

INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL "PEDRO KOURÍ"

Estudio de correlación entre cepas *Escherichia coli* sorbosa negativa y su capacidad de producir enterotoxinas

Dr. Adalberto Águila,¹ Dra. Margarita Valdés-Dapena,² Dra. Margarita Ramírez,³ Dr. Carlos Fernández⁴ y Dra. Laura Bravo⁵

RESUMEN

Se estudiaron 50 cepas de *Escherichia coli* sorbosa negativas, aisladas de niños con diarreas líquidas de aparición espontánea. La identificación hasta especie se realizó por métodos convencionales, incluidos los marcadores fenotípicos sorbosa y sorbitol. Las técnicas de reacción en cadena de la polimerasa e hibridación de ADN, fueron realizadas para confirmar la capacidad de producción de enterotoxinas. Se obtuvo muy buena correlación entre las cepas de *Escherichia coli* sorbosa negativas y su capacidad de elaborar enterotoxinas termolábil y termoestable. El estudio demostró un alto porcentaje de estas cepas con fragmentos de genes codificadores, 94 y 44 % respectivamente, predominando la enterotoxina termoestable. Se obtuvieron los principales biotipos primarios de importancia taxonómica y epidemiológica. Se demostró que el método de la sorbosa posee cualidades que lo distinguen como marcador fenotípico, con 100 % de sensibilidad y 88 % de especificidad, revelándose como método de diagnóstico presuntivo práctico y de gran utilidad para los Laboratorios de Microbiología Clínica.

Palabras clave: *Escherichia coli* enterotoxigénica, sorbosa negativa, enterotoxinas, diarreas líquidas, RCP e hibridación de ADN, microbiología.

Escherichia coli enterotoxigénica (ECET) históricamente se ha identificado en países con deficientes condiciones higiénico-sanitarias, en la actualidad es uno de los principales agentes bacterianos causante de enfermedades diarreicas agudas (EDAs). Desde los años 70 se viene reportando como el principal agente de etiología bacteriana responsable de la diarrea del viajero.¹

Múltiples estudios clínico-epidemiológicos han relacionado a ECET con significativa morbilidad-mortalidad; a lo anterior se unen en la actualidad los desastres y fenómenos naturales, que establecen las malas condiciones de higiene e

insalubridad que caracterizan a la población de los países subdesarrollados.^{1,2}

ECET es también responsable de casos aislados y de brotes de EDAs, con considerables pérdidas de vidas humanas y desde el punto de vista económico gastos superiores a 100 000 000 000 USD, según estudios en los EE. UU.^{2,3}

ECET combina los factores de colonización (FAC) con la producción de enterotoxina termolábil (ETTL) y enterotoxina termoestable (ETTE), ambos codificados por plásmidos conjugativos; en los que además se puede encontrar información relacionada con la resistencia a los antimicrobianos. ECET produce una o ambas toxinas ETTL y

¹ Especialista de I Grado en Microbiología. Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí" (IPK).

² Doctora en Ciencias. Especialista de II Grado en Microbiología. Profesora Titular. Hospital Pediátrico Docente "Juan M. Márquez" Ciudad de La Habana.

³ Médico Especialista de II Grado en Microbiología. Investigadora Agregada. IPK.

⁴ Doctor en Ciencias. Licenciado en Microbiología. Investigador Auxiliar. IPK.

⁵ Doctora en Ciencias. Licenciada en Microbiología. Investigadora Auxiliar. IPK.

ETTE, las que a su vez se subdividen en ETTL tipo I y II y ETTE tipo a y b.^{4,5}

Las pruebas para el diagnóstico y la confirmación de ECET, se fundamentan básicamente en principios inmunológicos, siendo sistemas de diagnóstico comerciales de alto costo en el mercado internacional. El cultivo celular y los modelos animales constituyen la base del resto de las pruebas diagnósticas que existen en la actualidad, solo accesibles en laboratorios de referencia. Es por ello que resultan inaplicables en los laboratorios de microbiología clínica, donde se procesan cotidianamente un gran número de muestras y se demanda rápida respuesta para garantizar la atención médica y el seguimiento de los casos clínicos.^{4,5}

Desde hace algún tiempo, se aplican técnicas de biología molecular (BM) para la determinación de genes o fragmentos que codifican factores de virulencia de *E. coli*, sobre todo en investigaciones básicas y en el diagnóstico clínico microbiológico.^{4,6} Estas técnicas brindan innumerables facilidades diagnósticas en breve tiempo, sin embargo, resultan costosas sobre todo para los países subdesarrollados.^{6,7}

Con el actual estudio de correlación de métodos de identificación fenotípica y genotípica, los autores de este trabajo se propusieron demostrar la viabilidad de la prueba de la sorbosa como método de diagnóstico presuntivo, constituyendo una alternativa práctica, sencilla y económica que supera desventajas de otras técnicas diagnósticas y aporta significativas y elementales huellas fisiológicas al complejo esquema de identificación. Se aspira que los resultados de este trabajo contribuyan a incentivar el uso del método de la sorbosa, para garantizar el diagnóstico presuntivo de las ECET en laboratorios de escasos recursos.

MÉTODOS

Se utilizaron las cepas de referencia: *E. coli* K: 88, control positivo (+) para ETTL y negativo (-) para ETTE, y *E. coli* K: 99,(+) para ETTE y (-) para ETTL.

Se analizaron 65 cepas de *E. coli*, 50 eran sorbosa negativas aisladas en el Hospital Pediátrico Docente “Juan Manuel Márquez” de Ciudad de

La Habana, de niños menores de 5 años de edad con diarreas líquidas. Estas cepas fueron recolectadas entre noviembre de 1996 y octubre de 1998. Las restantes 15 cepas pertenecían al serogrupo *O 157*, de las que se desconocía su comportamiento frente al sustrato sorbosa y formaban parte de la colección del Laboratorio Nacional de Referencia de Enfermedades Diarreicas Agudas del Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourí” (IPK).

La identificación bioquímica de todas las cepas hasta la especie se realizó por el método del enterotubo.⁸ Se utilizó el método de la sorbosa y el de sorbitol para seleccionar las cepas presuntivamente como ECET.

Partiendo de cuñas de agar nutriente con crecimiento de 18-24 h, se tomó una ansada y se inoculó en tubos que contenían 2 mL del sustrato sorbosa (Oxoid) 1 % e igualmente en tubos con 2 mL de sorbitol (Oxoid) 1 %, que se incubaron a 37 °C durante 18-24 h. En el caso de la sorbosa cuando no se observó positividad a las 24 h, se prolongó la incubación hasta las 48 h. Se consideró positiva la prueba cuando ocurrió cambio de color del azul al amarillo y negativa cuando se mantuvo el color azul.^{8,9}

Cuando la cepa resultó sorbosa y sorbitol negativo y dicha condición se mantuvo por más de 72 h, fue imprescindible definir la categoría de *E. coli* con la prueba del 4-metilumbeliferil- β -D-glucurónico (MUG). La presencia de la enzima β -D- glucuronidasa en las cepas de estudio permitió diferenciar a las cepas ECET que portan dicha enzima, del serotipo O157:H7, el cual resulta negativo a la mencionada prueba. Este último serotipo de importancia en las enfermedades de transmisión alimentaria (ETAs) pertenece a otra categoría de *E. coli* que se caracteriza por la producción de verotoxinas, las cuales provocan colitis hemorrágica y como complicación el síndrome urémico hemolítico (SUH), sobre todo en pacientes menores de 5 años de edad.¹⁰

Posteriormente se realizó la determinación de los biotipos primarios de las cepas en estudio, siguiendo el esquema propuesto por Crichton.¹¹

Para la prueba PCR (*polymerase chain reaction*, siglas en inglés de reacción en cadena de la polimerasa) que determina el fragmento del gen codificador de ETTL, se utilizaron

oligonucleótidos específicos TL1 (22 bases): GCG AAT TCG GAA TGA ATT ATG A y TL2 (23 bases): CGG ATC CTA GCA TTA GAC ATG CT, que amplificaban un fragmento de 400 pb (Blanco O, Ramírez M, Maestre J, Valdes-Dapena, Suárez OM. Determinación de la capacidad de producción de toxina termolábil en cepas *Escherichia coli* sorbosa negativa. Tesis de terminación de Residencia, C. de La Habana: Instituto de Medicina Tropical; 1995). El ADN de las cepas se obtuvo por el método térmico (ebullición a 100 °C durante 30 min). Se programaron 30 ciclos en el termociclador MINICYCLER PTC-150 (MJ Research, EE. UU.). Las temperaturas utilizadas fueron desnaturalización 95 °C durante 1 min; hibridación 55 °C durante 90 s; extensión 72 °C durante 45 s; el tiempo de extensión final fue de 12 min a 72 °C (Blanco O, Ramírez M, Maestre J, Valdes-Dapena, Suárez OM. Determinación de la capacidad de producción de toxina termolábil en cepas *Escherichia coli* sorbosa negativa. Tesis de terminación de Residencia, C. de La Habana: Instituto de Medicina Tropical; 1995).

Para corroborar la presencia del segmento de gen codificador de ETTL fue empleada la técnica de hibridación de ADN. Se utilizó como sonda un producto amplificado (400 pb) de la cepa control *E. coli* K: 88, purificado previamente por el método descrito en WIZARD de Promega.¹² La hibridación se realizó siguiendo las recomendaciones de trabajos anteriores.^{7,13-15}

En la determinación de ETTE se realizó una PCR anidada. Fueron utilizados 5 oligonucleótidos: TE1(24 bases): TTA ATA GCA CCC GGT ACA AGC AGG; TE2 (26 bases): CCT GAC TCT TCA AAA GAG AAA ATT AC; TE3 (45 bases): ATT TGT TAT CCG CTC ACA ATT GAT TAC AAC AAA GTT CAC AGC AGT; TE4 (27 bases): AAT ACA TTA GAG ACT AAA AAG TGT GAT y TE5 (27 bases): ATC ACA CTA GAA TCA AAA AAA TGT AAC, que amplifican un fragmento genómico de 103 pb.¹⁶ Se programaron 30 ciclos

en el termociclador MINICYCLER PTC-150 (MJ Research, EE. UU.), para cada una de las 2 PCR realizadas en la Nester, las condiciones fueron similares a las descritas para ETTL.¹⁶

Se realizó electroforesis submarina al producto amplificado de la PCR, se corrió en un gel de agarosa 1,5 %, se utilizó cámara PHARMACIA BIOTECH EPS 200, reactivos de Promega.^{7,17}

La sonda utilizada en la hibridación de ADN, en la confirmación de las cepas positivas a ETTE, se obtuvo a partir del producto final de la PCR anidada; la que correspondió a la cepa control *E. coli* K: 99, purificada por el método del fenol cloroformo.¹³ Los reactivos utilizados fueron de Promega y los procedimientos para la hibridación de ADN, según recomendaciones extraídas de trabajos que abordaban los procedimientos para la elaboración y el marcaje de la sonda, así como la realización de la hibridación del ADN como método de comprobación de la PCR.^{15,18-20}

Para el análisis estadístico se empleó el método de Mc Nemar (prueba no paramétrica para 2 muestras relacionadas), con el objetivo de correlacionar estadísticamente el método de la sorbosa (fisiológico) con la técnica de PCR (genética), para lo cual fue aplicada la prueba de chi cuadrado.

RESULTADOS

Los resultados obtenidos en las pruebas bioquímicas (método del enterotubo) fueron heterogéneos, comportamiento típico del género; las 65 cepas ensayadas proporcionaron códigos que correspondieron con la especie *E. coli*.^{8,21}

Con la aplicación de los métodos convencionales y el uso de marcadores fenotípicos sorbosa y sorbitol, se obtuvieron 52 cepas que cumplían los criterios de selección, indicando el diagnóstico presuntivo de ECET (tabla 1).

TABLA 1. Distribución del número de cepas estudiadas, según resultados de las pruebas: sorbosa, sorbitol y PCR

Cepas N= 65	Sorbosa (-)	Sorbosa (+)	Total	Sorbitol (-)	Sorbitol (+)	Total
PCR (+)	50	0	50	0	50	50
PCR (-)	2	13	15	15	0	15
Total	52	13	65	15	50	65

Sorbosa (-), Sorbitol (-), PCR (-): Resultados negativos; Sorbosa (+), Sorbitol (+), PCR (+): Resultados positivos.

Al seguir los criterios se descartaron 13 cepas por resultar sorbosa positiva y sorbitol negativas (tabla 1). Correspondieron con cepas de *E. coli* serotipo O157:H7 de la colección del laboratorio de EDAs del IPK.

Se obtuvieron los biotipos más frecuentes (14, 6, 13 y 5) de las cepas ensayadas (tabla 2), resultando de gran valor taxonómico y epidemiológico, pues este esquema de clasificación no se había aplicado anteriormente con cepas autóctonas de la especie y con el diagnóstico definitivo de la categoría ECET. Otro aporte significativo lo constituye el conocimiento de la relación específica biotipo-enterotoxina (ETTL y/o ETTE).

TABLA 2. Correlación entre biotipos de *E. coli enterotoxigénica* sorbosa negativas y la capacidad de producción de enterotoxina termolabil (ETTL) y enterotoxina termoestable (ETTE) (N= 50)

	ETTL		ETTE		
	No. de cepas	No. de cepas	ETTL %	No. de cepas	
Biotipo 5	7	3	6	6	12
Biotipo 13	8	6	12	8	16
Biotipo 6	13	4	8	13	26
Biotipo 14	22	10	20	22	44

ETTL: *Escherichia coli* toxigénica termolabil; ETTE: *Escherichia coli* toxigénica termoestable; No. de cepas: número de cepas representadas en el estudio actual.

TABLA 3. Correlación entre cepas sorbosa negativas y la presencia de ETTL y/o ETTE (N= 52)

	No. de cepas sorbosa (-)	%
ETTE (+)	49	94
ETTL (+)	23	44
ETTE y ETTL (+)	22	42

TS (+): Tenencia del gen que codifica para toxina termoestable; TL (-): Tenencia del gen que codifica para toxina termolábil; TS y TL: Tenencia de ambos genes codificadores de toxina termoestable y termolábil.

Con la aplicación de la PCR se demostró que de 52 cepas de *E. coli* sorbosa negativa, 49 (94 %) presentaron el fragmento de gen que codifica para ETTE y 23 (44 %) portaban el fragmento codificador de ETTL (tabla 3).

Un total de 22 cepas (42 %) presentaron ambos fragmentos codificadores de las enterotoxinas (TL y TE), las que previamente se habían comportado como sorbosa negativa y MUG positivo.

En el ensayo, 2 cepas de *E. coli* que pese a haber sido negativas a la sorbosa, resultaron negativas en ambos PCR, representando el bajo porcentaje (3,8 %) de falsos positivos en la aplicación del método de la sorbosa.

Al contar con el sustrato sorbitol en la identificación, se pudo orientar la búsqueda sin necesidad de realizar otra prueba bioquímica complementaria, indicando este hecho la factibilidad de utilizarse en paralelo ambos indicadores fenotípicos (sorbosa y sorbitol) en el flujograma de trabajo. Al tener en cuenta los resultados del método del sorbitol y la prueba del MUG, ambas cepas fueron descartadas como posibles ECET, quedando señaladas de forma presuntiva como integrantes del serotipo O157:H7.^{9,10,22}

El método de la sorbosa reportó una sensibilidad de 100 % y una especificidad de 87 %, demostrando que la posibilidad de falsos positivos es real, pero a la vez mínima (tabla 1).

Se obtuvieron por PCR fragmentos amplificados de 400 pb que correspondían con la producción de ETTL y de 103 pb que correspondían con la ETTE.

El método de confirmación empleado para corroborar la calidad de los resultados de la PCR demostró gran confiabilidad en estos, pues la correlación entre los resultados de ambas pruebas moleculares fue de 100 %.

DISCUSIÓN

Desde la década de los años setenta se demostró una amplia participación de ECET en procesos diarreicos agudos, así como el potente efecto de su principal factor de virulencia, las ET, que ejercen su efecto en las células del intestino delgado, sobre todo en niños de 0-5 años de edad y poblaciones provenientes de países desarrollados, constituyendo estos los principales blancos del microorganismo. Se destaca como uno de los principales agentes que causan la diarrea del viajero, porque fustiga con mayor fuerza a los individuos con inmadurez inmunológica, inmunosuprimidos por diversas causas y los que no guarden en memoria inmunológica pasajes de anteriores contactos con serotipos de la categoría ECET. En la actualidad, en todo el mundo y en Cuba, se destinan recursos

y se realizan esfuerzos en la búsqueda de nuevos métodos de diagnóstico y el perfeccionamiento de la terapéutica que incluya sobre todo la profilaxis de estos procesos donde se alcanzaría gran éxito con el logro de preparados vacunales.

Estos resultados evidenciaron predominio en la producción de ETTE en las cepas de *E. coli* sorbosa negativa, lo que coincide con reportes de brotes ocurridos en EE. UU., donde también se ha observado predominio de la ETTE.⁵ De igual manera reportes epidemiológicos internacionales que incluyen países de otras áreas geográficas han confirmado la tendencia predominante de la ETTE.^{5,6}

En la fisiopatogenia de la diarrea por ECET se describe a las enterotoxinas como 2 subunidades (A y B), que se liberan en el lugar de acción en la luz intestinal, donde son captadas por receptores específicos. La subunidad B es transportadora y la A es la que ejerce la acción en el interior del enterocito. En el caso de la ETTE ocurre de forma lenta pero en grandes cantidades y en la ETTL el fenómeno ocurre de forma contraria. Lo anterior explica de alguna manera la variedad de cuadros clínicos (unos más floridos y prolongados, otros más leves y breves) que provoca este microorganismo, dependiendo finalmente de la toxina o combinación de estas con los factores de colonización en el sitio de acción específica.^{5,6} El conocimiento de este hecho permite comprender y relacionar mejor los diferentes cuadros clínicos que manifiestan los pacientes con síndromes diarreicos agudos, donde se encuentre implicado ECET.⁵ Este resultado coincide con autores que describen estas asociaciones e incluyen los subtipos de las toxinas ETTL y ETTE.^{2,4,6}

Los autores de este trabajo consideran de gran importancia el conocimiento de las diferentes combinaciones de los factores de virulencia en estas cepas, porque de esta forma se puede interpretar mejor el conjunto de síntomas y signos que caracterizan los cuadros clínicos; de hecho se ha demostrado que al conocerse las asociaciones más virulentas, justifica y se comprende mejor la intensidad de los cuadros clínicos en pacientes enfermos con síndrome diarreicos agudos, sirviendo estos criterios de herramienta adicional al médico de asistencia.⁴⁻⁶

Es conocido que 95 % de las cepas del serotipo O157:H7 se comportan como sorbitol negativo, constituyendo un marcador fisiológico de amplio uso en la búsqueda del serotipo involucrado en las ETAs. El citado serotipo es capaz de provocar cuadros de colitis hemorrágica y el SUH, cuadros y características no compatibles con los síntomas y signos de los casos del estudio actual; es por esta razón técnica y por otras de tipo económicas que se incluyó este sustrato en el esquema de identificación en paralelo con la sorbosa.^{10,22}

El método de hibridación de ADN como método de comprobación de los resultados del PCR, fue utilizado de forma satisfactoria en este estudio, ambas técnicas moleculares han sido utilizadas con igual objetivo por otros autores que nos precedieron en sus investigaciones.^{15,19,20,23}

La sensibilidad y especificidad diagnóstica obtenida en este trabajo, fueron más elevadas que las reportadas por *Gunburg*, el cual no obstante recomendó el uso del método de la sorbosa al concluir sus trabajos. Solo existe una diferencia en la comparación de este trabajo con el de *Gunburg* y es que empleó cepas de ECET aisladas de animales. Este hecho no debe constituir obstáculo, porque se han reportado aislamientos de los mismos serogrupos y serotipos de *E. coli* en humanos y en algunos animales, describiéndose el fenómeno de las infecciones cruzadas.^{5,6}

No se tiene conocimiento de otro trabajo realizado en Cuba con cepas de *E. coli* aisladas de niños menores de 5 años con diarreas líquidas, donde se hiciera una correlación entre la no fermentación de la sorbosa y la confirmación por PCR de ambas enterotoxinas. Sin embargo, existe un estudio realizado en el país donde se correlaciona el método de la sorbosa con la producción de ETTL (utilizando la hibridación de colonias, como método genético en la detección del factor de virulencia de ETTL), concluyendo el mismo con resultados poco alentadores: solo 21 % de las cepas sorbosa negativa presentaron el gen de la ETTL, no recomiendan el uso del método de la sorbosa por el bajo porcentaje obtenido en la búsqueda de cepas

de ECET.¹² Por el contrario, en este trabajo se alcanzaron valores de correlación (cepas sorbosa negativa y producción de toxina) mayores que justifican y recomiendan su uso. Además, al determinar y relacionar la producción de ambas toxinas con la no fermentación de la sorbosa, se demostró por primera vez que las cepas autóctonas se comportaban de forma similar (predominio en la producción de ETTE) a las reportadas en otras regiones del planeta (América del Norte y del Sur, Europa, Asia y Australia).^{4-6,17,23} También este trabajo guarda relación con otros mencionados antes, porque enfatiza en la importancia y la creciente necesidad de implantar este diagnóstico, de forma temprana y al nivel de laboratorio de microbiología en unidades de asistencia médica, para garantizar la identificación (sobre todo en niños menores de 5 años) de ECET y aplicar de forma eficiente la conducta y el tratamiento.

El método de la sorbosa resultó ser técnicamente sencillo, económico y de alta sensibilidad y especificidad diagnóstica. Al tomar como base los resultados que brinda este ensayo y al sumar la experiencia acumulada en el uso del método por casi 15 años en el laboratorio de microbiología del Hospital Pediátrico Docente "Juan Manuel Márquez", los autores de este estudio plantean que se tenga en cuenta para el diagnóstico presuntivo de ECET en los laboratorios de microbiología clínica del país. Una vez aplicado este método se recomienda enviar las cepas al Laboratorio Nacional de Referencia de EDA del IPK, para realizar confirmación del diagnóstico y los estudios de caracterización correspondientes.

Study of correlation between negative sorbose *E. coli* strains and their enterotoxin-producing capacity

SUMMARY

Fifty negative sorbose *Escherichia coli* strains isolated from children who suffered spontaneously occurring fluid diarrheas were studied. Identification up to the level of species was performed by conventional methods including phenotypical markers known as sorbose and sorbitol. The PCR and DNA gene hybridization were applied to confirm the enterotoxin-producing capacity. A good correlation between negative sorbose

Escherichia coli and their capacity of producing heat-labile and heat-stable enterotoxin was observed. The study showed a high percentage of these strains with encoding gene fragments, 94 and 44% respectively, being heat-stable enterotoxin the predominant. The main primary biotypes of taxonomic and epidemiological importance were obtained. It was demonstrated that the sorbose method has certain qualities that make it stand out as a phenotypical marker, with 100% sensitivity and 88% specificity, and as a practical presumptive diagnostic method that is very useful for Clinical Microbiology Laboratories.

Key words: enterotoxigenic *Escherichia coli*, negative sorbose, enterotoxins, fluid diarrheas, PCR and DNA gene hybridization, microbiology.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Valdés-Dapena Vivanco M. Etiología bacteriana de la Enfermedad Diarreica Aguda. Enteropatogenicidad. Rev Soc Volví Pediatría 1992;31(3):63-6.
2. Subekti D, Lesmana M, Komalarin R. Enterotoxigenic *E. coli* and other causes of infectious pediatric diarrheas in Jakarta Indonesia. Southeast Asian J Trop Med Public Health 1992;24(3):420-4.
3. Bern C, Martines de Zoysa J, Glass IR. The magnitude of the global problem of diarrhoeal disease: a ten-year update. Ginebra: Bull WHO; 1992.
4. Viboud GI, Binsztein N, Svennerholm AM. Characterization of monoclonal antibodies against putative colonization factors of enterotoxigenic *Escherichia coli* and their use in an epidemiological study. J Clin Microbiol 1993;31(3):558-64.
5. Blanco J. *Escherichia coli* enterotoxigénicas, necrotoxigénicas y verotoxigénicas de origen humano y bovino. Galicia: Edit. Univers. Santiago de Compostela; 1993. p. 11-309.
6. Candrian U, Ferrer B, Hofelein C, Meyer R, Jermini M, Luthy J. Detection of *Escherichia coli* and identification of enterotoxigenic strains by primer-directed enzymatic amplification of specific DNA sequences. Int J Food Microbiol 1991;12(4):339-51.
7. Sambrook J, Maniatis T, Fritsch EF. Molecular cloning, a laboratory manual 2nd ed.; 1991. p. 120-30.
8. WHO. Manual of Laboratory investigations of acute enteric infections. Programme for Control of Diarrhoeal Diseases. CDC 1987;1:3-83.
9. Gunburg ST, Burke V. Sorbose fermentation in relation to acquisition and maintenance of enterotoxin plasmids in *Escherichia coli*. Pathol 1991;(1):18-20.
10. Reilly WJ. Verotoxigenic *E. coli* O 157 in Scotland, background paper number 4. WHO Consultation on the Prevention and Control of Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) Infection. Geneva: World Health Organization; 1997.
11. Crichton PB, Logan MJ, Old DC. A miniaturized biotyping system for strain discrimination in *Escherichia coli*. Epidemiol Infect 1993;111:81-8.
12. PROMEGA. Wizard tm PCR. Preps DNA purification system for rapid purification of DNA fragments; Technical Bull 1993;118:5-12.
13. Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook, J. Molecular Cloning a laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Manual; 1982. p. 86-465.
14. Hughes MS. Identification and elimination of DNA sequences in Taq DNA Polymerase. J Clin Microbiol 1994;32(9):2007-8.
15. Zhu QY, Li LQ, Huang YT, Lin WM, Lin YT, Wang J. Study of the identification of enterotoxigenic *Escherichia coli*

- by LT-DNA gene hybridization. Chin Med J(Engl) 1991;104(1):14-7.
16. Hornes E, Wasteson Y, Olsvik O. Detection of *Escherichia coli* heat- stable enterotoxin genes in pig stool specimens by an immobilized polymerase chain reaction. J Clin Microbiol 1991;29(11):2375-9.
 17. Abe A. A sensitive method for the detection of enterotoxigenic *Escherichia coli* by the polymerase chain reaction using multiple primer pairs. Int J Met Microbiol Virol Parasitol Infect Dis 1992;277(2):170-8.
 18. PROMEGA. Procedures for Nucleic Acid Transfer BIODYNE NYLON Membranes Sample DNA. Dot Blots 1992;49:49-51.
 19. Rademaker EM. Detection of diarrhea causing *E. coli* using DNA probes. Ned Tijdschr Geneesk 1992;136(52):2581-4.
 20. Agudelo CA. Tipificación de *Escherichia coli* productora de diarrea por medio de sondas de ADN. Fundames Bogotá 1991;3:112-55.
 21. Mac Faddin JF. Pruebas bioquímicas individuales. En: Mac Faddin JF ed. Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. Buenos Aires:Panamericana; 1980.
 22. Wehmeir UF. Cloning of the *Escherichia coli* genes L-sorbose transport and metabolism and physical mapping of the genes near meth and Ic1r. J. Bacteriol 1992;174(23):7784-90.
 23. Sommerfelt H, Svennerholm AM, Kalland KH, Haukanes BI, Bjorvatn B. Comparative study of colony hybridization with synthetic oligonucleotide probes and enzyme linked immunosorbent assay for identification of enterotoxigenic *Escherichia coli*. J Clin Microbiol 1988;26:530-4.

Recibido: 6 de mayo de 2005. Aprobado: 12 de enero de 2006.
Dr. Adalberto Águila Sánchez. Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí" Autopista Novia del Mediodía, km. 6 1/2, Ciudad de La Habana. Teléf.: 204 60 51, Fax (537) 202 06 51. Correo electrónico: adalberto@ipk.sld.cu y adalberto.aguila@infomed.sld.cu