



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA

FACULTAD DE CIENCIAS E INGENIERÍA

Evaluación de un método de detección de *Escherichia coli*
enterotoxigénica (EPEC) utilizando Chelex – 100 en muestras de heces
colectadas en papel filtro

Tesis para optar el Título Profesional de Licenciado en
Biología

Autor

Maria Alejandra Lican Mendoza

Asesor

Dra. Monica Jehnny Pajuelo Travezaño

Lima, Perú

2024

Jurado calificador

Presidenta: Dra. Manuela Verastegui Pimentel

Vocal: Dr. Pablo Tsukayama Cisneros

Secretaria: M.Sc. Dora Maurtua Torres

Dedicatoria

A mis padres, Bonnie y Christian

Agradecimientos

A la Dra. Monica Pajuelo por ser mi asesora y dejarme ser parte del Laboratorio de Microbiología Molecular.

Al Dr. Gilman por haber dado la idea inicial de este proyecto.

Al proyecto “La infección natural de norovirus y sapovirus en una cohorte de nacimiento en una comunidad periurbana del Perú” por permitirme utilizar su población.

Al Dr. Pablo Tsukayama por proporcionarme las cepas bacterianas para el presente estudio.

A mis amigas Mishel Sandoval, Alejandra Ingunza, Mayra Ochoa y Macarena Vittet.

Evaluación de un método de detección de Escherichia coli enterotoxigénica (ETEC) utilizando Chelex - 100 en muestras de heces colectadas en papel filtro

INFORME DE ORIGINALIDAD



FUENTES PRIMARIAS

1	journals.plos.org Fuente de Internet	2%
2	scielosp.org Fuente de Internet	1%
3	edocs.maseno.ac.ke Fuente de Internet	1%
4	www.scielo.br Fuente de Internet	1%
5	sites.kowsarpub.com Fuente de Internet	1%
6	Submitted to Kingston University Trabajo del estudiante	<1%
7	coek.info Fuente de Internet	<1%
8	pure.johnshopkins.edu Fuente de Internet	<1%

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
I INTRODUCCIÓN	3
II OBJETIVOS	8
II.1 General	8
II.2 Específicos	8
III METODOLOGÍA	9
III.1 Diseño de estudio	9
III.2 Población y tamaño muestral	11
III.3 Procedimiento	12
III.3.2 Validación	14
III.3.2.1 Preparación y cuantificación del contaminante	14
III.3.2.2 Contaminación de heces	14
III.3.2.3 Extracción de ADN desde heces en papel filtro usando Chelex	15
III.3.2.4 Ensayos de validación	15
III.3.3 Comparación entre los dos métodos de detección	17
III.3.4 Evaluación de la calidad y cantidad de ácidos nucleicos extraídos	17
III.4 Análisis de datos	17
III.5 Consideraciones éticas	18
IV RESULTADOS	18
IV.1 Determinación de UFC en el contaminante para los ensayos de validación	18
IV.2 Ensayos de Validación	21
IV.2.1 Límite de Detección	21
IV.2.2 Parámetro de Especificidad Analítica	22
IV.2.3 Parámetro de Precisión	24
IV.2.4 Parámetro de Exactitud	24
IV.3 Comparación entre el método validado y el método referencial con muestras de niños del estudio de cohortes	25

IV.4 Evaluación de la calidad y cantidad de ácidos nucleicos obtenidos con los dos métodos de extracción	26
V DISCUSION.....	27
V.1 Hallazgos principales	27
V.2 Comparación con otros estudios	27
V.3 Relevancia en salud pública.....	30
VI LIMITACIONES.....	32
VII CONCLUSIONES	32
VIII RECOMENDACIONES	33
IX REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	34
ANEXOS	39
Anexo 1	39
INFORMACIÓN SUPLEMENTARIA	40

RESUMEN

La enfermedad diarreica es una de las causas principales de muerte en niños menores de cinco años. Uno de los patógenos involucrados en esta enfermedad especialmente en países de mediano y bajo ingreso es la *Escherichia coli* Enterotoxigénica (ETEC). En los estudios realizados que implican el uso de muestras fecales para el diagnóstico, existen dificultades en la colecta, transporte y almacenamiento; una alternativa planteada para superar estos problemas es el uso del papel filtro, que permite el almacenamiento de muestras a temperatura ambiente y ocupa menor espacio. Asimismo, existe un amplio número de métodos de extracción de ADN muchos de los cuales están basados en kits que no se ajustan económicamente a las necesidades de los lugares donde la enfermedad diarreica es prevalente. De esta forma, este estudio busca evaluar conjuntamente el uso de muestras de heces en papel filtro y la extracción de su ADN utilizando Chelex – 100 para detectar *Escherichia coli* enterotoxigénica (ETEC) mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) convencional múltiple. El límite de detección del método propuesto fue 5.8×10^4 UFC/g. El ensayo de interferencia para determinar especificidad analítica para detectar ETEC y el análisis de los cebadores utilizados mostraron que el método es específico. En el ensayo de precisión se obtuvo un 100% para 3 de los 4 puntos de las diluciones escogidas y se obtuvo un 80% para uno de los puntos mostrando una buena precisión del método. El método propuesto obtuvo un 100% de exactitud al compararlo con la extracción con kit Qiagen a partir de muestras frescas. La detección de ETEC utilizando Chelex-100 y muestras de heces en papel filtro mostró una concordancia de moderada a fuerte ($k=0.794$) con la detección de ETEC utilizando un kit comercial y muestras de heces frescas.

Palabras claves: *Escherichia coli*, diarrea, papel filtro, Chelex-100

ABSTRACT

Diarrheal disease is one of the leading causes of death in children under five years of age. One of the pathogens involved in this disease especially in middle and low income countries is Enterotoxigenic *Escherichia coli*. In studies involving the use of fecal samples for diagnosis, there are difficulties in colección, transport and storage; an alternative proposed to overcome these problems is the use of filter paper, which allows the storage of samples at room temperature and takes up less space. Likewise, there are a large number of DNA extraction methods, many of which are based on kits that are not economically adjusted to the needs of places where diarrheal disease is prevalent. Thus, this study seeks to jointly evaluate the use of stool samples on filter paper and their DNA extraction using Chelex - 100 to detect Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) by conventional multiplex Polymerase Chain Reaction (PCR). The detection limit of the proposed method was 5.8×10^4 CFU/g. The interference assay to determine analytical specificity to detect ETEC and the analysis of the primers used showed that the method is specific. In the precision test, 100% was obtained for 3 of the 4 points of the chosen dilutions and 80% was obtained for one of the points showing a good precision of the method. The proposed method obtained 100% accuracy when compared to the extraction with Qiagen kit from fresh samples. Detection of ETEC using Chelex-100 and stool samples on filter paper showed moderate to strong agreement ($k=0.794$) with detection of ETEC using a commercial kit and fresh stool samples.

Keywords: *Escherichia coli*, diarrhea, filter paper, Chelex-100.

I INTRODUCCIÓN

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), la enfermedad diarreica se encuentra dentro de las 10 causas principales de muerte a nivel global en países de mediano y bajo ingreso. El número absoluto de muertes debido a esta enfermedad disminuyó de 1.9 millones a 1.1 millones entre los años 2000 y 2019 (1). En la actualidad, se producen 1.7 millones de casos de enfermedad diarreica infantil anualmente y esta enfermedad ocasiona la muerte de 50 851 niños de 5 a 9 años y de 443 832 niños menores de 5 años (2). En este último grupo, la enfermedad diarreica tiene mayor relevancia, específicamente en la niñez (1-59 meses) encontrándose como segunda causa principal de mortalidad solo por debajo de las infecciones respiratorias agudas (3).

Las *Escherichia coli* asociadas a episodios de diarrea aguda en niños son los agentes etiológicos más importantes en la enfermedad diarreica, específicamente el grupo de *E. coli* diarrogénicas (DEC) (4). Las DEC se refieren al grupo conformado por diferentes patotipos de *E. coli* que se diferencian por su lugar de colonización, mecanismos de virulencia y cuadro clínico (5). Estos patotipos identificados hasta la actualidad son *E. coli* enteropatógena, enterotoxigénica, enteroagregativa, enteroinvasiva, de adherencia difusa, enterohemorrágica y adherente e invasiva (6). Estudios realizados en países en vías de desarrollo de Asia, África y Latinoamérica han puesto en evidencia que la *E. coli* enterotoxigénica (ETEC) es uno de los patógenos que se presenta más frecuentemente en la enfermedad diarreica aguda en niños menores de cinco años (7-11). En el Perú, la prevalencia promedio de ETEC en muestras de diarrea en niños se ha reportado en 5.3% y en 6.9% (12) (13) y ha sido una de las bacterias junto con *Shigella* spp., de un total de 19, encontrada positivamente asociada con gastroenteritis en un estudio realizado en Lima (14).

La ETEC se diferencia de las otras *E. coli* diarrogénicas porque presenta factores de virulencia específicos que permiten al organismo colonizar el intestino

delgado y causar diarrea. Uno de estos factores son las enterotoxinas; existen dos de ellas y ETEC puede producir una o ambas. Una de las enterotoxinas se conoce como termolábil (LT) y la otra como termoestable (ST), la cual presenta a su vez dos variantes (STp y STh). Y los otros factores de virulencia que presenta ETEC son los factores de colonización de los cuales se conocen más de 22 (15). En ETEC los factores de colonización son llamados antígenos de superficie coli, antígenos de los factores de colonización y factores de colonización putativos. ETEC presenta dos principales mecanismos de patogenicidad; la adherencia mediada por los factores de colonización y la secreción de toxinas mediada por las enterotoxinas (S1) (6).

El Centro Nacional de Epidemiología, Prevención y Control de Enfermedades (CDC Minsa) informó en su Boletín Epidemiológico del Perú que los episodios semanales de la enfermedad diarreica aguda muestran una tendencia creciente desde la semana 31 a la semana 35 del 2023. Además, hasta la semana 35 del 2023 se notificaron 34 defunciones por enfermedad diarreica aguda en el grupo de menores de 5 años (16). En el 2024, hasta la semana 19 se observó un incremento de 1.2% en el promedio de episodios de enfermedad diarreica aguda respecto al año anterior pero también se observó una tendencia al descenso de los episodios de enfermedad diarreica aguda desde la semana 13 en el presente año (Figura 1) (17). Sin embargo, en muchas áreas rurales no se diagnostica el agente causante de la enfermedad diarreica debido a la falta de herramientas necesarias en los puestos de salud. En un estudio realizado en la ciudad de Cajamarca, las muestras de heces frescas tomadas en el hospital regional tuvieron que estar guardadas a -20°C y posteriormente trasladadas a Lima para procesarse (18).

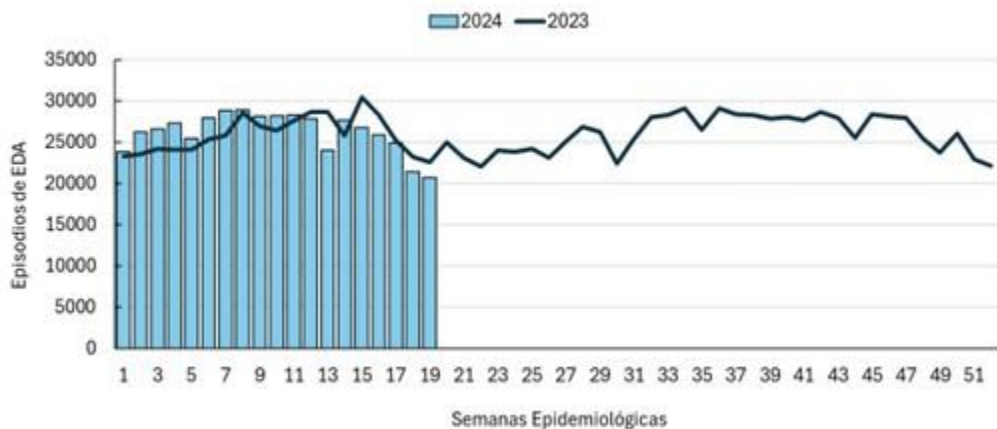


Figura 1. Episodios de las enfermedades diarreicas agudas por semana epidemiológica Perú, 2023-2024 (SE19). Fuente: Centro Nacional de Epidemiología, Prevención y Control de Enfermedades (CDC) – Minsa. Figura tomada del Boletín Epidemiológico del Perú Volumen 33 SE 19 (17).

El diagnóstico de enfermedades a partir de muestras frescas (sangre, plasma, saliva, heces, etc.), como lo es el diagnóstico de la enfermedad diarreica, presenta dificultades en la colecta y transporte, especialmente si se realiza en lugares que no tienen equipos para mantener muestras a una temperatura determinada. El uso de muestras secas en papel filtro ha brindado una alternativa para poder superar estas dificultades, especialmente en muestras de sangre; y, a través de ensayos de validación, ha demostrado tener sensibilidad y especificidad similar al uso de muestras frescas en estudios de serología y amplificación de ácidos nucleicos (como la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)) para la detección de distintos patógenos (19-21).

Debido a que las *E. coli* diarrogénicas no se detectan rutinariamente en muestras de heces en los laboratorios clínicos, se han buscado métodos de detección que no consuman tanto tiempo y dinero como el PCR convencional múltiple, una variación del PCR convencional que permite detectar simultáneamente varios genes de virulencia (22) (13). Sin embargo, en estos estudios se optó por realizar sembrado y aislamiento de cepas en agar (proceso que se incubaba una noche) para

luego extraer ADN de colonias individuales o de un grupo de colonias. Otros estudios realizados han utilizado muestras de heces en papel filtro y como método de extracción han optado por kits comerciales, método de fenol-cloroformo y reactivos purificadores FTA (Flinders Technology Associates) específicos para papeles filtro FTA (tipo especial de papel filtro impregnado con reactivos que promueven la lisis celular) (23- 25).

El Chelex-100 es una resina con propiedades quelantes y alta afinidad hacia iones metálicos, de esta forma cuando se colocan muestras en una solución con Chelex y se aumenta la temperatura para liberar el ADN de las células, el Chelex se une a iones como el magnesio evitando la degradación del ADN (26). El Chelex-100 ha sido utilizado para extraer ADN de muestras de sangre en papel filtro y se ha mostrado como un método más rápido y económico comparado con el metanol, fenol- cloroformo y buffer TE (27). También, el uso de Chelex y PCR convencional múltiple se ha encontrado como un método altamente sensible y específico en un estudio para diagnosticar malaria (28).

En el caso de muestras de heces, la cantidad y calidad del ADN extraído a partir de heces frescas de animales utilizando Chelex-100 ha sido comparada con el obtenido de un kit comercial, utilizado como gold estándar, dando como resultado alta y similar cantidad y calidad de ADN (29). Existen pocos estudios que han utilizado Chelex- 100 con tarjetas rescatadoras de proteína (Protein Saver Cards) Whatman 903, un tipo de papel filtro específico para recolectar muestras (30) (31). Uno de estos estudios comparó los métodos de extracción usando Chelex y un kit Qiagen para detectar parásitos enteropatógenos en heces frescas y suspensión de heces, encontrando que la sensibilidad de la extracción con Qiagen fue mejor en heces frescas pero la extracción con Chelex en suspensión de heces mostró una sensibilidad muy comparable a la del kit.

Si bien no hay muchos estudios con muestras de heces en papel filtro que hayan comprobado la eficiencia de la extracción con Chelex, con los reportes obtenidos

se puede observar que es un buen competidor contra los métodos ya establecidos y utilizados comúnmente como son los kits comerciales. Además, debido al bajo costo y el poco tiempo que consume es una gran opción para poder usar en zonas que no cuentan con recursos suficientes y donde el almacenamiento de muestras sea un problema (Tabla 1).

Tabla 1. Comparación de tiempo y precio (o costo) por muestra entre métodos de extracción utilizando Chelex-100 o un Kit comercial.

Extracción	Chelex-100 (1)	Kit Comercial (2)
Precio por muestra	\$0.33 (3)	\$7.18 (4)
Tiempo	50 minutos (5)	90-120minutos (6)

- (1) Para la extracción con Chelex-100, por muestra se consideró el uso de 50ul de Chelex-100 al 20%, 150ul de agua libre de nucleasas y 2mL de PBS (32).
- (2) Los estudios citados utilizan diferentes Kits comerciales, en este caso se tomó como ejemplo el QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit.
- (3) Precio en dólares para cada reactivo obtenido de las páginas web <https://www.sigmaaldrich.com/PE/es/product/sigma/c7901>, <https://www.qiagen.com/us/products/discovery-and-translational-research/lab-essentials/buffers-reagents/nuclease-free-water?catno=129115> y <https://www.fishersci.com/shop/products/phosphate-buffered-saline-pbs-1x-sterile-filtered/AAJ61196AP>
- (4) Precio en dólares obtenido de la página web <https://www.qiagen.com/us/products/discovery-and-translational-research/dna-rna-purification/dna-purification/genomic-dna/qiaamp-fast-dna-stool-mini-kit?catno=51604>
- (5) Tiempo basado en el procedimiento de Clinical Group WWARN, 2015 para 12 muestras.
- (6) Tiempo basado en el inserto del kit QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit para 12 muestras.

El presente estudio buscó evaluar y aprovechar las ventajas de la colección de muestra de heces en papel filtro, en conjunto, con una técnica de extracción de ADN simple (Chelex-100) y posterior PCR convencional múltiple como métodos efectivos para detectar ETEC; el cual es un patógeno muy importante causante de la enfermedad diarreica en el Perú y en el mundo.

II OBJETIVOS

II.1 General

Evaluar un método de detección de *Escherichia coli* enterotoxigénica (ETEC) a través de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) convencional múltiple utilizando Chelex – 100 para la extracción de ácidos nucleicos en muestras de heces colectadas en papel filtro.

II.2 Específicos

- Validar la extracción de ADN utilizando Chelex-100 a partir de muestras de heces negativas contaminadas con la cepa *Escherichia coli* H10407 ATCC 35401 en papel filtro evaluando el límite de detección, especificidad analítica, precisión y exactitud.
- Realizar la extracción de ácidos nucleicos usando Chelex - 100 de muestras de heces colectadas en papel filtro de niños menores de 2 años de una comunidad de Villa el Salvador.
- Realizar la extracción de ácidos nucleicos usando el kit comercial QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit de muestras de heces colectadas en viales de niños menores de 2 años de una comunidad de Villa el Salvador.
- Realizar la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) convencional múltiple para detectar *Escherichia coli enterotoxigénica* (ETEC) en

material extraído con Chelex-100 y con el kit comercial QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit.

- Comparar los resultados del método de extracción con Chelex-100 a partir de muestras en papel filtro con los resultados de la extracción con kit comercial QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit a partir de muestras frescas, considerando a este último método como referencia.

III METODOLOGÍA

III.1 Diseño de estudio

Estudio transversal y experimental. El estudio se divide en dos etapas: en la primera etapa del estudio se validó la técnica de extracción de ADN con Chelex-100, estableciendo los parámetros de límite de detección, especificidad analítica, precisión y exactitud (Figura 2) y en la segunda etapa se comparó el desempeño de esta técnica con el método de extracción de ADN utilizando el kit comercial QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit a partir de muestras colectadas en viales, comparando los resultados positivos y negativos (Figura 3). Finalmente, para evaluar la cantidad y calidad de ácidos nucleicos extraídos con Chelex-100 a partir de muestras de papel filtro y con el kit QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit a partir de muestras en viales se utilizaron 5 muestras extraídas por duplicado.

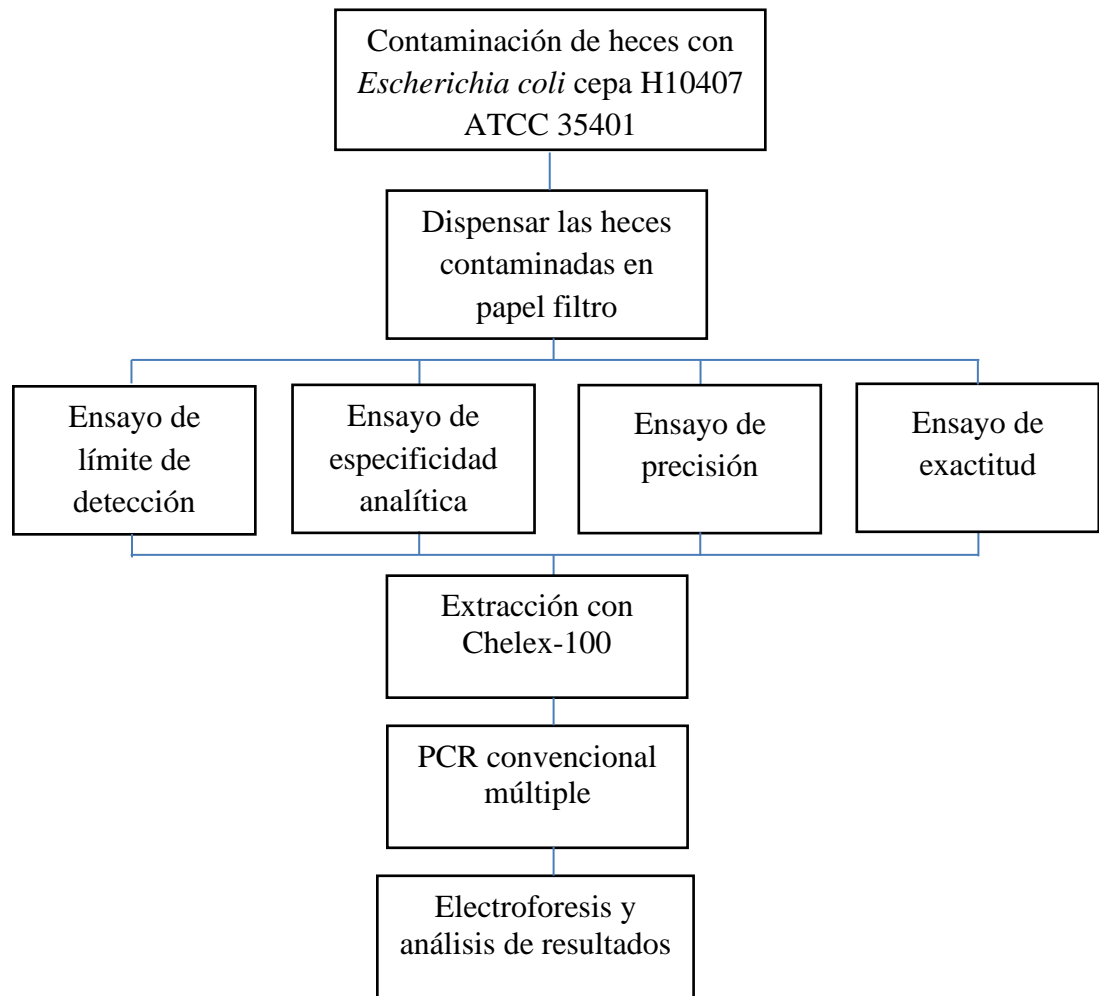


Figura 2. Flujograma 1: Procedimiento para la validación de la extracción de ADN utilizando Chelex-100. En la primera etapa del estudio se contó con heces contaminadas en el laboratorio con cantidades conocidas de una cepa de *Escherichia coli* H10407 ATCC 35401 productora de las enterotoxinas LT, STp y STh (33). Las heces contaminadas fueron añadidas a un papel filtro Whatman 40 a partir del cual se realizaron 4 ensayos para el proceso de validación del método de extracción con Chelex – 100 evaluando parámetros que apliquen a pruebas cualitativas y se realizó PCR convencional múltiple.

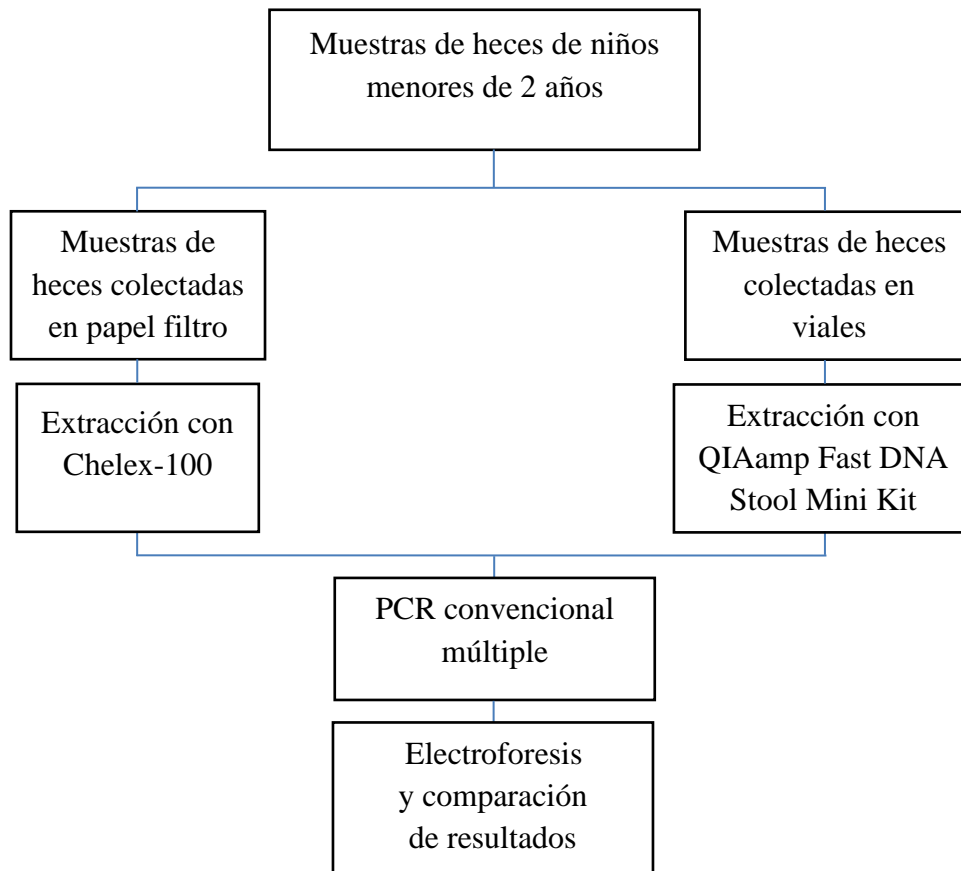


Figura 3. Flujograma 2: Procedimientos para la comparación del método validado con el método de referencia. En la segunda etapa del estudio se utilizaron muestras de heces de niños menores de 2 años que fueron colectadas en papel filtro y en viales. Las muestras colectadas en papel filtro fueron extraídas utilizando Chelex-100 y las muestras colectadas en viales fueron extraídas con el kit QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit de Qiagen. Ambas extracciones fueron sometidas a PCR convencional múltiple y se compararon los resultados obtenidos.

III.2 Población y tamaño muestral

Todas las muestras que se utilizaron para el presente estudio provienen del proyecto “La infección natural de norovirus y sapovirus en una cohorte de nacimiento en una comunidad periurbana del Perú” (SIDISI: 65178). Para el proceso de validación se utilizaron muestras de heces negativas a ETEC que se

contaminaron en el laboratorio y para el proceso de comparación de métodos y evaluación de la calidad y cantidad de ácidos nucleicos se utilizaron muestras colectadas entre octubre y diciembre del 2019. Para la comparación de métodos, el muestreo se realizó directamente del pañal del niño y en forma simultánea fueron colocados las muestras de heces en el papel filtro y las heces frescas en un vial de 2mL.

Para calcular el tamaño de muestra, diversos estudios (34-36) que buscan determinar una concordancia entre dos métodos establecen previamente un coeficiente de Kappa esperado. El número de muestras fue determinado basado en el estudio de Bujang y Baharum (2022) (37) donde demuestran que para determinar un coeficiente de Kappa razonable o moderado entre dos métodos con respuesta binaria (positivo – negativo), es suficiente utilizar entre 29 y 85 unidades (38) con un poder estadístico de 80% y un alfa de 0.05. Es importante recalcar que en los estudios mencionados previamente opinan que es bueno duplicar la cantidad de muestras para obtener mejores resultados. En este caso se decidió utilizar todas las muestras colectadas entre octubre y diciembre del 2019 que fueron 171 en total.

III.3 Procedimiento

III.3.1 Procedimientos para realizar el PCR convencional múltiple y electroforesis

La secuencia de los cebadores que se utilizaron para las tres enterotoxinas y el tamaño del producto de amplificación se muestran en la **Tabla 2**. Todos los ensayos de PCR convencional múltiple se realizaron siguiendo lo establecido previamente por Rodas et al. (2009) (39) con modificaciones. La reacción se realizó en un volumen de Máster Mix de 20 μ L que contenían 2.5 μ L de 10x DreamTaq Green Buffer, 1.0 μ L de primer LT forward y reverse (5 μ M), 1.0 μ L de primer STp forward y reverse (7.5 μ M), 1.5 μ L de primer STh forward y reverse (15 μ M), 3.0 μ L de dNTPs, 10.875 μ L de dH₂O y 0.125 μ L de DreamTaq Green ADN Polimerasa. El volumen final de reacción fue de 25 μ L incluyendo 5 μ L de

ADN.

Tabla 2. Secuencia de nucleótidos de los cebadores de las tres enterotoxinas y tamaño del producto de amplificación (39).

Enterotoxina	Secuencia de los cebadores	Producto de amplificación
LT	F 5'-ACGGCGTTACTATCCTCTC-3' R 5'- TGGTCTCGGTCAGATATGTG-3'	273pb
STp	F 5'-TCTTTCCCTCTTTTAGTCAG-3' R 5'-ACAGGCAGGATTACAACAAAG-3'	166pb
STh	F 5'-TTCACCTTTCCTCAGGATG-3' R 5'-CTATTCATGCTTTCAGGACCA-3'	120pb

Las reacciones de PCR convencional múltiple fueron amplificadas por una denaturación inicial a 95°C por 5 minutos, seguida de 40 ciclos de amplificación (95°C por 30 segundos, 56°C por 30 segundos, 72°C por 30 segundos) y finalmente 10 minutos a 72°C. Todos los procesos de electroforesis fueron realizados en gel de agarosa al 2.5% durante 50 minutos a 140V. En la **Figura 4** se observa el esquema de las tres enterotoxinas presentes en el control positivo y sus respectivos tamaños en un gel de agarosa.

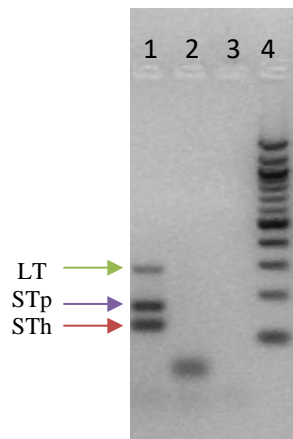


Figura 4. Esquema del gel de electroforesis mostrando las enterotoxinas LT, STp y STh del control positivo *Escherichia coli* H10407 ATCC 35401. El carril 1 contiene la colonia control; la banda de 273pb pertenece a la toxina LT (flecha verde), la siguiente banda de 166pb pertenece a la toxina ST (flecha morada) y la última banda de 120pb pertenece a la toxina STh (flecha roja). El carril 2 contiene el control negativo (PBS más el mix de PCR) y el carril 3 contiene un blanco (solo mix de PCR). El carril 4 contiene al marcador de peso molecular 100bp DNA Ladder NEB. Gel de agarosa al 2.5%, 50 minutos a 140V.

III.3.2 Validación

Para realizar los ensayos de validación se utilizó *Escherichia coli* cepa H10407 ATCC 35401 adquirida por el Laboratorio de Microbiología Molecular como control positivo ya que produce las enterotoxinas termolábiles (LT) y termoestables (STp y STh) (33).

III.3.2.1 Preparación y cuantificación del contaminante

Una colonia control de *Escherichia coli* H10407 ATCC 35401 fue colocada en Caldo Triplicase de Soya (TSB) y se incubó a 37°C en movimiento por aproximadamente 8 horas. Cada hora se fue midiendo el OD (densidad óptica) con un espectrofotómetro hasta que se obtuvo un OD cercano a 1 que corresponde aproximadamente a 1×10^9 UFC/mL. A partir del contaminante obtenido, se hicieron diluciones seriadas desde 10^{-1} hasta 10^{-8} en un total de 1mL, que sirvieron para los ensayos de validación.

Para determinar la cantidad exacta de UFC/mL se realizó un conteo de colonias esparciendo 100uL de cada dilución en placas de agar Mac Conkey por triplicado las cuales se colocaron a 37°C por 24 horas. Aquellas placas que presentaron una alta carga bacteriana fueron catalogadas como incontables y se promedió el recuento de colonias obtenidas en cada dilución.

III.3.2.2 Contaminación de heces

Inicialmente se obtuvieron muestras de heces frescas que fueron sometidas a una

extracción de ADN utilizando el kit QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit de Qiagen siguiendo los mismos pasos del inserto y se les realizó PCR convencional múltiple para comprobar que la ETEC no estaba presente en la muestra. Posteriormente se colocó aproximadamente 8g de estas heces negativas para ETEC en un tubo de 15mL y se le añadió 3mL de PBS para darle una consistencia semilíquida. Se repartió esta mezcla equitativamente (aproximadamente 1g) en 8 tubos de 2mL, para cada una de las diluciones (10^{-1} - 10^{-8}) trabajadas. Seguidamente, se añadió 350uL de cada dilución del contaminante en cada uno de los tubos y se mezcló hasta tener una muestra homogénea. Finalmente, utilizando una pipeta se dispensó una alícuota de 200uL de cada mezcla en papel filtro Whatman grado cuantitativo N°40 y se dejó secar por 30 minutos.

III.3.2.3 Extracción de ADN desde heces en papel filtro usando Chelex

Para la extracción de ADN se utilizó el procedimiento de Clinical Group WWARN (32) donde inicialmente se recortó una pieza de 9x3mm (semejante a un rectángulo) de papel filtro que contenía la muestra, utilizando unas tijeras y se colocó en un tubo de 1.5mL. Entre cada recorte de cada muestra las tijeras se esterilizaron utilizando alcohol al 70% y un mechero. Después se añadió 1mL de PBS en el tubo de 1.5mL y se incubó a temperatura ambiente por 10 minutos. Pasado este tiempo, se centrifugó a 14000 rpm por 2 minutos y se descartó el sobrenadante. Luego se añadió nuevamente 1mL de PBS, se volvió a centrifugar a 14000rpm por 2 minutos y se descartó el sobrenadante. Posteriormente, se añadió 150uL de agua libre de nucleasas y 50uL de Chelex al 20%. Finalmente se incubó a 99°C por 10 minutos y se guardó el sobrenadante en otro tubo de 1.5mL. Cada grupo de extracción fue de 12 muestras y se incluyó un control negativo cuya muestra consistió en una pieza recortada de una zona de papel filtro donde no estuviera la muestra.

III.3.2.4 Ensayos de validación

Se tomaron en cuenta cuatro parámetros de validación para los cuales sus respectivos ensayos se describen a continuación, basados en el artículo de Burd (2010) (40).

- **Límite de detección.** Se realizó el ensayo de límite de detección utilizando las muestras de heces en papel filtro contaminadas con las diluciones seriadas desde 10^{-1} hasta 10^{-8} . Cada muestra se extrajo por triplicado y se realizó PCR convencional múltiple y electroforesis descrito en la sección III.3.1.

- **Especificidad analítica.** Se realizó un ensayo de interferencia contaminando heces negativas para ETEC con cuatro bacterias proporcionadas generosamente por el Dr. Pablo Tsukayama caracterizados por bioquímica y secuenciados en su laboratorio. Las cuatro bacterias utilizadas fueron *Escherichia coli*, *Enterobacter* sp., *Citrobacter* sp. y *Klebsiella* sp., cada uno fue utilizado individualmente en las heces negativas. Se inocularon las heces contaminadas en el papel filtro y posteriormente se realizó la extracción, PCR convencional múltiple y electroforesis descrito en la sección III.3.1. Además, se utilizó la herramienta Primer – BLAST para determinar la especificidad de los 3 pares de cebadores. En la página <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/> sección *Primer Parameters* se introdujo la secuencia de cebadores para cada enterotoxina y para tener la mayor cobertura, en la sección *Primer Pair Specificity Checking Parameters* se cambió el Database a “nr” y no se especificó un organismo. Una vez que se inició el programa, se obtuvieron los targets de secuencias para las que los cebadores eran específicos.

- **Precisión.** Se escogieron cuatro puntos de las diluciones seriadas que se encontraron cercanas al límite de detección obtenido. Las heces contaminadas con esas diluciones se inocularon en papel filtro y se realizaron extracciones en cinco días diferentes en conjunto con el PCR convencional múltiple y electroforesis descritos en la sección III.3.1 para observar los resultados.

- **Exactitud/Veracidad.** Se realizó un ensayo de comparación de métodos de extracción en el cual se utilizó como referencia la extracción de ADN a partir de heces frescas con un kit comercial QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit de Qiagen siguiendo los mismos pasos del inserto. Las muestras que se utilizaron para este ensayo fueron muestras de niños previamente analizadas en el laboratorio con el

método de referencia. Se recibieron 8 muestras entre positivas y negativas debidamente codificadas para ser analizadas en ciego.

III.3.3 Comparación entre los dos métodos de detección

Se utilizaron 171 muestras de heces provenientes de niños menores de 2 años del estudio según se explicó en la sección III.2 a las cuales se les realizó dos procedimientos de extracción: el procedimiento validado utilizando Chelex-100 a partir de las muestras colectadas en papel filtro y el procedimiento de extracción utilizando un kit comercial de Qiagen a partir de las mismas muestras, pero frescas. Ambos procedimientos de extracción posteriormente fueron sometidos al PCR convencional múltiple y electroforesis descrito en la sección III.3.1.

III.3.4 Evaluación de la calidad y cantidad de ácidos nucleicos extraídos

Se utilizaron 5 muestras de heces provenientes de niños menores de 2 años del estudio según se explicó en la sección III.2 que habían sido colectadas en viales. A partir de los viales principales se alicuotó una porción de aproximadamente 100mg en papel filtro y otra porción de aproximadamente 200mg en un vial. Las muestras en papel filtro se extrajeron utilizando Chelex-100 y las muestras en viales se extrajeron usando el kit QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit de Qiagen. Las muestras se extrajeron por duplicado, haciendo un total de 10 reacciones por cada método de extracción. Posteriormente se utilizó el espectrofotómetro Nanodrop 2000c de Thermo Scientific y el kit 1X dsDNA HS con el Fluorómetro Qubit 4 de Invitrogen Thermo Fisher Scientific para evaluar la calidad y cantidad de ácidos nucleicos extraídos con ambos métodos.

III.4 Análisis de datos

Para determinar el límite de detección primero se utilizó la siguiente fórmula para hallar las UCF/ml en el contaminante:

$$\frac{\text{Promedio de colonias} \times \text{Factor de dilución}}{\text{mL de muestra sembrada (0.1mL)}}$$

Seguidamente, para hallar las UFC añadidas a las muestras de heces se utilizó la

siguiente fórmula:

$$\frac{\text{Promedio de UFC/mL en el contaminante } X \text{ mL de muestra añadida (0.35mL)}}{\text{Factor de dilución}}$$

Los resultados obtenidos de los parámetros de precisión y exactitud se presentaron en tablas y además se utilizó la herramienta Primer BLAST para la especificidad analítica. Finalmente, se utilizó el software STATA 17 para determinar la concordancia entre los resultados obtenidos de la comparación del método propuesto y el método de referencia a través de la prueba Kappa y para evaluar los resultados obtenidos de la cantidad y calidad de ácidos nucleicos obtenidos se utilizó la prueba de signos y rangos de Wilcoxon.

III.5 Consideraciones éticas

El presente proyecto de investigación con código de inscripción 202307 fue aprobado por el Comité Institucional de Ética en Investigación de la Universidad Peruana Cayetano Heredia bajo la categoría de revisión exento en la Constancia 362-20-20. El estudio principal del cual se obtuvieron las muestras “La infección natural de norovirus y sapovirus en una cohorte de nacimiento en una comunidad periurbana del Perú” (SIDISI: 65178) también cuenta con aprobación ética del Comité Institucional de Ética en Investigación de la Universidad Peruana Cayetano Heredia señalado en la Constancia R-217-23-19. No se contó con datos de identificación de las muestras de niños que se usaron durante el proyecto, solo se obtuvieron códigos. Finalmente, para garantizar la confidencialidad, el acceso a las muestras y a los códigos de estas fue restringido solo a la tesista y a la asesora.

IV RESULTADOS

IV.1 Determinación de UFC en el contaminante para los ensayos de validación

Para determinar la cantidad de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) presentes

en el contaminante del cual se obtuvieron las diluciones, se realizó el recuento de colonias presentes en cada dilución (**Figura 5**). Una vez obtenido el promedio del recuento de las colonias se aplicó la fórmula para determinar las UFC/mL en el contaminante (**Tabla 3**).

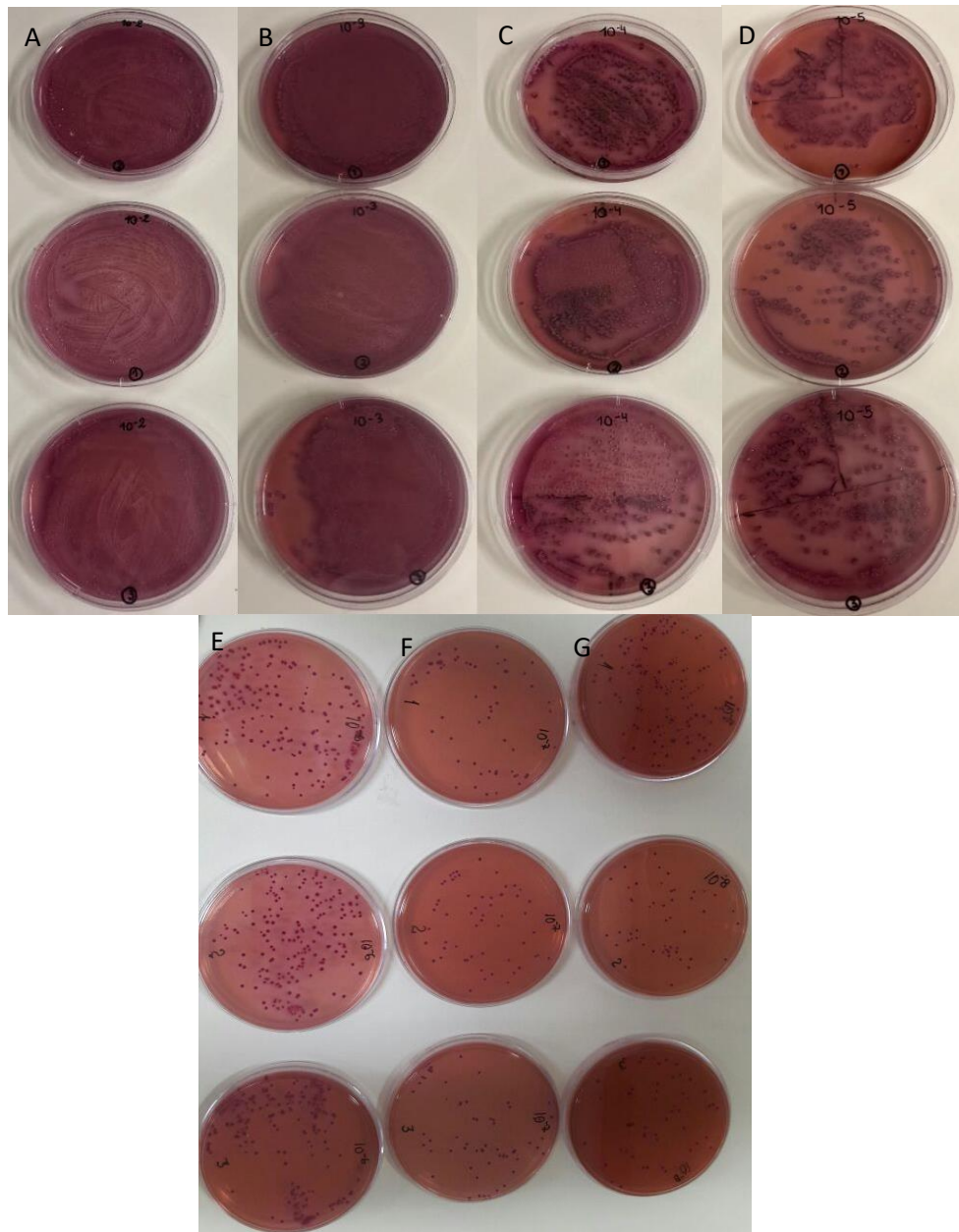


Figura 5: Placas de agar Mac Conkey sembradas con 100ul de cada dilución por triplicado. A-G: diluciones desde 10^{-1} hasta 10^{-8} .

Tabla 3. Recuento de colonias para determinar el número de UFC presentes en el contaminante.

Dilución	Conteo de colonias			Promedio	UFC/mL en el contaminante
	Placa 1	Placa 2	Placa 3		
1.00E-01	Incontable	Incontable	incontable	N/A	N/A
1.00E-02	Incontable	Incontable	incontable	N/A	N/A
1.00E-03	Incontable	Incontable	incontable	N/A	N/A
1.00E-04	Incontable	Incontable	incontable	N/A	N/A
1.00E-05	1080	848	912	947	9.47E+08
1.00E-06	279	312	375	322	3.22E+09
1.00E-07	152	164	177	164	1.64E+10
1.00E-08	45	43	49	46	4.57E+10
				Promedio de UFC/mL en el contaminante	1.66E+10

Como se observa en la **Tabla 3** se obtuvieron diferentes valores de UFC/mL es por lo que se realizó un promedio de estos valores a partir de la sumatoria de UFC/mL del contaminante dividido entre el número de diluciones para obtener el valor final de UFC/mL en el contaminante que fue de 1.66×10^{10} . A partir de este valor del contaminante se calculó el valor para cada dilución por 350ul de contaminante añadido (**Tabla 4**) utilizando la fórmula para hallar las UFC añadidas. El valor final de UFC/g coincide con el valor de UFC/ml añadidos debido a que la muestra de heces era de 1 gramo. Este valor obtenido sirvió para hallar el límite de detección.

Tabla 4. Determinación de UFC/g de heces para obtener el valor del límite de detección

Contaminación de heces		
UFC/mL en cada dilución	UFC/mL añadido a las muestras de heces	UFC/g de heces
1.66E+09	5.80E+08	5.80E+08
1.66E+08	5.80E+07	5.80E+07
1.66E+07	5.80E+06	5.80E+06
1.66E+06	5.80E+05	5.80E+05
1.66E+05	5.80E+04	5.80E+04
1.66E+04	5.80E+03	5.80E+03
1.66E+03	5.80E+02	5.80E+02
1.66E+02	5.80E+01	5.80E+01

IV.2 Ensayos de Validación

IV.2.1 Límite de Detección

Para el primer parámetro de validación se realizó el ensayo del límite de detección. Los resultados de este ensayo se muestran en el gel de electroforesis de la **Figura 6** donde se puede observar una amplificación hasta el carril 5. Basándonos en los resultados de la **Tabla 4**, podemos decir que el límite de detección de la prueba se encontró en la dilución 1×10^{-5} para cada enterotoxina, lo cual equivale a 5.8×10^4 UFC/g de heces.

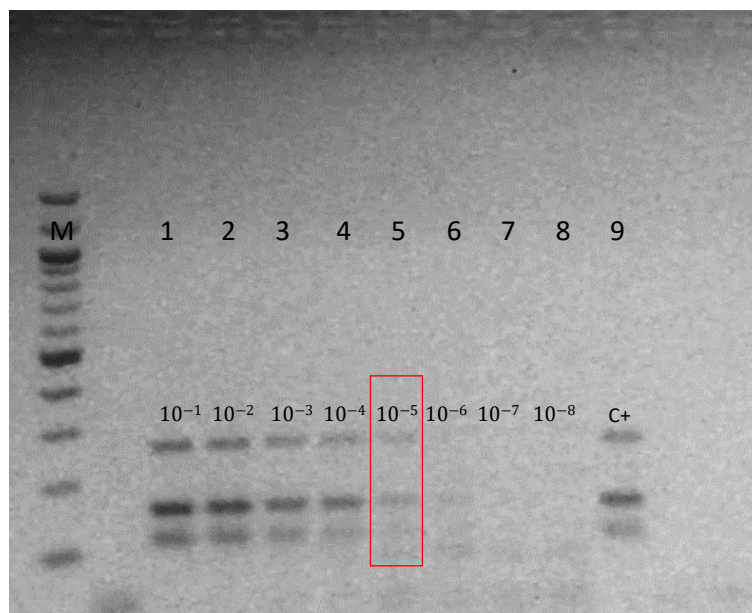


Figura 6. Gel de electroforesis para el ensayo de límite de detección. De los carriles 1 al 8 se muestran las diluciones de 1×10^{-1} hasta 1×10^{-8} , en el carril 9 se muestra el control positivo (H10407 ATCC 35401) y en el carril M contiene al marcador de peso molecular 100bp DNA Ladder NEB. Gel de agarosa al 2.5%, 50 minutos a 140V.

IV.2.2 Parámetro de Especificidad Analítica

El segundo parámetro de validación, la especificidad analítica, tuvo dos secciones que complementaron el resultado. Primero, se realizó el ensayo de interferencia el cual no presentó reactividad cruzada con ninguno de los patógenos adicionales (**Figura 7**).

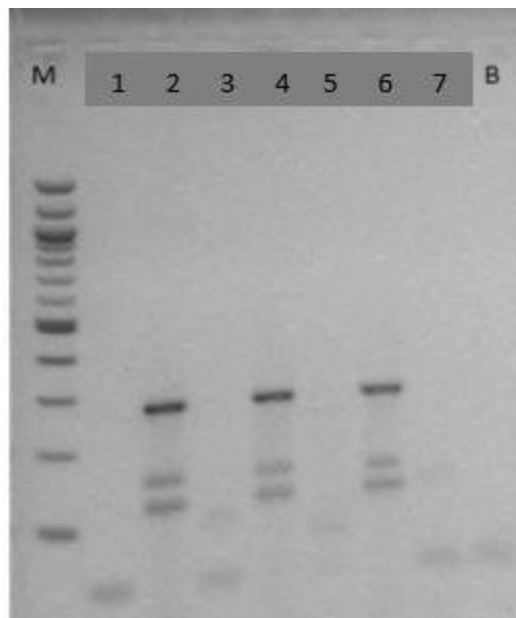


Figura 7. Gel de electroforesis en el ensayo de interferencia con 3 patógenos adicionales y el control positivo *Escherichia coli* H10407 ATCC 35401. Los carriles 2, 4 y 6 contienen la colonia control, el carril 1 contiene *Escherichia coli*, el 3 contiene *Enterobacter* sp., el 5 contiene *Citrobacter* sp., y el carril 7 contiene *Klebsiella* sp. El carril B contiene un blanco (solo mix de PCR) y el carril M contiene al marcador de peso molecular 100bp DNA Ladder NEB. Gel de agarosa al 2.5%, 50 minutos a 140V.

Segundo, se utilizó la herramienta Primer-BLAST para observar la especificidad de los 3 pares de cebadores. En la **Figura 8** se observan algunas dianas obtenidas con cada par de cebadores, en total se obtuvieron 86 para LT, 60 para STp y 72 para STh. Se realizó una revisión de cada uno de los targets obtenidos y se observó que todos pertenecen a ETEC. Estos resultados se obtuvieron cuando se usó la herramienta Primer-BLAST en setiembre del 2021.

A

Primer pair 1

		Sequence (5'->3')	
Forward primer	1	ACGGCGTTACTATCCTCTC	19
Reverse primer		TGGTCTCGGTACAGATATGTG	

Products on target templates

>CP035885.1 Escherichia coli strain LSN03-016011/A plasmid pLSN03016011A_163, complete sequence

product length = 274
 Forward primer 1 ACGGCGTTACTATCCTCTC 19
 Template 146537 146555

Reverse primer 1 TGGTCTCGGTACAGATATGTG 20
 Template 146818 146791

>CP035883.1 Escherichia coli strain WS0115A plasmid pWS0115A_186, complete sequence

product length = 274
 Forward primer 1 ACGGCGTTACTATCCTCTC 19
 Template 145563 145545

Reverse primer 1 TGGTCTCGGTACAGATATGTG 20
 Template 145298 145389

>CP035880.1 Escherichia coli strain DS26-1 plasmid pDS26_129, complete sequence

product length = 274
 Forward primer 1 ACGGCGTTACTATCCTCTC 19
 Template 66233 66251

Reverse primer 1 TGGTCTCGGTACAGATATGTG 20
 Template 66596 66487

B

Primer pair 1

		Sequence (5'->3')	
Forward primer	1	TCTTCCCTCTTTTAGTCAG	21
Reverse primer		ACAGGCAGGATTACAACAAG	

Products on target templates

>CP080226.1 Escherichia coli O141:H4 strain P13-6 plasmid pP136-3, complete sequence

product length = 165
 Forward primer 1 TCTTCCCTCTTTTAGTCAG 21
 Template 11173 11193

Reverse primer 1 ACAGGCAGGATTACAACAAG 21
 Template 11337 11317

>CP080236.1 Escherichia coli O139:H1 strain W13-16 plasmid pW1316-1, complete sequence

product length = 165
 Forward primer 1 TCTTCCCTCTTTTAGTCAG 21
 Template 17671 17691

Reverse primer 1 ACAGGCAGGATTACAACAAG 21
 Template 17835 17815

>CP035868.1 Escherichia coli strain E275 a plasmid pE275a_90, complete sequence

product length = 165
 Forward primer 1 TCTTCCCTCTTTTAGTCAG 21
 Template 15273 15293

Reverse primer 1 ACAGGCAGGATTACAACAAG 21
 Template 15437 15417

C

Primer pair 1

		Sequence (5'->3')	
Forward primer	1	TTCACCTTCCCTCAGGATG	20
Reverse primer		CTATTCATGCTTTCAGGACCA	

Products on target templates

>M34916.1 E.coli heat-stable enterotoxin gene, complete cds

product length = 120
 Forward primer 1 TTCACCTTCCCTCAGGATG 20
 Template 92 111

Reverse primer 1 CTATTCATGCTTTCAGGACCA 21
 Template 211 191

>CP035875.1 Escherichia coli strain B2C plasmid pB2C_151, complete sequence

product length = 120
 Forward primer 1 TTCACCTTCCCTCAGGATG 20
 Template 148587G..... 148568

Reverse primer 1 CTATTCATGCTTTCAGGACCA 21
 Template 148468 148488

>CP035842.1 Escherichia coli strain TW10722 plasmid pTW10722_147, complete sequence

product length = 120
 Forward primer 1 TTCACCTTCCCTCAGGATG 20
 Template 93575G..... 93556

Reverse primer 1 CTATTCATGCTTTCAGGACCA 21
 Template 93456 93476

Figura 8. Capturas de pantalla de una sección de los resultados de Primer – BLAST para cada par de primer de las tres enterotoxinas (LT, STp y STh). A: Dianas obtenidas con los pares de cebadores para la enterotoxina LT. B: Dianas obtenidas con los pares de cebadores para la enterotoxina STp. C: Dianas obtenidas con los pares de cebadores para la enterotoxina STh.

IV.2.3 Parámetro de Precisión

Para el parámetro de precisión, la **Tabla 5** muestra que se obtuvo como resultado un 100% de precisión entre corridas durante los cinco días de experimento a excepción de un resultado de 80% de precisión para la muestra de 10^{-4} la cual arrojó un resultado negativo en el tercer día. De esta manera, la precisión total se encontró en 95%.

Tabla 5. Porcentaje de precisión entre corridas y precisión total.

ID	DIA 1	DIA 2	DIA 3	DIA 4	DIA 5	Precisión entre corridas (%)
Positivo 10^{-3}	LT+ STp+ STh+	LT+ STp+ STh+	LT+ STp+ STh+	LT+ STp+ STh+	LT+ STp+ STh+	100%
Positivo 10^{-4}	LT+ STp+ STh+	LT+ STp+ STh+	LT+ STp+ STh+	LT+ STp+ STh+	LT+ STp+ STh+	100%
Positivo 10^{-5}	LT+ STp+ STh+	LT+ STp+ STh+	LT- STp- STh-	LT+ STp+ STh+	LT+ STp+ STh+	80%
Negativo 10^{-6}	LT- STp- STh-	LT- STp- STh-	LT- STp- STh-	LT- STp- STh-	LT- STp- STh-	100%

IV.2.4 Parámetro de Exactitud

Finalmente, se realizó el ensayo de comparación de métodos para evaluar la exactitud y se obtuvo que ambos métodos coincidían en el resultado de las muestras positivas y de las negativas tal como se muestra en la **Tabla 6**.

Tabla 6. Exactitud obtenida a través del ensayo de comparación de método.

		Método Referencial ¹		
		Positivo	Negativo	Total
Método Nuevo ²	Positivo	4	0	4
	Negativo	0	4	4
Total		4	4	8

1: Muestras de heces colectadas en viales y extraídas con QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit.

2: Muestras de heces colectadas en papel filtro y extraídas con Chelex-100.

IV.3 Comparación entre el método validado y el método referencial con muestras de niños del estudio de cohortes.

Una vez finalizada la validación del método de detección propuesto, se procedió a comparar los resultados obtenidos con ambos métodos de detección utilizando muestras de niños. En la **Tabla 7**, se muestra los detalles de los resultados obtenidos, el total de muestras negativas y positivas, así como las concordancias y discrepancias entre ambos métodos. Se estimó el coeficiente de Kappa que mide la concordancia entre ambos métodos y se obtuvo 0.794 (CI 95%:0.635-0.952).

Tabla 7. Resultados de concordancia entre el método de referencia (PCR QUIAGEN) y el método propuesto (PCR CHELEX) utilizando el programa STATA 17.

		PCR QUIAGEN	
PCR CHELEX		Negativo	Positivo
Negativo		152	6
Positivo		0	13
Total		152	19

Kappa (95% CI) = 0.794 (0.635 - 0.952)

IV.4 Evaluación de la calidad y cantidad de ácidos nucleicos obtenidos con los dos métodos de extracción

Finalmente, para evaluar la cantidad de ácidos nucleicos obtenidos con los dos métodos de extracción se compararon las cantidades obtenidas del instrumento Nanodrop 2000c y Qubit 4 y en el caso de la calidad se comparó el ratio 280/260 y 260/230 obtenidas del instrumento Nanodrop 2000c. Como se observa en la Tabla 8 existen diferencias significativas ($p=0.002$, $p=0.006$ y $p=0.002$) entre la cantidad y calidad de ácidos nucleicos obtenidos por ambos métodos con el Nanodrop, sin embargo, no hay diferencias entre las cantidades de ácidos nucleicos obtenidas con el Qubit ($p=0.232$).

Tabla 8. Resultados obtenidos de la comparación de la calidad y cantidad de ácidos nucleicos obtenidos con el método de extracción de Chelex-100 y kit comercial de Qiagen utilizando el programa STATA 17.

	CHELEX, N = 10 ¹	Kit Qiagen, N = 10 ¹	p-value ²
Nanodrop ng/ul	60 (37, 74)	157 (149, 163)	0.002
Qubit ng/ul	26 (13, 38)	31 (18, 57)	0.232
260/280	1.56 (1.46, 1.63)	2.04 (2.02, 2.07)	0.006
260/230	0.43 (0.39, 0.50)	1.97 (1.47, 2.12)	0.002

¹ Mediana (IQR)

² Wilcoxon test de signos y rangos

V DISCUSION

V.1 Hallazgos principales

Recolectar muestras de heces en papel filtro supone una ventaja económica en el almacenaje y transporte; mientras que el uso de Chelex-100 para extraer ADN y realizar PCR convencional múltiple pueden ser fáciles de aplicar en entornos de bajos recursos. Utilizados en conjunto pueden convertirse en una técnica apropiada para la detección de patógenos de interés como lo es la ETEC. Con los resultados obtenidos se puede observar que el método de extracción usando Chelex-100 a partir de muestras de heces en papel filtro tiene un buen límite de detección, es específico para detectar ETEC y tiene una precisión total de 95% y exactitud de 100%. Además, al utilizar muestras de niños para comparar el método propuesto con uno referencial utilizando un kit de Qiagen para extraer muestras de heces en viales se encontró una concordancia de moderada a fuerte.

V.2 Comparación con otros estudios

En estudios previos se ha reportado que el límite de detección de ETEC a través de métodos como el PCR convencional, qPCR, amplificación isotérmica mediada por bucle y Taqman Array se encuentra entre 10^2 y 10^5 UFC/g (41-46). De estos estudios, todos utilizaron muestras frescas de heces, además dos utilizaron métodos de extracción de ADN que no eran kits comerciales sino métodos de solo ebullición o ebullición con buffer de lisis. En estos dos estudios se encontró el límite de detección en 9×10^4 y 10^4 UFC/g que son muy similares al 5.8×10^4 UFC/g encontrado en la técnica que se está evaluando en la presente investigación, como se observa en la Figura 6 y Tabla 4. Solo un estudio (42) que detectó ETEC a través de la técnica Rapid LAMP based Diagnostic Test (RLDT) utilizando muestras de heces en papel filtro obtuvo un límite de detección de 9×10^3 UFC/g de heces estando por debajo del límite de detección encontrado con la técnica propuesta.

La especificidad del método fue inicialmente evaluada utilizando patógenos adicionales pertenecientes a las Enterobacterias para observar alguna posible

interferencia. En el gel de electroforesis obtenido (Figura 7) no se observó amplificación en ninguno de las bacterias adicionales. Sin embargo, debido a que no se pudo obtener una mayor cantidad de bacterias para evaluar, se utilizó la herramienta Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) del National Center for Biotechnology Information (NCBI) para comprobar la especificidad de los primers utilizados. Si bien al obtener los resultados con el Primer-BLAST se observaron varias dianas, al revisar cada diana obtenida se comprobó que todos pertenecían solo a diferentes serotipos de ETEC aislados en diferentes países de diferentes especies (humanos, animales y vegetales) a lo largo de los años. Asimismo, los estudios que diseñaron los cebadores del presente proyecto resaltan haber comprobado su especificidad a través de BLAST y amplificaciones con PCR usando cepas de referencia (39) (43) (44) sugiriendo así que el presente método es específico para detectar ETEC.

Para el parámetro de precisión se tomó en cuenta el límite de detección obtenido en la dilución 10^{-5} para poder utilizar muestras cercanas a este valor. Se seleccionaron 4 diluciones (10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} y 10^{-6}) que se procesaron durante 5 días. Como se muestra en la Tabla 5, se obtuvo un 100% en el ensayo de precisión para las dos diluciones que se encontraron por encima del límite de detección (10^{-3} , 10^{-4}) ya que todas dieron resultados positivos. Para la dilución que se encuentra por debajo del límite de detección (10^{-6}) también se obtuvo un 100% de precisión. Sin embargo, para la dilución donde se encontró el límite de detección (10^{-5}) se obtuvo una precisión del 80%. Algunos estudios realizados para detectar ETEC a través de qPCR múltiple (47), TaqMan array (41) y RLDT (42) evaluaron la precisión de sus métodos; en los dos primeros estudios se evaluó la precisión a través del coeficiente de variación encontrándose alrededor del 1-7%. En el último estudio se evaluó la precisión realizando repeticiones de 2 muestras por encima del límite de detección y al obtenerse todas positivas, se estableció como precisión del 100%. En el presente estudio, a pesar de haberse obtenido buenos porcentajes de precisión en 3 de 4 diluciones, el 80% obtenido en la dilución que se encuentra en el límite de detección representa las variaciones

que pueden presentarse al reproducir un método en días diferentes. Variaciones durante la extracción, PCR convencional múltiple electroforesis contribuyeron a la obtención de un resultado distinto, pero para poder darle más validez a este resultado se consideraría utilizar un mayor número de repeticiones e incluso añadir factores como diferentes operarios.

Para el parámetro de exactitud se buscó comparar el método propuesto con el método referencial utilizando muestras entre positivas y negativas que se corrieron en ciego. Al término del análisis de las 8 muestras se obtuvo 4 muestras positivas por ambos métodos y 4 muestras negativas por ambos métodos correspondiendo a un 100% de acuerdos entre ambos métodos. Este resultado indica una similitud en la sensibilidad analítica del método propuesto y el método de referencia reflejando que el método de extracción con Chelex-100 a partir de muestras de heces en papel filtro podría funcionar correctamente en reemplazo de una extracción con un kit comercial y heces frescas.

Posterior a la validación del método propuesto, se colectaron 171 muestras de niños para poner a prueba el rendimiento del método de una manera que represente el uso futuro que se le quiere dar. Se analizaron los resultados obtenidos con el programa STATA 17 y en la Tabla 7 se muestra que ambos métodos concordaron en 152 resultados negativos. También se observó que hubo un total de 19 resultados positivos de los cuales ambos métodos concordaron en 13 resultados, los restantes 6 resultados salieron positivos para el método de referencia, pero negativos para el método propuesto. El análisis de concordancia entre los resultados obtenidos con ambos métodos se observó a través del estadístico Kappa. El estadístico Kappa mide la concordancia entre dos criterios corrigiendo el acuerdo esperado por azar, tiene valores entre -1 y 1 de tal modo que un Kappa diferente de 0 indica que la concordancia no se debe al azar (48). El valor de Kappa obtenido fue de 0.794 y de acuerdo con el Anexo 1 que presenta la interpretación del valor de Kappa de Cohen, existe una concordancia entre moderada y fuerte entre el método propuesto y el método de referencia. Es posible que el método de extracción haya causado las discrepancias, obtenidas en la Tabla

7 es por lo que adicionalmente se realizó la evaluación de la cantidad y calidad de ácidos nucleicos extraídos con ambos métodos, pero con una menor cantidad de muestras. Como se observa en la Tabla 8 la cantidad de ácidos nucleicos extraídos con el kit de Qiagen fue significativamente mayor (promedio 60 versus promedio 157, $p=0.002$) utilizando el Nanodrop, sin embargo, no se observaron diferencias significativas (promedio 26 versus promedio 31, $p=0.232$) en la cuantificación utilizando el Qubit. Esta diferencia de resultados puede deberse a que el Nanodrop capta la presencia de ARN o impurezas en la muestra que absorban luz a 260nm, por el contrario, el Qubit 4 utiliza un kit que detecta solo ácidos nucleicos de doble hebra haciéndolo un método más selectivo (49), de esta manera la cantidad de ADN para detectar ETEC obtenida con ambos métodos sería similar. En el caso de la calidad del extraído obtenido se analizaron los ratios 260/280 o 260/230 y como se observa en la Tabla 8 la calidad de ácidos nucleicos fue significativamente diferente entre ambos métodos de extracción (promedio del ratio 260/280 de 1.56 versus 2.04, $p=0.006$ y promedio del ratio 260/230 de 0.43 versus 1.97, $p=0.002$). Valores entre 1.8 – 2.0 para el ratio 260/280 y valores entre 2.0 y 2.2 para el ratio 260/230 son considerados de buen grado de pureza, en el caso de los extraídos con Chelex – 100 el promedio para ambos ratios se encontró muy por debajo, lo cual puede indicar la presencia de proteínas u otros contaminantes (50) (51). De esta manera, las discrepancias obtenidas en el análisis de concordancia se pueden deber a la presencia de impurezas y contaminantes presentes en el material extraído con Chelex-100 que hayan podido inhibir el PCR convencional múltiple como ha sido demostrado previamente en el estudio de Sjöholm et. al (2007) (52).

V.3 Relevancia en salud pública

Para poder detectar este patógeno se opta por coleccionar muestras de heces frescas, pero se conoce que el transporte y manejo de este tipo de muestras, especialmente cuando se tienen poblaciones grandes, puede dificultar el proceso. Como se ha revisado en la presente investigación, con los resultados obtenidos se puede decir que el uso de papel filtro no ha proporcionado inconvenientes en la detección de

ETEC, por el contrario, no se necesitó de una cadena de frío para el transporte de muestras ni de una congeladora para almacenarlas. Un estudio desarrollado por Cevallos et al. (2018) (25) demostró que el papel filtro puede ser usado para almacenar a largo plazo (1 año) en temperatura ambiente muestras de heces humanas y poder extraer su ADN y cabe resaltar que la presente investigación tuvo las muestras almacenadas a temperatura ambiente durante aproximadamente 8 meses hasta su uso. Adicionalmente, el tipo de papel filtro utilizado en el presente estudio es el papel Whatman 40 que se caracteriza por ser un papel filtro de uso general, con una retención de partículas de 8µm y un grosor de 210µm. Es de tipo cuantitativo lo que lo hace más preciso y se puede usar a menudo para aplicaciones analíticas. Además, el papel filtro Whatman 40 es un filtro muy puro ya que no contiene cenizas lo que lo hace ideal para una amplia gama de procedimientos de filtración (53)(54).

El método tradicional para aislar *E. coli* de muestras de heces era sembrándolas en medios de cultivo selectivo como el agar MacConkey; sin embargo, para poder identificar el patotipo específico de *E. coli* se adoptaron técnicas moleculares para una detección e identificación más rápida (55). El uso de Chelex-100 para extraer el ADN es un método rápido y poco laborioso, pero se sabe que la pureza del ADN que se obtiene no es buena y al haber utilizado heces, que son muestras con altas cantidades de inhibidores, es posible que sea este tipo de extracción la que haya causado las discrepancias de algunos resultados en las muestras de niños.

En el Perú, ETEC se encontró como el patógeno más frecuente en pacientes hospitalizados con diarrea y deshidratación (14), sin embargo; los estudios realizados en su mayoría se han centrado en zonas periurbanas de Lima y no hay datos sobre la prevalencia de ETEC en otras regiones del Perú. No hay un sistema de vigilancia en las zonas fuera de Lima debido a que no es un patógeno buscado en exámenes rutinarios y debido a que no se cuenta con equipos necesarios para realizar un diagnóstico correcto.

Tener un método de detección que facilite la vigilancia de ETEC es importante

para diversos objetivos como por ejemplo ayudar a comprender la prevalencia e importancia actual que tiene ETEC. De esta manera, se podría contribuir al objetivo que vienen buscando diferentes autoridades internacionales de salud pública de desarrollar una vacuna para ETEC, ya que tendría un gran impacto no solo en la salud sino también en la economía y además ayudaría a reducir el uso de antibióticos indiscriminadamente, que está aumentando la resistencia bacteriana en la actualidad (56-58).

El presente estudio buscó un método que pueda reducir tiempo y costo y pueda ser utilizado en diferentes escenarios. La colecta, transporte y almacenamiento de muestras de heces en papel filtro, así como el corto tiempo de una extracción con Chelex-100 son una gran ventaja para poder realizar estudios de barrido y si bien es cierto, el uso de termocicladores y cámaras electroforéticas puede limitar el uso del método en laboratorios, el poder mantener las muestras en papel filtro a temperatura ambiente abaratarían los costos de un posible transporte.

VI LIMITACIONES

El método de detección presentado tuvo resultados que pueden competir fácilmente con otros métodos ya existentes, sin embargo, presenta algunas limitaciones. La cantidad de repeticiones durante la etapa de validación fue menor a la recomendada debido a que se contaba con una cantidad justa de materiales disponibles para realizar todo el experimento. Se evaluó la cantidad y calidad de ácidos nucleicos extraídos con poca cantidad de muestras, pero esto permitió dar una idea de la razón de las discrepancias en la detección de ETEC con ambos métodos usando muestras de niños. La conservación de muestras de heces en papel filtro almacenadas a temperatura ambiente ha sido evaluada hasta 1 año y en el presente estudio hasta 8 meses por lo que falta evaluar si a largo plazo aún se podrá recuperar ADN.

VII CONCLUSIONES

Los ensayos de validación del método de extracción con Chelex -100 a partir de muestras de heces en papel filtro mostraron un buen límite de detección

(5.8×10^4 UFC/g), especificidad analítica, precisión y exactitud. Asimismo, se obtuvo una concordancia de moderada a fuerte ($k=0.794$) en la comparación de los resultados entre la extracción con Chelex-100 a partir de muestras en papel filtro y la extracción utilizando el kit QIAamp Fast DNA Stool Mini kit de Qiagen para detectar ETEC a través de PCR convencional múltiple. Sin embargo, en la evaluación de la calidad de ácidos nucleicos obtenidos con la extracción con Chelex-100 se observó que no tuvo una buena pureza comparado con la extracción con el kit de Qiagen.

VIII RECOMENDACIONES

Dadas las limitaciones mencionadas previamente en la sección VI, se recomienda incrementar el número de repeticiones para tener una validación más robusta. Además, dados los resultados obtenidos de la pureza del ADN se puede considerar modificar la extracción con Chelex-100 agregándole enzimas como la Proteinasa K para que se pueda eliminar algún contaminante que pueda estar presente y realizar una evaluación con una mayor cantidad de muestras para confirmar el resultado. También, se podría considerar incrementar la cantidad de muestras en la comparación de métodos para mejorar el resultado obtenido y ajustar el intervalo de confianza.

IX REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. The top 10 causes of death [Internet]. Who.int. [citado el 3 de julio de 2018]. Disponible en: <http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>.
2. Organización Mundial de la Salud. Enfermedades diarreicas [Internet]. Who.int. World Health Organization: WHO; 2024. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/diarrhoeal-disease>.
3. World Health Organization. World health statistics 2018: Monitoring health for the SDGs, sustainable development goals. Ginebra, Suiza: World Health Organization; 2018.
4. O’Ryan M, Prado V, Pickering LK. A millennium update on pediatric diarrheal illness in the developing world. *Semin Pediatr Infect Dis*. 2005;16(2):125–36.
5. Gomes TAT, Elias WP, Scaletsky ICA, Guth BEC, Rodrigues JF, Piazza RMF, et al. Diarrheogenic *Escherichia coli*. *Braz J Microbiol*. 2016;47:3–30.
6. Farfán-García AE, Ariza-Rojas SC, Vargas-Cárdenas FA, Vargas-Remolina LV. Mecanismos de virulencia de *Escherichia coli* enteropatógena. *Rev Chilena Infectol*. 2016;33(4):438–50.
7. Platts-Mills JA, Liu J, Rogawski ET, Kabir F, Lertsethtakarn P, Siguas M, et al. Use of quantitative molecular diagnostic methods to assess the aetiology, burden, and clinical characteristics of diarrhoea in children in low-resource settings: a reanalysis of the MAL-ED cohort study. *Lancet Glob Health*. 2018;6(12):e1309–18.
8. Kotloff KL, Nataro JP, Blackwelder WC, Nasrin D, Farag TH, Panchalingam S, et al. Burden and aetiology of diarrhoeal disease in infants and young children in developing countries (the Global Enteric Multicenter Study, GEMS): a prospective, case-control study. *Lancet*. 2013;382(9888):209–22.
9. Huilan S, Zhen LG, Mathan MM, Mathew MM, Olarte J, Espejo R, et al. Etiology of acute diarrhoea among children in developing countries: a multicentre study in five countries. *Bull World Health Organ*. 1991;69(5):549–55.
10. Levine MM, Ferreccio C, Prado V, Cayazzo M, Abrego P, Martinez J, et al. Epidemiologic studies of *Escherichia coli* diarrheal infections in a low socioeconomic level peri-urban community in Santiago, Chile. *Am J Epidemiol*. 1993;138(10):849–69.

11. Albert MJ, Faruque AS, Faruque SM, Sack RB, Mahalanabis D. Case-control study of enteropathogens associated with childhood diarrhea in Dhaka, Bangladesh. *J Clin Microbiol.* 1999;37(11):3458–64
12. Ochoa TJ, Mercado EH, Durand D, Rivera FP, Mosquito S, Contreras C, et al. Frequency and pathotypes of diarrheagenic *Escherichia coli* in Peruvian children with and without diarrhea. *Rev Peru Med Exp Salud Publica.* 2011;28(1):13–20.
13. Rivera FP, Ochoa TJ, Maves RC, Bernal M, Medina AM, Meza R, et al. Genotypic and phenotypic characterization of enterotoxigenic *Escherichia coli* strains isolated from Peruvian children. *J Clin Microbiol.* 2010;48(9):3198–203.
14. Ballard S-B, Requena D, Mayta H, Sanchez GJ, Oyola-Lozada MG, Colquechagua Aliaga FD, et al. Enteropathogen changes after Rotavirus vaccine scale-up. *Pediatrics.* 2022;149(1).
15. Qadri F, Svennerholm A-M, Faruque ASG, Sack RB. Enterotoxigenic *Escherichia coli* in developing countries: epidemiology, microbiology, clinical features, treatment, and prevention. *Clin Microbiol Rev.* 2005;18(3):465–83.
16. Centro Nacional de Epidemiología, Prevención y Control de Enfermedades. *Boletín Epidemiológico del Perú.* 2023 sep.
17. Centro Nacional de Epidemiología, Prevención y Control de Enfermedades. *Boletín Epidemiológico del Perú.* 2024 may.
18. Cornejo-Tapia A, Orellana-Peralta F, Weilg P, Bazan-Mayra J, Cornejo-Pacherres H, Ulloa-Urizar G, et al. Etiology, epidemiology and clinical characteristics of acute diarrhea in hospitalized children in rural Peru. *J Infect Dev Ctries.* 2017;11(11):826–32.
19. Smit PW, Elliott I, Peeling RW, Mabey D, Newton PN. An overview of the clinical use of filter paper in the diagnosis of tropical diseases. *Am J Trop Med Hyg.* 2014;90(2):195–210.
20. Rajendram D, Ayenza R, Holder FM, Moran B, Long T, Shah HN. Long-term storage and safe retrieval of DNA from microorganisms for molecular analysis using FTA matrix cards. *J Microbiol Methods.* 2006;67(3):582–92.
21. Seyer A, Karasartova D, Ruh E, Güreser AS, Imir T, Taylan-Ozkan A. Is “dried stool spots on filter paper method (DSSFP)” more sensitive and effective for detecting *Blastocystis* spp. and their subtypes by PCR and sequencing? *Parasitol Res.* 2016;115(12):4449–55.

22. Guion CE, Ochoa TJ, Walker CM, Barletta F, Cleary TG. Detection of diarrheagenic *Escherichia coli* by use of melting-curve analysis and real-time multiplex PCR. *J Clin Microbiol.* 2008;46(5):1752–7.
23. Subrungruang I, Mungthin M, Chavalitsheewinkoon-Petmitr P, Rangsin R, Naaglor T, Leelayoova S. Evaluation of DNA extraction and PCR methods for detection of *Enterocytozoon bienuesi* in stool specimens. *J Clin Microbiol.* 2004;42(8):3490–4.
24. Nantavisai K, Mungthin M, Tan-ariya P, Rangsin R, Naaglor T, Leelayoova S. Evaluation of the sensitivities of DNA extraction and PCR methods for detection of *Giardia duodenalis* in stool specimens. *J Clin Microbiol.* 2007;45(2):581–3.
25. Cevallos W, Fernández-Soto P, Calvopiña M, Buendía-Sánchez M, López-Abán J, Vicente B, et al. Diagnosis of amphimeriasis by LAMP *Phimerus* assay in human stool samples long-term storage onto filter paper. *PLoS One.* 2018;13(2):e0192637.
26. Singh UA, Kumari M, Iyengar S. Method for improving the quality of genomic DNA obtained from minute quantities of tissue and blood samples using Chelex 100 resin. *Biol Proced Online.* 2018;20(1).
27. Panda BB, Meher AS, Hazra RK. Comparison between different methods of DNA isolation from dried blood spots for determination of malaria to determine specificity and cost effectiveness. *J Parasit Dis.* 2019;43(3):337–42.
28. Pradhan N, Rath A, Panda BB, Mohanty I, Somalkar NM, Hazra RK. Implementation of molecular method in routine malaria diagnosis and entomological studies. *J Vector Borne Dis.* 2020;57(4):314–24.
29. Yang J-L, Wang M-S, Cheng A-C, Pan K-C, Li C-F, Deng S-X. A simple and rapid method for extracting bacterial DNA from intestinal microflora for ERIC-PCR detection. *World J Gastroenterol.* 2008;14(18):2872–6.
30. Natarajan G, Kabir M, Perin J, Hossain B, Debes A, Haque R, et al. Whatman protein saver cards for storage and detection of parasitic enteropathogens. *Am J Trop Med Hyg.* 2018;99(6):1613–8.
31. Debes AK, Ateudjieu J, Guenou E, Ebile W, Sonkoua IT, Njimbia AC, et al. Clinical and environmental surveillance for *Vibrio cholerae* in resource constrained areas: Application during a 1-year surveillance in the Far North region of Cameroon. *Am J Trop Med Hyg.* 2016;94(3):537–43.
32. Clinical Group WWARN. Molecular Testing for Malaria Standard Operating Procedure DNA Extraction by Chelex. 2015.

33. *Escherichia coli* (Migula) Castellani and Chalmers [Internet]. Atcc.org. [citado el 20 de julio de 2020]. Disponible en: <https://www.atcc.org/products/35401>
34. Sciandra I, Piccioni L, Coltella L, Ranno S, Giannelli G, Tarasca F, et al. Comparative analysis of 2 commercial molecular tests for the detection of gastroenteric viruses on stool samples. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2020;96(1):114893.
35. Phyu L, Kriengsinyos W, Rojroongwasinkul N. Validation of a Pediatric Nutrition Screening Tool in Hospital Outpatients of Myanmar. *Asian Journal of Dietetics*. 2020.
36. Mohd A, Salmiah, M, Ahmad Z, Muhammad, R. A study protocol on risk factors for hepatitis c infection among adult patients at tertiary hospitals in Kedah state. *International Journal of Public Health and Clinical Sciences*. 2019;6(2):266.
37. Bujang MA, Baharum N. Guidelines of the minimum sample size requirements for Kappa agreement test. *Epidemiol Biostat Public Health*. 2022;14(2).
38. Landis JR, Koch GG. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics*. 1977;33(1):159–74.
39. Rodas C, Iniguez V, Qadri F, Wiklund G, Svennerholm A-M, Sjöling A. Development of multiplex PCR assays for detection of enterotoxigenic *Escherichia coli* colonization factors and toxins. *J Clin Microbiol*. 2009;47(4):1218–20.
40. Burd EM. Validation of laboratory-developed molecular assays for infectious diseases. *Clin Microbiol Rev*. 2010;23(3):550–76.
41. Liu J, Gratz J, Amour C, Kibiki G, Becker S, Janaki L, et al. A laboratory-developed TaqMan Array Card for simultaneous detection of 19 enteropathogens. *J Clin Microbiol*. 2013;51(2):472–80.
42. Chakraborty S, Connor S, Velagic M. Development of a simple, rapid, and sensitive diagnostic assay for enterotoxigenic *E. coli* and *Shigella* spp applicable to endemic countries. *PLoS Negl Trop Dis*. 2022;16(1):e0010180.
43. Bölin, I, Wiklund G, Qadri F, Torres O, Bourgeois AL, Savarino S, & Svennerholm, A.-M. (2006). Enterotoxigenic *Escherichia coli* with STh and STp genotypes is associated with diarrhea both in children in areas of endemicity and in travelers. *Journal of Clinical Microbiology*, 44(11), 3872–3877
44. Sjöling A, Wiklund G, Savarino SJ, Cohen DI, & Svennerholm A.-M. (2007).

Comparative analyses of phenotypic and genotypic methods for detection of enterotoxigenic *Escherichia coli* toxins and colonization factors. *Journal of Clinical Microbiology*, 45(10), 3295–3301.

45. Fialho OB, de Souza EM, de Borba Dallagassa C, de Oliveira Pedrosa F, Klassen G, Irino K, et al. Detection of diarrheagenic *Escherichia coli* using a two-system multiplex-PCR protocol: DEC detection by multiplex-PCR. *J Clin Lab Anal*. 2013;27(2):155–61.
46. Oh K-H, Kim S-B, Park M-S, Cho S-H. Development of a one-step PCR assay with nine primer pairs for the detection of five diarrheagenic *Escherichia coli* types. *J Microbiol Biotechnol*. 2014;24(6):862–8.
47. Duong VT, Tu LTP, Tuyen HT, Nhi LTQ, Campbell JI, Van Minh P, et al. Novel multiplex real-time PCR assays reveal a high prevalence of diarrhoeagenic *Escherichia coli* pathotypes in healthy and diarrhoeal children in the south of Vietnam. *BMC Microbiol*. 2020;20(1):192.
48. McHugh ML. Interrater reliability: the kappa statistic. *Biochem Med (Zagreb)*. 2012;22(3):276–82.
49. Sarnecka AK, Nawrat D, Piwowar M, Ligęza J, Swadźba J, Wójcik P. DNA extraction from FFPE tissue samples – a comparison of three procedures. *Contemp Oncol*;23(1):52–8.
50. Koetsier G, Cantor E, Biolabs E. *A Practical Guide to Analyzing Nucleic Acid Concentration and Purity with Microvolume Spectrophotometers*. 2019. Disponible en: https://www.neb.com/en/ /media/nebus/files/application-notes/technote_mvs_analysis_of_nucleic_acid_concentration_and_purity.pdf?rev=c24cea043416420d84fb6bf7b554dbbb
51. Thermo Scientific. NanoDrop Spectrophotometers [Internet]. 2019. Available from: https://dna.uga.edu/wp-content/uploads/sites/51/2019/02/Note-on-the-260_280-and-260_230-Ratios.pdf
52. Sjöholm MIL, Dillner J, Carlson J. Assessing Quality and Functionality of DNA from Fresh and Archival Dried Blood Spots and Recommendations for Quality Control Guidelines. *Clinical Chemistry*. 2007 Jun 22;53(8):1401–7.
53. Whatman filter paper: The guide to choosing the right one [Internet]. Pulp Paper Mill; 2022. Disponible en: <https://www.pulppapermill.com/whatman-filter-paper-the-guide-to-choosing-the-right-one/>
54. Whatman GE Healthcare [Internet]. Whatman GE Healthcare. Disponible en:

<https://www.whatman.co.kr>

55. Khalil IA, Troeger C, Blacker BF, Rao PC, Brown A, Atherly DE, et al. Morbidity and mortality due to shigella and enterotoxigenic *Escherichia coli* diarrhoea: the Global Burden of Disease Study 1990-2016. *Lancet Infect Dis.* 2018;18(11):1229–40.
56. Croxen MA, Law RJ, Scholz R, Keeney KM, Wlodarska M, Finlay BB. Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev.* 2013;26(4):822–80.
57. Khalil I, Anderson JD, Bagamian KH, Baqar S, Giersing B, Hausdorff WP, et al. Vaccine value profile for enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC). *Vaccine.* 2023;41:S95–113.
58. Hosangadi D, Smith PG, Giersing BK. Considerations for using ETEC and *Shigella* disease burden estimates to guide vaccine development strategy. *Vaccine.* 2019;37(50):7372–80.

ANEXOS

Anexo 1

Niveles de concordancia según el estadístico Kappa (49)

Value of Kappa	Level of Agreement	% of Data that are Reliable
0-.20	None	0-4%
.21-.39	Minimal	4-15%
.40-.59	Weak	15-35%
.60-.79	Moderate	35-63%
.80-.90	Strong	64-81%
Above.90	Almost Perfect	82-100%

INFORMACIÓN SUPLEMENTARIA

S1. Mecanismo de acción de ETEC mediada por los factores de colonización y enterotoxinas (6).

Mecanismo de adherencia a través de Factores de colonización (FC)	Mecanismo usando las enterotoxinas termoestables (ST) y termolábil (LT)
<p>ETEC expresa la exoproteína EtpA para permitir que los FC se adhieran a las células epiteliales del intestino delgado.</p>	<p>ETEC secreta LT, que se une al gangliósido GM1 del enterocito generando un aumento de AMPc.</p>
<p>El auto transportador EatA inhibe la actividad de EtpA.</p>	<p>ETEC secreta ST, que se une al receptor guanilato – ciclasa – C (GC-C) del enterocito generando un aumento de GMPc.</p>
<p>Se origina la adhesión final a los enterocitos por las proteínas de membrana loci toxigénico de invasión A (Tia) y B (TibA).</p>	<p>El aumento de AMPc y GMPc estimulan la secreción de cloruro y electrolitos e impiden la absorción del intestino ocasionando la diarrea.</p>