361	361	95%	1e-96	86%
EU085528.1	Norovirus Hu/GI.1/P738.Delsjo2004/Gothenburg/Sweden capsid protein gene, complete cds	360	360	99%	4e-96	85%
EU085529.1	Norovirus Hu/GI.1/P774.Delsjo2004/Gothenburg/Sweden capsid protein gene, complete cds	356	356	95%	5e-95	85%
EU085527.1	Norovirus Hu/GI.1/P726.Delsjo2004/Gothenburg/Sweden capsid protein gene, complete cds	356	356	95%	5e-95	85%

Figura 16.- Secuenciación automática del plásmido recombinante pJET-Calicivirus 12.

Análisis de la secuencia de la muestra 12 positiva para calicivirus con el programa BLAST (NCBI) contenida en el GenBank.

8.8 IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS PRODUCTORAS DE DIARREA (EPEC y EIEC)

En estudios de corte epidemiológico se ha reportado la presencia de infecciones mixtas en los cuadros gastroentéricos con más de dos patógenos ya sea astrovirus, calicivirus o adenovirus y cepas de *Escherichia coli* productoras de diarrea: EPEC, ETEC, EIEC (24, 34, 64) por lo que decidimos buscar la presencia de estas en las muestras de la población infantil estudiada, tomando como referencia la información

contenida en el banco de datos en cuanto a los datos clínicos registrados, los cuales sugerían la posibilidad de encontrar muestras positivas a alguna de estas variantes .

Al igual que para los patógenos anteriores, primero se estandarizó el control positivo a partir de cepas de referencia para cada una de las variantes mediante una PCR sobre colonia en presencia de los oligonucleótidos reportados por Scaletsky, et.al (66) (**Tabla 7**).

Los resultados obtenidos permitieron la amplificación de un producto de 917 pb para la cepa EPEC (carril 1) y un amplificado de 600 pb para la cepa EIEC (carril 5); los carriles 2, 4 y 6 corresponden a los controles negativos, es decir, la mezcla de reacción pero sin la colonia bacteriana (**Fig. 17**). En cuanto al resultado obtenido para la cepa ETEC, este fue negativo (carriles 3 y 4), se repitió el ensayo cambiando las condiciones de amplificación y no se logró obtener ningún amplificado para esta cepa por lo que se decidió no buscar esta en las muestras seleccionadas.

Una vez estandarizados los controles positivos, se buscó la presencia de estas, en los clarificados a partir de DNA purificado como se describió en materiales y métodos. Los resultados de las muestras analizadas por PCR para EPEC fueron negativos, estos ensayos se repitieron al menos tres veces siempre en presencia del control positivo para descartar algún problema durante la reacción de amplificación y no se obtuvo ninguna muestra positiva por lo que decidimos no mostrar el gel de este análisis.

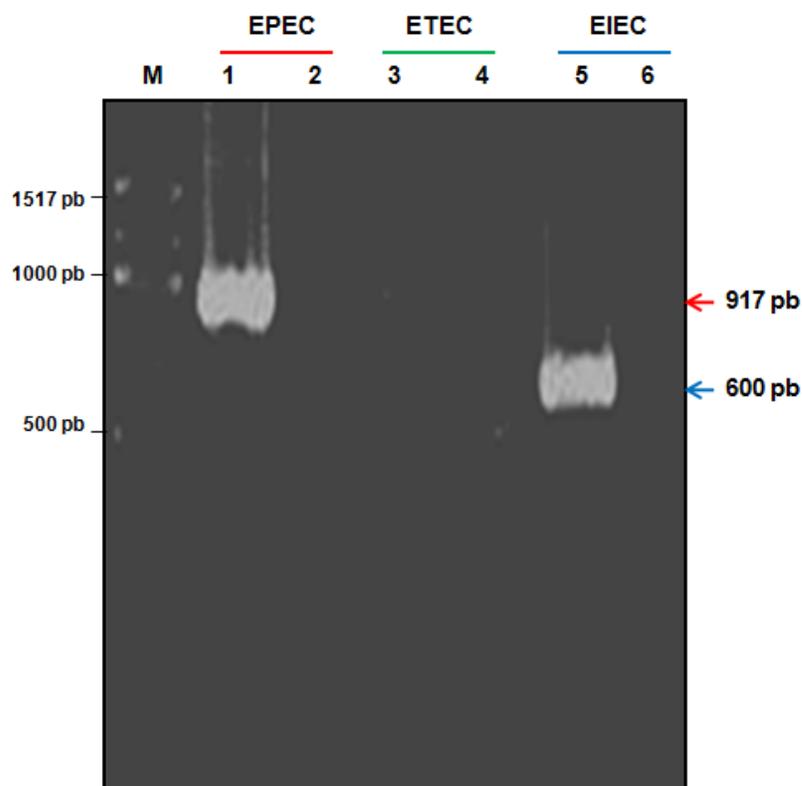


Figura 17.- PCR sobre colonia de cepas de *Escherichia coli* productoras de diarrea. A partir de la colonia de cada una de las cepas de *Escherichia coli* EPEC, ETEC, EIEC, se realizó una reacción de PCR. Carriles 1,3 y 5 productos de PCR amplificados a partir; los controles negativos corresponden a los carriles 2, 4 y 6. Los productos amplificados analizaron en un gel de agarosa al 1.5% y se señalan con flechas a la derecha de la figura. M, corresponde al marcador de tamaño molecular de 100 pb DNA Ladder (New England Biolabs).

Por otro lado, los resultados obtenidos para EIEC, con estas mismas muestras revelo el producto amplificado de 600 pb que corresponde al tamaño esperado para la variante en las diez muestras analizadas inicialmente (**Fig. 18, panel A**), como controles del experimento se usaron la colonia bacteriana de EIEC como control positivo (carril C+) y como control negativo la mezcla de reacción sin bacteria (carril C-). Este resultado nos llamo la atención, sobre todo por la positividad de todas las

muestras estudiadas así que para descartar una posible contaminación en la mezcla de oligonucleótidos, contaminación entre las muestras o inespecificidad de los oligonucleótidos, se realizó un ensayo con el DNA obtenido a partir de dos muestras de heces de niños sanos, los cuales fueron procesados exactamente igual que las muestras estudiadas, se utilizó como control positivo de la reacción el producto amplificado a partir de una colonia de EIEC, y como se esperaba no hay ningún producto amplificado (carriles 1 y 2) , el carril C+ corresponde al control positivo (**Fig. 18, panel B**).

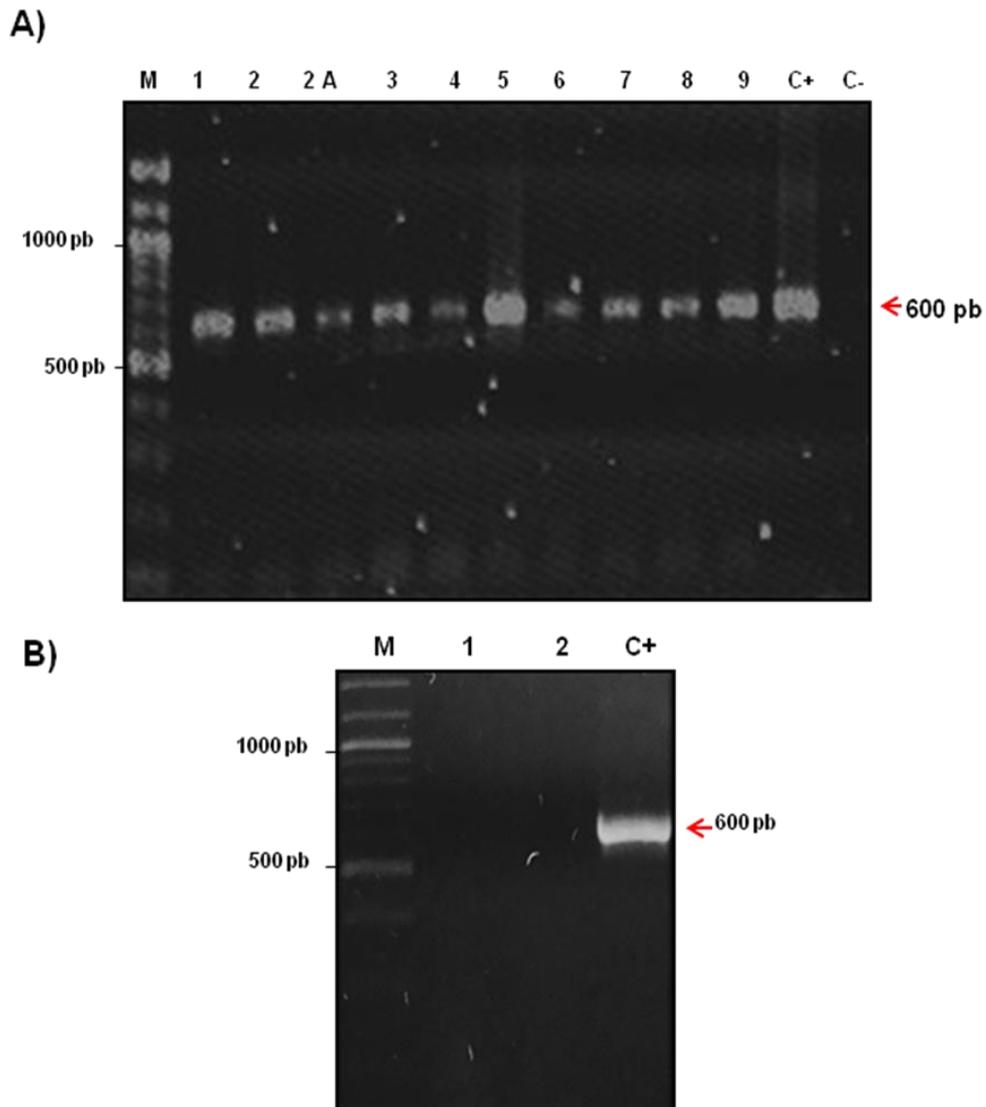


Figura 18.- Identificación de EIEC y control negativo por PCR. Reacción de PCR a partir de clarificados de heces para identificación de *E. coli enteroinvasiva* **(A)** y a partir de muestras de heces de niños sanos como control negativo **(B)**. Carriles 1-9 producto amplificado de 600 pb; C+ corresponde al control positivo de la reacción; C- control negativo de la reacción (sin DNA). Los carriles 1 y 2 corresponden al producto de PCR de las muestras de niños sanos, carril C+ control positivo de la reacción. Los productos de la PCR se corrieron en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio, y se indican con una flecha a la derecha de la figura. M, marcador de tamaño molecular de 100 pb DNA Ladder (New England *Bio Labs*).

Posteriormente analizamos 8 muestras más (seleccionadas en base al cuadro clínico y que no hubieran recibido tratamiento antibiótico) para la identificación de EIEC. Utilizamos el mismo control positivo para las 10 muestras analizadas previamente (**Fig. 18 A**) y encontramos 3 muestras más positivas a EIEC (**Fig. 19**) los carriles 2,6 y 8 corresponden a las muestras positivas, se observa un producto amplificado de 600 pb; el carril 1, 3, 4,5 y 7 corresponden a muestras negativas. El carril 9 y 10 corresponde al control positivo y negativo de la reacción respectivamente.

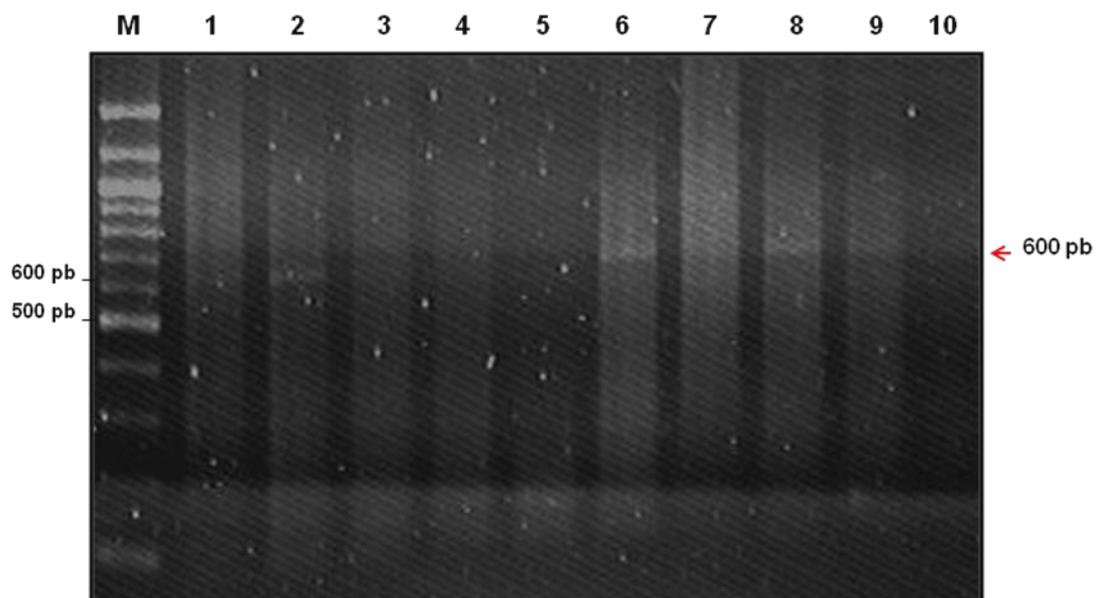


Figura 19.- Identificación de EIEC por PCR. Reacción de PCR a partir de clarificados de heces para identificación de *E. coli enteroinvasiva*. Carril 2, 6, y 8 corresponden a muestras positivas a EIEC, se observa un producto amplificado de 600 pb; carril 1, 3, 4, 5 y 7 corresponden a muestras negativas a EIEC; carril 9 y 10 corresponde al control positivo y negativo de la reacción. Los productos de la PCR se corrieron en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio, y se indican con una flecha a la derecha de la figura. M, marcador de tamaño molecular de 100 pb DNA Ladder (New England *Bio Labs*).

8.9 RESULTADO DE SECUENCIACIÓN DE LA MUESTRA POSITIVA PARA EIEC

De la misma manera que se hizo para las muestras positivas para virus, decidimos seleccionar el producto amplificado de sola una de las diez muestras, este se purificó y se secuenció para comparar el resultado con lo reportado en el GenBank. El resultado mostro que el análisis de la secuencia obtenida y comparada con la base de datos del GenBank, corresponden a las especies bacterianas esperadas como se ha reportado en la literatura (**Fig.20**) por lo que el resultado obtenido de las muestras analizadas para esta cepa son reales y resultado de amplificaciones inespecíficas o contaminación durante la preparación de la mezcla de reacción de PCR.

Sequences producing significant alignments:						
Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
GU186373.1	Escherichia coli strain HGZ12 ipaH6 gene, partial sequence	203	203	95%	2e-49	100%
CP001064.1	Escherichia coli 53638 plasmid p53638_226, complete sequence	203	813	95%	2e-49	100%
CP001384.1	Shigella flexneri 2002017 plasmid pSFxv_1, complete sequence	203	1016	95%	2e-49	100%
CP001383.1	Shigella flexneri 2002017, complete genome	203	1397	95%	2e-49	100%
EU743832.1	Shigella boydii invasion plasmid antigen (ipaH6) gene, partial cds	203	203	95%	2e-49	100%
EU743831.1	Shigella boydii invasion plasmid antigen (ipaH2) gene, complete cds	203	203	95%	2e-49	100%
CP001063.1	Shigella boydii CDC 3083-94, complete genome	203	1010	95%	2e-49	100%
CP001062.1	Shigella boydii CDC 3083-94 plasmid pBS512_211, complete sequence	203	813	95%	2e-49	100%

Figura 20.- Secuenciación automática de una muestra positiva para EIEC. Análisis de la secuencia de la muestra 5 para EIEC con el programa BLAST (NCBI) contenida en el GenBank.

En relación a los resultados para la cepa ETEC, dado que se ha reportado en la literatura que la presencia de esta cepa como responsable de infecciones gastroentéricas importantes en la población infantil parecen no ser tan relevantes en los rangos de edad de la población seleccionada en este proyecto y ya que no fue posible la estandarización del control positivo

a partir de la colonia bacteriana, se decidió no continuar con la búsqueda de esta en las muestras que conforman el banco biológico.

8.10 DETECCION DE *Entamoeba histolytica* por ELISA

Además del interés de estudiar virus y bacterias causantes de infecciones gastroentéricas en la población infantil, otro de los patógenos que se buscó fue *Entamoeba histolytica* dada la importancia que tiene este como responsable de gastroenteritis en niños menores de 4 años.

Tomando en cuenta que existen métodos inmunocromatográficos para la identificación cualitativa de *Entamoeba histolytica* a partir de muestras de heces, decidimos realizar el mismo procedimiento que seguimos para virus, analizamos los clarificados de 19 muestras con el kit RIDAQUICK *Entamoeba* (r-biopharm), el cual tiene una sensibilidad del 84.8% y una especificidad de 87.4% comparado con el examen microscópico convencional; es importante acotar que se seleccionaron solo este número de muestras debido a que al revisar la información contenida en la base de datos, varios de los niños habían recibido tratamiento antiparasitario como consecuencias del cuadro gastroentérico por el que cursaron.

El resultado obtenido mostró que las 19 muestras fueron negativas para *Entamoeba histolytica* (**Fig. 21**) ya que la aparición de una banda roja debajo del control interno del kit (banda azul) indicaría la positividad de la muestra, sin embargo este no fue el caso para ninguna de las muestras analizadas. Siguiendo la lógica de lo plasmado en los antecedentes, estos métodos de detección cualitativos aun cuando tienen sensibilidades altas, muestran muchas limitaciones en cuanto a la subestimación de que una muestra resulte negativa evaluada por este método cuando en realidad esta pudiera ser positiva, razón por la cual se decidió analizar las 19 muestras por PCR.

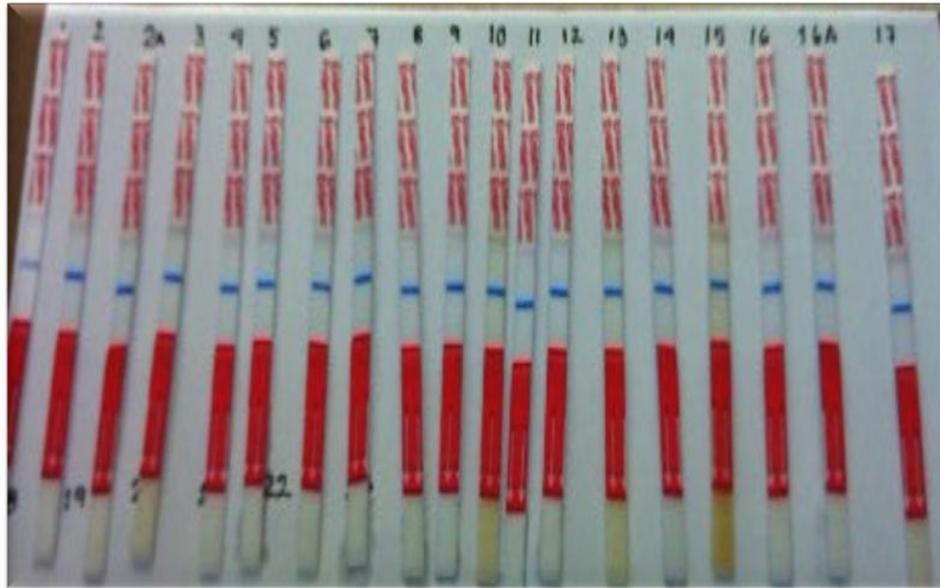


Figura 21.- Ensayo inmunocromatográfico para la detección de *Entamoeba*. Evaluación de clarificados de heces para la detección de *E. histolytica* por ELISA con el kit RIDAQUICK *Entamoeba* (r-biopharm). La banda azul en las tiras reactivas corresponde al control negativo del kit.

Entre las conclusiones de los diferentes estudios realizados en diversas partes del mundo en los cuales se utiliza el método de ELISA y PCR para la identificación de *Entamoeba histolytica/dispar* se ha observado que el nivel de los anticuerpos anti-amiba monitoreados por ELISA, no correlaciona con la infección de *E. histolytica* en la mayoría de los casos, ya que el tipo y nivel de anticuerpo varía con la evolución de la enfermedad, por lo que utilizar este método de forma convencional para la identificación de este parásito conlleva muchas limitaciones; sin dejar de mencionar que este método no permite establecer la diferencia entre las distintas especies de *Entamoeba*. Por lo que la mayoría de estos estudios mencionan la importancia de utilizar un método molecular como la PCR que ha demostrado ser más sensible y

especifico en comparación con el ELISA en diferentes estudios epidemiológicos 29,30,53,70).

8.11 IDENTIFICACION DE *Entamoeba histolytica* POR PCR

Considerando que los clarificados que se evaluaron por ELISA resultaron negativos, estos se analizaron por PCR empleando los oligonucleótidos RD5 y RD3 (**Tabla 8**), por lo que también se estandarizó un control positivo a partir del DNA genómico de la clona C2 donada por la Dra. Ma. del Consuelo Gómez García (PIBIOM, ENMyH-IPN) dado que la muestra de heces positiva a amibas con la que contábamos aún cuando contenía quistes, no fue posible extraer el DNA para ser amplificado con los oligonucleótidos ya mencionados, muy probablemente porque esta había sido tratada con formalina previamente.

Previo a la amplificación con los oligonucleótidos RD5 y RD3, se verificó la integridad del DNA mediante la amplificación por PCR del gen de actina de amibas con oligonucleótidos específicos para este generando un producto de 210 pb (**Fig. 22, panel A**), el cual se observa en el carril 1, mientras que el carril 2 corresponde al control negativo de la reacción. Posteriormente se amplificó un fragmento de 1950 pb que corresponde a la subunidad ribosomal 16S del RNA ribosomal pequeña con los oligonucleótidos RD5 y RD3 y que se usó como control positivo (**Fig. 22, panel B**), el carril 2 corresponde al control negativo de la reacción; este producto se purificó para ser utilizado en las reacciones de identificación de *Entamoeba*, es importante señalar que este par de oligonucleótidos no permiten diferenciar entre *E. histolytica* y *E. dispar* solo permiten determinar la presencia de parásitos del genero *Entamoeba* razón por la cual se decidió utilizarlos inicialmente.

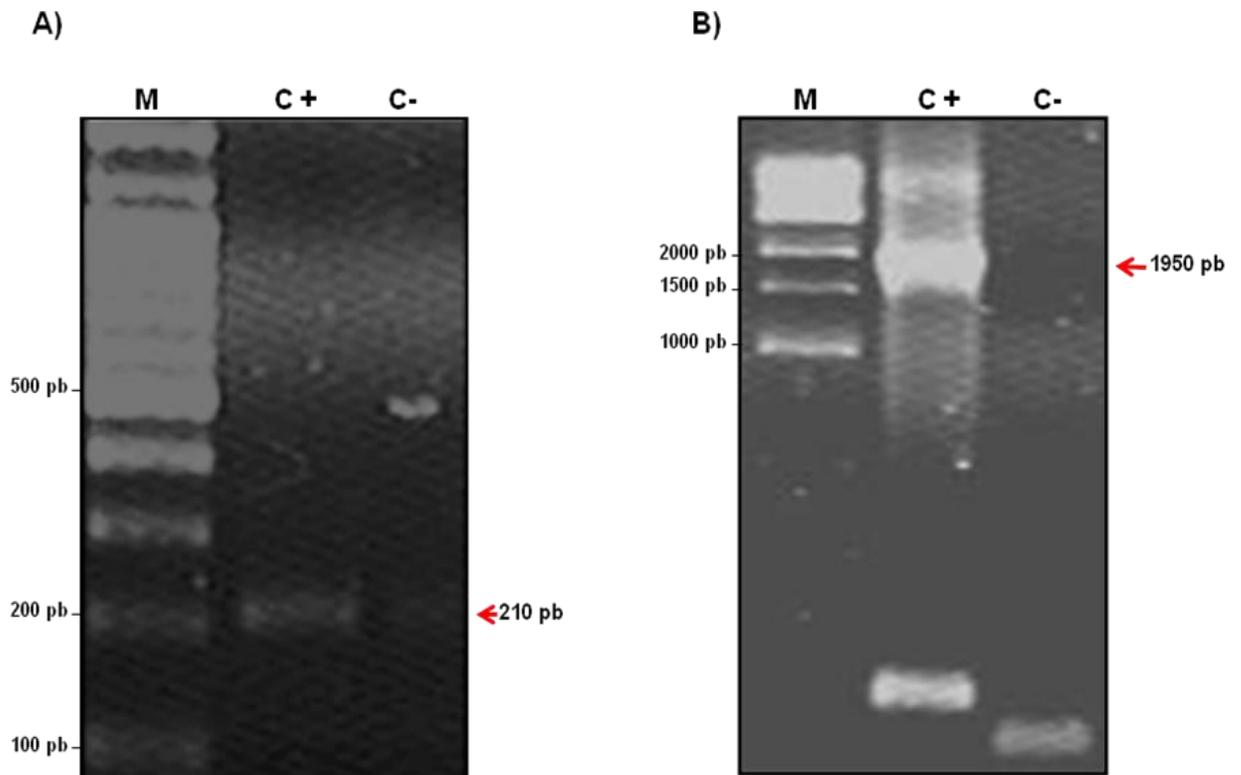


Figura 22.- Control positivo para *Entamoeba histolytica* por PCR. Amplificación por PCR del gen de actina de amiba de 210 pb **(A)** y el producto 1950 pb de la subunidad ribosomal 16S como control positivo **(B)**. Carriles C+, corresponden a los productos amplificados; carriles C-, corresponden a los controles negativos de la reacción. Los productos se corrieron en geles de agarosa al 0.8% y 1.5 % respectivamente y se tiñeron con bromuro de etidio, los productos son señalados con una flecha a la derecha de la figura. M, marcador de tamaño molecular de 1 kb Plus (New England Biolabs).

Una vez estandarizado el control positivo y como el análisis inmunocromatográfico mostro que las muestras analizadas fueron negativas se procedió a la identificación de *E. histolytica* por PCR, por lo que se extrajo el DNA de los clarificados con el kit QIAamp DNA Stool (QIAGEN) como se describió en materiales y métodos, como control positivo se usó el producto de PCR purificado obtenido previamente **(Fig 22,**

panel B). Se llevó a cabo la PCR en las 19 muestras utilizando los oligonucleótidos RD5/RD3 y en ninguna de ellas se observó amplificación del producto esperado, sin embargo como los datos clínicos sugerían fuertemente que las muestras podrían ser positivas, decidimos analizar estas utilizando los oligonucleótidos Psp5 y Psp3 que son específicos para identificar *Entamoeba histolytica* y que amplifican un producto de 876 pb con la idea por un lado, de corroborar que las muestras eran negativas o bien que los oligonucleótidos RD5 y RD3 por alguna razón no fueron capaces de amplificar esa región genómica de la subunidad ribosomal 16 S aún cuando se trata de una zona altamente conservada entre este tipo de parásitos.

Al llevar a cabo el análisis de estas muestras con los oligonucleótidos Psp5 y Psp3 específicos para amplificar *Entamoeba histolytica*, encontramos dos muestras positivas, las cuales se observan en los carriles 2 y 5 con el producto de 876 pb que corresponde al tamaño esperado; los carriles 3 y 4 corresponden a muestras negativas; el carril 7 corresponde al control negativo de la reacción (**Fig. 23, panel A**), como control positivo de este ensayo se usó el producto de 1950 pb de la clona 2 de amiba (carril 6).

Dado que la amplificación de una de las muestras positivas (panel A, carril 5) fue pobre, decidimos repetir la PCR usando como templado los productos amplificados de las dos muestras que resultaron positivas y como control positivo el DNA de la clona 2 con los mismos oligonucleótidos (Psp5 y Psp3), por lo que con este ensayo, corroboramos el resultado anterior, en los carriles 1 y 3 se muestra el producto de la PCR para *Entamoeba histolytica* de 876 pb; el carril 2 corresponde a una muestra negativa; los carriles 4 y 5 corresponden al control positivo y negativo de la reacción respectivamente (**Fig. 23, panel B**).

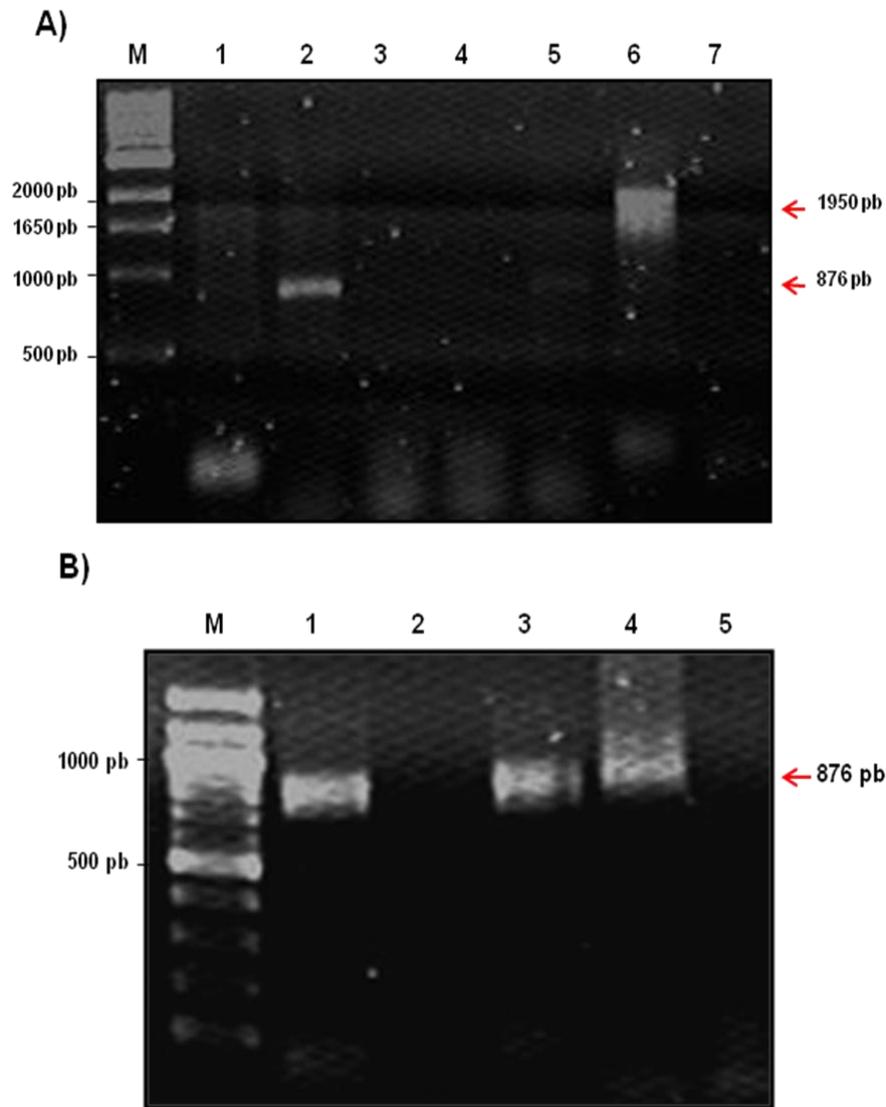


Figura 23.- Identificación de *Entamoeba histolytica* por PCR. Se amplificaron por PCR con los oligonucleótidos RD5 /RD3 y Psp5/Psp3 los controles positivos (1950 pb) y muestras para *E. histolytica*; carriles 2 y 5 producto de PCR de muestras positivas (876 pb); carriles 6 y 7 control positivo y negativo de la reacción con los oligonucleótidos RD5/RD3 respectivamente **(A)**. Reamplificación de muestras positivas a *E. histolytica*, carriles 1 y 3 producto de PCR de 876 pb; carril 2, muestra negativa; carriles 4 y 5 control positivo y negativo de la reacción respectivamente con los oligonucleótidos Psp5 y Psp3 y el DNA de la clona C2 **(B)**. Los productos se analizaron en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio y se señalan con una flecha al lado derecho de la figura. M corresponde al marcador de 1 kb DNA Ladder.

8.12 ESTANDARIZACIÓN DEL ENSAYO DE PCR MÚLTIPLE

Dado que el objetivo más importante de este trabajo, fue el establecimiento de un método molecular del tipo PCR múltiple que fuera más específico y sensible que los métodos convencionales para la detección de patógenos causantes gastroenteritis y considerando que encontramos muestras positivas para todos los patógenos estudiados, llevamos a cabo la estandarización del ensayo de PCR múltiple para la detección simultánea de estos con la finalidad de obtener una herramienta diagnóstica más específica que las descritas a la fecha.

Previo a la estandarización del método molecular, decidimos realizar un análisis bioinformático que nos facilitara encontrar las condiciones “óptimas” teóricas de concentración de oligonucleótidos a utilizar así como las temperaturas de alineamiento de estos. Por lo que tomando en cuenta todos estos parámetros, decidimos primero realizar un ensayo de PCR por grupo de patógenos, es decir, amplificar por separado virus (astrovirus, calicivirus) en una reacción y bacterias y parásitos en otra reacción, esto debido a que el genoma de ambos virus estudiados es de RNA y no sabíamos si bajo las condiciones de RT-PCR, el DNA provenientes de bacterias y parásitos al ser desnaturalizado durante el ciclo de separación de los híbridos RNA-cDNA, pudieran hibridarse de manera inespecífica preferencialmente con los oligonucleótidos específicos para virus y no con los propios aun cuando el análisis teórico indico que esto no era posible que sucediera.

Una vez establecido este criterio, revisamos las condiciones de amplificación individuales y decidimos utilizar temperaturas promedio para la amplificación de cada grupo mientras que para la concentración de oligonucleótidos decidimos utilizar una concentración equimolar de los mismos en cada uno de los ensayos.

PATÓGENO	T _m	T _m (PUBLICADO EN ARTÍCULOS)	[] PRIMERS
ASTROVIRUS	59°C	55°C	10 uM
NOROVIRUS	64°C	56°C	50 pmoles
EIEC	59°C	60°C	20 pmoles
EPEC	87°C	60°C	20 pmoles
<i>Entamoeba histolytica</i>	55°C	55°C	20 pmoles

Tabla 13.- Condiciones de T_m y concentración de oligonucleótidos para amplificar cada uno de los patógenos por PCR múltiple.

Los resultados de este primer análisis, en donde se mezclaron los dos pares de oligonucleótidos para amplificar bacterias (EIEC) y amibas (*E. histolytica*) y como templados los productos de PCR provenientes de los controles positivos para ambos (**Fig. 24**) mostraron que ambos productos se amplificaron por separado como controles del ensayo (carriles 1 a 4), los carriles nones corresponden a los productos de 1950 pb y de 600 pb para *E. histolytica* y EIEC respectivamente, mientras que los carriles pares corresponde a los controles negativos de la reacción. Cuando se mezclaron ambos productos de PCR para cada patógeno, sé logro amplificar en la misma reacción ambos productos (carril 5) y no se obtuvo ningún amplificado en el control negativo de esta mezcla (carril 6) lo que nos indicó que estas condiciones de PCR fueron las optimas para la amplificación de los genomas de ambos patógenos (**Fig. 24**).

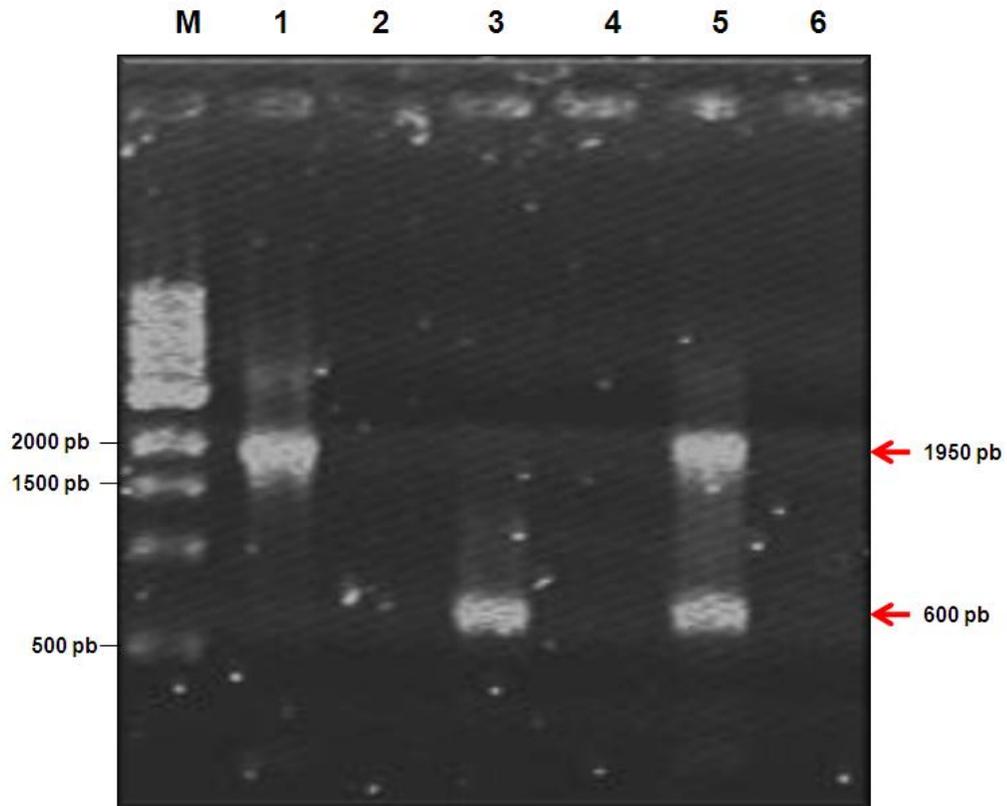


Figura 24.- PCR múltiple para la identificación de EIEC y *Entamoeba*. A partir del DNA obtenido de los controles positivos para cada patógeno se realizó la PCR múltiple con los oligonucleótidos IpaH1, IpaH2 (EIEC) y RD5, RD3 (*Entamoeba*). Carriles 1 y 3, productos amplificados de *Entamoeba* (1950 pb) y EIEC (600 pb) respectivamente; carriles 2 y 4, controles negativos de la reacción. Carril 5, productos de la PCR múltiple para EIEC y *Entamoeba*; carril 6 corresponde al control negativo de la reacción. Los productos se corrieron en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. M corresponde al marcador de tamaño molecular de 1 kb DNA ladder Plus (Invitrogen).

En cuanto al ensayo de PCR múltiple para astrovirus y calicivirus (norovirus) se utilizó como templado el producto amplificado por RT-PCR a partir de los controles positivos para ambos virus (**Fig. 8,9 y 11**), el ensayo se realizó de la misma forma que para bacterias y amibas; sin embargo para observar la diferencia en tamaño de

los productos amplificados entre ambos virus , ya que el producto amplificado de astrovirus con los oligonucleótidos Mon- 380/Mon-384 es de 289 pb y el de calicivirus es de 319 pb decidimos emplear otro par de oligonucleótidos para astrovirus (Mon-269/ Mon-270), estos se han empleado para genotipificar astrovirus en heces (28,43,45,46,75) y cuyo producto de 449 pb corresponde a una región altamente conservada del ORF2 del genoma viral. De igual manera, ambos productos se amplificaron por separado como controles del ensayo (carriles 1 a 4), los carriles impares corresponden a los productos de 319 pb y de 449 pb para calicivirus y astrovirus respectivamente, mientras que los carriles pares corresponden a los controles negativos de la reacción, cuando se mezclaron ambos productos en el mismo tubo de reacción con los dos pares de oligonucleótidos se amplificaron los productos de 449 pb (astrovirus) y de 319 pb (calicivirus) como se puede observar en el carril 5 y el control negativo de la reacción se muestra en el carril 6, nuevamente, este resultado indicó que estas condiciones de PCR fueron las optimas para la amplificación de los genomas de ambos virus **(Fig. 25)**.

La amplificación individual del producto de 319 pb correspondiente a calicivirus, no se vio claramente (carril 1) aunque en la reacción en donde se mezclaron los dos productos en un solo tubo, este se observó ligeramente enriquecido (carril 5); este ensayo se repitió tres veces y siempre se observó el mismo comportamiento para calicivirus y no sabemos cuál pudiera ser la explicación a esto, pues los productos obtenidos de las muestras que resultaron positivas a este virus se observaron enriquecidas **(Fig. 11, panel B)**, creemos que una posible explicación es que la región genómica de calicivirus es más susceptible a degradarse bajo las condiciones experimentales de la PCR múltiple probadas en este trabajo.

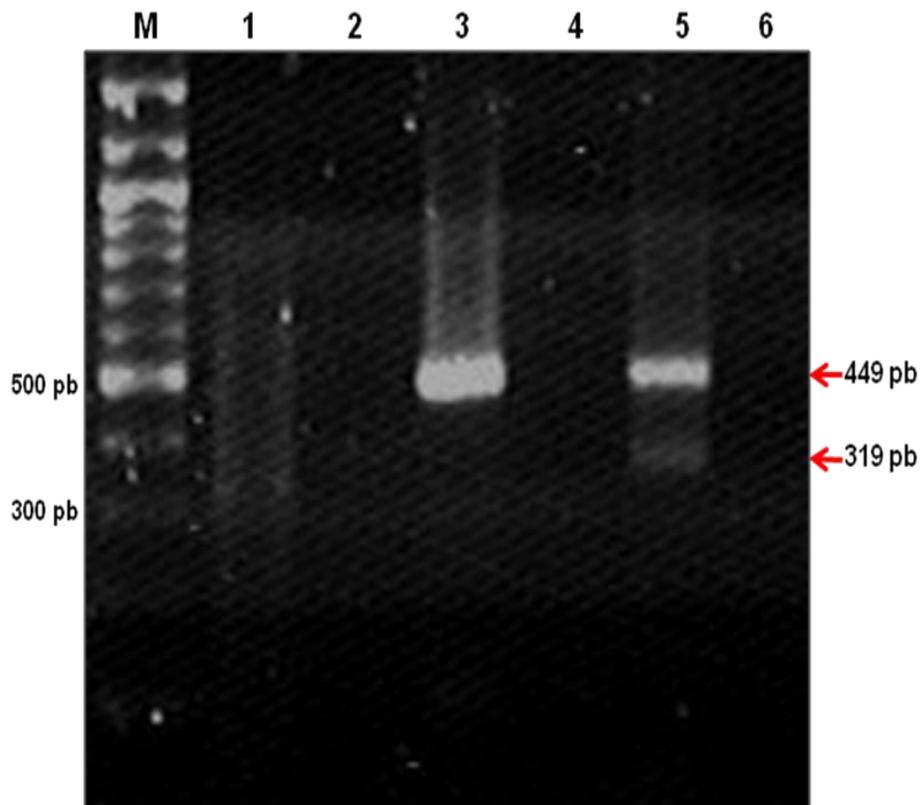


Figura 25.- PCR múltiple para la identificación de astrovirus y calicivirus. A partir de los productos de la RT-PCR de los controles positivos para astrovirus y calicivirus se realizó la reacción de PCR múltiple con los oligonucleótidos Mon- 269/Mon-270 (astrovirus), p-289 / p-290 (calicivirus). Carriles 1 y 2 reacción de PCR para calicivirus, carril 1 amplificado de 319 pb y carril 2 control negativo; carriles 3 y 4 reacción de PCR para astrovirus, carril 3 amplificado de 449 pb y carril 4 control negativo. Carriles 5 y 6 corresponden a la reacción de PCR múltiple, carril 5 productos amplificados de 449 pb (astrovirus) y 319 pb (calicivirus), carril 6 corresponde al control negativo de la reacción. Los productos de la PCR se analizaron en un gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio y se señalan con una flecha al lado derecho de la figura. M, marcador de tamaño molecular de 100 pb (Invitrogen).

Una vez que se logró la amplificación por PCR múltiple para cada grupo de patógenos, se llevó a cabo la estandarización de la PCR múltiple utilizando ahora el ácido nucleico de las muestras positivas obtenidas a partir de los clarificados, para ellos se ajustaron las condiciones de amplificación para todos los microorganismos.

Previo a la realización de la PCR múltiple se llevó a cabo la RT-PCR para la obtención del cDNA de las muestras positivas para astrovirus y calicivirus y posteriormente llevar a cabo la mezcla de estos productos con el DNA de la muestra positiva para EIEC y *Entamoeba histolytica*. El resultado obtenido permitió la amplificación por separado de cada patógeno (**Fig. 26**) como se observa en los carriles 1 al 8 que corresponden a los controles positivos y negativos de la reacción de PCR para cada uno de los microorganismos, es decir, calicivirus (carriles 1 y 2), astrovirus (carriles 3 y 4), EIEC (carriles 5 y 6) y *Entamoeba histolytica* (carriles 7 y 8). En los carriles impares se observan los productos amplificados de 319 pb, 449 pb, 600 pb y 876 pb que corresponden a los productos esperados para calicivirus, astrovirus, EIEC y *Entamoeba histolytica* respectivamente y los carriles pares a los controles negativos. En el carril 9 se muestra el resultado de la PCR múltiple utilizando como templado la mezcla de los DNA de astrovirus, calicivirus, EIEC y *Entamoeba histolytica*, en donde se observa la amplificación de los productos de 876 pb, 600 pb y 449 pb que corresponde al producto esperado para *Entamoeba histolytica*, EIEC y astrovirus respectivamente, igual que en el ensayo anterior, la amplificación individual por RT-PCR de la muestra positiva de calicivirus empleada para este ensayo de PCR múltiple con todos los patógenos, fue pobre (carril 1) y nuevamente no se logró la amplificación del producto de 319 pb cuando se mezclaron todos los genomas en el mismo tubo de reacción, este ensayo se repitió al menos tres veces sin lograr la obtención de este producto.

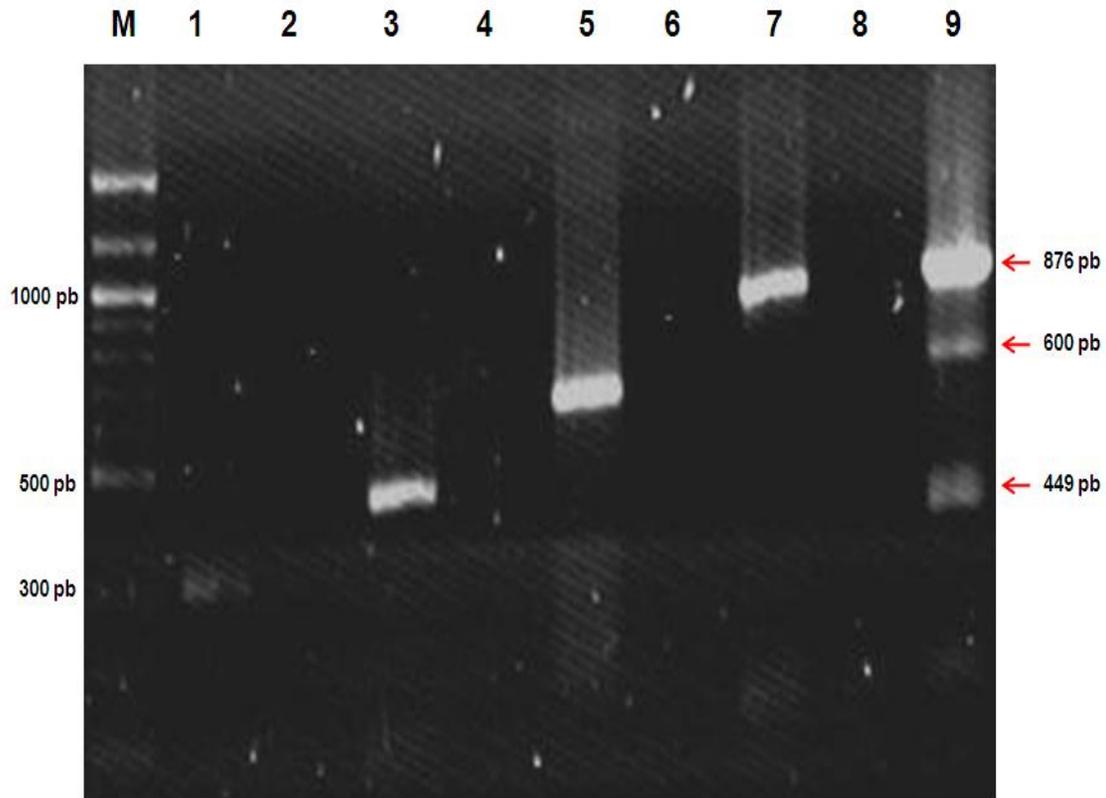


Figura 26.- Ensayo de PCR múltiple para la detección de virus, bacterias y parásitos a partir de heces. A partir del DNA obtenido de los clarificados de heces de muestras positivas para virus, bacterias y parásitos se llevó a cabo el ensayo de PCR múltiple. Carriles 1 al 8 corresponden a la reacción de PCR individual para calicivirus (319 pb), astrovirus (449 pb), EIEC (6 pb), *Entamoeba histolytica* (876 pb), carriles nones productos amplificados y carriles pares controles negativos para cada patógeno. Carril 9, amplificación de muestras para astrovirus, EIEC y *E. histolytica*. Los productos amplificados se corrieron en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio y se señalan con una flecha al lado derecho de la figura. M: corresponde al marcador de peso molecular de 100 pb (Invitrogen).

9 DISCUSIÓN

La gastroenteritis aguda tiene una etiología muy diversa (virus, bacterias y parásitos) siendo los virus los principales agentes etiológicos reportados a nivel mundial como responsables de estos cuadros principalmente en niños, causando un alto grado de morbilidad y mortalidad en países en vías de desarrollo como el nuestro. El hecho de que los cuadros clínicos provocados por estos agentes patógenos sean muy similares y la presencia frecuente de coinfecciones limite enormemente el diagnóstico, hace necesario el desarrollo de métodos que sean capaces de identificar simultáneamente a estos patógenos en los cuadros gastroentéricos, sobre todo en los grupos de mayor riesgo pues los métodos utilizados de forma convencional son poco sensibles y poco específicos. Por ello el objetivo principal de este trabajo fue desarrollar una herramienta molecular del tipo PCR múltiple que nos permitiera llevar a cabo la detección simultánea de virus (astrovirus, calicivirus), bacterias (EIEC) y parásitos (*Entamoeba histolytica*) con la finalidad de proponerla como un método diagnóstico altamente sensible y específico, por lo que durante dos años se colectaron 103 muestras de heces de niños mexicanos con un cuadro clínico de gastroenteritis aguda, las cuales fueron analizadas por ELISA para identificar cada uno de los microorganismos (astrovirus, norovirus, y *Entamoeba histolytica*) y por métodos moleculares (RT-PCR y PCR).

Actualmente se ha propuesto en diversos estudios epidemiológicos en todo el mundo, el uso de métodos moleculares para la identificación de estos microorganismos como son la RT-PCR y PCR (4,10,13,16,31,35,47,56,60,62,74,75,77) sin embargo las propuestas en estos trabajos ha sido la identificación por género de cada uno de estos microorganismos, pero no de forma simultánea, por lo que comparando nuestros resultados con lo reportado en la literatura para astrovirus, encontramos que las 103 muestras

analizadas por ELISA fueron negativas y de estas mismas cuatro resultaron positivas por RT-PCR (3.8%) (**Tabla 12, Fig. 8 y 9**). Estos resultados concuerdan con los datos epidemiológicos encontrados en la mayoría de los estudios realizados en México y otras partes del mundo (4, 43, 51, 75) pues en todos ellos los porcentajes de detección de astrovirus oscila entre el 1 a 26 % de niños con gastroenteritis tanto en los países desarrollados como en vías de desarrollo dependiendo del tipo de estudio realizado, es decir, muestras provenientes de niños hospitalizados o muestras de niños en población abierta (16,23) encontrándose la presencia de astrovirus 1 (HastV-1) y astrovirus 8 (HastV-8) como los serotipos responsables del cuadro diarreico. Al respecto, en varios estudios a nivel mundial sobre la prevalencia de los serotipos circulantes en la población infantil, HastV-1 es el más común a nivel mundial mientras que HastV- 8 parece ser raro o poco común (18, 28, 59); sin embargo esto parece contradecir lo reportado por Walter y cols (77) y Méndez- Toss y cols (45), quienes reportaron la coexistencia de diferentes cepas en México incluido astrovirus 8 que fue encontrado específicamente en la ciudad de México además de otras ciudades del país como Monterrey y Mérida, en esta última con una prevalencia del 40% en la población estudiada, lo cual concuerda con los resultados obtenidos en nuestro trabajo ya que por el análisis de las secuencias de las muestras positivas para astrovirus encontramos la presencia del serotipo 1 y 8. Los resultados para calicivirus fueron obtenidos de la misma manera que para astrovirus, es decir, comparamos los dos métodos y los datos por ELISA revelaron que de las 40 muestras evaluadas, solo una de ellas fue positiva (2.5%) (**Tabla 12, Fig. 10**) situación que llamó nuestra atención debido a que el kit inmunocromatográfico utilizado por nosotros y otros grupos de investigación (46, 74) tiene una sensibilidad y especificidad de 77% y 100% respectivamente y se usa rutinariamente para el diagnóstico de estos en la clínica y de las 103 muestras

analizadas por RT-PCR, encontramos 4 positivas (3.8%), interesantemente la muestra que fue positiva por ELISA resulto positiva por RT-PCR (**Tabla 12, Fig. 11**), estos resultados también concuerdan con lo reportado en estudios epidemiológicos en México en cuanto a la prevalencia de estos virus en la población infantil y otras partes del mundo, ya que aún considerando que se trata de un virus con una elevada prevalencia en infecciones gastroentéricas (62) debemos considerar que es un agente etiológico de brotes de gastroenteritis en niños y adultos, y principalmente en individuos que se encuentra en hacinamiento, y dado que no fue nuestro caso, la prevalencia encontrada fue similar a la reportada en otros trabajos. La mayoría de los estudios en los que se uso el método de ELISA para identificar a calicivirus ha sido únicamente utilizado para descartar coinfecciones con otros virus (58) y no como un método rutinario. La muestra positiva por ambos métodos (ELISA, RT-PCR) se clonó y secuenció y el análisis reveló (**Fig. 16**) que el porcentaje de mayor identidad (98%) corresponde a una proteína no estructural del virus Norwalk, y considerando que este virus es la cepa prototipo de los calicivirus humanos y se ha reportado con una elevada frecuencia en brotes de gastroenteritis no bacteriana (26), consideramos que este resultado concuerda con lo reportado en otros estudios en diferentes partes del mundo, como el realizado por Belliot y cols (4) quienes reportan una prevalencia de (37.5%) para el virus Norwalk por el método de RT-PCR, y aunque la prevalencia pareciera mayor que la encontrada en nuestro trabajo (3.8%) debemos considerar que el número de muestras es mayor en el trabajo reportado por Belliot y cols (4), además de que ellos utilizaron muestras tanto de niños como de adultos. De la misma manera otros estudios señalan a los virus Norwalk como una de las principales causas de gastroenteritis aguda en humanos tanto niños como adultos a nivel mundial (28, 72,80) por lo cual no fue raro encontrar a este virus en cuadros gastroentericos en niños.

Logramos la identificación de los virus blanco (astrovirus, calicivirus) a través de la RT-PCR a partir de muestras de heces, sin embargo la intensidad de los productos amplificados en ambos casos fue baja, lo cual puede explicarse debido a una carga viral baja en las muestras, ya que la excreción viral puede variar durante el periodo de diarrea, como se describió en el estudio realizado por Walter y cols (77) en el cual reportaron que a partir de una muestra de heces de la misma persona lograron la identificación de astrovirus una semana antes del episodio diarreico, siendo indetectable en otra muestra diarreica una semana después, otro caso en el que identifican astrovirus en una muestra de heces tomada un día después del inicio del episodio diarreico, siendo indetectable en una muestra diarreica de la misma persona tomada una semana antes, lo cual los lleva a sugerir que la detección de astrovirus puede variar durante el periodo diarreico y que las muestras positivas pueden ser detectadas desde el periodo de incubación y en periodos de excreción prolongada. Otro estudio en el que se observó una variación de la excreción viral fue el realizado por Maldonado y cols (43), en el cual del 30% de los niños con infección por astrovirus, el virus es detectado únicamente en una muestra durante el análisis de las mismas y el resto fueron detectadas de forma intermitente a lo largo de 17 semanas, ellos comentan que cuando una muestra se analizada por RT-PCR en comparación con ELISA requiere un procesamiento más largo lo cual podría provocar afección de las partículas virales intactas disponibles para la detección por RT-PCR. Por lo cual en base a estos estudios podemos sugerir que la carga viral de las muestras utilizadas en nuestro trabajo pudo haber sido baja y aunque las muestras fueron tomadas de niños cursando con un cuadro clínico de gastroenteritis, esto no garantiza que la excreción de particular virales fuera elevada en el momento de la toma de la muestra, además otro factor que pudo haber contribuido a que la señal de amplificación fuera baja es precisamente la afectación de las partículas

virales durante el almacenamiento de las muestras y durante la extracción del ácido nucleico para llevar a cabo la RT-PCR.

Otros de los patógenos que nos interesó buscar en este trabajo fueron las bacterias productoras de diarrea como *Escherichia coli enteroinvasiva* (EIEC) y el parásito protozoario *Entamoeba histolytica*, este último por ambos métodos (ELISA y PCR) mientras que para bacterias productoras de diarrea, buscamos sistemas comerciales del tipo ELISA y no encontramos ninguno por lo que el análisis de estas se hizo solo por PCR.

De las 20 muestras analizadas por PCR para EIEC, 14 fueron positivas (70%), lo que nos llamó la atención por los antecedentes reportados en la literatura en relación a la prevalencia de este tipo de bacteria en la población infantil, razón por la cual usamos heces de niños sanos, de las cuales se extrajo el DNA para usarlos como controles y como esperábamos, no hubo amplificación en ninguna de las muestras utilizadas; mientras que para determinar la identidad de una de las muestras positivas se secuenció y el resultado obtenido reportó 100% de identidad para EIEC, pero también se encontró un 100% de identidad para *Shigella flexneri*, lo cual resulta lógico ya que *Escherichia coli enteroinvasiva* (EIEC) y *Shigella spp.* están estrechamente relacionadas bioquímica, genética y patogénicamente, además de ser taxonómicamente indistinguibles y se ha mantenido su distinción en la nomenclatura debido a algunas diferencias en el cuadro clínico (34), por lo que revisando el banco de datos clínicos de la muestra secuenciada podemos confirmar que se trata de *Escherichia coli enteroinvasiva*. Sin embargo nuestro resultado no concuerda con lo reportado en otras partes del mundo, en donde se estima una mayor prevalencia de EAEC y EPEC, y en la mayoría de los casos no se logra identificar EIEC (24, 64, 66); lo cual sugiere una probable diferencia en la epidemiología entre nuestro país y otras partes del mundo, esto nos lleva a pensar en la necesidad de tener métodos de

diagnóstico altamente sensibles y específicos que permitan llevar a cabo estudios de corte epidemiológico de una forma más precisa. Además considerando que *Escherichia coli* tiene una alta capacidad de adquirir factores de virulencia específicos para adaptarse a nuevos nichos, puesto que son codificados en elementos genéticos móviles para crear combinaciones exitosas (37) no sería raro encontrar nuevas cepas que compartan factores de virulencia que sean difíciles de detectar con los métodos hasta ahora conocidos, además otro factor que no debemos olvidar es el hecho de que en nuestro país el uso indiscriminado de antibióticos es una práctica común que puede llevar a un cambio enorme en la epidemiología establecida a nivel mundial. Cabe señalar que a pesar de haber buscado la presencia de la variante EPEC no se logró su detección aún cuando se hicieron varios intentos con los oligonucleótidos seleccionados para ello por lo cual decidimos excluirla del estudio.

Por otro lado, las 19 muestras analizadas por ELISA para la detección de *Entamoeba histolytica*, fueron negativas aún cuando el kit empleado tiene una sensibilidad y especificidad de 84.8% y 87.4% respectivamente comparado con el examen microscópico convencional; decidimos utilizar el método de ELISA dado que este es empleado de forma convencional en diversos estudios por considerarse una técnica rápida, práctica aunque poco sensible (20, 21,70).

Los resultados encontrados con este método concordaron con diversos estudios, como fue el trabajo realizado por Stark y cols (70) quienes reportan que el método de ELISA para la identificación de *Entamoeba histolytica* fue 1,000 veces menos sensible en comparación con la PCR, mientras que en estudios llevados a cabo en regiones endémicas para amibiasis como el realizado por Gatti y cols (20) demostraron que la sensibilidad de los kits probados (Tech Lab *E. Histolytica*, CELISA PATH) fue pobre (14.3%) y mucho más baja que el examen microscópico

(66%) y la especificidad de 98.4% en comparación con el análisis isoenzimático. Gonin y cols (21) también reportan una baja sensibilidad del método de ELISA en comparación con el examen microscópico, sin embargo estos trabajos se contraponen al reportado por Haque y cols en 1998 (31) quienes reportaron una correlación del 90% entre la PCR, el kit de ELISA (TechLab) y el análisis isoenzimático, aunque concluyeron que sus resultados no concuerdan con estudios realizados en niños mexicanos, lo que refleja diferencias en la epidemiología entre un país y otro, así mismo concluyen que en la mayoría de los estudios en los que se utiliza la PCR para la identificación de este microorganismo no se confirman los resultados con otros métodos como cultivo o detección de antígeno, por lo cual no se realiza una comparación entre la PCR con el ELISA (31); ellos utilizan muestras de heces frescas para la identificación de *Entamoeba histolytica* mientras nosotros sometimos las muestras a un proceso de congelamiento lo cual puede sugerir que este cambio, provocó daño a la forma vegetativa del parásito y es precisamente esta forma la identificada de forma convencional a través del método de ELISA (31), esa puede ser una causa por la cual no logramos la amplificación de ninguna muestra a través de este método.

Aun cuando las muestras de las que partimos para detectar *E.histolytica* habían sido congeladas decidimos llevar a cabo la identificación de este parásito por PCR solo en las muestras de niños que no habían recibido tratamiento antiparasitario, encontrándose dos muestras positivas (10.5%) (**Fig. 23**), este resultado también coincidió con la prevalencia reportada en México y otras partes del mundo (10, 29, 60,70), aunque esperábamos encontrar más muestras positivas, considerando que en nuestro país la amibiasis es aún una enfermedad endémica.

Lamentablemente no fue posible tener los resultados de la secuenciación de las dos muestras que resultaron positivas para corroborar que los oligonucleótidos utilizados amplifican regiones específicas de *Entamoeba histolytica* (60).

Ahora bien, como nuestro objetivo primordial fue la estandarización de una PCR múltiple para la identificación de virus, bacterias y parásitos, utilizando las muestras positivas (astrovirus y calicivirus) o cepas de referencia (bacterias) de cada patógeno llevamos a cabo los ensayos de PCR múltiple usando como planteados los productos de la PCR individual de cada uno.

Decidimos estandarizar la PCR múltiple primero por grupo de patógenos con la finalidad de encontrar las condiciones óptimas de amplificación tomando en cuenta lo publicado por Henegariu y cols (33) y otros trabajos (28,51,59,62, 74,78) y logramos amplificar en el mismo tubo de reacción a astrovirus y calicivirus (**Fig 25**) y en otro tubo de reacción amplificamos EIEC y *E.histolytica* (**Fig 24**), posteriormente probamos estas mismas condiciones en las muestras de heces positivas para cada uno (astrovirus, norovirus, EIEC y *E. histolytica*) logrando amplificar de forma simultánea a tres de los cuatro patógenos estudiados, astrovirus, EIEC y *Entamoeba histolytica*, en este ensayo para hacer evidente la presencia de las secuencias virales dado que los genomas de estos son de RNA, primero se sintetizó el cDNA de cada región genómica viral a partir del RNA purificado de los clarificados positivos a cada virus y estos cDNAs se mezclaron con el DNA obtenido de cada clarificado que resultó positivo a EIEC y *E. histolytica*.

Con este resultado logramos el objetivo más importante de este trabajo, un ensayo de PCR múltiple novedoso a través del cual se puede identificar los tres tipos de microorganismos, virus, bacterias y parásitos, en forma simultánea que causan gastroenteritis aguda, sin embargo no logramos amplificar calicivirus de forma simultánea con el resto de los patógenos (EIEC, *Entamoeba histolytica*, astrovirus) lo

cual nos llevó a pensar que probablemente cuando combinamos en un mismo tubo los ácidos nucleicos de los cuatro microorganismos existió una degradación del templado específicamente de calicivirus motivo por el cual no se logró amplificar.

En resumen debido a que la gastroenteritis aguda continua siendo un padecimiento con una elevada prevalencia no solo en nuestro país sino a nivel mundial; el método desarrollado en nuestro trabajo creemos que tendrá una enorme ventaja en comparación con otros métodos reportados en la literatura para la identificación simultanea de virus (4,16,43,45,71,74,77), bacterias (50,57,61) y parásitos (10,11,29,31,53,60) ya que es capaz de identificar simultáneamente a los patógenos de tres géneros diferentes.

El desarrollo de esta herramienta diagnostica de tipo molecular, consideramos que puede representar una disminución considerablemente en costo y tiempo en la identificación de estos patógenos en estudios de corte epidemiológico y puede llegar a ser utilizada como apoyo en el diagnóstico de la gastroenteritis aguda en niños en diversos hospitales de la Ciudad de México y tal vez en los hospitales pediátricos de nuestro país, lo cual representaría un gran impacto en el diagnóstico temprano y tratamiento de los cuadros gastroentericos y por ende un cambio epidemiológico importante.

10 CONCLUSIONES

Con los resultados obtenidos en este trabajo podemos concluir:

- Se logró la identificación de astrovirus, norovirus, EIEC y *Entamoeba histolytica* en población infantil mexicana con cuadro clínico de gastroenteritis aguda por métodos moleculares tales como RT-PCR y PCR.
- Los serotipos 1 y 8 de astrovirus fueron los serotipos encontrados en las muestras positivas.
- El virus Norwalk fue el tipo encontrado en las muestras que fueron positivas para calicivirus.
- Las muestras positivas para EIEC correspondieron efectivamente a EIEC.
- Se logró la amplificación por PCR múltiple de astrovirus, EIEC y *Entamoeba histolytica* en muestras de heces.

11 PERSPECTIVAS

Dada la relevancia que tienen los patógenos causantes de cuadros gastroentéricos en la población infantil por ser esta la más susceptible a estos, es indispensable contar con métodos diagnósticos, rápidos, sensibles y altamente específicos, por lo que proponemos las siguientes perspectivas a raíz de los resultados obtenidos en este trabajo.

- Realizar los ensayos de sensibilidad y especificidad de la PCR múltiple estandarizada

- Realizar un estudio en un centro hospitalario utilizando la PCR múltiple diseñada en niños con diarrea por rotavirus y diarrea de causa desconocida con la finalidad de validar el método propuesto para ser utilizado como diagnóstico y comparar los resultados obtenidos para observar el comportamiento epidemiológico

- Utilizar los ensayos de RT-PCR ya estandarizados para identificar astrovirus y calicivirus en muestras de niños con diagnóstico de rotavirus (no vacunados y vacunados) contra este patógeno, para poder realizar un estudio comparativo del comportamiento epidemiológico y clínico de estos virus en presencia de rotavirus

- Aislar astrovirus de heces en la línea celular CaCo 2 para estudiar el posible mecanismo de la unión del virus a su célula blanco y poder explicar el mecanismo por el cual no causa una diarrea de tipo inflamatoria

12 BIBLIOGRAFIA

1. Atmar, R.L., Estes, M.K. 2001. Diagnosis of noncultivable gastroenteritis viruses, the human caliciviruses. *J. Clin. Microbiol.* 14(1): 15-37.
2. Bailey, G.B., D.B. Day, J.W. Gasque. 1985. Rapid polymerization of *Entamoeba histolytica* actin induced by interaction with target cells. *J. Exp. Med.* 162 (2):546-558.
3. Bass, D.M., U. Upadhyayula. 1997. Characterization of human serotype 1 astrovirus-neutralizing epitopes. *J. Virol.* 71:8666-8671.
4. Belliot, G., O. Traoré, H. Laveran, and C. Mollat. 2000. RT-PCR identification and typing of astroviruses and Norwalk-like viruses in hospitalized patients with gastroenteritis: evidence of nosocomial infections. *J. Clin. Virol.* 17:151-158.
5. Belliot, G., O. Traoré, H. Laveran, S.S. Monroe. 1997. Detection and genetic differentiation of human astroviruses: phylogenetic grouping varies by coding region. *Arch. Virol.* 142:1323-1334.
6. Bhella, D., D. Gatherer, et. al. 2008. Structural Insights into Calicivirus Attachment and Uncoating. *J. Virol.* 82: 8051-8058.
7. Boom, R., C.J.A. Sol, M.M.M. Salimans, C.L. Jansen, P.M.E. Wertheim-Van Dillen, J. Van Der Noordaa. 1990. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J. Clin. Microbiol.* 28: 495-503.
8. Brown, D.W., K.B. Gunning, et.al. 2008. A DNA oligonucleotide microarray for detecting human astrovirus serotypes. *J. Virol.* 147:86-92.
9. Buesa, J., B. Collado, et.al. 2002. Molecular Epidemiology of Calicivirus Causing Outbreaks and Sporadic Cases of Acute Gastroenteritis in Spain. *J. Clin. Microbiol.* 40: 2854-2859.

10. Carneiro, H.L., R.H. Saramago, H. Werneck, et.al. 2007. Comparison of Multiplex-PCR and Antigen Detection for Differential Diagnosis of *Entamoeba histolytica*. *J. Infect. Dis.* 11:365-370.
11. Clark, C.G., M. Zaki. 2001. Isolation and characterization of polymorphic DNA from *Entamoeba histolytica*. *J. Clin. Microbiol.* 39: 897-905.
12. Conde-Bonfil, M.C., C. Mora-Zerpa. 1992. *Entamoeba histolytica*: un desafío vigente. *Rev. Salud Pública Mex.* 34:335-341.
13. De Grazia, S., M.A. Platia, V. Rotolo, C. Colomba, V. Martella, G.M. Giammanco. 2010. Surveillance of human astrovirus circulation in Italy 2002-2005 : emergence of lineage 2c strains. *Clin. Microbiol. Infect.* 17(1):97-101.
14. Espinosa, C.M., P.A. Martinez. 2000. Pathogenesis of intestinal amebiasis: from molecules to disease. *Clin. Microbiol. Rev.* 13:318-331.
15. Farkas, T., M.W. Zhong, Y. Jing, P.W. Huang, S.M. Espinosa, N. Martinez, A.L. Morrow, G.M. Ruíz Palacios, L.K. Pickering, X. Jiang. 2004. Genetic diversity among sapoviruses. *Arch. Virol.* 149:1309-1323.
16. Farkas, T., X. Jiang, M.L. Guerrero, W. Zhong, N. Wilton, T. Berke, D.O. Matson, L.K. Pickering, G. Ruíz-Palacios. 2000. Prevalence and genetic diversity of human calicivirus (HuCVs) in Mexican children. *J. Med. Virol.* 62:217-223.
17. Farshad, S., R. Sheikhi, et.al. 2006. Characterization of *Shigella* strains in Iran by plasmid profile analysis and PCR amplification of *ipa* genes. *J. Clin. Microbiol.* 44:2879-2883.
18. Finkbeiner, S.R., Y. Li, S. Ruone, C. Conrady, N. Gregoricus, D. Toney, H.W. Virgin, L.J. Anderson, J. Vinje, D. Wang, S. Tong. 2009. Identification of a novel astrovirus (Astrovirus VA1) associated with an outbreak of acute gastroenteritis. *J. Virol.* 83:10836-10839.

19. Fujioka, M., K. Kasai, T. Miura, T. Sato, Y. Otomo. 2009. Rapid diagnostic method for the detection of diarrheagenic *Escherichia coli* by multiplex PCR. *J. Infect. Dis.* 62:476-480.
20. Gatti, S., G. Swierczynski, F. Robinson, M. Anselmi, J. Corrales, J. Moreira, G. Montalvo, A. Bruno, R. Maserati, Z. Bisoffi, y M. Scaglia. 2002. Amebic infections due to the *Entamoeba histolytica-Entamoeba dispar* complex: a study of the incidence in a remote rural area of Ecuador. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 67:123-127.
21. Gonin, Patrick., L. Trudel. 2002. Detection and differentiation of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* isolates in clinical samples by PCR and enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Clin. Microbiol.* 41:237-241.
22. Gryl, T.E., L.M. Sloan, J.E. Rosenblatt, R. Patel. 2009. Rapid and sensitive detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from nonenriched stool specimens by real-time PCR and comparison to enzyme immunoassay and culture. *J. Clin. Microbiol.* 47(7):2008-2012.
23. Guix, S., A. Bosch, y R.M. Pintó. 2007. Astrovirus Replication: An Overview. Structure-based study of virus replication. 22:571-591.
24. Gunzburg, S. T., N. G. Tornieporth, L. W. Riley. 1995. Identification of enteropathogenic *Escherichia coli* by PCR-based detection of the bundle forming pilus gene. *J. Clin. Microbiol.* 33:1375–1377.
25. Gutiérrez, E.A.L., J. Escobar-Herrera, C. Cancio, G.I. Guzmán, N. Villegas-Sepulveda, T. Estrada- García, H. García-Lozano, F. Gómez-Santiago. 2006. Construction of an internal RT-PCR standard control for the detection of human caliciviruses in stool. *J. Virol. Methods.* 137:334-338

26. Gutiérrez, E.A.L., A.U. Brito, R.M. Del Angel, y X. Jiang. 2000. Interaction of celular proteins with the 5´ end of Norwalk virus genomic RNA. *J. Virol.* 74(18): 8558-8562.
27. Gutierrez, E.A.L., J.Escobar-Herrera, F.J. Medina-Ramírez. 2007. A carboxymethyl-cellulose plaque assay for feline calicivirus. *J. Virol. Methods.* 146:393-396.
28. Gutiérrez, M.F., A. Matiz, J.C. Ulloa, M. Alvarado. 2005. Astrovirus (HAstV) como agente causal de diarrea en niños Colombianos: siete años de estudio. *Nova.* 3(3):18-24.
29. Hamzah, Z., S. Petmitr, M. Mungthin, S. Leclayoova, P. Chavalitshewinkoon-Petmitr. 2006. Differential Detection of *Entamoeba histolytica*, *Entamoeba dispar* and *Entamoeba moshkovskii* by a single –round PCR assay. *J. Clin. Microbiol.* 9:3196-3200.
30. Haque, R., D. Mondal, P.Duggal, M. Kabir, S. Roy, B.M. Farr, B. Sack, W. A. Petri. 2006. *Entamoeba histolytica* Infection in children and protection from subsequent amebiasis. *Infect. Immun.* 74:904-909.
31. Haque, R., I.K.M. Ali, S. Akther, W.A. Petri. 1998. Comparison of PCR, isoenzyme analysis, and antigen detection for diagnosis of *Entamoeba histolytica* infection. *J. Clin. Microbiol.* 36 (2):449-452.
32. Haque, R., S. Roy, A. Siddique, U. Mondal, S.M.M. Rahman, D. Mondal, E. Houpt, W.A. Petri. 2007. Multiplex real-time PCR assay for detection of *Entamoeba histolytica*, *Giardia intestinalis* y *Cryptosporidium spp.* *J. Trop. Med. Hyg.* 76(4):713-717.
33. Henegariu, O., N.A. Heerema, S.R. Dlouhy, G.H. Vance y P.H. Vogh. 1997. Multiplex PCR: critical parameters and step-by-step protocol. *Bio Techniques.* 23:504-511.

34. Hilbi, H., N.S. Gunnar. 2008. Molecular pathogenesis of *Shigella spp.*: controlling host cell signaling, invasion and death by type III secretion. *J. Clin. Microbiol.* 21(1):134-156.
35. Jiang, X., J. Wang, D.Y. Graham, M.K. Estes. 1992. Detection of Norwalk virus in stool by polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* 30:2529-2534.
36. Kamel, E.M., O.A. Shaker. 2003. Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction and enzyme immunoassay for diagnosis of Astrovirus Gastroenteritis. *J. Med. Lab. Sci.* 12(1): 1-16.
37. Kaper J.B., J.P. Nataro, H.L.T. Mobley. 2004. Pathogenic *Escherichia coli*. *J. Microbiol.* 2:123-140.
38. Koci, M.D. 2005. Immunity and Resistance to Astrovirus Infection. *J. Viral Immunol.* 18 (1):11-16.
39. Krishna, N.K. 2005. Identification of structural domains involved in astrovirus capsid biology. *J. Viral Immunol.* 18 (1):17-26.
40. Larrosa-Haro A., M. Ruiz-Pérez, S. Aguilar-Benavides. 2002 Utilidad del estudio de las heces para el diagnóstico y manejo de lactantes y preescolares con diarrea aguda. *Salud Pública Mex.* 44:328-334.
41. López Saucedo C., J.F. Cema, N. Villegas-Sepulveda, R. Thompson, F.R. Velazquez, J. Torres, P.I. Tarr, T. Estrada- García. 2003. Single multiplex polymerase chain reaction to detect diverse loci associated with diarrheagenic *Escherichia coli*. *Emerg. Infect. Dis.* 9(1):127-131.
42. Madeley, C. R., and B.P. Cosgrove. 1975. 28 nm particles in faeces in infantile gastroenteritis. *Lancet* 1: 451-452.
43. Maldonado, Y., M. Cantwell, M. Old, D.Hill, M.L. Sánchez, L. Logan, F. Millan-Velasco, J.L. Valdespino, J. Sepúlveda, S. Matsui. 1998. Population-based

- prevalence of symptomatic and asymptomatic astrovirus infection in rural Mayan infants. *J. Infect. Dis.* 178: 334-339.
44. Mendez, e & Arias, C.F., 2007. *Fields' Virology*, 4 Th ed. pp.571-591.
45. Méndez, T.M., D.D. Griffin, J. Calva, J.F. Contreras, F.I. Puerto, F. Mota, H. Guiscafré, R. Cedillo, O. Muñoz, I. Herrera, S. López, C.F. Arias. 2004. Prevalence and genetic diversity of human astroviruses in Mexican children with symptomatic and asymptomatic Infections. *J. Clin. Microbiol.* 42:151-157.
46. Meqdam, M.M., I.R. Thwiny. M. 2007. Prevalence of group A rotavirus, enteric adenovirus, norovirus and astrovirus infections among children with acute gastroenteritis in Qassim, Saudi Arabia. *Pak. J. Med. Sci.* 4:551-555.
47. Morán, P., F. Ramos, M. Ramiro, O. Curiel, E. González, A. Valadez, A. Gómez, G. García, E.I. Melendro, C. Ximénez. 2005. *Entamoeba histolytica* and/or *Entamoeba dispar*. infection frequency in HIV⁺/AIDS patients in Mexico city. *Exp. Parasitol.* 110(3):331-334.
48. Moser, L.A., S. Schultz-Cherry. 2005. Pathogenesis of astrovirus infection. *Viral Immunol.* 18 (1): 4-10.
49. Mota-Hernández F., C. Gutiérrez-Camacho, R.G. Cabrales-Martínez. 2002. Hidratación oral continua a dosis fraccionadas en niños deshidratados por diarrea aguda. *Salud Pública Méx.* 44 (1): 21-25.
50. Moyo S.J., S.Y. Maselle, M.I. Matee, N. Langeland, H. Mylvaganam. 2007. Identification of diarrheagenic *Escherichia coli* isolated from infants and children in Dar es Salaam, Tanzania. *J. Infect. Dis.* 7: 92.
51. Mustafa, H., E.A. Palombo, R.F. Bishop. 2000. Epidemiology of astrovirus infection in young children hospitalized with acute gastroenteritis in Melbourne, Australia, over a period of four consecutive years, 1995 to 1998. *J. Clin. Microbiol.* 38: 1058-1062.

52. Nataro, J.P., and J.B. Kaper. 1998. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *J. Clin. Microbiol. Rev.* 11:142-201.
53. Núñez, Y.O., M.A. Fernández, D. Torres-Núñez., et al. 2001. Multiplex polymerase chain reaction amplification and differentiation of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* DNA from stool samples. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 64:293-297.
54. Ochoa, T.J., F. Barletta, C. Contreras, E. Mercado. 2008. New insights into the epidemiology of enteropathogenic *Escherichia coli* infection. *J. Trop. Med. Hyg.* 102 (9):852-856.
55. Organización Panamericana de la Salud. Vigilancia Epidemiológica de diarreas causadas por rotavirus. Guía Práctica. Publicación Científica y Técnica No. 623. PAHO. 2007.
56. Palombo, E.A., R.F. Bishop. 1996. Annual incidence, serotype distribution, and genetic diversity of human astrovirus isolates from hospitalized children in Melbourne, Australia. *J. Clin. Microbiol.* 34:1750-1753.
57. Paton, A. W., and J. C. Paton. 1998. 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.* 36:598–602.
58. Petri, W.A., M. Miller, H.J. Binder, M.M. Levine, R. Dillingham, y R.L. Guerrant. 2008. Enteric infections, diarrhea, and their impact on function and development. *J. Clin. Invest.* 118:1277-1290.
59. Putzker, M., H. Sauer, G. Kirchner, O. Keksel, A. Malic. 2000. Community acquired diarrhea-the incidence of astrovirus infection in Germany. *Clin. Lab.* 46: 269-273.

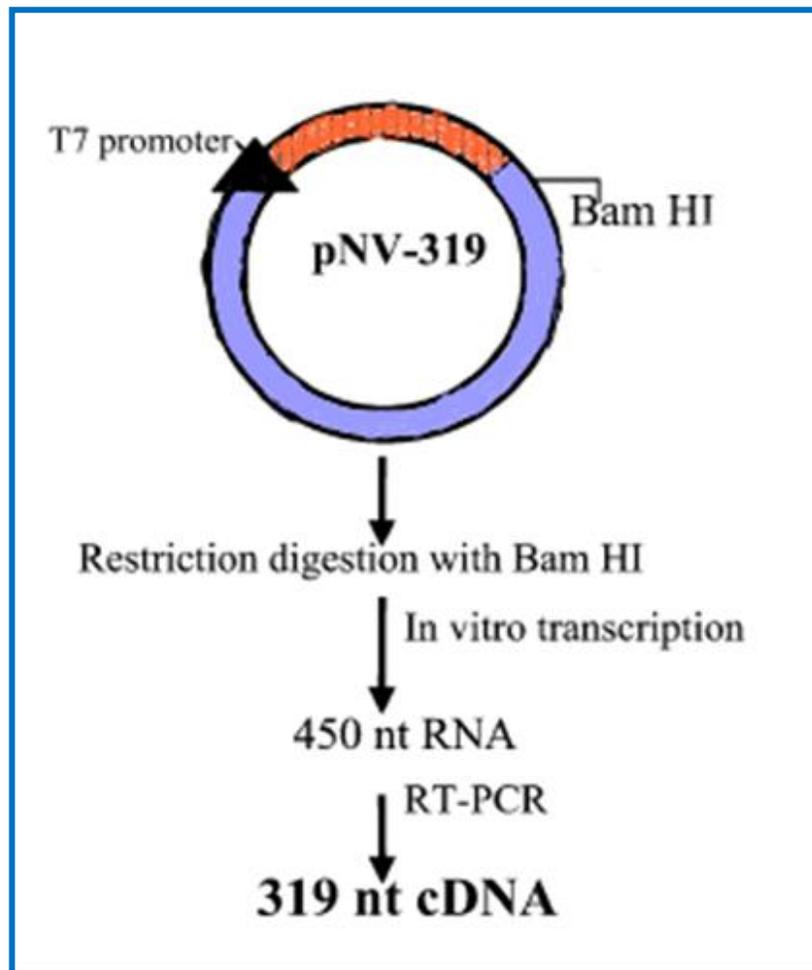
60. Ramos, F., P. Moran, E. González, G. García, M. Ramiro, A. Gómez, M.C. García de León, E.I. Melendro, A. Valadez, C. Ximénez. 2005. *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* :prevalence infection in a rural mexican community. *Exp. Parasitol.* 110: 327-330.
61. Reid, S. D., D. J. Betting, T. S. Whittam. 1999. Molecular detection and identification of intimin alleles in pathogenic *Escherichia coli* by multiplex PCR. *J. Clin. Microbiol.* 37:2719–2722.
62. Rohayem, J., S. Berger, T. Juretzek, O. Herchenroder, M. Mogel, M. Poppe, J. Henker, A. Rethwilm. 2004. A simple and rapid single step multiplex RT-PCR to detect *norovirus*, *astrovirus* and *adenovirus* in clinical stool samples. *J. Virol. Methods.* 118:49-59.
63. Royuela, E., A. Negredo, F.A. Sanchez-Fauquier. 2006. Development of a one step real-time RT-PCR method for sensitive detection of human astrovirus. *J. Virol. Methods.* 133(1):14-19.
64. Sack R.B., F. Qadri, A.M. Svennerholm, A.S.G. Faruque. 2005. Enterotoxigenic *Escherichia coli* in Developing Countries: Epidemiology, Microbiology, Clinical Features, Treatment, and Prevention. *J. Clin. Microbiol.* 18 (3):465-483.
65. Samie, A., C.L. Obi, L.J. Barrett, S.M. Powell, R.L. Guerrant. 2007. Prevalence of *Campylobacter* species, *Helicobacter pylori* and *Acrobacter* species in stool samples from the Venda region, Limpopo, South Africa: studies using molecular diagnostic methods. *J. Infect.* 54:558-566.
66. Scaletsky, I.C.A., K.R. Aranda, U. Fagundes-Neto. 2004. Evaluation of Multiplex PCRs for diagnosis of infection with diarrheagenic *Escherichia coli* and *Shigella* spp. *J. Clin. Microbiol.* 42:5849-5853.
67. Schultz-Cherry S. 2005. Special Focus Section: Enteric Viruses. *Viral Immunol.* 1:2-3.

68. Sethabutr, O., M. Venkatesan, G. S. Murphy, B. Eampokalap, C. W. Hoge, and P. Echeverria. 1993. Detection of *Shigella* and enteroinvasive *Escherichia coli* by amplification of the invasion plasmid antigen H DNA sequence in patients with dysentery. *J. Infect. Dis.* 167:458–461.
69. Stacy-Phipps, S., J. J. Mecca, and J. B. Weiss. 1995. Multiplex PCR assay and simple preparation method for stool specimens detect enterotoxigenic *Escherichia coli* DNA during course of infection. *J. Clin. Microbiol.* 33:1054–1059.
70. Stark, D., S. VanHal, R. Fotedar, A. Butcher, D. Marriott, J. Ellis, J. Harkness. 2008. Comparison of stool antigen detection kits to PCR for diagnosis of amebiasis. *J. Clin. Microbiol.* 46(5):1678-1681.
71. Subekti, D., M. Lesmana, P. Tjaniadi, N. Safari, E. Frazier, C. Simanjuntak, S. Komalarinj, J. Taslim, J.R. Campbell, B.A. Oyofu. 2002. Incidence of Norwalk-like viruses, rotavirus and adenovirus infection in patients with acute gastroenteritis in Jakarta, Indonesia. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 33(1):27-33.
72. Svraka, S., E. Duizer, H. Vennema, E. Bruin, B. Van der Veer, B. Dorresteyn, M. Koopmans. 2007. Etiological role of viruses in outbreaks of acute gastroenteritis in the Netherlands from 1994 through. *J. Clin. Microbiol.* 45(5): 1389-1394.
73. Ternhag, A., A. Törner, A. Svensson, K. Ekdahl, J. Giesecke. 2008. Short- and long-term effects of bacterial gastrointestinal infections. *Emerg. Infect. Dis.* 14(1):143-147.
74. Tran, A., D. Talmud, B. Lejeune, N. Jovenin, F. Renois, C. Payan, N. Leveque, L. Andreoletti. 2010. Prevalence of rotavirus, adenovirus, norovirus and

- astrovirus infections and co-infections among hospitalized children in northern France. *J. Clin. Microbiol.* 48:1943-1946.
75. Ushijima, H., H. Yan, F. Yagyu, S. Okitsu, O. Nishio. 2003. Detection of norovirus (GI, GII), Sapovirus and astrovirus in fecal samples using reverse transcription single-round multiplex PCR. *J. Virol. Methods.* 114:37-44.
76. Ushijima, H., W. Chan-it, A. Thongprachum, S. Okitsu, M. Mizuguchi. 2010. Epidemiology and molecular characterization of sapovirus and astrovirus in Japan, 2008-2009. *J. Infect. Dis.*, 63:302-303.
77. Walter, J.E., D.K. Mitchell, L. Guerrero, T. Berke, D.O. Matson, S.S. Monroe, L.K. Pickering, and G. Ruíz Palacios. 2001. Molecular epidemiology of human astrovirus diarrhea among children from a periurban community of Mexico City. *J. Infect. Dis.* 183(6):681-686.
78. Wang, D., S.R. Finkbeiner, L.R. Holtz, Y. Jiang, P. Rajendran, C.J. Franz, G. Zhao, G. Kanget. 2009. Human stool contains a previously unrecognized diversity of novel astroviruses. *J. Virol.* 6:161.
79. Widdowson, M.A., S.S. Monroe, R.I. Glass. 2005. Are noroviruses emerging? *Emerg. Infect. Dis.* 11:735-736.
80. Wilhelmi, E. Roman, y Sánchez-Fauquier. 2002. Viruses causing gastroenteritis. *Clin. Microbiol. Infect.* 9:247-262.
81. World Health Organization. 1997. Amoebiasis an expert consultation weekly epidemiological record no. 14, Ginebra.
82. Yuen, W.K.L., M.G. Catton, B.J. Cox, P.J. Wright, J.A. Marshall. 2001. Heminested multiplex reverse transcription-PCR for detection and differentiation of Norwalk-like virus genogroups 1 and 2 in fecal samples. *J. Clin. Microbiol.* 39(7):2690-2694.

ANEXOS

ANEXO I.- Mapa del plásmido pNV 319. En rojo se indica la región que corresponde al cDNA de la RNA polimerasa del virus Norwalk y que es reconocida por los oligonucleótidos para calicivirus mostrados en la tabla 7 (25).



ANEXO II.- Ficha de registro para la identificación de las muestras y datos clínicos relevantes para el análisis de resultados.

INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
ESCUELA NACIONAL DE MEDICINA Y HOMEOPATÍA
SECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN
LABORATORIO DE VIROLOGIA III

Fecha: ___/___/___ No. de Registro: _____

FICHA DE IDENTIFICACIÓN

Nombre del paciente: _____ Sexo: Fem/Masc Edad:- _____

Fecha de Nacimiento: _____ Estancia del Niño (a): Guardería/ Casa/ Otro _____

Nombre-Guardería: _____ Alimentación: Materna Exclusiva/ Artificial/ Mixta/ Variada/Otra: _____

Fecha de Toma de Muestra: _____ Muestra: Pañal/ Tubo/ Otro: _____

Lugar de toma de muestra: Centro de Salud/ Hospital/ Casa/Guardería (especifique) _____

DATOS CLINICOS

Fecha de inicio del cuadro clínico: _____

Diarrea: SI _____ Número de evacuaciones en últimas 24 horas: _____ Se desconoce _____ NO _____

Características de evacuaciones: líquidas/semilíquidas/sólidas/sanguinolentas/otra: _____

Vómito: SI _____ No. de episodios en 24 horas: _____ NO _____ Se desconoce _____ Fiebre: SI _____°C No _____

Deshidratación: SI _____ Level Moderada/ Severa NO _____

Tratamiento previo al cuadro clínico: _____

Vacuna Rotavirus: SI _____ NO _____ Se desconoce _____ OBSERVACIONES: _____

RESPONSABLE DE LA INFORMACIÓN

Nombre: _____ Colaborador/a: _____

ANEXO III.- MAPA DEL VECTOR pJET 1.2 para la clonación de los productos amplificados mediante los ensayos de RT-PCR y PCR. En el se indican los sitios de restricción para varias enzimas y en azul el sitio donde es clonado el producto de interés. Tiene un gen de resistencia a ampicilina (Ap^R)

