

SUBSECRETARÍA DE EDUCACIÓN SUPERIOR
DIRECCIÓN GENERAL DE EDUCACIÓN SUPERIOR
TECNOLÓGICA
INSTITUTO TECNOLÓGICO DE TUXTLA GUTIÉRREZ



SECRETARÍA DE
EDUCACIÓN PÚBLICA



SEP

TRABAJO PROFESIONAL
COMO REQUISITO PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
INGENIERA BIOQUÍMICA

QUE PRESENTA:
MIRNA GRISELDA HERRERA OVANDO

CON EL TEMA:
**“INVESTIGACIÓN DE GENES DE *Escherichia coli*
ENTEROAGREGATIVA EN AISLADOS PROCEDENTES DE
MUNICIPIOS MARGINADOS DE CHIAPAS”**

ASESOR INTERNO:
QBP. AURA FLORES PÉREZ

ASESOR EXTERNO:
DR. JAVIER GUTIÉRREZ JIMENEZ

REVISORES:
**QFB. DULCE HERNÁNDEZ BERISTAIN
DRA. PATRICIA SÁNCHEZ ITURBE
DR. REINER RINCÓN ROSALES**

MEDIANTE:
**OPCION X
(MEMORIA DE RESIDENCIA PROFESIONAL)**

TUXTLA GUTIÉRREZ, CHIAPAS

AGOSTO 2012

ÍNDICE

| | |
|---------------------------------------|----|
| 1 INTRODUCCIÓN | 5 |
| 2 CAPÍTULOS | 7 |
| 2.1 Antecedentes | 7 |
| 2.2 Planteamiento del problema | 11 |
| 2.3 Justificación | 13 |
| 2.4 Hipótesis | 15 |
| 2.5 Objetivos | 15 |
| 2.5.1 Objetivo general | 15 |
| 2.5.2 Objetivos específicos | 15 |
| 2.6 Alcances y limitaciones | 16 |
| 3 MARCO TEÓRICO | 17 |
| 3.1 Desnutrición | 17 |
| 3.1.1 Tipos de desnutrición | 17 |
| 3.1.1.1 Desnutrición tipo marasmo | 17 |
| 3.1.1.2 Desnutrición tipo Kwashiorkor | 18 |
| 3.1.1.3 Desnutrición mixta | 19 |
| 3.1.2 Incidencias y consecuencias | 19 |
| 3.2 Diarrea | 19 |
| 3.2.1 Importancia y consecuencias | 20 |
| 3.2.2 Agentes patógenos | 22 |
| 3.2.2.1 Virales | 22 |
| 3.2.2.2 Parasitarios | 23 |
| 3.2.2.3 Bacterianos | 24 |
| 3.3 Enterobacterias | 25 |
| 3.3.1 Fisiología | 26 |
| 3.3.2 Estructura | 27 |
| 3.3.3 Patogenia | 29 |
| 3.3.3.1 <i>Escherichia coli</i> | 30 |

| | | |
|-----------------|--|----|
| 3.3.3.1.1 | Características generales | 30 |
| 3.3.3.1.2 | Epidemiología | 33 |
| 3.3.3.1.3 | <i>Escherichia coli</i> como patógena entérica | 36 |
| 3.3.3.1.3.1 | <i>Escherichia coli</i> enteropatógena | 36 |
| 3.3.3.1.3.1.1 | Patogénesis | 37 |
| 3.3.3.1.3.1.1.1 | Etapas de adherencia y eliminación . | 37 |
| 3.3.3.1.3.1.2 | Epidemiología | 39 |
| 3.3.3.1.3.1.3 | Consideraciones clínicas | 40 |
| 3.3.3.1.3.1.4 | Detección y diagnóstico | 41 |
| 3.3.3.1.3.2 | <i>Escherichia coli</i> enterotoxigénica | 42 |
| 3.3.3.1.3.2.1 | Patogénesis | 43 |
| 3.3.3.1.3.2.1.1 | Toxina LT | 43 |
| 3.3.3.1.3.2.1.2 | Toxina ST | 44 |
| 3.3.3.1.3.2.2 | Epidemiología | 45 |
| 3.3.3.1.3.2.3 | Consideraciones clínicas | 46 |
| 3.3.3.1.3.2.4 | Detección y diagnóstico | 46 |
| 3.3.3.1.3.3 | <i>Escherichia coli</i> enteroinvasiva | 47 |
| 3.3.3.1.3.3.1 | Patogénesis | 47 |
| 3.3.3.1.3.3.2 | Epidemiología | 48 |
| 3.3.3.1.3.3.3 | Consideraciones clínicas | 49 |
| 3.3.3.1.3.3.4 | Detección y diagnóstico | 49 |
| 3.3.3.1.3.4 | <i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica | 50 |
| 3.3.3.1.3.4.1 | Patogénesis | 50 |
| 3.3.3.1.3.4.1.1 | Toxina Shiga | 51 |
| 3.3.3.1.3.4.1.2 | EAST 1 | 52 |
| 3.3.3.1.3.4.1.3 | Enterohemolisina | 52 |
| 3.3.3.1.3.4.1.4 | Factores de adherencia | 53 |
| 3.3.3.1.3.4.1.5 | Plasmido pO157 | 53 |
| 3.3.3.1.3.4.2 | Epidemiología | 53 |
| 3.3.3.1.3.4.3 | Consideraciones clínicas | 57 |

| | | |
|-------------------|---|----|
| 3.3.3.1.3.4.4 | Detección y diagnóstico | 59 |
| 3.3.3.1.3.5 | <i>Escherichia coli</i> enteroagregativa | 60 |
| 3.3.3.1.3.5.1 | Patogénesis | 60 |
| 3.3.3.1.3.5.1.1 | Adherencia mediada por fimbrias | 61 |
| 3.3.3.1.3.5.1.2 | Aumento de la producción de moco | 62 |
| 3.3.3.1.3.5.1.3 | Actividad citotóxica | 62 |
| 3.3.3.1.3.5.1.3.1 | Proteína Pic | 62 |
| 3.3.3.1.3.5.2 | Epidemiología | 63 |
| 3.3.3.1.3.5.3 | Consideraciones clínicas | 64 |
| 3.3.3.1.3.5.4 | Detección y diagnóstico | 64 |
| 3.3.3.1.3.6 | <i>Escherichia coli</i> con adherencia difusa | 65 |
| 3.3.3.1.3.6.1 | Patogénesis | 65 |
| 3.3.3.1.3.6.2 | Epidemiología | 65 |
| 3.3.3.1.3.6.3 | Consideraciones clínicas | 66 |
| 3.3.3.1.3.6.4 | Detección y diagnóstico | 66 |
| 4 | ZONA DE ESTUDIO | 67 |
| 4.1 | Pantepec | 67 |
| 4.1.1 | Localización | 67 |
| 4.1.2 | Población | 68 |
| 4.1.3 | Salud | 68 |
| 4.1.4 | Vivienda | 68 |
| 4.1.5 | Vías de comunicación | 68 |
| 4.1.6 | Actividad económica | 69 |
| 4.2 | Chanal | 70 |
| 4.2.1 | Localización | 70 |
| 4.2.2 | Población | 70 |
| 4.2.3 | Salud | 71 |
| 4.2.4 | Vivienda | 71 |
| 4.2.5 | Vías de comunicación | 71 |
| 4.2.6 | Actividad económica | 72 |

| | |
|---|----|
| 5 METODOLOGÍA | 73 |
| 5.1 Reactivación de cepas de <i>Escherichia coli</i> | 73 |
| 5.2 Extracción de ADN | 73 |
| 5.3 Amplificación de genes | 74 |
| 5.3.1 PCR múltiple “A” | 75 |
| 5.3.2 PCR múltiple “B” | 75 |
| 5.4 Análisis de ADN amplificado | 76 |
| 5.5 Obtención de proteínas totales bacterianas | 76 |
| 5.6 Análisis de proteínas | 77 |
| 5.7 Western blot | 79 |
| 6 RESULTADOS | 81 |
| 6.1 Estado nutricional | 82 |
| 6.2 PCR múltiple “A” | 83 |
| 6.3 Western blot | 89 |
| 6.4 PCR múltiple “B” | 90 |
| 6.5 <i>Escherichia coli</i> diarreogénica | 93 |
| 6.6 Vinculación: desnutrición- <i>E. coli</i> diarreogénica | 97 |
| 7 DISCUSION DE RESULTADOS | 98 |
| CONCLUSIONES | |
| REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS | |

1 INTRODUCCIÓN

La salud infantil es una de las prioridades que México tiene por tradición y uno de los principales problemas a los que se enfrenta, como las enfermedades de rezago epidemiológico, entre ellas la diarrea, infecciones respiratorias y por supuesto la desnutrición, esta última al igual que las anteriores, evita que los niños y niñas puedan tener una mejor calidad de vida ya que no solo afecta su salud sino también su crecimiento, desarrollo y por supuesto esto implica una deficiencia en su aprendizaje afectando su educación (UNICEF, 2008). A nivel nacional el Estado de Chiapas ocupa el primer lugar en la prevalencia de bajo peso y talla, en niños en edad preescolar (ENSANUT, 2006) esto se concentra primordialmente en los municipios que tienen una baja condición socio-económica.

Los niños que padecen desnutrición tienen mayor probabilidad de contraer enfermedades, esto nos indica que son más propensos a contraer las enfermedades de rezago epidemiológico anteriormente mencionadas, pudiendo afectar su supervivencia; esto puede verse reflejado en la tasa de mortalidad infantil, donde Chiapas es nuevamente un estado con datos alarmantes, pues posee una tasa de mortalidad en menores de 5 años de 24.9¹ contra la nacional de 17.9² (SINAIS, 2008) en Chiapas, una de cada cuatro defunciones en menores de 5 años es producto de una enfermedad diarreica o una infección respiratoria (Secretaría de Salud, 2007); siendo la diarrea la más persistente.

Monkemuller menciona que la diarrea se encuentra asociada principalmente con los factores de higiene y saneamiento deficientes, pero que también los factores como la edad, zona geográfica, condición socio-económica y el estado inmunológico de cada persona son importantes y es importante porque precisamente todo lo anterior es lo que permite la aparición de infecciones parasitarias y bacterianas causantes de la enfermedades gastrointestinales y además de desnutrición.

^{1,2} Tasa por 100 000 menores de cinco años.

Dentro de las bacterias causantes de enfermedades gastrointestinales, se encuentran algunas enterobacterias como *Salmonella spp.*, *Shigella spp.* y *Escherichia coli (E. coli)*. Donde *E. coli*, aunque tiene una función nutricional en el intestino como la de sintetizar vitaminas, debido a que ha adquirido factores de virulencia, es un causante de diarrea crónica, además de ser el causante de diarrea más común en todo el mundo. (Brooks, Butel & Morse, 2005). La *E. coli* diarreogénica se clasifica dependiendo de sus características y cada grupo causa la enfermedad por un mecanismo diferente, hoy en día se conocen seis categorías patógenas diferentes, entre ellas se encuentran: *E. coli* enteropatógena (EPEC), *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC ó STEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* difusamente adherente (DAEC) y cada una de ellas ha causado estragos alrededor del mundo incluido México, donde la población infantil es una de las más afectadas.

Debido a todo lo anterior durante este trabajo se buscó la presencia de cada categoría de *E. coli* diarreogénica (exceptuando DAEC) en 81 aislados de *E. coli* obtenidos de niños con una edad de entre 0 y 5 años, de municipios marginados de Chiapas; para la identificación de cada aislado de *E. coli* se buscaron los genes que codifican los factores de virulencia, además de buscar la presencia de la proteína Pic en los sobrenadantes de EAEC, debido a que a esta proteína se le adjudica el daño en la mucosa intestinal, lo que podría causar daños al desarrollo del infante. Con base en la Norma oficial mexicana NOM-031-SSA2-1999 se obtuvo el estado nutricional de cada niño y niña y los resultados se compararon con la presencia de *E. coli* diarreogénica, todo esto para determinar si la desnutrición en la población infantil de esas comunidades se debe a la presencia de estas bacterias patógenas.

2 CAPÍTULOS

2.1 Antecedentes

La mortalidad infantil de menores de 5 años continúa siendo un problema de salud frecuente para muchos países del mundo, especialmente para los más pobres. La mortalidad infantil es posiblemente el indicador más usado en salud pública en todo el mundo. Este indicador se emplea con mucha frecuencia porque capta la calidad de vida y el nivel de desarrollo social y por tanto, es un alto predictor de las desigualdades sociales. (Secretaría de Salud, 2006).

En México las enfermedades infecciosas intestinales ocupan el primer lugar como causa de mortalidad en la población de edad preescolar teniendo una tasa de 5.9³ (SINAIS, 2008). Estas enfermedades son causadas por virus, parásitos y bacterias, manifestándose como signo principal la diarrea. En Chiapas la prevalencia de la diarrea en la población infantil menor de 5 años continúa siendo un problema sumamente relevante (ENSANUT, 2006) debido a que atenta contra la vida de estos niños.

Hace años en los altos de Chiapas se llevó a cabo una investigación por Riley y sus colaboradores (1990) quienes buscaban los factores de riesgo asociados con la diarrea aguda en el estado. Ellos encontraron que los niños con diarrea tenían más probabilidades de haber tenido una madre con este padecimiento en las 2 semanas anteriores a la aparición de diarrea del niño.

Granich y sus colaboradores (1999), realizaron una investigación en las comunidades indígenas en las zonas altas de Chiapas, durante esta investigación analizaron si el tratamiento de la diarrea infantil estaba influenciado por las creencias y prácticas culturales. Descubriendo que el comportamiento de salud en esa zona

³ Tasa por 100 000 menores de cinco años.

utilizaba una combinación ecléctica de las opciones tradicionales, alopáticas y la atención de salud local y distante.

En las poblaciones con mayor marginación socioeconómica de Chiapas como las estudiadas anteriormente es habitual que las personas ocupen el agua directamente de los ríos, lagos, pozos, etc.; por tanto la posibilidad de disponer fácilmente de agua inocua para los distintos usos domésticos, especialmente para beber, lavar y cocinar, es fundamental para la buena salud y la seguridad alimentaria. Debido a que el agua contaminada es una de las causas primordiales de diarrea, su análisis es importante.

Sánchez-Pérez y colaboradores (2000) llevaron a cabo una investigación en la región fronteriza de Chiapas esto con el fin de conocer la calidad del agua que consume esta población, sus resultados develan que el agua usada para consumo de la mayoría de las comunidades de esta región tiene una cantidad bacteriológica sumamente alta lo que la hace no apta para consumo humano, perjudicando la salud de la población.

De igual manera en 2006, Graniel y Carrillo llevaron a cabo un análisis del río Zanatenco, ubicado en Tonalá un municipio de Chiapas, para conocer su grado de contaminación. Las coliformes totales y fecales determinadas en las muestras de agua rebasaron el límite máximo permisible de la NOM-127-SSA1-1994. De tal manera se indicó que el agua de dicho río no es apta para el consumo humano.

En 2008, Orozco, Ramírez y Cruz publicaron la caracterización fisicoquímica y bacteriológica de aguas subterráneas de pozos artesanales y efluentes hídricos en la costa de Chiapas; las coliformes fecales se determinaron con la técnica de filtración por membrana, descubriéndose que en todas las muestras tomadas se exceden los límites permisibles que indica la NOM-127-SSA1-1994 de coliformes fecales.

En las investigaciones anteriores se reporta la presencia de coliformes totales y fecales como causa de contaminación fecal, pero solo en la investigación realizada

por Sánchez-Pérez (2000) se llevó a cabo la identificación de una coliforme específica (*E. coli*). Para ello se realizó una prueba confirmatoria, utilizando un medio selectivo para ese microorganismo, es importante aclarar que la presencia de esta coliforme no indica que esta cepa puede considerarse patógena, para llegar a esa conclusión se deben realizar análisis más específicos, tales como el realizado por López-Saucedo y su grupo de colaboradores (2003) que para la detección de *E. coli* diarreogénica en las heces de personas con diarrea y en alimentos (salsa picante y aderezo de tacos) de vendedores ambulantes en la ciudad de México, desarrollaron una PCR múltiple para detectar la presencia de *E. coli* enteropatógena, enterotoxigénica, enteroinvasiva y *E. coli* productora de toxina Shiga con el fin de poder detectar la presencia de *E. coli* diarreogénica de una manera más eficiente y económica. Su trabajo logró identificar la presencia de *E. coli* diarreogénica en los pacientes y los alimentos analizados.

Cerna y sus colaboradores en 2003 llevaron a cabo la identificación de una *E. coli* patógena (*E. coli* enteroagregativa); esta cepa se ha asociado con diarrea persistente y además se ha demostrado que puede llegar a provocar daños en la mucosa intestinal. Aunque el diagnóstico ha sido un tanto problemático, para su identificación este grupo de investigadores desarrolló un reconocimiento por PCR múltiple que detecta específicamente y con sensibilidad los genes plasmídicos que codifican los factores de virulencia más frecuentes de dicha bacteria.

Steiner, Lima, Nataro y Guerrant (1998) también llevaron a cabo un estudio en Brasil sobre *E. coli* enteroagregativa, sin embargo, ellos relacionaron que la presencia de esta bacteria puede contribuir a la desnutrición infantil, llegaron a esta conclusión porque los niños portadores de la bacteria tenían un deterioro significativo de crecimiento independientemente de la presencia o ausencia de diarrea.

En cuanto a desnutrición, de igual manera que la diarrea, este padecimiento ha prevalecido a través de los años en el Estado de Chiapas. En 1998, Ávila-Curiel y sus colaboradores, hicieron un análisis sobre el estado nutricional de niños que viven

en zonas rurales en México, los resultados mostraron que los estados con mayor población indígena fueron los que presentaron mayores niveles de desnutrición. Los estados del norte del país mostraron niveles de desnutrición mínimo, mientras que en los estados del sureste mexicano, la desnutrición alcanzó niveles superiores; esta distribución parece estar asociada a la extensa presencia de grupos indígenas en los estados con mayor prevalencia de desnutrición.

En una investigación por Sánchez-Pérez y sus colaboradores (2007) se sugirió que la persistencia de la desnutrición en niños de Chiapas podría deberse a diversos conflictos como las posesiones de tierras, la religión, etc. incluso al conflicto armado del Ejército Zapatista de Liberación Nacional. Durante este estudio se observó que el retraso del crecimiento en los niños era mayor al reportado en la Encuesta Nacional de Nutrición y que la prevalencia de este retraso en el crecimiento era similar al de niños que viven en zonas de conflicto como Afganistán y Angola. Los altos niveles de desnutrición tienen como resultado que los niños en escuelas y trabajos tengan un bajo rendimiento. Sin embargo los resultados obtenidos, no representan la totalidad de la población en estudio, por lo tanto su generalización resulta limitada.

En 2011, Lutter, Chaparro y Muñoz hicieron un análisis referente al indicador que se usa en América Latina y el Caribe para medir la desnutrición. Ellos evaluaron la utilización del retraso del crecimiento y la delgadez, para medir la prevalencia de desnutrición en 13 países; observaron una diferencia importante en la utilización de ambos, por ejemplo México tiene una prevalencia en delgadez de 10.8% y en retraso de crecimiento de 26.9% observándose una diferencia significativa; sin embargo, hay países donde las diferencias entre estos 2 indicadores de desnutrición son mucho mayores.

2.2 Planteamiento del problema

Las estadísticas nacionales confirman que quienes son pobres mueren antes, o por lo menos es lo que González-Parodi y Luna-Ordóñez (2007) confirman. Mencionan que lo anterior se puede observar tan solo evidenciando las cifras de mortalidad infantil, además hacen hincapié que en México los más pobres entre los pobres es la población indígena. Esta población sufre de rezago social conllevándola a altos niveles de marginación y es en las comunidades indígenas donde se registran los mayores niveles de defunción infantil.

Tomando en cuenta esta perspectiva, encontramos que la entidad federativa con mayor porcentaje en pobreza y con altos grados de exclusión social en México es Chiapas, donde el 76.7% de la población está bajo estas condiciones (CONEVAL, 2008) y los datos de mortalidad infantil no son nada alentadores, la tasa de mortalidad infantil en niños menores de 5 años supera los datos nacionales, donde la población infantil chiapaneca posee 24.9¹ contra la nacional de 17.9² (SINAIS, 2008).

Y como sucede a nivel mundial; en Chiapas los principales problemas que aquejan a la población infantil de esta edad son la desnutrición y la persistencia de la diarrea, esto se observa nuevamente en los datos presentados en el país donde la desnutrición presenta una TMI en niños menores de 5 años de 8.0⁴ contra la nacional de 3.0⁵ (SINAIS, 2008). No obstante la desnutrición es un desequilibrio del organismo donde la capacidad de digerir, absorber y utilizar los nutrientes decae (Secretaría de Salud, 2006) ocasionando diversos inconvenientes en la salud del niño, ya que su derecho a la vida, al crecimiento y desarrollo se ven afectados (UNICEF, 2008).

Durante la desnutrición los niños se vuelven más susceptibles a contraer enfermedades, dentro de estas enfermedades oportunistas se encuentran las enfermedades infecciosas intestinales causadas por parásitos y bacterias; por otro lado se sabe que existen varios factores que causan desnutrición y dentro de ellos se encuentran los microorganismos mencionados. Las bacterias como Enterobacterias,

^{1, 2, 4, 5} Tasa por 100 000 menores de cinco años.

dentro de ellas la *E. coli* patógena suele causar daños graves en la mucosa y pared intestinal de manera que los nutrientes no se pueden absorber; creándose así un círculo vicioso entre desnutrición y diarrea; de manera más concreta se puede decir que la desnutrición debilita a los niños y eleva su susceptibilidad a infecciones gastrointestinales, así como la gravedad y duración de éstas. A su vez, las infecciones empeoran el estado nutricional e inmunitario del niño al reducir su apetito y alimentación, así como la absorción intestinal de macronutrientes, e incrementar la pérdida de electrolitos y micronutrientes a través de la orina. No obstante dichas bacterias no solo pueden causar desnutrición, primordialmente causan diarrea crónica siendo uno de los agentes bacterianos que produce diarrea con mayor frecuencia en el mundo y es aquí donde la presencia de ellas se vuelve más relevante, ya que su presencia puede influir también en la prevalencia de diarrea en Chiapas. Y como se mencionó anteriormente otro problema a combatir en Chiapas es la diarrea, esto se puede observar con las referencias que en 2006 señaló ENSANUT donde mencionó que la prevalencia de diarrea en Chiapas es superior a la nacional (21.1% contra la nacional de 12.9%), son datos tan graves en Chiapas que una de cada cuatro defunciones en menores de 5 años es producto de una enfermedad diarreica o una infección respiratoria. (Secretaría de salud, 2007); a pesar de los esfuerzos realizados por las autoridades sanitarias del país, no se ha logrado impactar la frecuencia de estos padecimientos, que continúan siendo unos de los grandes retos para el sistema de salud.

2.3 Justificación

Existen 8 ambiciosos Objetivos de Desarrollo del Milenio (ODM) para mejorar la calidad de vida mundial que un grupo de 189 países miembros de la ONU entre ellos México, acordaron cumplir como plazo el año 2015. Dentro de estos objetivos uno de los prioritarios para el país y por supuesto también del Estado de Chiapas, es el de reducir la mortalidad infantil de los niños menores de 5 años, debido a que la primera infancia de los 0 a los 5 años de edad, representa una etapa decisiva en el desarrollo de las capacidades físicas, intelectuales y emotivas de cada niño(a), y es la etapa más vulnerable del crecimiento, pues las enfermedades de rezago epidemiológico contribuyen a que el entorno saludable de estos niños no sea favorable dando como resultado TMI alta o personas adultas que no tienen condiciones de desplegar su máximo potencial intelectual, físico y por ende productivo. Por lo tanto, cuando la niñez no alcanza su pleno desarrollo y no logra niveles educativos satisfactorios se contribuye a la transmisión intergeneracional de la pobreza. (UNICEF, 2008), es por ello que el estudio o seguimiento de las enfermedades más comunes y más problemáticas de los niños de esta edad son de suma importancia.

Por ejemplo, el conocimiento actual sobre las enfermedades diarreicas, su prevención y control, ha permitido en los últimos años salvar millones de vidas en todo el mundo y contribuir a la supervivencia infantil; a pesar de estos avances, millones de niños y niñas, continúan padeciendo estas enfermedades cuya prevención y tratamiento requieren de medidas sencillas y de bajo costo. (Londoño, 2008). Por tanto, es de vital importancia tener datos locales y regionales de la distribución de los patógenos, que producen diarrea. (Ochoa, et. Al, 2011)

El Estado de Chiapas tiene como alta prioridad el estudio de las enfermedades diarreicas agudas en menores de 5 años de edad, ya que es la principal causa de mortalidad sostenida los últimos años (Secretaría de Salud, 2007); además que

pueden causar daños importantes en el desarrollo y crecimiento de los niños de esa edad; sumándole a esto la desnutrición sufrida que no se ha podido erradicar en el Estado, principalmente en las comunidades como Pantepec y Chanal, considerados municipios prioritarios del estado, puesto que son de carácter predominantemente rural, cuya población registra índices de pobreza, marginación indicativos de la existencia de marcadas insuficiencias y rezagos en el ejercicio de los derechos para el desarrollo social establecidos en la Ley General de Desarrollo Social. (CEIEG, 2011)

2.4 Hipótesis

La presencia de *E. coli* diarreogénica se encuentra asociada a la desnutrición infantil en los municipios Chanal y Pantepec, Chiapas.

2.5 Objetivos

2.5.1 Objetivo general

Detectar la presencia de genes de *Escherichia coli* diarreogénica en aislados obtenidos de municipios marginados de Chiapas.

2.5.2 Objetivos específicos

- Identificación de los genes plasmídicos *aggR*, *aap* y *AA* en cepas de *Escherichia coli* obtenidas en niños de Pantepec y Chanal, para la detección de *E. coli* enteroagregativa.
- Identificación de los genes específicos de las variedades patógenas *E. coli* enterotoxigénica, *E. coli* enteropatógena, *E. coli* secretora de toxina Shiga y *E. coli* enteroinvasiva, en aislados de *E. coli* obtenidos de niños de Pantepec y Chanal, Chiapas.
- Detección de la proteína Pic en cepas de *E. coli* aisladas de Pantepec y Chanal.
- Determinar si la desnutrición infantil en Pantepec y Chanal se asocia a la presencia de *Escherichia coli* diarreogénica.

2.6 Alcances y limitaciones

Este trabajo contribuirá al conocimiento acerca de uno de los agentes microbianos causantes de infecciones intestinales como es el caso de *E. coli* enteroagregativa, enterotoxigénica, enteropatógena, enteroinvasiva y enterohemorrágica, entre los niños de Chiapas, específicamente de municipios prioritarios para el estado, en este caso Pantepec y Chanal. Asimismo, que sea una herramienta para las autoridades sanitarias a fin de que se considere tomar medidas de prevención y/o corrección

Para este proyecto se analizaron los aislados de cepas *E. coli* en niños y niñas de comunidades de los municipios de Pantepec y Chanal, por lo que entre las limitantes fue no poder abarcar a toda la población infantil de dichos municipios, debido al tiempo, situaciones de logística y costo que esto implica.

3 MARCO TEÓRICO

3.1 Desnutrición

Es un trastorno del equilibrio entre la ingesta de alimentos y las necesidades individuales provocado por una absorción altera de nutrientes, una disminución de la ingesta, una pérdida elevada de nitrógeno u otros nutrientes o una situación clínica de hipermetabolismo. Si este desequilibrio se prolonga se produce un trastorno de la composición corporal caracterizado por un exceso de agua extracelular, déficit de potasio, masa muscular, tejido graso e hipoproteinemia que interfieren con la respuesta normal del individuo ante la enfermedad y su tratamiento. (Carrasco, 2006)

La palabra desnutrición señala toda pérdida anormal de peso del organismo, desde la más ligera hasta la más grave, sin prejuzgar en sí, de lo avanzado del mal, pues igualmente se llama desnutrido a un niño que ha perdido el 15% de su peso, que al que ha perdido 60% o más, relacionando estos datos siempre al peso que le corresponde tener para una edad determinada, según las constantes conocidas (Gómez, 2003).

3.1.1 Tipos de desnutrición

3.1.1.1 Desnutrición tipo marasmo

Es la desnutrición crónica o calórica. Se debe a deprivación parcial o total y prolongada de energía y nutrientes que depleciona las reservas corporales ocasionando un aspecto emaciado característico (Carrasco, 2006). En general, el marasmo predomina en los lactantes de entre seis y 18 meses de edad y es el resultado de una ingestión deficiente y crónica de energía, proteínas, vitaminas y nutrimentos inorgánicos. En la historia dietética del marasmo existe una falta de amamantamiento o el empleo de sustitutos de la leche humana muy diluida que conducen a una situación de pérdida de peso continua. Está caracterizado por una

grave reducción de peso, el edema no es detectable y existe adelgazamiento del tejido muscular y subcutáneo (la piel que retrata a los huesos); es decir, emaciación, que se acompaña de hipotonía, extremidades flácidas y "bolsas" en los glúteos.

Cuando la privación continúa, se presenta desmedro, o sea, alteración sobre el crecimiento lineal o retardo del crecimiento. El niño con marasmo presenta también cambios en la piel y ocasionalmente, en el pelo y se muestra muy irritable y apático al medio ambiente (Martínez y García, 2007).

3.1.1.2 Desnutrición tipo Kwashiorkor

El Kwashiorkor es consecuencia también de una deficiencia de energía y micronutrientes a la cual se suma una ingestión inadecuada aguda de proteínas. Se presenta con mayor frecuencia en la etapa posterior al destete, en lactantes mayores o preescolares. La característica clínica es el edema, que comienza en los miembros inferiores y cuando llega a afectar la cara del niño le da aspecto de "luna llena", además de lesiones en la piel, cambios de textura y coloración en el pelo, apatía, anorexia, hepatomegalia por infiltración de grasa (falta de síntesis de lipoproteínas) y albúmina sérica disminuida.

La fisiopatología del edema es compleja y no del todo conocida. Sin embargo, se ha postulado la interacción de los siguientes mecanismos: disminución de la albúmina sérica, reducción del potasio total del organismo, aumento de la permeabilidad capilar, elevación de las concentraciones de cortisol y de la hormona antidiurética, hipoinsulinismo, formación de radicales libres debido a la disminución de antioxidantes como las vitaminas A, C, E y el zinc, así como por la presencia y cantidad de hierro libre y de los mediadores de la respuesta inflamatoria. (Martínez y García, 2007)

3.1.1.1.3 Desnutrición mixta (caquexia)

Este tipo de desnutrición aparece en pacientes desnutridos que sufren una enfermedad aguda. Es la forma más grave de desnutrición y la más frecuente en la población hospitalaria, cursando con la depleción de todos los compartimentos corporales. (Carrasco, 2006).

3.1.2 Incidencias y consecuencias

La desnutrición aumenta la morbimortalidad y la incidencia de complicaciones: enlentece el proceso de cicatrización y curación de las heridas, disminuye la resistencia de las suturas quirúrgicas, prolonga la duración de la ventilación mecánica y favorece el riesgo de trombosis venosa por el reposo y la aparición de úlceras por presión y de la infección nosocomial (Carrasco, 2006).

3.2 Diarrea

La diarrea consiste en un aumento en el número de deposiciones y/o una disminución en su consistencia, de instauración rápida. Se puede acompañar de signos y síntomas como náuseas, vómitos, fiebre o dolor abdominal. (Riechmann et al., 2008)

La diarrea ocurre más frecuentemente en la niñez y se caracteriza por la presencia de 3 o más evacuaciones líquidas en 24 horas (o por la presencia de 1 evacuación con moco y sangre) acompañada en la mayoría de los casos por vómitos y fiebre. Es necesario tener en cuenta que el número de deposiciones en el niño sano varía según la alimentación. Por ejemplo, los niños alimentados con leche materna tienen evacuaciones más blandas y frecuentes que lo normal, siendo lo más importante la consistencia de las deposiciones, las cuales deben ser líquidas para definir las como heces diarreicas.

El órgano esencial para la degradación y absorción de nutrientes es el intestino delgado. Este órgano consta de un tubo alargado con muchos pliegues y asas, el cual aumenta su capacidad de absorción. Está cubierto externamente por una capa serosa e internamente por la mucosa intestinal, misma que es de forma columnar y recubre las vellosidades intestinales. El epitelio intestinal es un tejido activo, altamente prolífero que se renueva muy rápido y regularmente. En el epitelio intestinal existen dos regiones (vellosidad y cripta); en la región de la cripta o base de la vellosidad, las células se multiplican y luego migran hasta llegar a la punta de las vellosidades donde se descaman en el lumen intestinal. A medida que las células migran adquieren madurez y capacidad de absorción, de manera que al llegar al borde de la vellosidad, están completamente maduras y poseen propiedades de absorción, secreción, degradación y resíntesis de nutrientes. (Schael y Martínez, 1990).

La longitud y forma de las vellosidades, así como la tasa de recambio celular están relacionadas con la capacidad de absorción. En consecuencia, cualquier daño morfológico o cualquier alteración en el tiempo de migración celular repercute en la función de asimilación de los nutrientes. Se ha demostrado que el ayuno, la desnutrición, así como la eliminación de la flora intestinal, disminuyen la masa del intestino, la actividad enzimática y la tasa de recambio celular. Todos estos factores interfieren con los mecanismos de absorción, digestión y excreción de nutrientes, así como también con los mecanismos de defensa del intestino contra agentes invasores. (Schael y Martínez, 1990).

3.2.1 Importancia y consecuencias

El binomio diarrea-desnutrición ha sido ampliamente documentado. Esta asociación se manifiesta en ambas direcciones, por ejemplo, en niños y adultos desnutridos se ha demostrado que la diarrea es más severa y dura más, así como también en los animales; por otro lado, se observa que las diarreas recurrentes conducen a la desnutrición. Se ha comprobado que niños que han padecido episodios frecuentes de diarreas tienen deficiencias en el peso y la talla.

La diarrea afecta el estado nutricional de diversas maneras; las infecciones intestinales producen cambios metabólicos y/o funcionales a nivel del epitelio intestinal. Las diarreas provocan anorexia y por acción de los agentes patógenos se altera y disminuye el funcionamiento intestinal. A estos daños ocasionados por los agentes y por la infección se unen otros mecanismos que incrementan estas deficiencias, como son las medidas terapéuticas practicadas unos años atrás, entre las cuales están el suspender la alimentación durante la enfermedad, cuando es el momento en el cual se necesitan más calorías, el hidratarlo por vía intravenosa y la prescripción de antibióticos, la mayoría de ellos innecesarios ya que la diarrea es un proceso autolimitado. En consecuencia, tanto los organismos causantes de las diarreas, como los factores culturales, agravan el proceso. Las creencias y hábitos socio-culturales transmitidos en algunos por generación, influyen de manera determinantes en el curso de la enfermedad. La idea de “poner el intestino en reposo” practicada durante años y sin ninguna base fisiológica, ha inducido a un mal manejo de esta enfermedad tanto a nivel familiar como médico, lo que ha hecho un daño tremendo en las comunidades donde existe una alta prevalencia de diarrea infantil.

Por estas razones, las diarreas producen pérdida de peso y estancamiento del crecimiento y son el principal factor desencadenante de desnutrición. Se ha calculado que un niño marginal menor de 2 años sufre entre 3 y 7 episodios de diarrea al año, tiempo que pasa sin poder aprender y asimilar la información que le da el ambiente (de por sí limitado) en una época de desarrollo y el crecimiento crucial, por ser la de mayor permeabilidad para incorporar e interiorizar lo que le rodea, de forma tal que, cuando sea adulto, se pueda integrar a los procesos sociales del país.

Sabemos que los niños menores son los más susceptibles de contraer la enfermedad, ya que no tienen la inmunidad adquirida; pero también se da el caso de recién nacidos que en sus primeros días de vida excretan Rotavirus, agente patógeno, sin presentar ningún síntoma. Por otro lado, si un niño está sujeto a deficiencias nutricionales, ya sea en el momento de la enfermedad o por periodos

prolongados de tiempo, es susceptible de contraer enfermedades más severas y prologadas. (Schael y Martínez, 1990).

La amenaza más grave de las enfermedades diarreicas es la deshidratación. Durante un episodio de diarrea, se pierde agua y electrolitos (sodio, cloruro, potasio y bicarbonato) en las heces líquidas, los vómitos, el sudor, la orina y la respiración. Cuando estas pérdidas no se restituyen, se produce deshidratación.

El grado de deshidratación se mide en una escala de tres:

- Deshidratación incipiente: Sin signos ni síntomas.
- Deshidratación moderada:
 - Sed
 - Comportamiento inquieto o irritable
 - Reducción de la elasticidad de la piel
 - Ojos hundidos
- Deshidratación grave:
 - Los síntomas se agravan
 - Choque, con pérdida parcial del conocimiento, falta de diuresis, extremidades frías y húmedas, pulso rápido y débil, tensión arterial baja o no detectable y palidez.

La deshidratación grave puede ocasionar la muerte si no se restituyen al organismo el agua y los electrolitos perdidos, ya sea mediante una solución de sales de rehidratación oral (SRO) o mediante infusión intravenosa. (OMS, 2009)

3.2.2 Agentes patógenos

3.2.2.1 Virales

Existe una serie de agentes virales como son los Rotavirus, el agente Norwalk, Adenovirus y Calicivirus entre otros, los cuales han sido asociados a episodios

diarreicos y en algunos casos a brotes epidémicos. Su causalidad directa con la enfermedad no ha sido bien estudiada excepto en dos de los casos, los Rotavirus y el agente Norwalk, de los cuales son los rotavirus los que no tienen importancia en las gastroenteritis infantil, ya que en el caso del agente Norwalk, aunque ha sido bien estudiado, es muy poco frecuente en niños y su importancia solo se asocia a la diarrea en adultos.

El periodo de incubación es de 24 a 72 horas con un promedio de 48 horas, se aloja en la parte superior del intestino delgado a nivel de las microvellosidades, produciendo un cuadro clínico caracterizado por evacuaciones líquidas frecuentes (diez evacuaciones por día) sin moco ni sangre en la mayoría de los casos y de color amarillo; del 10 al 30% de los pacientes presentan leucocitos en las heces, siendo los vómitos y fiebres muy frecuentes. En algunos casos, se encuentra asociado a congestión en la faringe, lo que sugiere su implicación con el tracto respiratorio y un posible mecanismo de transmisión por medio de las vías respiratorias, siendo el periodo de duración de esta enfermedad entre 4 y 7 días. La invasión viral es localizada y produce aplanamiento de las vellosidades, un incremento en la profundidad de las criptas y disminución de la actividad de las disacaridasas, pero como al mismo tiempo, existen zonas en el intestino no lesionadas, ello facilita el tratamiento dietético. (Schael y Martínez, 1990)

3.2.2.2 Parasitarios

Existe una serie de protozoarios y helmintos que están asociados con diarreas aunque se encuentran también muy frecuentemente en niños asintomáticos. Entre los parásitos, algunos como la *Entamoeba histolytica*, actúan invadiendo la mucosa y produciendo diarrea con moco y sangre, no ocurriendo lo mismo en el caso de la *Giardia lamblia* y el *Ascaris lumbricoides*.

Existen otros parásitos, pero los mencionados anteriormente son los más frecuentemente encontrados en niños con diarrea. (Schael y Martínez, 1990)

3.2.2.2.3 Bacterianos

Estos se pueden agrupar de acuerdo al tipo de diarrea que producen, ya sea acuosa o disentérica y de acuerdo al mecanismo de acción que puede ser invasor secretor o ambos al mismo tiempo. En las diarreas de tipo invasor, el microorganismo penetra la mucosa intestinal, llegando en algunas ocasiones hasta la muscularis, según sea el tipo de agente. La penetración y multiplicación produce inflamación y ulceración de la mucosa a nivel de yeyuno y en algunos casos de colon, trayendo como consecuencia una diarrea disentérica, con presencia de moco y sangre en las heces acompañada en la mayoría de los casos de fiebre, vómito y dolor abdominal. (Schael y Martínez, 1990)

Los principales gérmenes invasores son: *Shigella spp.*, *Salmonella spp.*, *Campilobacter yeyuni*, *Yersinia enterocolítica* y ciertas cepas de *Escherichia coli* enteroinvasoras. Existe otro grupo de bacterias que actúan a través de la secreción de toxinas, las cuales alteran la actividad enzimática de la adenilciclase y guanilciclase, lo que conduce un aumento de la concentración de AMP cíclico, responsable de la alteración de la permeabilidad de la membrana, originando una diarrea de tipo secretora o acuosa (Schael y Martínez, 1990), además existe un grupo de bacterias que parece actuar a través de ambos mecanismos (invasor y productor de toxinas), produciendo un cuadro combinado más severo.

Entre las bacterias enterotoxigénicas se encuentran algunas cepas de *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae*, *Klebsiella pneumoniae* (cuya importancia en las diarreas no está muy clara) y recientemente se han asociado a esta enfermedad las *Aeromonas spp.* Las toxinas producidas por estas cepas pueden ser de uno o dos tipos, termoestables y termolábil, las cuales actúan a través de la guanilciclase y adenilciclase, respectivamente. Entre las bacterias que pueden actuar por uno o ambos mecanismos se encuentra *Shigella*, *Salmonella*, *Yersinia enterocolítica* y *Campilobacter yeyuni*. Existe un tercer grupo de cepas de *Escherichia coli*,

denominada enteropatógenas cuyo mecanismo de acción no está bien definido y produce diarrea con fiebre y vómito, sin moco ni sangre.

El grado de variabilidad del cuadro clínico asociado a un agente determinado nos lleva a pensar que diagnosticar un microorganismo por la sintomatología clínica no es fácil debido a que es bastante difícil asociar las características de las heces con un agente determinado, porque estos agentes pueden producir una gama de síntomas que va desde cuadros acuosos hasta cuadros disentéricos. Sin embargo, para diferenciar una diarrea viral de una bacteriana podría ser de gran utilidad la presencia de leucocitos en las heces, ya que más de 20 leucocitos por campo y temperatura alta, hablan de una infección bacteriana, mientras que la presencia de menos de 20 leucocitos acompañados de diarrea líquida hablan de una infección por Rotavirus (Schael y Martínez, 1990).

3.3 Enterobacterias

La familia *Enterobacteriaceae* es el grupo más grande y heterogéneo de bacilos Gramnegativos con importancia clínica. Se han descrito 40 géneros con más de 150 especies (Murray, Rosenthal y Phaller, 2007). Las primeras clasificaciones realizadas a esta familia se basaron en las características fenotípicas y estudios serológicos. Estas clasificaciones han variado mucho, lo que ha dado lugar a que nuevas especies se hayan incorporado a las ya conocidas. En la actualidad, se añaden a los estudios ya establecidos por comportamiento fisiológico y carga antigénica de estas bacterias, los de hibridación de ADN y análisis computarizados. Las investigaciones para sus clasificaciones abarcan desde las reacciones bioquímicas hasta los estudios de resistencia, fagotipaje, presencia de toxinas y análisis sobre las lesiones en la mucosa entérica (Valdés-Dapena, 2001).

Las enterobacterias son microorganismos ubicuos, se encuentran de forma universal en el suelo, agua y vegetación, también en la flora intestinal normal de muchos animales, incluido el ser humano, producen una gran variedad de

enfermedades en el ser humano, como 30 ó 35% de las septicemias, más del 70% de las infecciones del aparato urinario (IAU) y muchas infecciones intestinales. Algunos microorganismos (p. ej., *Salmonella typhi*, *Shigella spp.*, *Yersinia spp.*) se asocian siempre a enfermedad, mientras que otros (p. ej., *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*) forman parte de la microflora comensal normal y pueden producir infecciones oportunistas. Existe un tercer grupo de enterobacterias: normalmente son microorganismos comensales, pero se pueden convertir en patógenas cuando adquieren genes con factores de virulencia presentes en plásmidos, bacteriófagos o islas de patogenicidad (p. ej., *E. coli* asociada a gastroenteritis).

Las infecciones por enterobacterias se pueden originar de un reservorio animal (p. ej., la mayoría de *Salmonella typhimurium*, *Yersinia pestis*), de un portador humano (p. ej., *Shigella sonnei*) o de la diseminación endógena de los microorganismos en un paciente vulnerable (p. ej., *E. coli*) y pueden afectar virtualmente a todas las zonas corporales. (Murray et al., 2007)

3.3.1 Fisiología

Los miembros de la familia *Enterobacteriaceae* son bacilos gramnegativos, tienen un grosor de 0,3 a 1 μm y una longitud de 1 a 6 μm , además están dotados de motilidad por flagelos peritricos o bien pueden ser inmóviles y no forman esporas. Todos los miembros pueden crecer rápidamente de forma aerobia o anaerobia (anaerobios facultativos) en varios medios no selectivos (p. ej., agar sangre) y selectivos (p. ej., agar Mac- Conkey).

La familia *Enterobacteriaceae* tiene requerimientos nutricionales sencillos: fermentan la glucosa, reducen los nitratos y son catalasa-positivos y oxidasa-negativos. La ausencia de actividad de citocromo oxidasa es una característica importante, debido a que se puede determinar rápidamente mediante una sencilla prueba, y se utiliza para diferenciar a las enterobacterias de otros bacilos gramnegativos fermentadores y no fermentadores. Tan sólo existen algunas

excepciones a esta regla (p. ej., *Plesiomonas shigelloides* es una especie oxidasa-positiva; *Klebsiella granulomatis* no se puede cultivar en medios convencionales). Las características de las colonias de estos microorganismos en los diferentes medios se han utilizado para distinguir a los miembros más frecuentes de la familia Enterobacteriaceae (Murray et al., 2007). Y poseen un contenido de 39 a 59% G + C en el DNA. (Brooks, Butel y Morse, 2005).

3.3.2 Estructura

La familia *Enterobacteriaceae* se caracteriza por tener antígenos somáticos “O” que determinan los grupos serológicos; se han identificado más de 150 de estos antígenos formados por lipopolisacáridos (LPS) que poseen la característica de ser termoestables. (Valdés-Dapena, 2001). El LPS es el principal antígeno de la pared celular y está formado por tres componentes: el polisacárido somático “O” más externo, una región central polisacáridica compartida por todas las enterobacterias (antígeno común enterobacteriano) y el lípido A.

La clasificación serológica de las enterobacterias se basa en tres grandes grupos de antígenos: los polisacáridos somáticos “O”, los antígenos capsulares “K” (polisacáridos específicos de tipo) y las proteínas flagelares “H”. Los antígenos específicos O están presentes en cada género, aunque es frecuente la reactividad cruzada entre los géneros que están muy relacionados (p. ej., *Salmonella* con *Citrobacter*, *Escherichia* con *Shigella*). Estos antígenos se detectan mediante aglutinación con anticuerpos específicos.

En ocasiones se manifiesta en *Enterobacteriaceae* entrecruzamiento antigénico entre los antígenos “O” de una especie con otra. Los antígenos “K” termolábiles pueden interferir en la detección de los antígenos “O”. Este problema se resuelve al hervir el microorganismo con el fin de eliminar el antígeno “K” termolábil y exponer el antígeno “O” termoestable. (Murray et al., 2007)

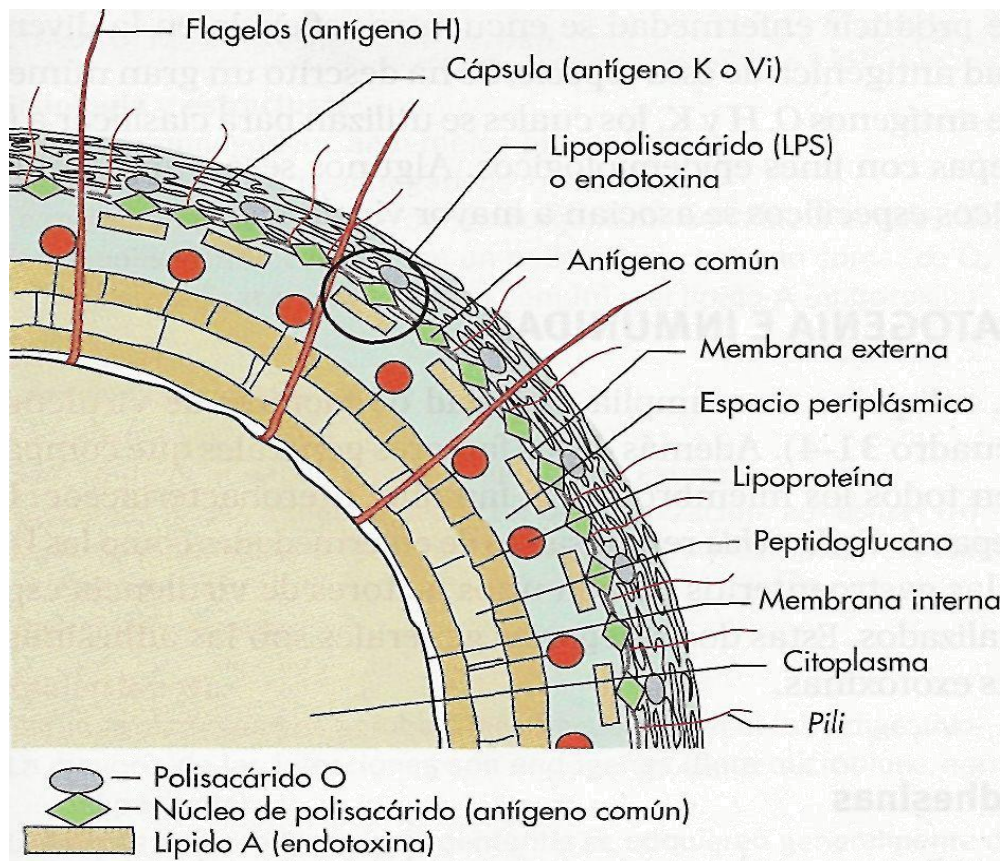


Figura 1. Estructura antigénica de las enterobacterias. (Murray et al., 2007)

Los antígenos “H” se relacionan con los flagelos de las cepas móviles; se han reconocido más de 50 de estos antígenos, los cuales están constituidos por flagelina, que es la proteína flagelar; se destruyen con el calor. Dentro de un mismo serotipo se puede presentar más de un antígeno flagelar, mostrándose en dos fases: fase 1 (representados por letra minúsculas) y fase 2 representados por números arábigos). Los microorganismos pueden variar de una fase a otra, lo cual se denomina variación de fase. (Valdés-Dapena, 2001).

Un gran número de enterobacterias posee, fimbrias (también conocidas como *pili*), las cuales se han subdividido en dos clases generales: fimbrias comunes codificadas por el cromosoma y *pili* sexuales codificados por plásmidos conjugativos. Las fimbrias comunes revisten importancia en la capacidad de la bacteria de

adherirse a receptores específicos de la célula anfitriona, mientras que los *pilis* sexuales o conjugativos facilitan el proceso de transferencia genética horizontal entre las bacterias. (Murray et al., 2007)

3.3.3 Patogenia

Se conocen varios factores que juegan un papel importante en la patogenicidad de varias infecciones de la familia *Enterobacteriaceae*, los más importantes son:

- Cápsula. Protege de la fagocitosis mediante antígenos capsulares hidrofílicos.
- Endotoxina. La actividad de esta endotoxina depende del componente lípido A del lipopolisacárido que se libera durante la lisis celular.
- Variación de fase genética. Una característica que protege a las bacterias de la destrucción celular mediada por anticuerpos
- Secuestro de factores de crecimiento. El transporte activo de Hierro es contrarrestado con la producción de compuestos propios o sideróforos en la célula bacteriana.
- Resistencia al efecto bactericida del suero.
- Resistencia antimicrobiana. Esta resistencia a los antibióticos puede estar codificada en plásmidos transferibles e intercambiarse entre especies, géneros e incluso familias de bacterias.
- Sistema de secreción de tipo III. Este sistema facilita la secreción de los factores de virulencia bacterianos.

Las infecciones oportunistas más frecuentes causadas por *Enterobacteriaceae* son: las infecciones del tracto urinario, infecciones respiratorias, infecciones dérmicas e hipodérmicas y sepsis. *E. coli* es el patógeno más frecuente en las infecciones bacterianas humanas; (Kayser et al., 2005) es considerado un organismo indicador de contaminación fecal en agua y alimentos, ya que su hábitat natural es el tracto intestinal de humanos y animales.

3.3.3.1 *Escherichia coli*

3.3.3.1.1 Características generales

Escherichia coli (*E. coli*) es una bacteria que fue aislada de heces fecales por Theodore Escherich en 1885; esta bacteria coloniza el intestino del hombre pocas horas después del nacimiento y se le considera un microorganismo de flora normal; además de poseer la capacidad de producir vitamina K2 (Piatkin, 1968).

Es un bacilo gram negativo no esporulado de tamaño intermedio (Murray et al., 2007) se diferencia por su polimorfismo, existiendo tipos móviles e inmóviles; forma parte de la familia *Enterobacteriaceae*, del género *Escherichia* (Brooks et al., 2005); anaerobia facultativa, mostrando el máximo de su crecimiento a 37°C, con un pH de 7.2 a 7.5, sus principales características bioquímicas se muestran en la tabla 1. Este microorganismo tiene una membrana lipídica externa y una capa de peptidoglucano fina (figura 2) lo que indica que *E. coli* es una bacteria gram negativa (Mathews, Holde y Ahern, 2002), como se mencionó anteriormente.

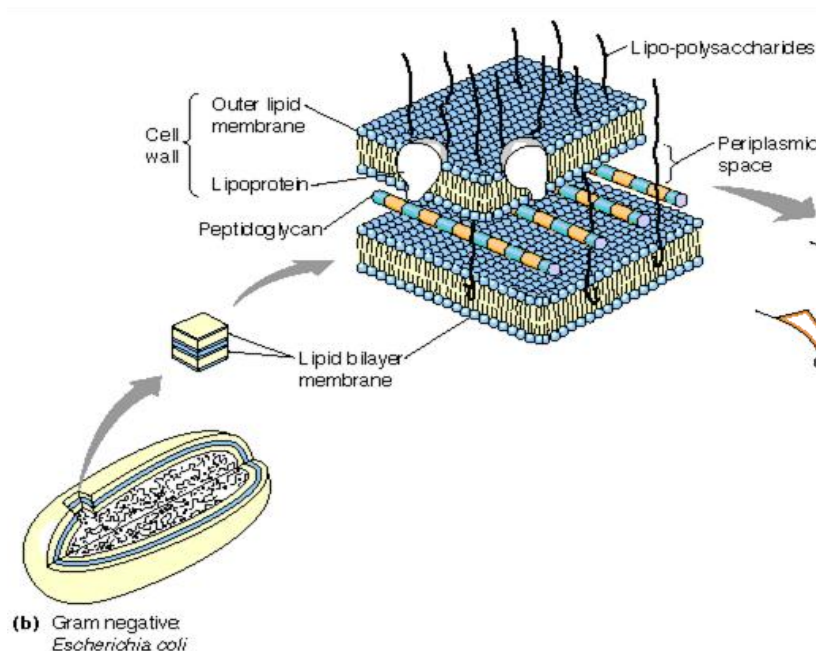


Figura 2. Pared celular bacteriana. (Mathews et al, 2002)

Tabla 1. Identificación Bioquímica de *Escherichia coli* (Rodríguez-Ángeles, 2002)

| PRUEBA BIOQUÍMICA | POSITIVO (%) | PRUEBA BIOQUÍMICA | POSITIVO (%) | PRUEBA BIOQUÍMICA | POSITIVO (%) |
|----------------------------------|-------------------------|--|-------------------------|------------------------------|-------------------------|
| Oxidasa | 0 | Crecimiento en KCN | 3 | Fermentación de trealosa | 98 |
| Producción de indol | 98 | Fermentación de lactosa | 95 | Fermentación de celobiosa | 2 |
| Rojo de metilo | 99 | Fermentación de sacarosa | 50 | Fermentación de eritritol | 0 |
| Voges- Proskauer | 0 | Fermentación de D-manitol | 98 | Hidrólisis de esculina | 35 |
| Citrato de Simmons | 1 | Fermentación de D-sorbitol | 94 | Fermentación de melobiosa | 75 |
| H ₂ S (TSI) | 1 | Fermentación de mucato | 95 | Fermentación de D-arabitol | 5 |
| Hidrólisis de urea | 1 | Fermentación de dulcitol | 60 | Fermentación de D-manosa | 98 |
| Utilización de malonato | 0 | Fermentación de salicina | 40 | Fermentación de glicerol | 75 |
| Ácido de glucosa | 100 | Fermentación de adonitol | 5 | Nitrato a nitrito | 100 |
| Gas de glucosa | 95 | Fermentación de inositol | 1 | Tartrato de Jordán | 95 |
| Fenilalanina desaminasa | 0 | Fermentación de L-arabinosa | 99 | Utilización de acetato | 90 |
| Lisina descarboxilasa | 90 | Fermentación de ratinosa | 50 | Lipasa (aceite de maíz) | 0 |
| Arginina dihidrolasa | 17 | Fermentación de L- ramnosa | 80 | DNasa a 25°C | 0 |
| Ornitina descarboxilasa | 65 | Fermentación de maltosa | 95 | ONPG | 95 |
| Movilidad a 36°C | 95 | Fermentación de D-xilosa | 95 | | |
| Hidrólisis de gelatina a 22°C | 0 | Fermentación de α-metil-D glucósido | 0 | | |

Una bacteria como *E. coli* está constituida por agua y una serie de moléculas en la proporción presentada en la tabla 2. El metabolismo de esta bacteria debe generar estos compuestos en la proporción necesaria para permitir el crecimiento del organismo, lo cual da lugar a la formación de nuevas células. (Bolívar, 2004).

Tabla 2. Composición química de *Escherichia coli** (Bolivar, 2004)

| COMPUESTO | % DEL PESO SECO | MOLÉCULAS POR CÉLULA |
|-------------------|-----------------|----------------------|
| Proteína | 55.0 | 2 350 000 |
| RNA | 20.5 | 255 480 |
| DNA | 3.1 | 2.1 |
| Lípidos | 9.1 | 22 000 000 |
| Lipopolisacáridos | 3.4 | 1 430 000 |
| Peptidoglicano | 2.5 | 1 |
| Glucógeno | 2.5 | 4 300 |
| Poliamidas | 0.4 | 6 600 000 |
| Cofactores, iones | 3.5 | 1 100 000 |

* La composición de *E. coli* crecida a 37°C en condiciones aerobias en un medio de cultivo compuesto de sales minerales con glucosa como fuente de carbono.

El genoma *E. coli*, (tabla 3) cuenta con un único cromosoma que está constituido por 4639221 pares de nucleótidos, tiene el potencial para codificar aproximadamente 4464 proteínas diferentes. La duplicación del cromosoma de *E. coli* requiere aproximadamente 40 min. Las células de *E. coli*, en condiciones favorables, se multiplican, no obstante, con un tiempo de duplicación de 20 min. (Schlegel, 1997)

El principal método de análisis experimental del proteoma se basa en el uso de la electroforesis. Esta tecnología permite separar y cuantificar la mayor parte de las proteínas de una célula.

Se ha determinado que en el metabolismo de esta bacteria participan aproximadamente 2760 enzimas y 794 metabolitos. Lo anterior constituye una red metabólica muy compleja, en la cual algunas reacciones siempre están activas y otras se inducen o reprimen dependiendo de las condiciones del medio externo. (Bolívar, 2004)

Tabla 3. Genoma de *E. coli* (Bolívar, 2004)

| ORGANISMO | TAMAÑO (Mn*) | No DE GENES | No CROMOSOMAS | DENSIDAD** |
|------------------|---------------------|--------------------|----------------------|-------------------|
| <i>E. coli</i> | 4.6 | 4 406 | 1 | 949 |

*Mn: millones de nucleótidos.

** : Genes por millón de nucleótidos.

Los estudios realizados con *E. coli* han permitido saber que se pueden producir hormonas humanas en bacterias como es el caso de la insulina y eso es solo un sencillo ejemplo de lo que ha propiciado el estudio de dicha bacteria, que actualmente es utilizada como sustrato y como modelo de infinidad de investigaciones metabólicas, genéticas, poblacionales, y de diversa índole.

3.3.3.1.2 Epidemiología

Aunque a esta bacteria se le considera un microorganismo de la flora normal, hay cepas que pueden ser patógenas y causar daño produciendo diferentes cuadros clínicos. La multitud de cepas *E. coli* capaces de producir enfermedad se encuentra reflejada en la diversidad antigénica de esta especie. Se ha descrito un gran número de antígenos O, H y K, los cuales se utilizan para clasificar a las cepas con fines epidemiológicos; el antígeno “O” es el responsable del serogrupo; la determinación del antígeno somático y flagelar (O:H) indica el serotipo. Algunos serogrupos antigénicos específicos se asocian a mayor virulencia. (Murray et al., 2007). La tabla 4 muestra algunos serotipos más frecuentemente asociados con los grupos patógenos. (Rodríguez-Ángeles, 2002), aunque también las cepas se identifican mediante sus factores de virulencia

haciendo ensayos in vitro, ensayos de toxigenicidad, aunque también se usan ensayos inmunológicos y pruebas de biología molecular.

E. coli es la causa más común de infección del aparato urinario (IAU) y con los *Streptococcus* del grupo B causan la mayoría de las infecciones del sistema nervioso central (SNC) en los niños menores de 1 mes. Alrededor del 75 % de las cepas de *E. coli* poseen el antígeno capsular K1. Este serogrupo está habitualmente presente en el aparato digestivo de las mujeres embarazadas y de los recién nacidos. (Murray et al., 2007)

- Adhesinas

E. coli es capaz de permanecer en el aparato urinario o en el aparato digestivo como consecuencia de su capacidad de adherencia a las células, en estas localizaciones, para evitar ser eliminado por el efecto de arrastre de la orina que se expulsa con la micción o por la motilidad intestinal. Las cepas de *E. coli* poseen numerosas adhesinas muy especializadas. (Murray, 2007)

- Exotoxinas

E. coli produce también un espectro variado de exotoxinas. Estas incluyen las toxinas Shiga (Stx-1, Stx-2), las toxinas termoestables (STa, STb) y las toxinas termolábiles (LT-I y LT-II). Por otra parte, las hemolisinas (HlyA) se consideran importantes en la patogenia de la enfermedad producida por *E. coli* uropatógeno. (Murray, 2007). Las propiedades de adherencia a las células epiteliales de los intestinos grueso y delgado son codificadas por genes situados en los plásmidos. De manera similar, con frecuencia las toxinas son mediadas por plásmidos o por fagos. (Brooks, 2005)

Tabla 4. Serotipos característicos de *E. coli* causante de diarrea. (Nataro y Keper, 1998)

| | SEROGRUPO | ASOCIACIÓN CON ANTÍGENO H | | SEROGRUPO | ASOCIACIÓN CON ANTÍGENO H |
|-------------|-----------|---------------------------------|-------------|-----------|---------------------------------|
| ETEC | O6 | H16 | EAEC | O3 | H2 |
| | O8 | H9 | | O15 | H18 |
| | O11 | H27 | | O44 | H18 |
| | O15 | H11 | | O86 | NM |
| | O20 | NM | | O77 | H18 |
| | O25 | H42, NM | | O111 | H21 |
| | O27 | H7 | | O127 | H2 |
| | O78 | H11, H12 | | O?a | H10 |
| | O128 | H7 | | | |
| | O148 | H28 | | | |
| | O149 | H10 | | | |
| | O159 | H20 | | | |
| | O173 | NM | | | |
| EPEC | O55 | H6, NM | EIEC | O28ac | NM |
| | O86 | H34, NM | | O29 | NM |
| | O111 | H2, H12, NM | | O112ac | NM |
| | O119 | H6, NM | | O124 | H30, NM |
| | O125ac | H21 | | O136 | NM |
| | O126 | H27, NM | | O143 | NM |
| | O127 | H6, NM | | O144 | NM |
| | O128 | H2, H12 | | O152 | NM |
| | O142 | H6 | | O159 | H2, NM |
| | | | | O164 | NM |
| | | O167 | H4, H5, NM | | |
| EHEC | O26 | H11, H32, NM | | | |
| | O55 | H7 | | | |
| | O111ab | H8, NM | | | |
| | O113 | H21 | | | |
| | O117 | H14 | | | |
| | O157 | H7 | | | |

3.3.3.1.3 *Escherichia coli* como patógena entérica

E. coli es el principal representante de la flora intestinal normal del hombre y los animales, sin embargo, existen cepas productoras de diarreas que pueden dar lugar a cuadros leves, evolucionar hasta la diarrea persistente u originar complicaciones que pueden llegar hasta la muerte de un paciente.

Las infecciones intestinales están limitadas a las producidas por las seis clases de *E. coli* que en la actualidad se consideran como patógenas entéricas, estas son: *E. coli* enteropatógena (EPEC), *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC ó STEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* difusamente adherente (DAEC).

Las cepas de cualquiera de las seis clases de productoras de diarreas, anteriormente señaladas, se presentan en los cultivos primarios, en los medios diferenciales, como cepas fermentadoras de la lactosa, por lo que no pueden distinguirse las clases en estos primeros cultivos y hay que utilizar otros métodos en cada tipo de *E. coli* para poder hacer su diferenciación. Cada una de estas categorías tiene propios patrones clínicos, sus características epidemiológicas, patogénicas y su diferenciación serológica, así como diversas formas de interactuar con la mucosa intestinal. (Valdés-Dapena, 2001)

3.3.3.1.3.1 *Escherichia coli* enteropatógena

Las cepas enteropatógenas de *E. coli* fueron las primeras en asociarse a la enfermedad diarreica y continúan siendo la principal causa de diarrea infantil en los países pobres. La enfermedad es rara en niños mayores y en adultos, tal vez debido al desarrollo de inmunidad protectora. Aunque se han asociado algunos serogrupos específicos "O" a brotes de diarrea por ECEP en las guarderías, no se recomienda estudiar el serotipo de una cepa *E. coli* aislada en una infección

esporádica o endémica, salvo en caso de estudios epidemiológicos. (Murray et al., 2007)

3.3.3.1.3.1.1 Patogénesis

La infección producida por ECEP se caracteriza por la adhesión bacteriana a las células epiteliales del intestino delgado con la destrucción posterior de las microvellosidades, estas características histopatológicas son conocidas como adhesión y esfacelamiento o borrado (A/E); además de presentar inhabilidad para producir citotoxinas. Los estudios realizados in vitro en relación con la unión de ECEP a la célula del hospedadero, ha permitido definir 3 etapas en el fenómeno de adherencia y borrado

3.3.3.1.3.1.1.1 Etapas de adherencia y eliminación

Primera etapa: Adherencia inicial

Está en relación con la característica de EPEC de formar densas microcolonias en la superficie de la célula, dando lugar al patrón denominado *adherencia localizada*. La adherencia esta mediada por pilis o fimbrias rizadas que se llaman bfp (bundle-forming pilus), cuya información genética está codificada en un plasmido de 50-70MDa denominado EAF (EPEC adherence factor). Otro elemento que se requiere para la adherencia localizada es una enzima periplasmática que es indispensable para la unión disulfuro de proteínas. En una segunda etapa, cuando se adhiere EPEC a las células epiteliales, se producen los cambios conocidos como A/E. El borrado se refiere a la perdida de microvellosidades del enterocito. Los genes necesarios para que ocurra A/E están localizados en la región del cromosoma llamado *locus para el borramiento de enterocito* (LBE o LEE por sus siglas en ingles), y todas las bacterias que producen borrado poseen este locus.

Durante la eliminación, la membrana epitelial que se encuentra por debajo de la *E. coli* adherida se eleva localmente para formar pedestales, que en ocasiones crean estructuras que semejan pseudópodos. Estos pedestales se deben al reordenamiento de las células del citoesqueleto de las células del hospedero, ya que algunos componentes como son: la actina, la alfa-actina y las cadenas cortas de miosina, se acumulan en las células epiteliales por debajo de donde se halla adherida *E. coli* enteropatógena. Además de estos elementos, se encuentran otros dos: el talin y el azrin, los cuales son las moléculas que unen la actina a la membrana de las células. En el tope de los pedestales está presente la tirosina fosforilada. La depolimerización localizada de filamentos de actina dentro de las microvellosidades, da como resultado la retracción de estas y el borrado posterior a la depolimerización.

Segunda etapa: Transducción de la señal

La EPEC posee un sistema excretor tipo III, esta localizado en el gen *eae* en LBE. Las proteínas *esp A* y *esp B* secretadas por este sistema son las responsables de activar las vías de transducción de la señal, incluyendo la fosforilización de inositol, la fosforilización de la tirosina, la depolimerización celular, el reacondicionamiento de la actina y la unión a la intimina.

También puede expresar otros factores de virulencia accesorios como EAST1 (por enteroaggregative heat-stable1 toxin) una toxina estructuralmente relacionada con la enterotoxina termoestable ST1 de ETEC, la enterohemolisina E-hly (por EHEC-enterohemolysin) y *afa* (por afimbrial adhesin). (Varela et al, 2007)

Tercera etapa: Intimina

La intimina es una proteína de la membrana externa del microorganismo que se requiere para íntima unión. El receptor para intimina también lo codifica

LBE. Esta proteína codificada por LBE anteriormente se llamó Hp 90, pero en la actualidad se denomina TIR (receptor de la intimina translocada), el cual es segregado por EPEC y enviado a la célula del hospedero por el sistema secretor III.

3.3.3.1.3.1.2 Epidemiología

La infección por EPEC es principalmente una enfermedad de niños menores de 6 meses y de 2 años aunque también puede causar diarrea en adultos, principalmente cuando hay un factor predisponente como diabetes; al igual que con otras cepas de *E. coli* diarreogénica, la transmisión de ECEP es fecal-oral por manos contaminadas de manipuladores de alimentos. En un estudio, ECEP se aisló de polvo y aerosoles, lo que sugiere la transmisión aérea potencial, ya sea directamente a través de la inhalación seguida por la ingestión o indirectamente a través de la contaminación de otros fomites. En los brotes de adultos poco frecuente, la transmisión por el agua y los alimentos ha sido reportada, pero ningún tipo particular de alimentos se ha considerado como más probable que sirva como una fuente de infección.

El reservorio de la infección de EPEC pueden ser los niños sintomáticos o asintomáticos e incluso los adultos. Numerosos estudios han documentado la propagación de la infección a través de hospitales, guarderías y centros de cuidado. Los estudios epidemiológicos en varios países han mostrado que existen portadores asintomáticos; en algunos estudios, hasta el 17 y el 20% de los niños sanos menores de 2 años tenían *E. coli* de los serotipos de ECEP en las heces. En los pacientes sintomáticos, EPEC se puede aislar de las heces hasta 2 semanas después del cese de los síntomas. Aunque los animales como conejos, cerdos, y los perros tienen EPEC, los serotipos patógenos que se encuentran en estos animales no suelen ser los serotipos humanos.

EPEC, causó brotes frecuentes de diarrea infantil en los Estados Unidos y el Reino Unido. Aunque EPEC ya no es el causante de diarrea de mayor importancia en los países desarrollados como fue en los años 1940-1950 esto debido a la baja incidencia de EPEC en los hospitales de estos países. Sin embargo, las cepas EPEC también están asociadas con casos esporádicos de diarrea en los Estados Unidos y otros países desarrollados. Un estudio de *E. coli* en aislados de niños con diarrea en Seattle hicieron uso de sondas de diagnóstico de ADN y se encontró una alta incidencia de EPEC en esta población. Este estudio encontró que las cepas tenían *eae*-positivo y *stx*-negativo (por lo general la adherencia localizada es positiva pero negativa para *eae*).

En contraste con la escasa importancia de EPEC en los países desarrollados, esta bacteria es una causa importante de diarrea infantil en los países en vías de desarrollo. Estudios realizados en Brasil, México y Sudáfrica han demostrado que el 30 y el 40% de la diarrea infantil pueden atribuirse a EPEC. Además varios estudios han demostrado que la lactancia materna protege contra la diarrea por EPEC.

3.3.3.1.3.1.3 Consideraciones clínicas

EPEC causa diarrea aguda principalmente, aunque muchos casos de diarrea prolongada también han sido reportados. La infección a menudo puede ser muy grave y muchos informes clínicos hacen hincapié en la gravedad de la enfermedad. En los países desarrollados con la gama completa de tratamientos modernos disponibles, la mortalidad es mucho menor, aunque todavía puede dar lugar a muertes. Además de la diarrea acuosa profusa, los síntomas comunes son también vómitos y fiebre de bajo grado (Nataro y Keper, 1998).

Biopsias en muestras de la mucosa intestinal, muestran a menudo, pero no siempre, la presencia de bacterias íntimamente adheridas y con la histopatología de A/E. La presencia de la lesión A/E está asociada con el desarreglo del sistema

de enzimas digestivas de absorción, lo que lleva a una mala absorción de nutrientes.

Como ocurre con otros patógenos de la diarrea, el principal objetivo del tratamiento de ésta EPEC es prevenir la deshidratación. La rehidratación oral puede ser suficiente para los casos más leves, pero los casos más graves requieren de rehidratación parenteral. Una gran variedad de antibióticos se han utilizado para tratar la EPEC y han demostrado ser útiles en muchos casos, pero la resistencia a múltiples antibióticos es común en EPEC. Actualmente no hay vacunas disponibles o en ensayos clínicos para prevenir la enfermedad debido a la EPEC. (Nataro y Keper, 1998)

3.3.3.1.3.1.4 Detección y diagnóstico

Las características que definen realmente a EPEC son la histopatología A/E y la ausencia de la toxina Shiga. Muchas cepas de EHEC también producen la lesión A / E, por lo tanto, la determinación de la presencia (indicativa de EHEC) o ausencia (indicativa de EPEC) de la Stx es esencial. La posesión de determinados antígenos O y H, que durante muchos años fue la única característica que definía microbiológicamente a EPEC, ahora ya no se considera una característica esencial de esta variante patógena. (Nataro y Keper, 1998)

Las cepas EPEC se consideran típicas cuando tienen los genes *eae* para la intimina, que participa en A/E, y el plásmido EAF que codifica para el *bfp* (se han descrito 2 variantes genéticas mayores del gen *bfpA*) (Varela et al, 2007); se dice que son atípicas cuando sólo presentan los genes *eae* pero no el plásmido EAF. Cepas con EAF-negativos podrían ser derivados de EHEC que han perdido los fagos que codifican Stx. La EPEC con EAF-negativos, han sido implicados como agentes causantes de al menos un pequeño brote de pediatría en el Reino Unido y un gran brote con más de 600 personas en Finlandia. (Varela et al., 2007)

Dado que las cepas de EPEC, al igual que otras cepas de *E. coli* diarreogénica, se definen sobre la base de las propiedades de virulencia, hay dos enfoques para la detección de EPEC en el laboratorio: fenotípico y genotípico. El enfoque fenotípico requiere del uso de cultivos celulares y microscopía de fluorescencia y el método genotípico requiere del uso de la hibridación de ADN o PCR. El fenotipo A/E se puede identificar mediante el uso de cultivos HEp-2 o las células HeLa y la prueba de FAS que emplea la toxina faloidina del hongo *A. phalloides* conjugado con FITC o rodamina, con. El fenotipo A/E también se puede identificar mediante el examen con microscopio electrónico de muestras de biopsia intestinal o de cultivos de células epiteliales que se incubaron con EPEC.

Hay una serie de pruebas fenotípicas para determinar la otra característica fundamental de la EPEC, la falta de expresión Stx (descritas en la sección de EHEC). Un excelente marcador fenotípico de la presencia del plásmido EAF es la adherencia localizada en HEp-2 o de las células HeLa, como se describió anteriormente. También se puede hacer uso de la prueba de ELISA para la detección de EAF-positivo. Para las pruebas genotípicas se han desarrollado y evaluado sondas de ADN y PCR para las tres principales características de la EPEC: A/E, el plásmido EAF, y la falta de toxina Shiga. (Nataro y Keper, 1998)

3.3.3.1.3.2 *Escherichia coli* enterotoxigénica

Este microorganismo fue reconocido por vez primera como agente causal de diarreas en estudios realizados en la India y Bangladesh en 1968. Las ETEC, especialmente aquéllas que poseen los factores de colonización, están entre los patógenos que más frecuentemente producen diarreas en los niños de los países en vías de desarrollo y son causa importante de la “diarrea del viajero” (Valdés-Dapena, 2001).

Es una infección propia de los países en vías de desarrollo y en aquellos lugares donde las condiciones higiénico-sanitarias son precarias. El hombre es el

principal reservorio, aunque algunas cepas han sido identificadas a partir del cerdo y bovinos. Las vías de transmisión son, principalmente, el agua y los alimentos contaminados, aunque las manos también pueden ser vía de transmisión, sobre todo para los recién nacidos.

3.3.3.1.3.2.1 Patogénesis

La patogenia de la diarrea producida por ETEC se relaciona con la colonización en la mucosa del intestino delgado por medio de pilis o fimbrias que tienen diversas formas denominadas CFA (colonization factor antigens) y la elaboración de la enterotoxina secretora. Por definición, las ETEC son aquellas cepas de *E. coli* que producen enterotoxinas termolábil (LT), termoestable (ST) o ambas. Las que poseen ambas toxinas son claramente patógenas, así como las que tienen la toxina termostable (ST), la importancia de la LT no está bien definida.

3.3.3.1.3.2.1.1 Toxina LT

La toxina LT de *E. coli* está estrechamente relacionada con la estructura y la función de la enterotoxina del cólera (CT) expresada por *Vibrio cholerae*. LT y CT comparten muchas características, incluyendo la estructura, la secuencia proteica, la identidad del receptor principal, la actividad enzimática, y la actividad en los ensayos de cultivo de células animales; algunas diferencias se pueden ver en el procesamiento y secreción de la toxina y en la respuesta de los linfocitos.

Hay dos principales serogrupos de LT: LT-I y LT-II, que no presentan reacción inmunológica cruzada. LT-I se expresa por cepas de *E. coli* que son patógenas para los seres humanos y animales. LT-II se encuentra principalmente en los aislados de *E. coli* de los animales y rara vez en los aislados humanos, pero en ninguno de ellos ha sido asociada con la enfermedad. A menos que se

distinguen por números romanos, el termino LT a continuación se refiere a la forma LT-I.

Poseen 2 subunidades, la A y la B; la primera activa las adenilciclase de los enterocitos. La subunidad B es la responsable de la unión al gangliósido de los eritrocitos. La toxina LT/II tiene de un 55 a 57% de identidad con la LT/I y la CT en la subunidad A, pero no existe esta homología con la subunidad B de esta enterotoxina. Se ha descrito dos variantes antigénicas en esta toxina, la LT/IIa y la LT/IIb. La LT/II también actúa activando la adenilciclase. (Valdés-Dapena, 2001)

La subunidad A de toxina LT activa irreversiblemente la enzima intracelular adenilciclase, lo cual conduce a una acumulación intracelular de adenosina monofosfato cíclico (AMPc). El aumento de AMPc causa un cambio en la función de los enterocitos, produciendo un incremento en la secreción por los enterocitos de las criptas intestinales y una disminución de la función de absorción por los enterocitos localizados en los ápices de las vellosidades intestinales. Esto da lugar a la diarrea líquida.

3.3.3.1.3.2.1.2 Toxina ST

Las toxinas ST son monoméricas y pequeñas; contienen grandes cantidades de cisteína residual, cuyas uniones disulfuro le dan la característica de estabilidad al calor. Existen dos clases de esta enterotoxina, la STa (también llamada ST-I) y la STb (solo se ha encontrado en ETEC), las cuales difieren en estructura y mecanismos de acción. Los genes para su codificación se encuentran localizados, principalmente, en plásmidos.

La STa tiene dos variantes: la STp, identificada al principio en los porcinos; y la STh, reconocida primeramente en los humanos. El principal receptor para STa es la enzima de membrana, llamada guanilato ciclase. Esta actividad lleva en última instancia a la estimulación de la secreción de cloruros y (o) la inhibición de

la absorción de cloruro de sodio. STb difiere en cuanto a su homología de STa, aunque contiene cuatro residuales de cistina que forman las uniones disulfuro. Esta toxina induce al daño histológico de las células epiteliales y atrofia parcial de las vellosidades. Su receptor se desconoce, aunque actualmente se plantea su posible unión a la membrana plasmática antes de ocurrir la endocitosis. Su estimulación no es sobre el ion cloro; esta toxina estimula la secreción de bicarbonato de las células intestinales. La toxina ST activa la enzima intracelular guanilatociclasa, lo que lleva a un acumulo intracelular de guanosina monofosfato cíclico (GMPc) y aumenta la secreción por incremento de calcio de citosol.

3.3.3.1.3.2.2 Epidemiología

Cepas de ETEC se asocia con dos síndromes clínicos principales: diarrea entre los niños lactantes del mundo en desarrollo y la diarrea del viajero. El patrón epidemiológico de la enfermedad de ETEC requiere una dosis infecciosa relativamente alta para que surja la infección. (Nataro y Keper, 1998)

Investigaciones epidemiológicas han implicado a alimentos y agua contaminados, como los vehículos más comunes para la infección por ETEC. El muestreo de los alimentos y las fuentes de agua de las áreas de infección endémica han demostrado tasas sorprendentemente altas de contaminación ETEC. Por lo tanto, la contaminación fecal de las fuentes de agua y la comida son la principal razón para la alta incidencia de la infección por ETEC en todo el mundo y un organismo de saneamiento adecuado es la piedra angular de los esfuerzos de prevención contra esta infección; las infecciones causadas por ETEC tienden a agruparse en los meses cálidos y húmedos, cuando la multiplicación de ETEC en los alimentos y el agua es más eficiente, aunque la infección por ETEC es más frecuente en los niños, los adultos también son susceptibles. De hecho, ETEC es el principal agente etiológico que causa la diarrea del viajero entre los adultos de los países desarrollados.

3.3.3.1.3.2.3 Consideraciones clínicas

La enfermedad generalmente es abrupta en el inicio con un corto período de incubación. La diarrea es acuosa, por lo general sin sangre, moco o pus, fiebre y vómitos están presentes en una minoría de pacientes. La diarrea por ETEC puede ser leve, breve, y auto-limitante o puede resultar en severa purga similar a la observada en el *Vibrio cholerae*.

La administración de antibióticos disminuye tanto la duración de la diarrea como la intensidad de la excreción de ETEC, aunque la resistencia a los antibióticos en las cepas de ETEC es un problema emergente. Aunque la terapia de rehidratación oral es usada a menudo para salvar vidas en los lactantes y los niños con diarrea por ETEC. Los viajeros de los países en desarrollo también deben ser aconsejados sobre la necesidad de mantener la hidratación cuando experimentan diarrea. Las vacunas orales contra ETEC están siendo desarrolladas por una variedad de enfoques, incluyendo fimbrias purificadas, las cepas atenuadas ETEC, *Salmonella* y atenuado, *Shigella* y cepas de *V. cholerae* que expresan antígenos de ETEC.

3.3.3.1.3.2.4 Detección y diagnóstico

La detección de ETEC ha dependido durante mucho tiempo de la localización de las enterotoxinas LT y / o ST. Varias técnicas de inmunoensayo se han desarrollado para la detección de ST, incluyendo un radioinmunoensayo y un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA). El bioensayo tradicional para la detección de LT implica el uso de cultivos celulares, o bien el ensayo de células Y1 suprarrenal o el ovario del hámster chino (CHO).

Sondas de ADN se encuentran útiles en la detección de LT-ST. Cabe destacar que no existe una prueba perfecta para ETEC: la detección de factores de colonización no es práctico debido a su gran número y heterogeneidad, la

detección de LT y ST específica a una ETEC aislada, sin embargo, muchas cepas expresan factores de colonización específicas para los animales y por lo tanto la falta de patogenicidad humana. (Nataro y Keper, 1998)

La sonda de polinucleótido LT ofrece una buena sensibilidad y especificidad cuando se etiqueta con radioisótopos o con sistemas enzimáticos. Sondos de ST polinucleótidos han tenido problemas de poca sensibilidad y especificidad, probablemente debido a las reducidas dimensiones del gen.

Recientemente, una sonda de oligonucleótidos trivalentes se ha propuesto que puede ser de utilidad en la detección de los genes que codifican LT, ST, y los genes de la toxina Shiga. Varios ensayos de PCR para ETEC son muy sensibles y específicos cuando se utilizan directamente en muestras clínicas o en las colonias de bacterias aisladas. Una adaptación útil de la PCR es la prueba denominada PCR múltiple, en la que varios PCR se combinan con el objetivo de detectar uno de los muchos diferentes patotipos de *E. coli* diarreogénica en una sola reacción. (Nataro y Keper, 1998)

3.3.3.1.3.3 *Escherichia coli* enteroinvasiva

El grupo EIEC y *Shigella spp.* están relacionados genética y bioquímicamente ya que son descarboxilasa negativas, no móviles y lactosa negativas. (Nataro y Keper, 1998)

3.3.3.1.3.3.1 Patogénesis

El esquema patogénico exacto de EIEC aún no se ha aclarado, sin embargo, los estudios de patogenia de la EIEC sugieren que sus características patogénicas son prácticamente idénticas a las de *Shigella spp.* Ambos organismos han demostrado que invaden el epitelio del colon, la información genética para este mecanismo está en loci del cromosoma y del plásmido. Además de tener la

capacidad de elaborar una o más enterotoxinas que pudieran ser importantes en la producción de diarrea.

El modelo actual de la patogénesis EIEC comprende: la penetración de las células epiteliales, la lisis de la vacuola endocítica, la multiplicación intracelular, y el movimiento direccional a través del citoplasma, y extensión dentro de las células epiteliales adyacentes. Cuando la infección es grave, esta secuencia de acontecimientos provoca una fuerte reacción inflamatoria. (Nataro y Keper, 1998). El sitio de la infección es la mucosa del colon. Los genes necesarios para la invasión se encuentran en un plásmido de 140-MDa llamado pInV, que codifica para proteínas, como por ejemplo las Ipa y otras que están involucradas en el proceso de patogénesis.

Las infecciones por EIEC se caracterizan por un periodo de diarrea acuosa, con sangre y moco, pero en algunos casos solo presentan diarrea, ésta en ocasiones es indistinguible de la que produce ETEC. El papel de las enterotoxinas no está probada, pero su presencia puede explicar la diarrea acuosa característica atribuida a EIEC.

3.3.3.1.3.3.2 Epidemiología

La mayoría de los estudios epidemiológicos de EIEC describen brotes. En casos esporádicos, muchas cepas EIEC probablemente se identificaron erróneamente como *Shigella spp.* o cepas de *E. coli* patógenas. Las cepas de EIEC se suelen transmitir por los alimentos o por el agua, a pesar de que se puede transferir de persona a persona, la dosis infecciosa de EIEC es superior a la de *Shigella spp.*, y por lo tanto el potencial de transmisión de persona a persona se reduce. La incidencia de EIEC en los países desarrollados se piensa que es bajo, pero existen brotes ocasionales de origen alimentario, como por ejemplo en un restaurante se produjo un brote asociado a EIEC que involucró a 370 personas en Texas (Nataro y Keper, 1998).

3.3.3.1.3.3.3 Consideraciones clínicas

La presentación clínica de la enfermedad EIEC se ha documentado a partir de los brotes, las enfermedades endémicas, y estudios con voluntarios. La infección de EIEC se presenta más comúnmente como diarrea acuosa, que puede ser indistinguible de la diarrea secretora vista con ETEC. Sólo una minoría de los pacientes experimentan el síndrome de la disentería, que se manifiesta con sangre, moco y leucocitos en las heces, tenesmo y fiebre. Las infecciones asintomáticas, debido a EIEC son inusuales. (Nataro y Keper, 1998)

3.3.3.1.3.3.4 Detección y diagnóstico

En general, la identificación de EIEC implica hacer pruebas in vivo como la de Serenity, que es la inoculación de un cultivo puro de la bacteria en un ojo de un conejillo de indias en el cual después de 24 a 96 horas se produce una ulceración en el ojo. La capacidad para formar placas en una monocapa de células HeLa también se correlaciona con las características de virulencia.

Una sonda de polinucleótido para la detección de EIEC se ha descrito, la sonda *ial* es un fragmento de 2.5-kb *Hind*III derivado de pInv de una cepa de EIEC (disponible como un fragmento clonado en el plásmido pSF55). La sonda es prácticamente 100% sensible y específica para las cepas de EIEC que han conservado su virulencia. Un oligonucleótido derivado de *ial* es idénticamente sensible y específico como la sonda del polinucleótido. La PCR con *ial* también es eficaz en un sistema de PCR múltiple para identificar cepas EIEC simultáneamente con otras categorías de *E. coli*. (Nataro y Keper, 1998).

Se ha desarrollado un método de ELISA para detectar el gen de la ipaC, que está contenido en el plásmido Inv de EIEC y *Shigella*, una ventaja de este ensayo sobre otros métodos es que no requiere de equipos costosos o muy sofisticados y no se utilizan animales vivos.

3.3.3.1.3.4 *Escherichia coli* enterohemorrágica

Riley describió y relacionó a EHEC con brotes caracterizados por dolor abdominal, diarrea acuosa con sangre y poco o nada de fiebre, cuadro al que se le llamó colitis hemorrágica (CH) y que era debido a la ingestión de carne cruda o mal cocida. La bacteria aislada de todos los casos fue *E. coli* del serotipo O157:H7.

Las cepas de *E. coli* enterohemorrágica son las cepas que causan con mayor frecuencia enfermedad en los países desarrollados. Se estima que estas bacterias producen 73.000 infecciones y 60 muertes al año en EE.UU. La ingestión de un inóculo que contenga menos de 100 bacterias puede producir la enfermedad. (Murray et al, 2007)

3.3.3.1.3.4.1 Patogénesis

La capacidad toxigénica de las cepas es necesaria para que el paciente desarrolle colitis hemorrágica y diarrea con sangre, ya que la citotoxina Stx es el principal mecanismo de patogenicidad de EHEC y su síntesis está relacionada con la presencia del bacteriófago Stx, que está insertado en el genoma.

Además de la toxina, las EHEC tienen otros mecanismos de patogenicidad como el fenómeno de adherencia y esfacelación (A/E), y presentan el gen cromosomal *eae* que codifica para la proteína de membrana externa 94 kDa, llamada intimina, cuya expresión es regulada por genes plasmídicos; el gen *eae* también se encuentra en las cepas EPEC. Otro factor de patogenicidad es el plásmido pO157, de 60 MDa, que codifica para la enterohemolisina. Actualmente hay al menos dos clasificaciones del grupo EHEC. Una es en función de la presencia de sus factores de patogenicidad: a) cepas típicas cuando tienen el fago, el plásmido de 60 MDa y presentan el fenómeno de A/E, y b) cepas atípicas,

cuando no producen lesiones de A/E y pueden presentar o no el plásmido de 60 MDa. La otra clasificación es en función del serotipo:

- a) Cepas E. coli O157:H7. Este serotipo no fermenta el D-sorbitol ni la ramnosa y no produce β -glucuronidasa; esta bacteria puede producir principalmente SUH y CH.
- b) Cepas no-O157:H7 cuya frecuencia de aislamiento es cuatro veces mayor que las O157:H7. Estas cepas pueden ser sorbitol positivo y sus serotipos son diferentes del O157:H7. Actualmente hay más de 200 serotipos. El cuadro clínico causado por las cepas no-O157 se caracteriza por diarrea acuosa con dolor abdominal y colitis hemorrágica. Las cepas no-O157 son capaces de causar brotes o casos aislados de diarrea y en ocasiones no se logra establecer la fuente de contaminación.

3.3.3.1.3.4.1.1 Toxina Shiga

Las cepas STEC de origen humano, animal o de alimentos pueden producir una o más potentes citotoxinas que forman parte de la familia de las toxinas Shiga (Stxs), las que poseen estructura de subunidades A-B. Las Stxs se clasifican en dos tipos, Stx1 y Stx2. Esta clasificación se basa en la neutralización del efecto citotóxico sobre células Vero con anticuerpos específicos. Hasta el momento para Stx1 se identificó la variante Stx1c, y para Stx2 se describieron numerosas variantes, Stx2c (*stx2vh-a* y *stx2vh-b*), Stx2e, Stx2d y Stx2f. Las cepas STEC pueden producir Stx1, Stx2 o variantes de Stx1 o Stx2, solas o en combinación de dos o más toxinas. Stx2c y Stx2d fueron identificadas en aislamientos humanos, la primera de ellas en cepas O157 y no-O157, y la segunda sólo en cepas STEC no-O157.

Stx2e o SLT-IIv fue la primera variante de Stx2 descrita y está asociada a la enfermedad de los edemas en cerdos, aunque raramente a enfermedad

humana. Stx2f fue identificada en aislamientos de STEC en heces de paloma y fue idéntica a una variante de Stx2-e descrita previamente como SLT-IIva, aislada de un caso de diarrea humana. Stx2e y Stx2f están codificadas en el cromosoma a diferencia del resto de las Stxs que están codificadas por profagos lambdoides en el cromosoma bacteriano. (Leotta et al., 2005)

3.3.3.1.3.4.1.2 EAST1

La importancia de EAST1 en la patogénesis de la enfermedad debido a la EHEC es desconocida, pero posiblemente podría explicar parte de la diarrea sin sangre con frecuencia en las personas infectadas con estas cepas. EAST1 fue descrita por primera vez en EAEC, y también se encuentra en muchas cepas de EHEC. En un estudio, todas las 75 cepas de EHEC O157:H7 poseían el gen *astA* que codifica a EAST1. (Nataro y Keper, 1998)

3.3.3.1.3.4.1.3 Enterohemolisina

El plásmido de 60MDA contiene genes que codifican una hemolisina (denominado enterohemolisina). La enterohemolisina se encuentra en casi todas las cepas O157: H7 y está ampliamente distribuida entre las cepas de *E. coli* productoras de Stx que no son O157: H7. En Alemania, aproximadamente el 90% de todas las cepas con Stx positiva en aislados de los pacientes, poseían los genes que codifican la hemolisina. Los pacientes con SUH desarrollan anticuerpos para enterohemolisina, pero no hay datos que indiquen que está involucrado en la patogénesis de la enfermedad. Enterohemolisina pertenece a la familia de toxinas RTX. El gen que codifica la hemolisina (*ehxA*) tiene un 60% de identidad al gen *hlyA* que codifica a la hemolisina expresada por uropatógenos de *E. coli*. Aunque el papel de enterohemolisina sigue siendo objeto de especulación. (Nataro y Keper, 1998)

3.3.3.1.3.4.1.4 Factores de adherencia intestinal

El único factor de adherencia potencial de *E. coli* O157:H7 que se ha demostrado juega un papel en la colonización in vivo en un modelo animal es la intimina, codificada por el gen *eae*. En lechones convencionales y gnotobióticos, O157:H7 produce lesiones extensas de A/E en el intestino grueso,

La existencia de factores de adherencia intestinal distinta a intimina es sugerido por el aislamiento de cepas *E. coli* productores de Stx de otros serotipos de O157: H7 que carecen del gen *eae*, pero todavía están asociados con diarrea con sangre o SUH en humanos. (Nataro y Keper, 1998)

3.3.3.1.3.4.1.5 Plásmido pO157

Todas las cepas de O157: H7 altamente conservadas contienen un plásmido, designado pO157, que varía en tamaño de 93,6 a 104kb. Este plásmido también está presente en cepas de O26: H11 y está presente en la mayoría pero no en todas las cepas aisladas de humanos de *E. coli* productoras de Stx.

Se ha demostrado que un fragmento de 3,4 kb del plásmido, codifica la enterohemolisina y se desarrolla como una sonda para el diagnóstico de EHEC. Además de la enterohemolisina este plásmido codifica la catalasa-peroxidasa, cuya función es desconocida. Aunque también se ha sugerido que juega un posible papel de este plásmido en la supresión de la producción de un exopolisacárido. (Nataro y Keper, 1998)

3.3.3.1.3.4.2 Epidemiología

Las infecciones por EHEC pueden producirse como casos esporádicos o en brotes. En América del Norte, las infecciones por EHEC O157:H7 son más frecuentes desde el verano hasta el otoño. En el Reino Unido suelen producirse

desde fines de la primavera hasta fines del verano. La estacionalidad puede ser a causa de los patrones de expulsión estacionales en los animales o podría deberse a otros factores como la ingesta de carne asada mal cocida en el verano. Por el contrario, las infecciones por EHEC O157: H, que son más comunes en niños menores de 3 años, suelen observarse en invierno.

La incidencia anual estimada de EHEC O157:H7 que se informó en Escocia, Estados Unidos, Alemania, Australia, Japón y la República de Corea osciló desde el 0.08 a 4.1 cada 100.000 habitantes, con la mayor incidencia en Escocia. En EE. UU., los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC) calculan que, la causa aproximadamente 73.000 casos de enfermedad, 2.000 hospitalizaciones y de 50 a 60 muertes cada año. La prevalencia de la EHEC no-O157 en la enfermedad humana probablemente está subestimada, debido a que la mayoría de los laboratorios rutinariamente no realizan exámenes para detectar estos organismos. (Nataro y Keper, 1998)

Las EHEC se transmiten por vía fecal-oral. Se pueden propagar entre animales por contacto directo o a través de bebederos, alimento compartido, lugares de pastaje contaminados u otras fuentes ambientales. Las aves y las moscas son vectores potenciales. En un experimento, la EHEC O157:H7 se transmitió a través de aerosoles cuando la distancia entre cerdos, era como mínimo de 3m. Se cree que el organismo se pudo haber aerosolizado durante el lavado con alta presión, pero también pueden haber contribuido las conductas normales de alimentación y de arraigo.

Los huéspedes reservorios y la epidemiología pueden variar con el organismo. Los rumiantes, en especial el ganado bovino y las ovejas, son los reservorios más importantes de la EHEC O157:H7. Una pequeña proporción del ganado bovino en un rodeo puede ser responsable de la liberación de más del 95% de los organismos. Estos animales, que se denominan súper-propagadores, están colonizados en el recto terminal, y pueden permanecer infectados durante

más tiempo que otros bovinos. Los súper-propagadores también se pueden presentar en las ovejas. Los animales que no son reservorios habituales de la EHEC O157:H7 pueden funcionar como reservorios secundarios después del contacto con rumiantes. La EHEC O157:H7 se transmite principalmente a los humanos a través del consumo de alimentos y agua contaminados o por el contacto con animales, heces y suelo contaminado. La transmisión de persona a persona puede contribuir con la propagación de la enfermedad durante los brotes; sin embargo, los humanos no parecen ser huésped de mantenimiento de este organismo. La mayoría de los casos en humanos han estado vinculados con el contacto directo o indirecto con el ganado bovino, pero algunos han estado asociados con otras especies, entre ellas ovejas, cabras (leche de cabra no pasteurizada), cerdos (salame de cerdo seco fermentado), ciervos (venado), caballos, conejos y aves. Se calcula que la dosis infectiva para los humanos es inferior a 100 organismos y tan poco como 10. (Spickler et al., 2010).

Las epidemias de EHEC O157:H7 de origen alimentario generalmente son causadas por la ingesta de productos de origen animal mal cocidos o no pasteurizados, en especial, carne molida pero también otras carnes y embutidos, leche y queso no pasteurizados. Otros brotes han estado vinculados a la alfalfa o brotes de rábanos, lechuga, espinaca y otros vegetales contaminados, así como también sidra no pasteurizada. El agua de riego contaminada con heces es una fuente importante de EHEC O157:H7 en los vegetales. Este organismo se puede adherir a las plantas, y sobrevive bien en la superficie de una variedad de frutas, vegetales y hierbas culinarias frescas. De acuerdo con las condiciones ambientales, pequeñas cantidades de bacterias que permanecen en los vegetales lavados pueden multiplicarse de manera significativa durante varios días. La EHEC O157:H7 puede internalizarse en los tejidos de algunas plantas, entre ellas la lechuga, donde es posible que no sea susceptible al lavado. Las moscas de la fruta puede transmitir este organismo a las plantas, donde se pueden multiplicar en los tejidos dañados. La EHEC O157:H7 puede permanecer viable por largos periodos en muchos productos alimenticios. Puede sobrevivir durante al menos 9

meses en carne molida almacenada a -20 °C. Tolera la acidez y permanece infecciosa de semanas a meses en alimentos ácidos tales como la mayonesa, salchichas, sidra de manzana y queso cheddar a temperaturas de refrigeración, además, resiste a la desecación.

Algunos casos en humanos se producen por exposición a la tierra o al agua contaminada. Las EHEC generalmente se eliminan por el tratamiento del agua, pero estos organismos se pueden producir en los suministros de agua privados tales como pozos. Nadar en aguas contaminadas, especialmente lagos y arroyos, ha sido asociado con algunas infecciones. La contaminación del suelo ha provocado brotes en áreas para acampar y otros lugares, especialmente cuando el ganado había pastado en el sitio. El tiempo de supervivencia informado de la EHEC O157:H7 en el suelo contaminado varía de un mes a más de 7 meses. Este organismo también puede sobrevivir durante 2 meses o más tiempo en algunas fuentes de agua dulce, especialmente en temperaturas frías y puede permanecer viable durante 2 semanas en el agua de mar. Un estudio indicó que la EHEC O157:H7 se inactiva en el barro en 2 semanas, otro sugirió que puede sobrevivir hasta 3 meses. (Spickler et al., 2010).

La epidemiología de otros serotipos de la EHEC, es poco entendida. Los reservorios de la EHEC O26 pueden ser animales. Se han encontrado miembros de este serogrupo de *E. coli* en varias especies, entre ellas, bovinos, cerdos, ovejas, cabras, conejos y pollos. Habitualmente se encuentran en animales sanos así como también en animales con diarrea. Aunque no se conoce la fuente del organismo en muchos casos humanos, algunos brotes de EHEC O26 han sido de origen alimentario (productos derivados de la carne y leche no pasteurizada), asociados al contacto con animales o al agua contaminada con heces. También se ha informado la posible transmisión de persona a persona.

Rara vez se ha aislado la EHEC O157: H- de bovinos, caballos y estuvo ausente en más de 1.800 muestras fecales obtenidas de bovinos, ovejas, cabras y

venados en Alemania y la República Checa. Sin embargo, un brote tuvo origen alimentario (salchichas) y el contacto con una vaca y caballo infectados fueron las fuentes probables de infección en otro brote. Es posible que los humanos sean reservorios de este organismo. (Spickler et al., 2010).

3.3.3.1.3.4.3 Consideraciones clínicas

El periodo de incubación de la enfermedad causada por la EHEC O157:H7 varía de 1 a 16 días. La mayoría de las infecciones se manifiestan después de 3 a 4 días. Los humanos pueden infectarse de forma asintomática o pueden desarrollar diarrea acuosa, colitis hemorrágica y/o síndrome urémico hemolítico. La mayoría de los casos sintomáticos comienzan con diarrea. Algunos casos se resuelven sin tratamiento en aproximadamente una semana, otros evolucionan a colitis hemorrágica en unos días, que se caracteriza por diarrea con sangre profusa y visible, acompañada de distensión abdominal y en muchos casos, espasmos abdominales. Algunos pacientes presentan fiebre baja, en otros, la fiebre está ausente. Se pueden observar náuseas y vómitos y es posible la deshidratación. Muchos casos de colitis hemorrágica son autolimitantes y se resuelven en aproximadamente una semana. La colitis grave puede provocar necrosis intestinal, perforación o el desarrollo de estenosis en el colon.

El síndrome urémico hemolítico (SUH) se produce en 16% de los pacientes con colitis hemorrágica. Este síndrome es más frecuente en niños, ancianos y personas inmunodeprimidas. Generalmente se desarrolla una semana después del comienzo de la diarrea, cuando el paciente se está mejorando. En ocasiones, los niños desarrollan SUH sin diarrea prodrómica. Este síndrome se caracteriza por insuficiencia renal, anemia hemolítica y trombocitopenia. La importancia relativa de estos signos varía. Algunos pacientes con SUH presentan anemia hemolítica y/o trombocitopenia con poca o ninguna enfermedad renal, mientras que otros presentan enfermedad renal significativa pero sin trombocitopenia y/o hemólisis mínima. Son habituales los signos extrarrenales, incluso los

relacionados al sistema nervioso central con letargo, irritabilidad y convulsiones. En los casos más graves, pueden presentarse paresia, accidente cerebro vascular, edema cerebral o coma. Las complicaciones respiratorias pueden incluir derrame pleural, sobrecarga de líquidos y síndrome disneico en adultos. También se puede observar aumento de las enzimas pancreáticas o pancreatitis. La rabdomiólisis y el compromiso miocárdico son poco frecuentes. La forma del SUH que generalmente se observa en adultos, especialmente ancianos, en ocasiones se denomina púrpura trombocitopénica trombótica (PTT). En la PPT, habitualmente se produce menor daño renal que en los niños, pero son más comunes los signos neurológicos que incluyen accidente cerebro vascular, convulsiones y deterioro del SNC. La muerte se produce con mayor frecuencia en los casos con enfermedad extrarrenal grave con signos en el SNC. Aproximadamente el 65 u 85% de los niños se recupera del SUH sin daños permanentes; sin embargo, también se producen complicaciones renales crónicas que incluyen hipertensión, insuficiencia renal e insuficiencia renal en la etapa terminal. Son posibles, problemas extrarrenales residuales tales como diabetes mellitus insulino dependiente de forma transitoria o permanente, insuficiencia pancreática, complicaciones gastrointestinales o defectos neurológicos tales como disminución en la coordinación motora fina. (Spickler et al., 2010).

La transmisión de persona a persona se produce por la vía fecal-oral. La mayoría de las personas elimina EHEC O157:H7 durante aproximadamente 7 a 9 días; una minoría puede eliminar este organismo durante 3 semanas o más tiempo después de la aparición de los síntomas. En algunos casos, la eliminación puede continuar durante varios meses. Los niños pequeños suelen eliminar este organismo durante más tiempo que los adultos. La transmisión es común, en niños que aún usan pañales.

El tratamiento de la colitis hemorrágica es de sostén, y puede incluir líquidos y una dieta blanda. Los antibióticos son controvertidos y, generalmente, se los evita: aparentemente, no reducen los síntomas, no previenen las complicaciones

ni disminuyen la propagación, y pueden aumentar el riesgo de presentar SUH. El uso de agentes que disminuyen la motilidad (antidiarreicos) en la colitis hemorrágica también parece aumentar el riesgo de desarrollar SUH. Los pacientes con complicaciones pueden requerir cuidados intensivos, incluyendo diálisis, transfusión y/o infusión de plaquetas. Los pacientes que desarrollan insuficiencia renal irreversible pueden necesitar un trasplante de riñón. (Spickler et al., 2010).

3.3.3.1.3.4.4 Detección y diagnóstico

Cultivo (método directo): Se debe hacer con heces fecales recién emitidas en los primeros 6 días de la enfermedad. El aislamiento se hace en medio Mac Conkey con sorbitol, donde se observan las colonias blancas que indican la no utilización de este sustrato. Todas las cepas deben ser comprobadas por medio de estudios fisiológicos que son *E. coli* y posteriormente son enfrentadas al suero clasificador O157 para determinar el serogrupo.

Otro método utilizado es el de la determinación de Stx, que puede hacerse directamente a partir de filtrados de heces fecales o de colonias aisladas. Las técnicas a utilizar para este son el cultivo en células Vero para observar la citotoxicidad, la hibridación del ADN cromosomal, por la reacción de la polimerasa en cadena (PCR) o por el método de inmunoensayo enzimático (ELISA). La determinación del plásmido puede llevarse a cabo por medio de la hibridación del ADN o por PCR. La enterotoxina alfa es posible detectarla por anticuerpos monoclonales o por ELISA y la beta, utilizando placas de agar-sangre de carnero lavada. La adherencia se detecta por la inoculación de EHEC en cepas HEp-2 y se observa la adherencia localizada características. La fluorescencia puede determinarse por el uso de medios especiales, así como la presencia de actina por coloraciones fluorescentes y el uso de la microscopía electrónica. Entre los métodos indirectos se han descrito la determinación de anticuerpos utilizando sueros pareados contra los antígenos O y la determinación de antitoxina contra VT.

3.3.3.1.3.5 *Escherichia coli* enteroagregativa

Escherichia coli enteroagregativa (EAEC), ha sido reconocida como agente causal de la diarrea en los países en desarrollo y (más recientemente) en los países industrializados. EAEC fue asociada con la diarrea infantil y del viajero en México y Santiago, Chile, donde se examinaron las propiedades de adherencia de cepas *E. coli* aisladas de niños infectados en células HEp-2; por este método se pudo observar la adherencia agregativa de estas cepas (Nataro y Keper, 1998); que se distinguió por la autoaglutinación prominente de las células bacterianas entre sí en una organización de «ladrillos apilados» (Murray et al., 2007). Este proceso está mediado por unas fimbrias formadoras de haces (fimbrias de adherencia agregativa I y II), las cuales son codificadas por un plásmido.

EAEC estimula la secreción de mucosidad, que atrapa a las bacterias en una biopelícula que recubre el epitelio del intestino delgado. Se observa acortamiento de las microvellosidades, infiltración mononuclear y hemorrágica. El diagnóstico de estas infecciones se restringe fundamentalmente a los laboratorios de investigación. Desde el punto de vista fisiológico muestran las mismas características del género *Escherichia*, que no producen toxinas ni LT ni ST y que se adhieren a las células HEp-2 con un patrón autoagregativo. (Nataro, 1998)

3.3.3.1.3.5.1 Patogénesis

Los mecanismos patogénicos de esta clase de *E. coli* no están bien definidos, no obstante, la lesión histopatológica que produce y sus factores de virulencia son muy conocidos. Estas cepas producen un aumento del moco, el cual atrapa a la bacteria en una biopelícula moco-bacteria. El papel del moco ha sido bien definido, sin embargo, la formación de esta biopelícula puede estar relacionada con el poder de esta bacteria para ocasionar diarrea y con su habilidad para producir colonizaciones persistentes y diarrea. Además, se han señalado efectos citotóxicos en la mucosa intestinal, y se ha demostrado

acortamiento de las microvellosidades, necrosis hemorrágica y una respuesta inflamatoria moderada con edema e inflamación de la submucosa con mononucleares. Por microscopía electrónica se ha demostrado que no existe alteración de la arquitectura de las microvellosidades sin invasión del enterocito; tampoco se detecta el efecto de adhesión y borrado (A/E). Se ha observado en algunas cepas un efecto citotoxigénico relacionado con genes codificados por un plásmido. Se identificaron dos proteínas de alto peso molecular de cepas EAEC, aisladas de niños que murieron de diarrea persistente. Estas proteínas fueron probadas en asa ligada de rata observándose vellosidades cortas, hemorragia y necrosis. El gen para una de estas proteínas se encontró en un plásmido de 65 MDa y a la proteína se le dio el nombre de Pet (plasmid-encoded toxin) la cual tiene la capacidad de producir efecto citopático en células HEp-2, caracterizado por arredondamiento y desprendimiento de las células así como contracción del citoesqueleto y pérdida de fibras de actina. En EAEC se ha descrito también la proteína Pic que está codificada en el genoma y que tiene actividad de proteasa (Nataro, 1998)

La adherencia de esta clase de *E. coli* se relaciona con una estructura fimbrial de 2 nm a 3 nm de diámetro denominada fimbria I de adherencia agregativa (AAF/I) y otra estructura fimbrial llamada fimbria II (AAF/II), la colonización intestinal de la EAEC parece estar mediado por una o más de varios diferentes antígenos de las fimbrias. En algunas cepas EAEC, la adherencia agregativa (AA) puede deberse a factores distintos de las fimbrias AAF. Una proteína de membrana externa afimbrial o una proteína de 38 kDa de membrana externa puede ser responsable de AA en algunas cepas.

3.3.3.1.3.5.1.1 Adherencia mediada por fimbrias

Consiste en la adhesión inicial a la mucosa intestinal y la capa de moco, lo que la adhesión inicial es aparentemente mediado por las fimbrias AAF.

3.3.3.1.3.5.1.2 Aumento de la producción de moco

Comprende el aumento en la producción de moco, aparentemente conduce al depósito de un grueso biofilm de moco que se incrusta con EAEC. Esto puede promover la colonización persistente y mala absorción de nutrientes.

3.3.3.1.3.5.1.3 Actividad citotóxica

Consiste en la secreción de proteínas con actividades enterotóxica / citotóxicas que causan alteraciones histopatológicas. EAEC es capaz de segregar dos proteínas autotransportadoras. Los individuos desnutridos son incapaces de reparar el daño de la mucosa y por lo tanto pueden llegar a ser propensos al síndrome de la diarrea persistente. El lugar de colonización del intestino aun no ha sido claramente demostrado, aunque en estudios experimentales se ha observado tanto en el intestino delgado como en el grueso.

3.3.3.1.3.5.1.1.1 Proteína Pic

Como se mencionó anteriormente EAEC tiene como característica en su mecanismo de patogenicidad la capacidad de incrementar en la mucosa la producción y secreción de moco que atrapa a las bacterias que se autoaglutinan en una biopelícula en el epitelio intestinal. En EAEC se encontró una proteína de 116 kDa denominada Pic, esta proteína participa en la colonización intestinal, debido a su actividad biológica, Pic se pueden encontrar en EAEC, UPEC (*E. coli* uropatógena), y *Shigella flexneri*. Pic además de la actividad mucinolítica debido a su acción de serina proteasa, también es capaz de provocar hipersecreción de moco y un incremento en el número de células que producen mucosidad. También se ha demostrado que Pic tiene entre sus actividades biológicas, actividad proteolítica, lo que podría promover la permanencia de EAEC en el intestino. Pic es capaz de degradar el moco intestinal y submaxillar; este efecto depende de su

atribución de serina proteasa. Pic no produce efectos citotóxicos en las células HEp-2. (Gutiérrez, 2010)

3.3.3.1.3.5.2 Epidemiología

Un número creciente de estudios han apoyado la asociación de la EAEC con diarrea en las poblaciones en desarrollo, lo más prominente posible en asociación con diarrea persistente. En varios de estos estudios, EAEC cultivadas a partir de las heces durante los primeros días de la diarrea es un factor predictivo de una mayor duración de la enfermedad.

En el subcontinente indio, cinco estudios independientes han sido publicados que demuestran la importancia de la EAEC en la diarrea infantil. Estos estudios incluyen pacientes hospitalizados con diarrea persistente, los pacientes ambulatorios que acuden a dispensarios de salud y casos esporádicos de diarrea detectados durante la vigilancia del hogar.

EAEC se ha implicado en el 68% de los casos de diarrea persistente, que representan una parte desproporcionada de la mortalidad por diarrea. EAEC también ha sido implicada como causa de diarrea esporádica en México, Chile, Bangladesh, e Irán. (Nataro y Keper, 1998)

Aunque la mayoría de los informes han implicado en la EAEC diarrea endémica esporádica, un número creciente de informes han descrito brotes por esta variante patógena. Se han descrito dos brotes de diarrea persistente EAEC que se produjeron en el pabellón de la desnutrición de un hospital de la Ciudad de México, se encontró que los bebés que murieron en estos brotes desarrollaron lesiones necróticas de la mucosa del íleo. Y también se han reportado cuatro brotes de diarrea EAEC en el Reino Unido en 1994. Los pacientes en estos brotes experimentaron vómito y diarrea, generalmente sin fiebre. La diarrea persistente se produjo en un pequeño número de pacientes. Y se ha informado de que al

menos tres brotes de diarrea en el Reino Unido que se atribuyeron a EPEC en realidad se debían a cepas EAEC. En los Estados Unidos, EAEC se ha relacionado con la diarrea en los humanos infectados por el virus de inmunodeficiencia, sin embargo, el papel preciso de EAEC en la diarrea de los pacientes con SIDA es desconocido. (Nataro y Keper, 1998)

Quizás aún más significativo que la asociación de la EAEC con diarrea persistente son los datos de Brasil y Australia que relacionó EAEC con el retraso del crecimiento en los niños. En cada uno de estos estudios, el aislamiento de la EAEC de las heces de los bebés estaba asociada con una baja puntuación de la altura y / o el peso, independientemente de la presencia de síntomas de diarrea. (Nataro y Keper, 1998)

3.3.3.1.3.5.2.3 Consideraciones clínicas

Las características clínicas de la diarrea EAEC cada vez están mejor definidas. Esta enfermedad típicamente se manifiesta por una diarrea acuosa, secreción de mucosa, con fiebre baja y poco o nada de vómito. Sin embargo, hasta un tercio de los pacientes con diarrea EAEC han tenido heces con sangre macroscópica, este resultado puede ser independiente de la cepa. El periodo de incubación puede ser de 8 a 18 horas. La duración de la diarrea EAEC es su característica más llamativa, en un estudio de vigilancia en el norte de India, la duración media de los casos de diarrea asociada a EAEC en niños menores de 3 años de edad fue de 17 días. En un gran porcentaje de los pacientes se ha detectado la presencia de lactoferrina fecal como indicador leucocitario. (Nataro y Keper, 1998)

3.3.3.1.3.5.4 Detección y diagnóstico

Se basa en el aislamiento de estas cepas a partir de las heces de pacientes y la demostración del patrón autoagregativo en células HEp-2. Se puede aplicar la

hibridación de ADN del plásmido que portan estas cepas, el estudio de PCR y otras técnicas como son: la formación de película en cultivo en caldo de Mueller-Hinton, así como en tubos o placas de poliestireno con Giemsa.

3.3.3.1.3.6 *Escherichia coli* de adherencia difusa

El término "*E. coli* difusamente adherente" (DAEC) se utilizó inicialmente para referirse a cualquier cepa de *Escherichia coli* con adherencia en HEp-2 que no forman microcolonias como EPEC. Con el descubrimiento de la EAEC, la mayoría de los autores reconocen ahora DAEC como una categoría independiente de *E. coli* potencialmente diarreogénica. (Nataro y Keper, 1998)

3.3.3.1.3.6.1 Patogénesis

Se sabe poco de su mecanismo de patogenicidad pero se ha caracterizado una fimbria de superficie, conocida como F1845, involucrada en el fenómeno de adherencia difusa. Los genes que codifican para esta fimbria se pueden encontrar en el cromosoma o en un plásmido.

Al realizar ensayos in vitro en células CaCo y HEp-2, las cepas DAEC tienen la capacidad de inducir la formación de estructuras protuberantes, semejantes a dedos, las cuales confieren protección a las bacterias, pero la presencia de dichas estructuras no se ha demostrado in vivo.

3.3.3.1.3.6.2 Epidemiología

El grupo DAEC se puede aislar tanto de personas sanas como de personas con diarrea, siendo más importante en niños de 4 a 5 años. Otras características epidemiológicas, tales como el modo de adquisición de la infección DAEC, también están todavía por determinar. Se ha demostrado que las cepas DAEC cuentan con una gran proporción de casos de diarrea entre los pacientes

hospitalizados en Francia que no tienen otros enteropatógenos identificados. Este informe sugiere que las cepas DAEC pueden ser importantes patógenos de diarrea en el mundo desarrollado. (Nataro y Keper, 1998)

3.3.3.1.3.6.3 Consideraciones clínicas

Pocos estudios epidemiológicos o clínicos permiten una descripción adecuada del síndrome clínico asociado con la infección DAEC. En un estudio, la mayoría de los pacientes infectados con DAEC tenía diarrea acuosa sin sangre o leucocitos fecales. (Nataro y Keper, 1998)

3.3.3.1.3.6.4 Detección y diagnóstico

Las cepas DAEC se identifican por la presencia del patrón de adherencia difusa en el ensayo de adherencia HEp-2. La hibridación con sondas derivadas de un fragmento del gen *daaC*, que codifica para la fimbria F-1845, también se ha empleado para el diagnóstico pero puede presentar falsos positivos y el diagnóstico empleando PCR aún no se ha desarrollado. (Rodríguez-Ángeles, 2002).

4.1.2 Población

La población total del municipio es de 10 870 habitantes, 5 399 son hombres y 5 471 mujeres. En el municipio habitan un total de 4 548 personas que hablan alguna lengua indígena (INEGI, 2010); el rezago social de esta población es alto y la situación de pobreza es del 93.90% de la población total en el municipio existiendo pobreza moderada 41.50% y pobreza extrema 52.40% (CEIEG, 2011).

4.1.3 Salud

La Tasa de Mortalidad General (TMG) en 2010 fue de 3.86 defunciones por cada 1,000 habitantes; y de 35.15 con respecto a la Tasa de Mortalidad Infantil (TMI). A nivel estatal correspondió 3.94 y 23.89 respectivamente (INEGI, 2010); las principales causas de mortalidad general en el municipio son: enfermedades infecciosas intestinales, tumores malignos, insuficiencia renal, ciertas afecciones originadas en el periodo perinatal y accidentes (INAFED, 2005).

4.1.4 Vivienda

En el año 2010 habían 2,364 viviendas particulares habitadas. En promedio cada vivienda la ocupan 4.59 habitantes. Los materiales predominantes en los pisos de las viviendas son 21.15% de tierra; 76.48% de cemento; el 96.11% de las viviendas disponen de energía eléctrica, 93.36% de agua entubada y el 92.17% cuentan con drenaje. En el estado los indicadores fueron, para energía eléctrica 95.87%, agua entubada 78.14% y drenaje 83.37% (CEIEG, 2011).

4.1.5 Vías de comunicación

De acuerdo al inventario de la Secretaría de Comunicaciones y Transportes, el municipio en el año 2000 contaba con una red carretera de 44.23 km integrados principalmente por la red de la Comisión Estatal de Caminos (21.30

km) y a caminos rurales construidos por las Secretarías de Obras Públicas, Desarrollo Rural, Defensa Nacional, la Comisión Nacional del Agua, entre otras. La red carretera del municipio representa el 2.20% de la región (INAFED, 2005).

4.1.6 Actividad económica

La Población Económicamente Activa (PEA) en el año 2010 fue de 3,112 habitantes. (INEGI, 2010). Distribuyéndose por sector, de la siguiente manera: Sector Primario, el 74.75% realiza actividades agropecuarias. El porcentaje de este sector en los ámbitos regional y estatal fue de 60.40% y 47.25% respectivamente. Sector Secundario, el 5.27% de la PEA ocupada laboraba en la industria de la transformación, mientras que en los niveles regional y estatal los porcentajes fueron de 11.77% y 13.24% respectivamente. Sector Terciario, el 18.37% de la PEA ocupada se emplea en actividades relacionadas con el comercio o la oferta de servicios a la comunidad, mientras que en los niveles regional y estatal el comportamiento fue de 25.69% y 37.31% respectivamente (INAFED, 2005).

En la percepción de ingresos, en el municipio, se tienen los siguientes resultados: el 45.82% de los ocupados en el sector primario no perciben ingresos y sólo 0.53% reciben más de cinco salarios. En el sector secundario, 20.50% no perciben salario alguno, mientras que 0.62% reciben más de cinco. En el terciario, 40.11% no reciben ingresos y el 3.39% obtienen más de cinco salarios mínimos de ingreso mensual (INAFED, 2005).

4.2 Chanal

4.2.1 Localización

El municipio colinda al Norte con el municipio de Oxchuc al Este con Altamirano y las Margaritas, al Sur con Comitán de Domínguez, San Cristóbal y Amatenango del Valle y al Oeste con Huixtán.

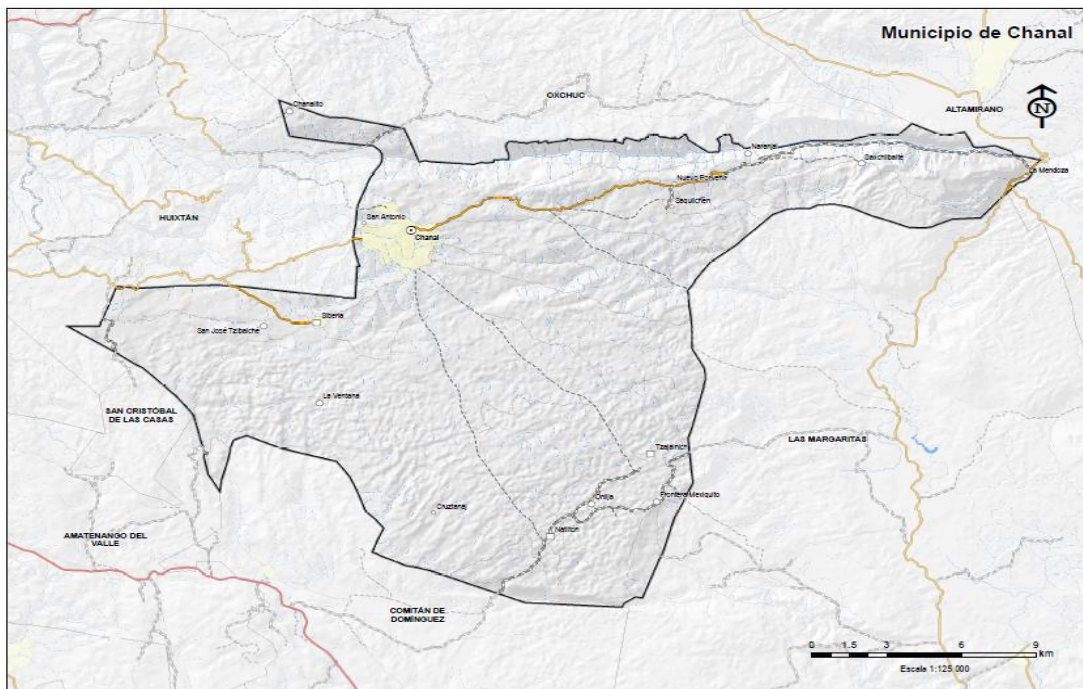


Figura 4. Estado de Chiapas- Chanal (CEIEG, 2011)

Las coordenadas geográficas de la cabecera municipal son: $16^{\circ} 39' 37''$ de latitud al Norte y $92^{\circ} 15' 27''$ de longitud Oeste y se ubica a una altitud de 2 087 metros sobre el nivel del mar (CEIEG, 2011).

4.2.2 Población

La población total del municipio es de 10 817 habitantes, el 49.70% son hombres y 50.30% son mujeres; un total de 9 638 habitantes hablan alguna lengua indígena (INEGI, 2010); Chanal sufre de un rezago social alto y la población que

se encuentra en situación de pobreza es del 96.10% siendo la pobreza extrema la predominante con 69.10% (INEGI, 2010).

4.2.3 Salud

La población derechohabiente a servicios de salud es de 9 112, perteneciendo la mayoría al seguro popular ocupando un 94.51% de la población derechohabiente; la Tasa de Mortalidad General (TMG) en el 2010 fue de 5.05 defunciones por cada 1,000 habitantes, y de 30.12 la Tasa de Mortalidad Infantil. A nivel estatal fue de 3.94 y 23.89 respectivamente (INEGI, 2010); las principales causas de la mortalidad general en el municipio son: accidentes, tumores malignos, desnutrición, diabetes mellitus, enfermedades del hígado, enfermedades infecciosas intestinales (INAFED, 2005).

4.2.4 Vivienda

En el año 2010 habían 1 783 viviendas particulares habitadas (INEGI, 2010). En promedio cada vivienda la ocupan 6.09 habitantes y la tasa de crecimiento es de 3.89. Los materiales predominantes en los pisos de las viviendas son 18.17% de tierra y 81.04 % de cemento y firme (CEIEG, 2011); el 94.41% de las viviendas disponen de energía eléctrica, 54.577% de agua entubada y el 11.85% cuentan con drenaje. En el Estado 95.87%, 78.141% y 83.37% respectivamente (CEIEG, 2011).

4.2.5 Vías de comunicación

Para atender la demanda del servicio de comunicación, este municipio dispone de una oficina postal, así como de una red telefónica con servicio estatal, nacional e internacional. De acuerdo al inventario de la Secretaría de Comunicaciones y Transportes, el municipio en el año 2000 contaba con una red carretera de 65.8 km. Integrados principalmente por la red de la Comisión Estatal

de Caminos (49.10 km.) y a caminos rurales construidos por las Secretarías de Obras Públicas, Desarrollo Rural, Defensa Nacional, la Comisión Nacional del Agua, entre otras. La red carretera del municipio representa el 3.10% de la región (INAFED, 2005).

4.2.6 Actividad económica

La Población Económicamente Activa (PEA) ocupada fue de 2,715 habitantes, en el año 2010 (CEIEG, 2011); en la percepción de ingresos, en el municipio, se tienen los siguientes resultados: el 85.48% de los ocupados en el sector primario no perciben ingresos. En el sector secundario, 18.52% no perciben salario alguno. En el terciario, 33.72% no reciben ingresos y el 1.16% obtienen más de cinco salarios mínimos de ingreso mensual; en este mismo rubro, la región reporta los siguientes datos: 45.16% de la PEA ocupada en el sector primario no recibe salario alguno y 0.43% recibe más de cinco salarios. En el sector secundario, 13.26% no percibe ingresos por su actividad, mientras que sólo 2.00% percibe más de cinco salarios. En el terciario, 5.78% no recibe ingresos y 11.72% más de cinco salarios mínimos mensuales de ingreso, por su actividad.

La distribución de ingresos de la PEA en el Estado reporta que el 40.66% del sector primario no recibe salario alguno y sólo 0.76% recibe más de cinco salarios mínimos. En el sector secundario, 6.63% no percibe ingresos y 4.46% recibe más de cinco salarios. En el terciario, 5.73% no recibe ingresos y el 11.98% obtiene más de cinco salarios mínimos (INAFED, 2005).

5 METODOLOGÍA

Las cepas clínicas de *Escherichia coli* analizadas, fueron aisladas previamente a este trabajo en el laboratorio de Biología Molecular y Genética de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas; dichas cepas fueron aisladas de heces de niños y niñas habitantes de los municipios de Chanal y Pantepec, con una edad de entre cero y cinco años.

Durante la recolección de heces, se tomaron datos antropométricos como edad y peso para cada uno de los niños (as) con el fin de llevar a cabo el análisis nutricional.

5.1 Reactivación de cepas de *Escherichia coli*

Cada una de las 81 cepas clínicas de *Escherichia coli* fue resembrada por el método de estría cruzada en caja petri con agar nutritivo y se incubó a 37°C durante 24 horas.

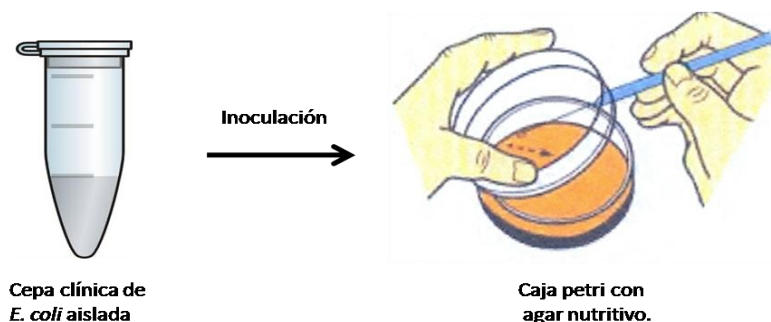


Figura 5. Reactivación de cepas clínicas

5.2 Extracción de ADN

La extracción de ADN se realizó por medio de lisis bacteriana; para lograr esto, se preparó en un tubo de 1.5 ml (Eppendorf) estéril la dilución de una sola

UFC de *E. coli* clínica anteriormente sembrada en 1 ml de agua deionizada (milliQ); y por último se hirvió durante 1 minuto a baño María.

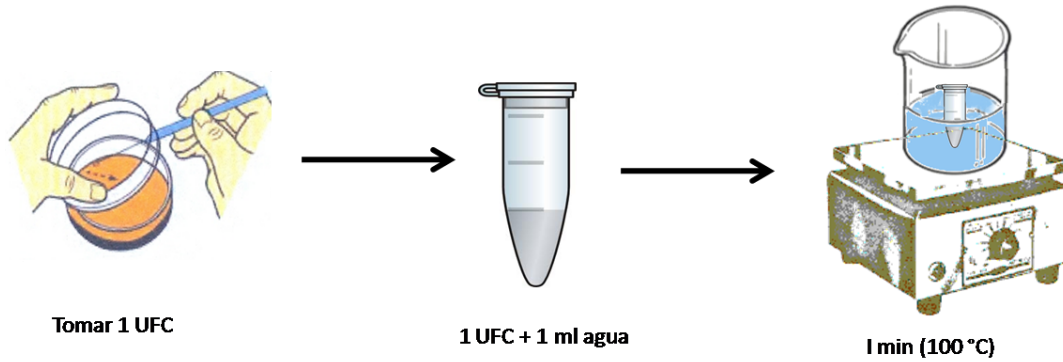


Figura 6. Extracción de ADN

5.3 Amplificación de genes

Mediante el uso de 2 técnicas diferentes de PCR múltiple se amplificaron los genes de *E. coli* diarreogénica de cada una de las cepas clínicas de *E. coli*; es decir, a cada una de las cepas obtenidas de Pantepec y Chanal se le realizaron 2 PCR múltiples diferentes.

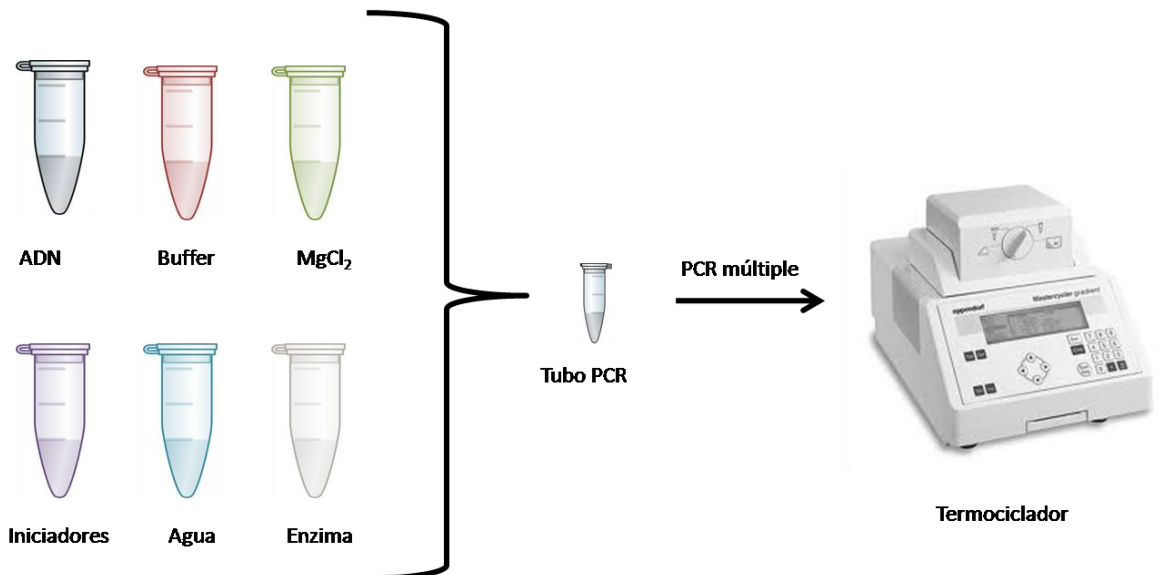


Figura 7. Amplificación de genes

5.3.1 PCR múltiple A

Durante el PCR “A” se buscó la presencia de los genes *aap*, *aggR* y *AA*, correspondientes a EAEC. Para poder realizar esta PCR se hizo la mezcla de componentes conforme a la tabla 5, en un tubo PCR en condiciones de esterilidad. A continuación se colocó dentro del termociclador con las siguientes condiciones: 50°C (2 min, 1 ciclo); 95°C (5 min, 1 ciclo); 95, 55 y 72°C (45 seg cada temperatura, 40 ciclos). (Cerna et al., 2003)

Tabla 5. Componentes de la mezcla PCR.

| REACTIVO | TUBO PCR [25µL] | CONCENTRACIÓN FINAL |
|------------------------|-----------------|---------------------|
| Buffer 10X | 2.5 µL | 1X |
| MgCl ₂ 50mM | 1.0 µL | 0.2 Mm |
| dNTP´s 2.5 mM | 2.0 µL | 1.5 Mm |
| Mezcla primers 100µM | 3.5 µL | |
| Taq polimerasa 5 U/µl | 0.2 µL | 1-2.5 U |
| Agua miliQ | 13.8µL | |
| ADN muestra | 2.0 µL | |

5.3.2 PCR múltiple B

Con el PCR “B” se buscó la presencia de los genes *ea*e y *bf*p de EPEC, *lt* y *st* de ETEC, *ial* de EIEC y *stx1* y *stx2* de STEC. Siguiendo las indicaciones de PCR “A” se hizo la misma mezcla de la tabla 5 sin embargo las condiciones dentro del termociclador fueron las siguientes: 50°C (2 min, 1 ciclo); 95°C (5 min, 1 ciclo); 95, 50 y 72°C (45 seg cada temperatura, 40 ciclos) y una extensión final de 72°C (10 min). (López-Saucedo et al., 2003)

5.4 Análisis de ADN amplificado

Para el análisis de ADN amplificado se realizaron electroforesis en gel de agarosa 2.5% en TAE 1X a 90 volts durante 40 minutos; se cargaron en cada pozo del gel 4 μ L de los productos amplificados por PCR A y B; como regulador para el corrimiento se usó buffer TAE 1X; luego del corrimiento electroforético, el gel fue teñido con bromuro de etidio 0.5 μ g/mL durante 15 min y se expuso en un transiluminador de luz UV.

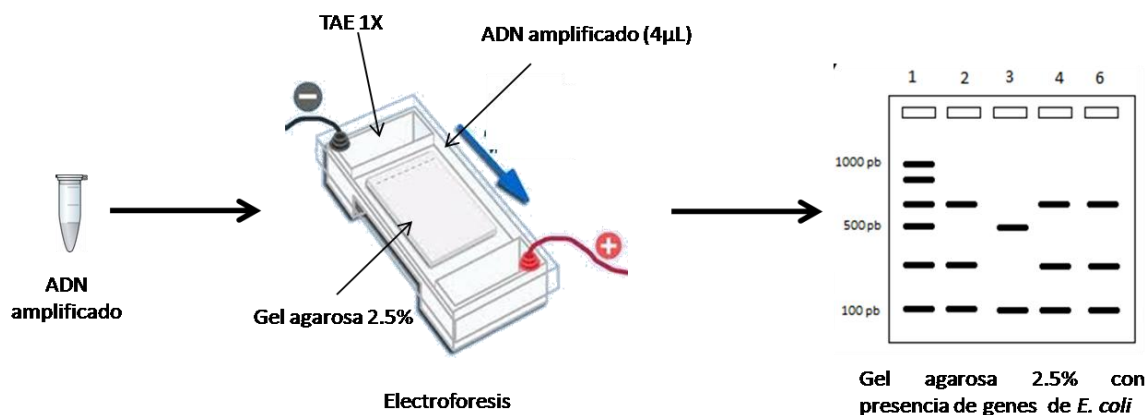


Figura 8. Análisis de ADN amplificado

5.5 Obtención de proteínas totales bacterianas

Se incubaron las cepas clínicas positivas a genes plasmídicos de EAEC en caldo LB a 37°C durante 24 h. Después, se separó el paquete bacteriano del sobrenadante mediante centrifugación a 2500 rpm durante 5 min; posteriormente se transfirieron a un tubo de 1.5 ml 1350 μ L del sobrenadante más 150 μ L de ácido tricloroacético (TCA) al 100% y se incubó en hielo a 4°C durante 10 horas.

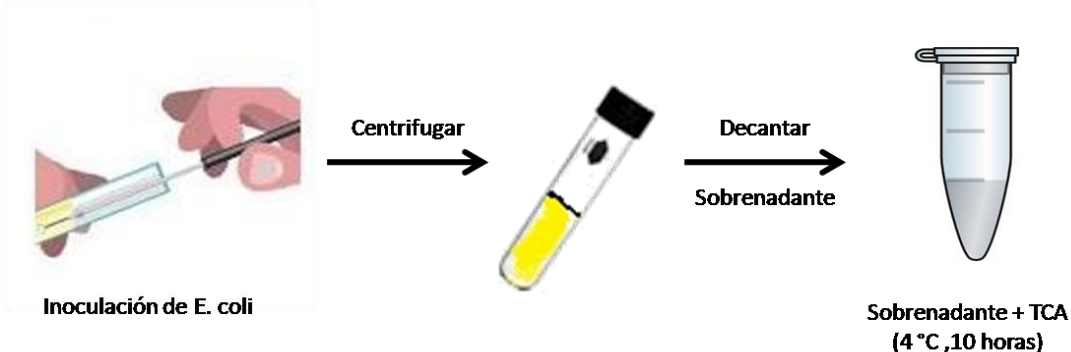


Figura 9. Proteínas totales 1

A continuación se centrifugó a 14,000 rpm a 4°C por 20 min; se desechó el sobrenadante y se efectuaron 2 lavados con 500 µl de acetona fría centrifugando a 14,000 rpm a 4° C durante 5 min, se decantó la acetona y se dejó secar. El paquete obtenido se disolvió en 50 µL de Tris-HCl 1 M pH 8.8 y el precipitado proteico se conservó a -20°C.

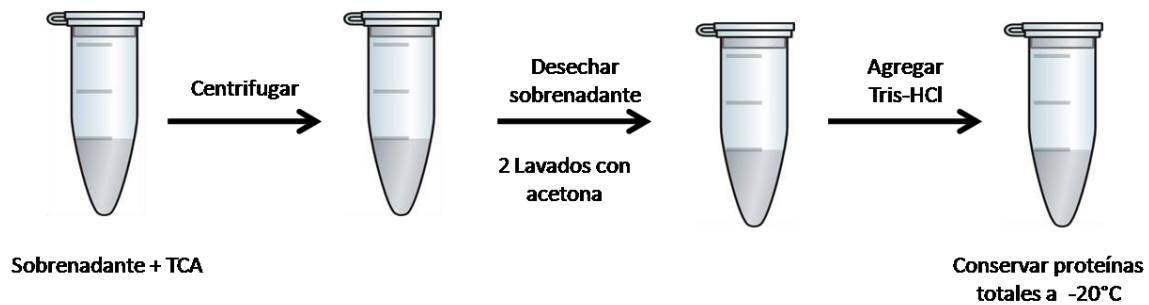


Figura 10. Proteínas totales 2

5.6 Análisis de proteínas

A las proteínas bacterianas obtenidas anteriormente se les agregó 10 µL de buffer de corrida con β-mercaptoetanol y se hirvieron durante 10min. Para separar las proteínas, éstas se sometieron a electroforesis en un gel de poliacrilamida 10% a 60 volts durante 30min con regulador de corrida 1X.

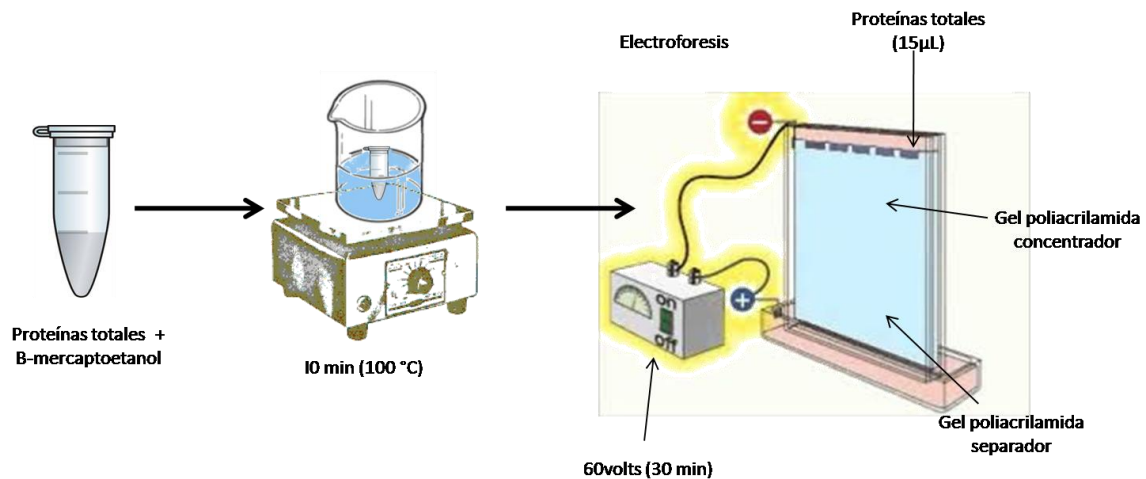


Figura 11. Análisis de proteínas.

El gel de poliacrilamida tenía un gel separador en la parte inferior y otro concentrador en la parte superior, el primero se hizo como lo indica la tabla 6 y el siguiente como dice la tabla 7. El gel separador se preparó y colocó primero en la cámara ensamblada de electroforesis y ya gelificado se procedió a colocar el otro gel al que se le colocó el peine, este peine formó los pozos donde las muestras se colocaron. El gel separador quedó 1 cm por debajo de donde llegan los bordes del peine.

Tabla 6. Componentes de gel separador

| REACTIVO | VOLUMEN |
|--|----------------|
| Buffer Tris-Cl/SDS pH 8.8 | 3.00 ml |
| Solución acrilamida-bisacrilamida 29.2% y 0.8% | 3.96 ml |
| Agua destilada | 5.08 ml |
| TEMED 8.4% | 0.06 ml |
| Persulfato de amonio 12.5% | 0.12 ml |

Tabla 7. Gel concentrador

| REACTIVO | VOLUMEN |
|-----------------------------------|----------------|
| Buffer Tris-Cl/SDS pH 6.8 | 1.00 ml |
| Solución acrilamida-bisacrilamida | 1.50 ml |
| Agua desionizada | 3.00 ml |
| TEMED 8.4% | 0.04 ml |
| Persulfato de amonio 12.5% | 0.08 ml |

5.7 Western blot

Una vez separadas las proteínas, éstas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa en una condición húmeda a 253 mA a 4°C durante 50 min con buffer de transferencia. Para que la transferencia se llevara a cabo se colocó el cassette de western blot como lo indica la figura 7.

- 1.-Fibra de soporte
- 2.-Papel filtro (whatman 3mm)
- 3.-Gel de poliacrilamida 10%
- 4.- Membrana
- 2.- Papel filtro (whatman 3mm)
- 1.-Fibra de soporte

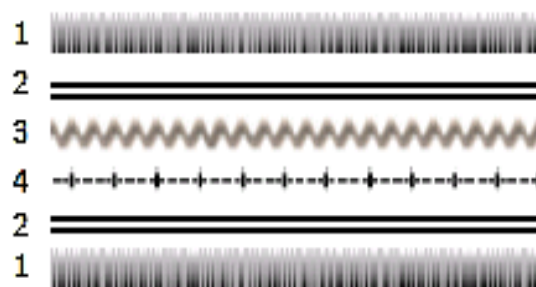


Figura 12. Ensamble del cassette para la técnica de Western blot.

Cuando la transferencia terminó, se tomó solo la membrana de nitrocelulosa y se colocó en leche 5% en PBS-T a 4°C durante una noche (15 horas aproximadamente).

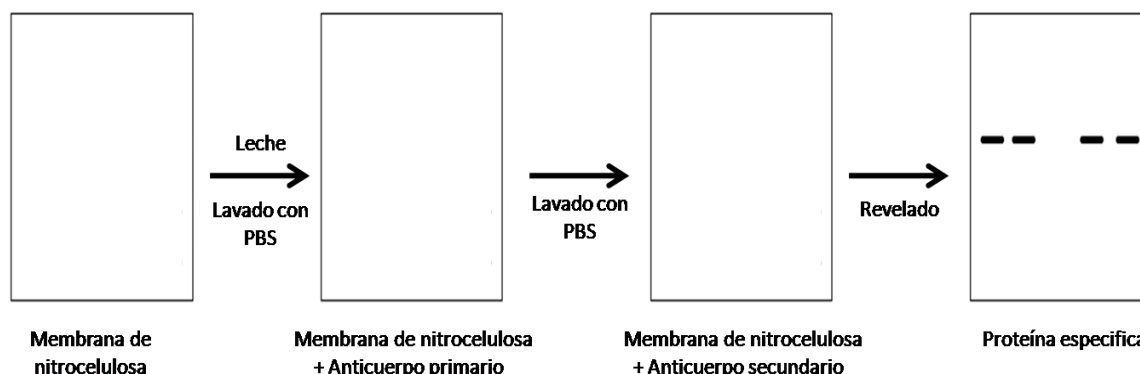


Figura 13. Western blot

Se continuó desechando la leche 5% y se añadieron anticuerpos anti-Pic (2.5 mg/ml) 1:500 en PBS-T por 2 horas en agitación lenta. Después la membrana se lavó 3 veces con PBS-T durante 5 min. Inmediatamente se incubó con el anticuerpo secundario 1:3000 (IgG acoplado a fosfatasa alcalina) en agitación lenta por 1 hora. Enseguida se hicieron 3 lavados como se hizo anteriormente.

Por último se hizo el revelado de la membrana con la solución descrita en la tabla 8, esta solución se dejó 5 min aproximadamente, para poder visualizar la proteína buscada en este caso proteína Pic; para detener el proceso de revelación se agregó agua destilada.

Tabla 8. Revelador de Western blot

| REACTIVO | VOLUMEN |
|--|----------------|
| TrisHCl 1M pH 9.5 | 1000 µL |
| NaCl 5M | 200 µL |
| MgCl ₂ 1M | 50 µl |
| H ₂ O cbp | 8657 µL |
| NTB (nitro-blue tetrazolium chloride) | 30 µl |
| BCIP(5-bromo-4-chloro-3'- indolyphosphate p-toluidine salt) | 33 µl |

6 RESULTADOS

Las cepas clínicas de *E. coli* analizadas corresponden a niños (as) con una edad de entre 0 y 5 años, en la tabla 9 y 10 se presentan los nombres asignados para cada una de las cepas aisladas; correspondiendo 40 cepas clínicas en total para Pantepec y 41 para Chanal.

Tabla 9. Cepas de Pantepec

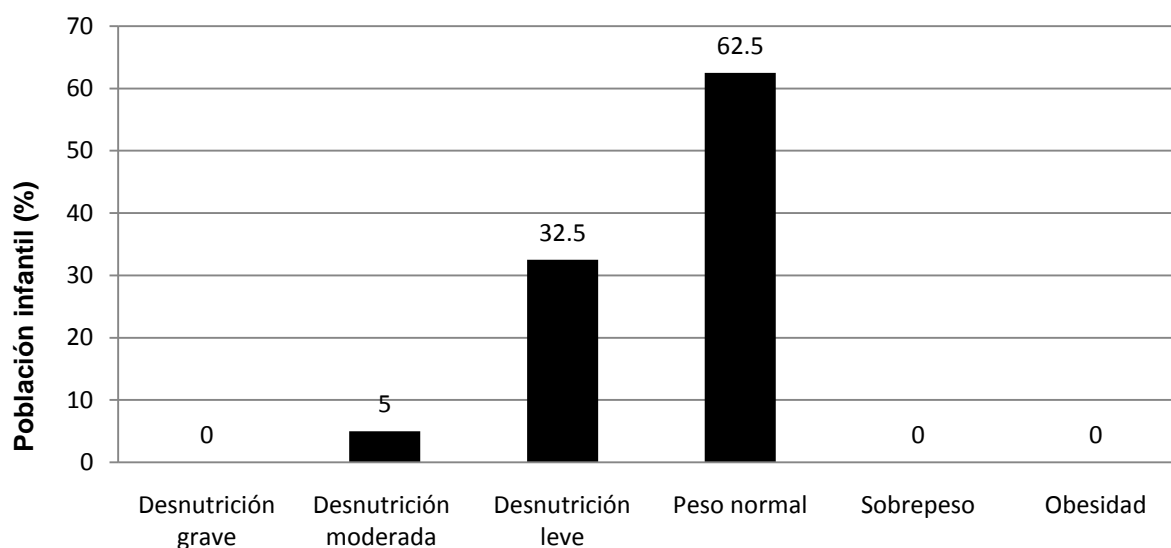
Tabla 10. Cepas de Chanal

| CEPA | CEPA | CEPA | CEPA |
|-------------|-------------|-------------|-------------|
| PAN 001 | PAN 028 | CHA 001 | CHA 031 |
| PAN 003 | PAN 029 | CHA 002 | CHA 032 |
| PAN 004 | PAN 030 | CHA 005 | CHA 033 |
| PAN 005 | PAN 031 | CHA 007 | CHA 034 |
| PAN 006 | PAN 032 | CHA 013 | CHA 035 |
| PAN 007 | PAN 033 | CHA 014 | CHA 036 |
| PAN 008 | PAN 034 | CHA 015 | CHA 037 |
| PAN 009 | PAN 036 | CHA016 | CHA 038 |
| PAN 010 | PAN 037 | CHA 017 | CHA 039 |
| PAN 011 | PAN 039 | CHA 019 | CHA 040 |
| PAN 013 | PAN 040 | CHA 020 | CHA 041 |
| PAN 014 | PAN 041 | CHA 021 | CHA 044 |
| PAN 015 | PAN 066 | CHA 022 | CHA 046 |
| PAN 016 | PAN 067 | CHA 023 | CHA 047 |
| PAN 017 | PAN 068 | CHA 024 | CHA 048 |
| PAN 018 | PAN 073 | CHA 025 | CHA 049 |
| PAN 020 | PAN 077 | CHA 026 | CHA 050 |
| PAN 021 | PAN 079 | CHA 027 | CHA 052 |
| PAN 022 | PAN 080 | CHA 028 | CHA 053 |
| PAN 026 | PAN 089 | CHA 029 | CHA 055 |
| | | CHA 030 | |

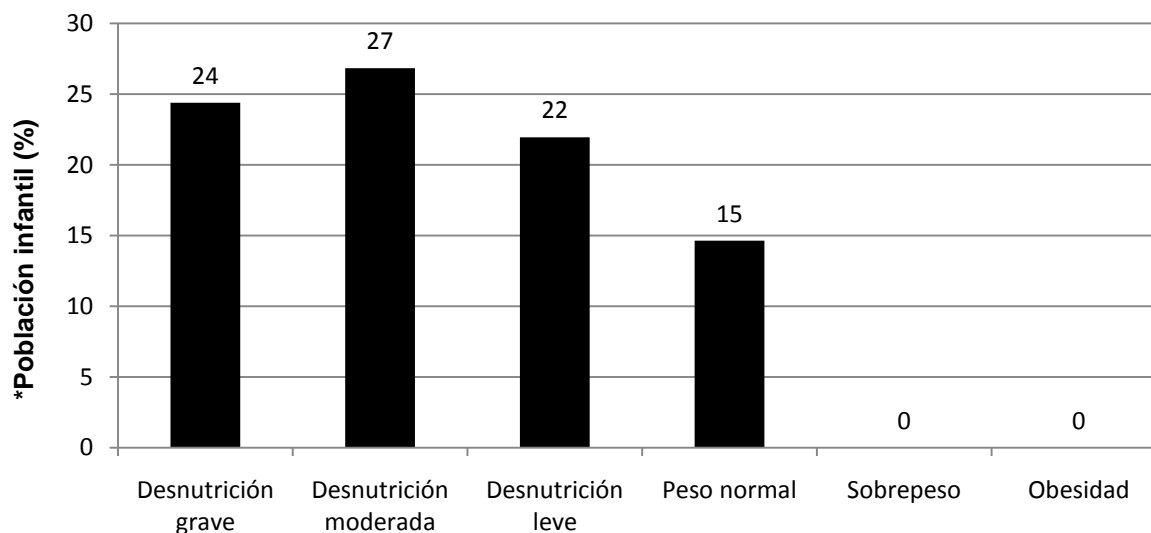
6.1 Estado nutricional

Para conocer el estado nutricional de los niños (as) de Pantepec y Chanal se interpretaron los datos de edad y peso como indica la NOM-031SSA2-1999. Las gráficas 1 y 2 muestran el resumen porcentual de los resultados de dicho análisis; el resultado global de estos resultados se muestra en la gráfica 3.

Gráfica 1. Estado nutricional en Pantepec (indicador peso/edad)

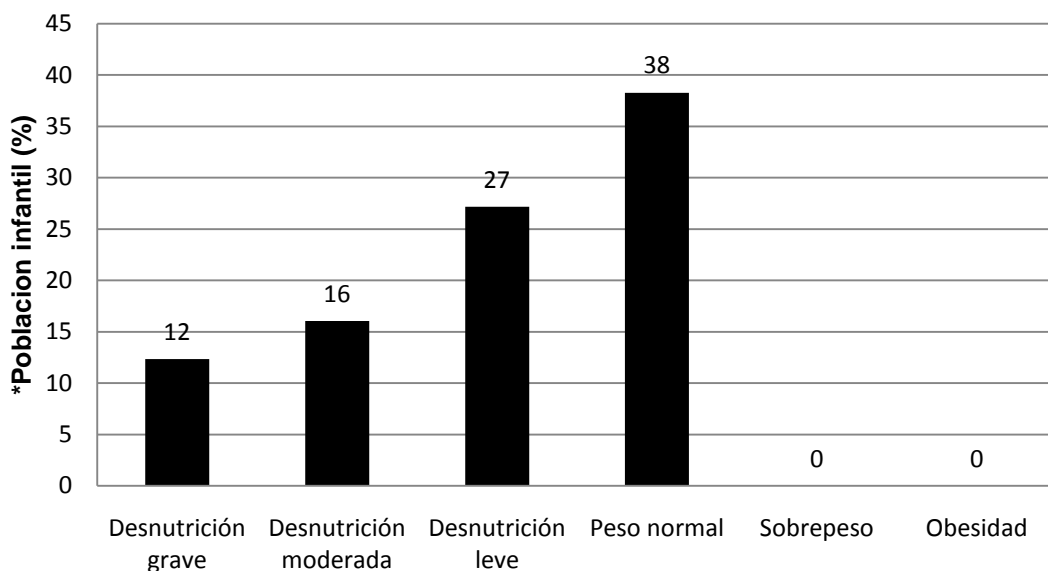


Gráfica 2. Estado nutricional en Chanal (indicador peso/edad).



* El 12% de la población infantil no proporcionó datos de peso, edad y talla.

Gráfica 3. Estado nutricional Pantepec - Chanal.



* El 6% de la población infantil no proporcionó datos de peso, edad y talla.

6.2 PCR múltiple "A"

Durante la realización del PCR "A" se buscó la presencia de EAEC mediante la amplificación de los genes plasmídicos AA probe, *aggR* y *aap*, descritos en la tabla 11.

Tabla 11. Genes de *E. coli* enteroagregativa (Cerna et al, 2003)

| GENES | O | INICIADORES | PARES DE BASES |
|-------------|---|-------------------------------------|----------------|
| | | Secuencia | |
| <i>aap</i> | F | 5'-CTT GGG TAT CAG CCT GAA TG-3' | 310 |
| | R | 5'-AAC CCA TTC GGT TAG AGC AC -3' | |
| <i>aggR</i> | F | 5'-CTA ATT GTA CAA TCG ATG TA-3' | 457 |
| | R | 5'-AGA GTC CAT CTC TTT GAT AAG-3' | |
| AA probe | F | 5'-CTG GCG AAA GAC TGT ATC AT-3' | 627 |
| | R | 5'-CAA TGT ATA GAA ATC CGC TGT T-3' | |

O, orientación: F, forward; R, reverse

A continuación se presentan todos los productos de PCR "A" que se obtuvieron, para poder analizarlos correctamente las muestras clínicas se compararon con cepas de referencia, como control positivo se utilizó *E. coli* 042 (positivo para los 3 genes plasmídicos) y como control negativo la cepa *E. coli* 25922(negativo para estos genes). Como marcador de peso molecular se utilizó la escalera de 100 pares de bases (pb) para estimar el tamaño de los amplicones. En cada figura se señala el tamaño de las bandas del MPM, así también el correspondiente a cada gen plasmídico (AA probe, *aggR* y *aap*).

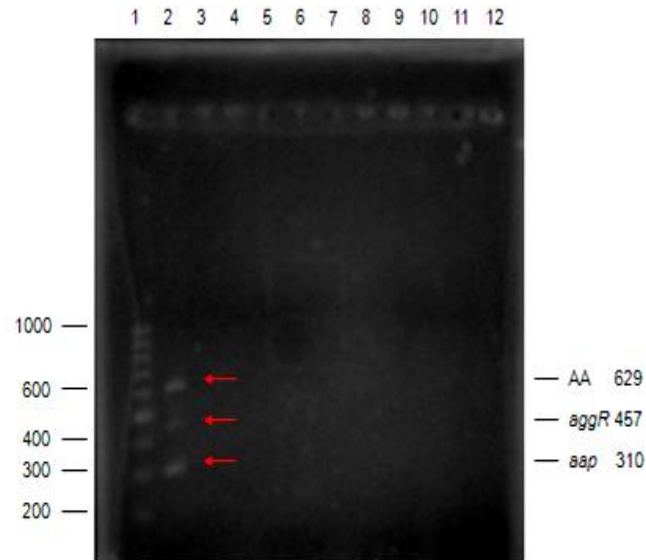


Figura 14. Productos PCR A, Pantepec. Carril 1, MPM; Carril 2, *E. coli* 042; Carril 3, *E. coli* 25922; Carril 4 a 11, Productos PCR de PAN 001, PAN 003a, PAN 003b, PAN 004, PAN 005, PAN 006, PAN 007, PAN 008.

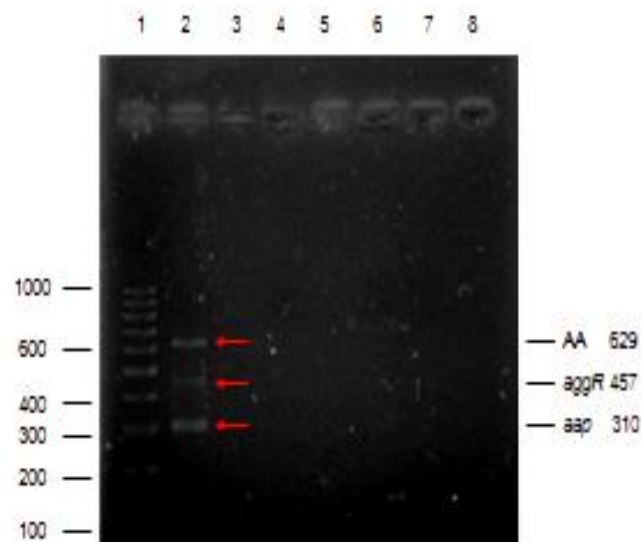


Figura 15. Productos PCR A, Pantepec. Carril 1, MPM; Carril 2, *E. coli* 042; Carril 3, *E. coli* 25922; Carril 4 a 8, Productos PCR de PAN 009, PAN 010. PAN 011. PAN 013. PAN 014.

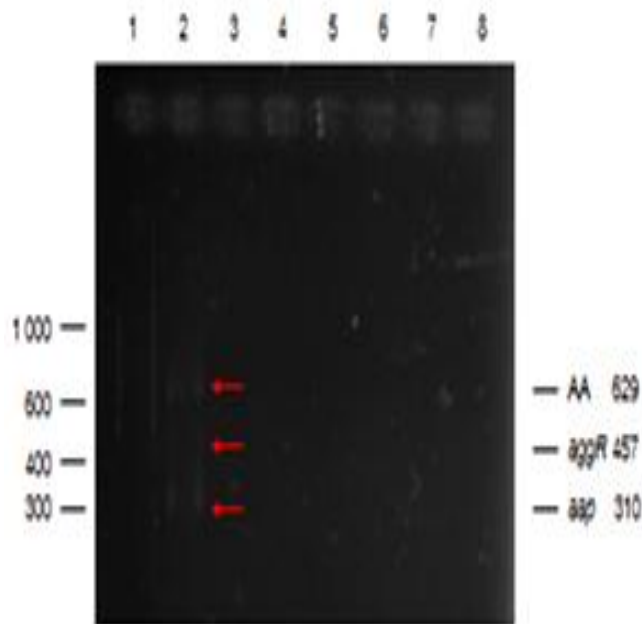


Figura 16. Productos PCR A, Pantepec. Carril 1, MPM; Carril 2, *E. coli* 042; Carril 3, *E. coli* 25922; Carril 4 a 8, productos PCR de PAN 015, PAN 016, PAN 017, PAN 018, PAN 020.

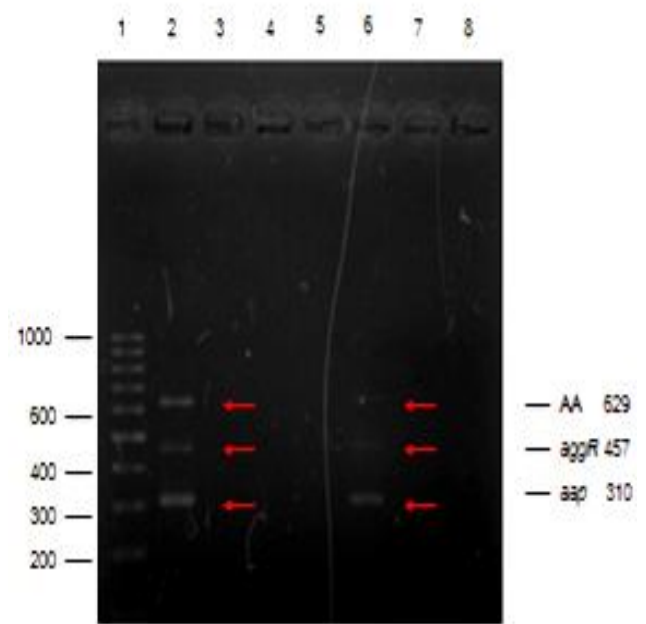


Figura 17. Productos PCR A, Pantepec. Carril 1, MPM; Carril 2, *E. coli* 042; Carril 3, *E. coli* 25922; Carril 4 a 8, productos PCR de PAN 021, PAN 022, PAN 026, PAN 028, PAN 029.

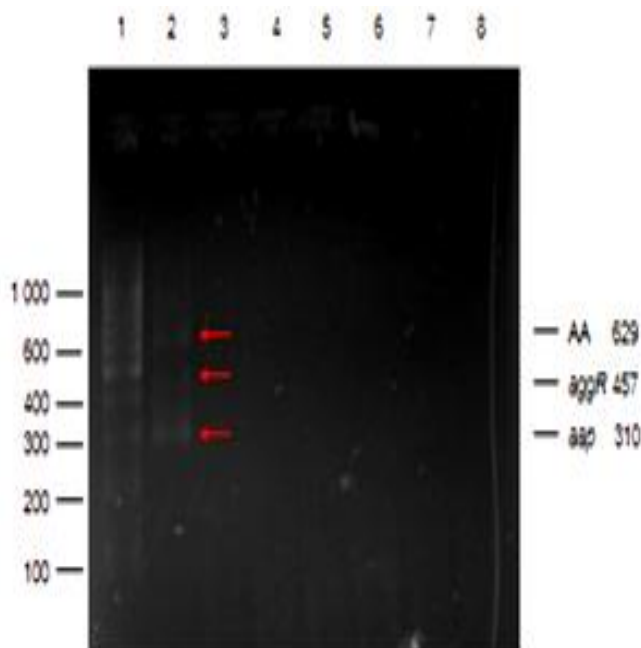


Figura 18 .Productos PCR A, Pantepec. Carril 1, MPM; Carril 2, *E. coli* 042; Carril 3, *E. coli* 25922; Carril 4 a 8, productos PCR de PAN 030, PAN 031, PAN 032, PAN 033, PAN 034.

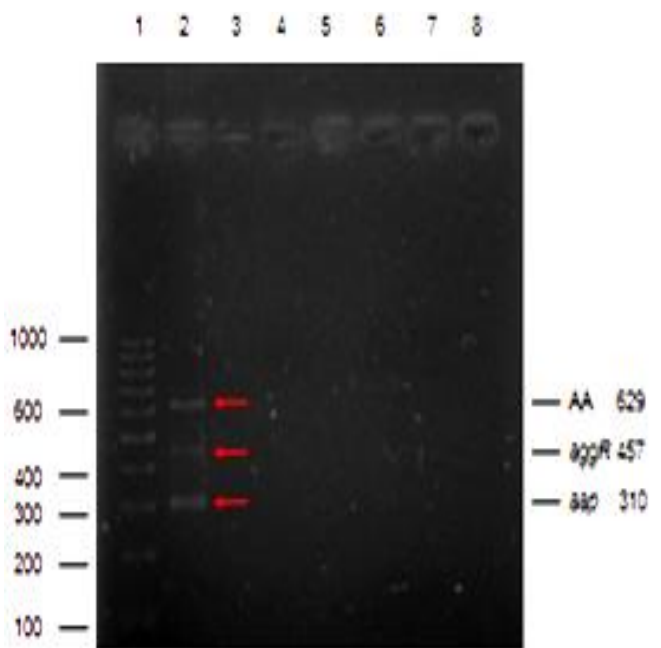


Figura 19. Productos PCR A, Pantepec. Carril 1, MPM; Carril 2, *E. coli* 042; Carril 3, *E. coli* 25922; Carril 4 a 8, productos PCR de PAN 036, PAN 037, PAN 039, PAN 040, PAN 041.

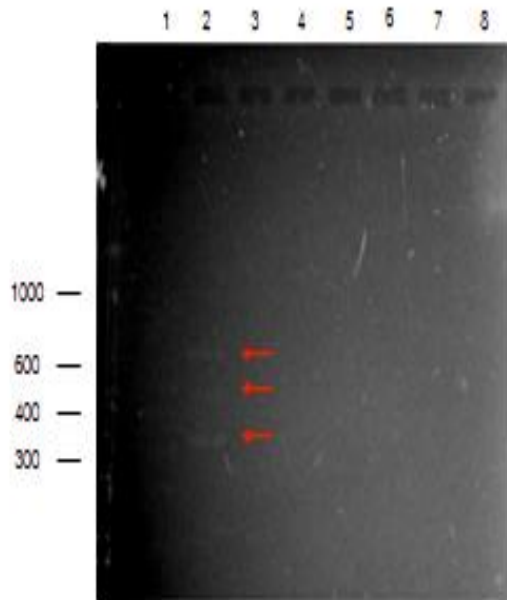


Figura 20. Productos PCR A, Pantepec. Carril 1, MPM; Carril 2, *E. coli* 042; Carril 3, *E. coli* 25922; Carril 4 a 8, productos PCR de PAN 042, PAN 044, PAN 048, PAN 049, PAN 054.

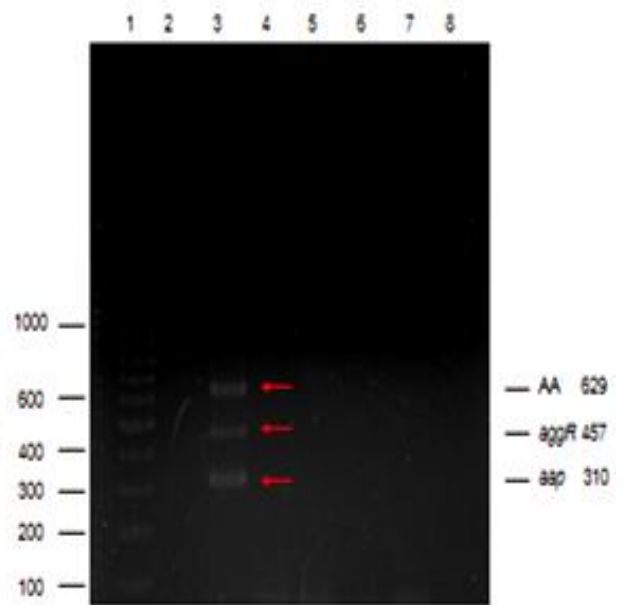


Figura 21. Productos PCR A, Pantepec. Carril 1, MPM; Carril 2, *E. coli* 25922; Carril 3, *E. coli* 042; Carril 4 a 8, productos PCR de PAN 060, PAN 061, PAN 062, PAN 066, PAN 067.

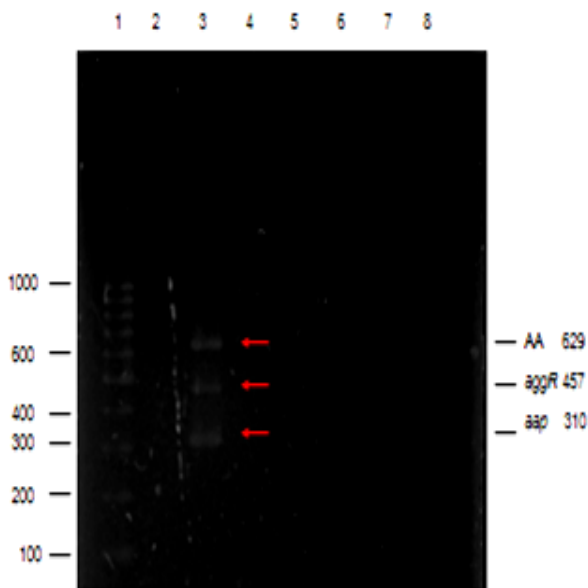


Figura 22. Productos PCR A, Pantepec. Carril 1, MPM; Carril 2, *E. coli* 25922; Carril 3, *E. coli* 042; Carril 4 a 8, productos PCR de PAN 068, PAN 073, PAN 077, PAN 079, PAN 080.

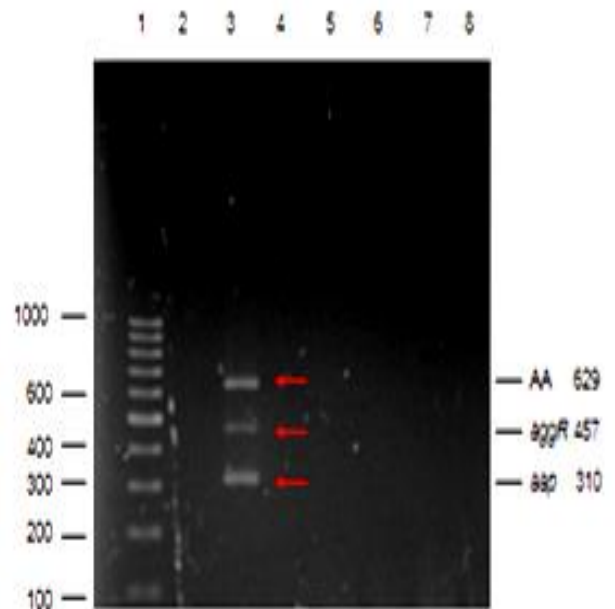


Figura 23. Productos PCR A, Pantepec y Chanal. Carril 1, MPM; Carril 2, *E. coli* 25922; Carril 3, *E. coli* 042, Carril 4, producto PCR de PAN 089; Carril 5 a 8, productos PCR de CHA 001, CHA 002, CHA 005, CHA 007.

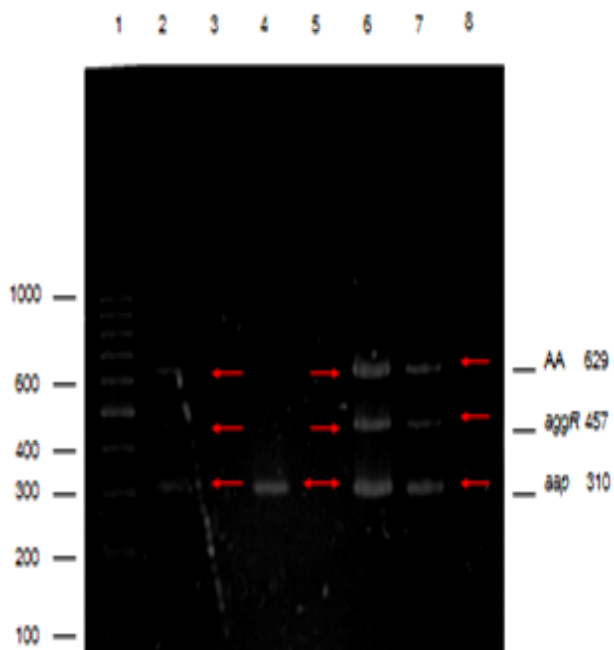


Figura 24. Productos PCR A, Chanal. Carril 1, MPM; Carril 2, *E. coli* 042; Carril 3, *E. coli* 25922; Carril 4 a 8, productos PCR de CHA 013, CHA 014, CHA 015, CHA 016, CHA 017.

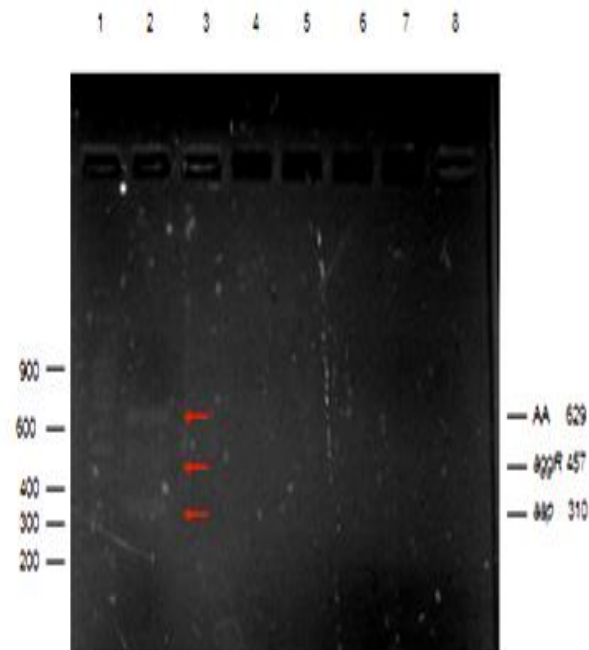


Figura 25. Productos PCR A, Chanal. Carril 1, MPM; Carril 2, *E. coli* 042; Carril 3, *E. coli* 25922; Carril 4 a 8, productos PCR de CHA 019, CHA 020, CHA 021, CHA 022, CHA 023.

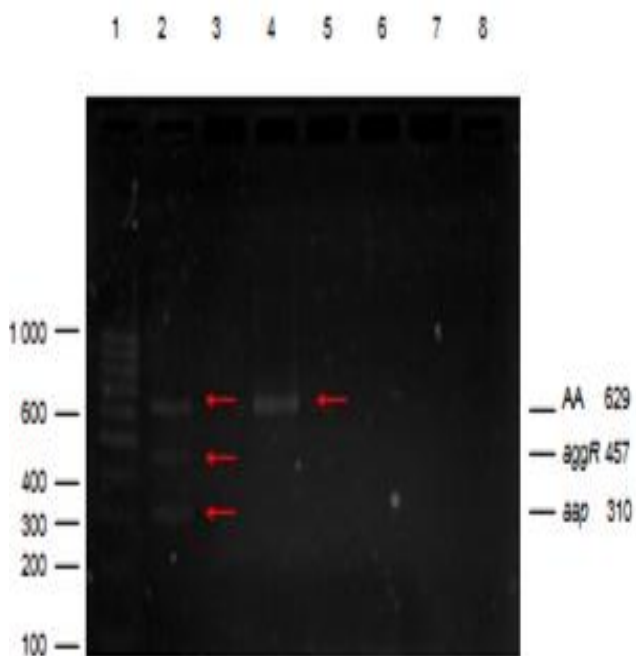


Figura 26. Productos PCR A, Chanal. Carril 1, MPM; Carril 2, *E. coli* 042; Carril 3, *E. coli* 25922; Carril 4 a 8, productos PCR de CHA 024, CHA 025, CHA 026, CHA 027, CHA 028.

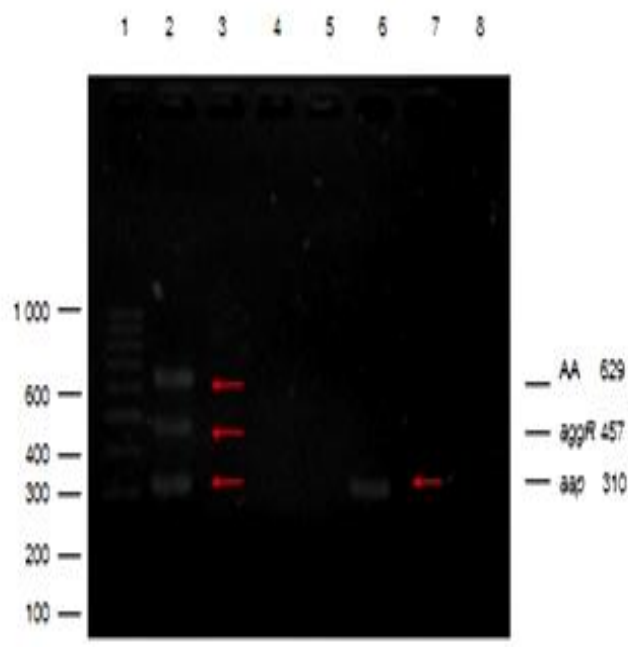


Figura 27. Productos PCR A, Chanal. Carril 1, MPM; Carril 2, *E. coli* 042; Carril 3, *E. coli* 25922; Carril 4 a 8, productos PCR de CHA 029, CHA 030, CHA 031, CHA 032, CHA 033.

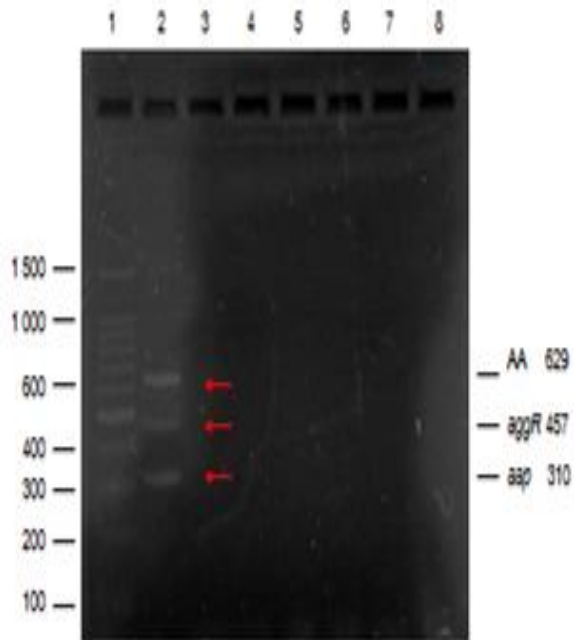


Figura 28. Productos PCR A, Chanal. Carril 1, MPM; Carril 2, *E. coli* 042; Carril 8, *E. coli* 25922; Carril 3 a 7, productos PCR de CHA 034, CHA 035, CHA 036, CHA 037, CHA 038.

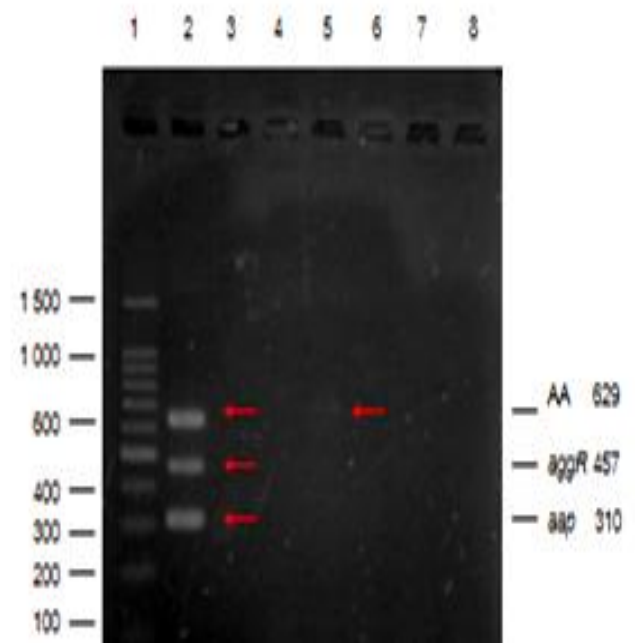


Figura 29. Productos PCR A, Chanal. Carril 1, MPM; Carril 2, *E. coli* 042; Carril 3, *E. coli* 25922; Carril 4 a 8, productos PCR de CHA 039, CHA 040, CHA 041, CHA 044, CHA 046.

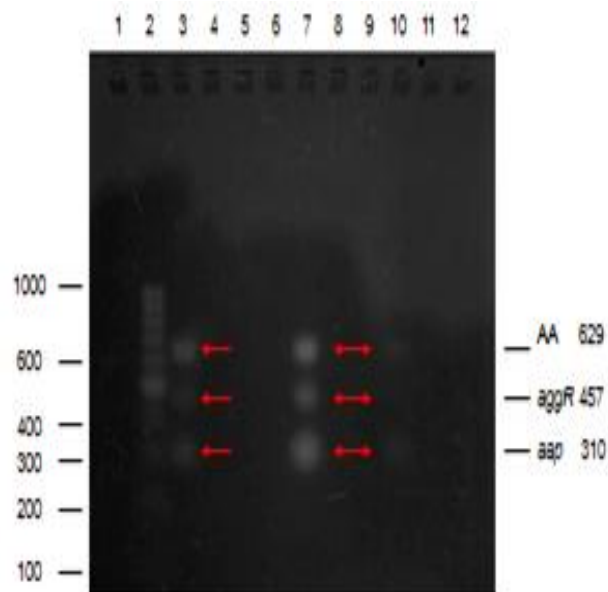


Figura 30. Productos PCR A, Chanal. Carril 2, MPM; Carril 3, *E. coli* 042; Carril 4, *E. coli* 25922; Carril 5 a 11, productos PCR de CHA 047, CHA 048, CHA 049, CHA 050, CHA 052, CHA 053, CHA 055.

6.3 Western blot

Se realizaron análisis de western blot para buscar la presencia de la proteína Pic, este análisis se realizó a todas las cepas que dieron positivo a por lo menos un gen de EAEC. Esta proteína es secretada por las cepas EAEC, por tanto el encontrar la presencia de esta proteína en dichos aislados de *E. coli* se comprobará que estas cepas poseen este factor de virulencia.

Para comparar los resultados de cada aislado se usó como control positivo la proteína Pic purificada, la clona mínima *E. coli* HB101/pPIC1 y *E. coli* 042, como control negativo se usó a *E. coli* 25922 ya que no secreta a la proteína Pic; se usó el marcador de peso molecular de proteínas de 116 kDa.



Figura 31. Western blot-1

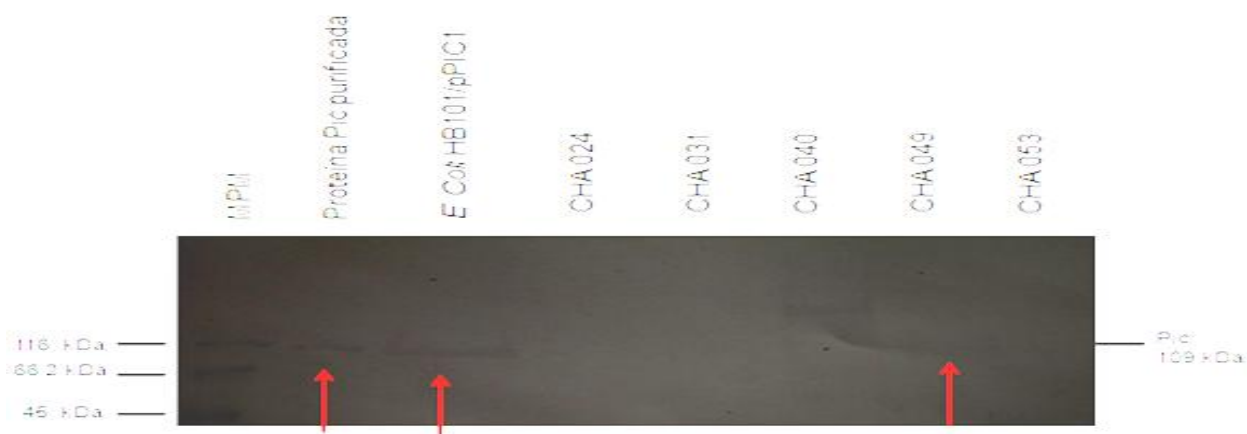


Figura 32. Western blot-2

6.4 PCR múltiple “B”

En el PCR “B” se buscó la presencia de EPEC, ETEC, EIEC y STEC. En las figuras correspondientes a PCR “B” se aprecia el MPM de 100 pares de bases, el control negativo utilizado en este caso la bacteria *E. coli* 042 (negativa para los genes: *eae*, *bfp*, *lt*, *st*, *ial* *stx1* y *stx2*) y el control positivo que contenía una mezcla de las siguientes bacterias de *E. coli* prototipo: EPEC E2348/69 (O127:H6) que contiene los genes *eae* y *bfp*, ETEC H10407 (O78:H11) que contiene los genes *lt* y *st*, EIEC E11 (O124NM) con el gen *ial* y STEC EDL933 (O157:H7) que contiene los genes *stx1* y *stx2*. Los iniciadores usados para amplificar dichos genes y el tamaño de los amplicones esperados se muestran en la tabla 12.

Tabla 12. Caracterización de genes de ETEC, EPEC, EIEC y STEC (López-Saucedo et al, 2003)

| GENES | O | INICIADORES | PARES DE BASES |
|-------------|---|-----------------------------------|----------------|
| | | Secuencia | |
| <i>lt</i> | F | 5´GGC GAC AGA TTA TAC CGT GC3´ | 450 |
| | R | 5´CGG TCT CTA TAT TCC CTG TT3´ | |
| <i>st</i> | F | 5´ATT TTT CTT TCT GTA TTG TCT T3´ | 190 |
| | R | 5´CAC CCG GTA CAA GCA GGA TT3´ | |
| <i>bfpA</i> | F | 5´AAT GGT GCT TGC GCT TGC TGC3´ | 324 |
| | R | 5´GCC GCT TTA TCC AAC CTG GTA3´ | |
| <i>eaeA</i> | F | 5´GAC CCG GCA CAA GCA TAA GC3´ | 384 |
| | R | 5´CCA CCT GCA GCA ACA AGA GG3´ | |
| <i>stx1</i> | F | 5´CTG GAT TTA ATG TCG CAT AGT G3´ | 150 |
| | R | 5´AGA ACG CCC ACT GAG ATC ATC3´ | |
| <i>stx2</i> | F | 5´GGC ACT GTC TGA AAC TGC TCC3´ | 255 |
| | R | 5´TCG CCA GTT ATC TGA CAT TCT G3´ | |
| <i>ial</i> | F | 5´GGT ATG ATG ATG ATG AGT CCA 3´ | 650 |
| | R | 5´GGA GGC CAA CAA TTA TTT CC 3´ | |

O, orientación: F, forward; R, reverse

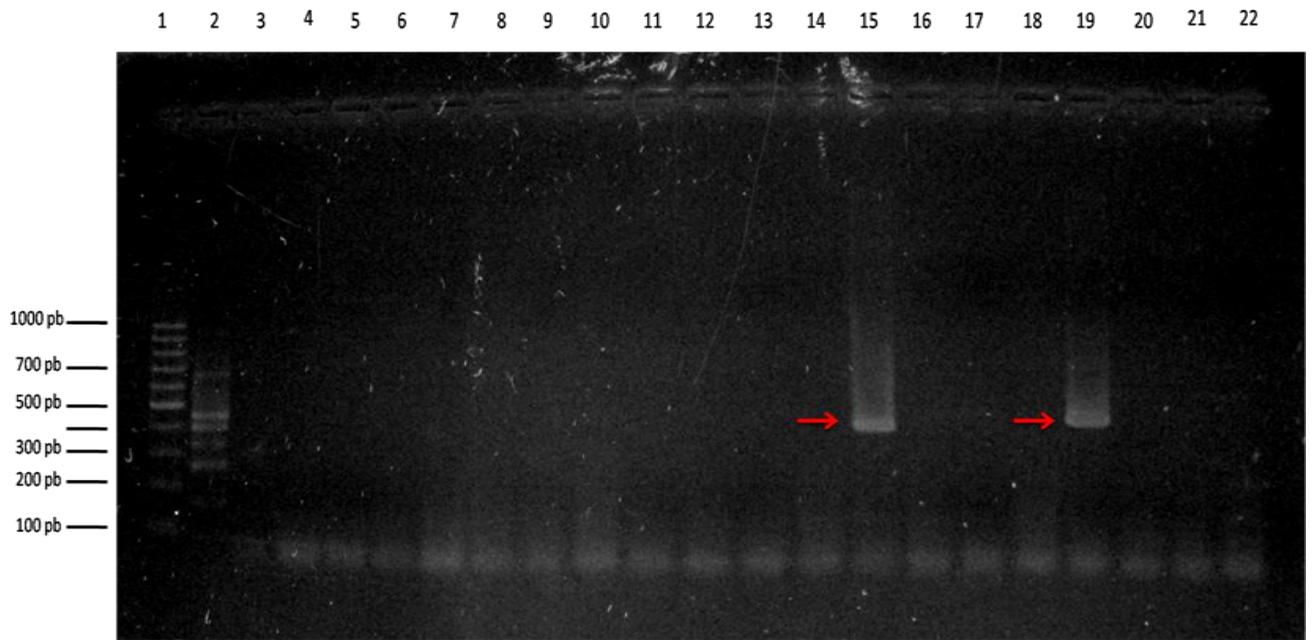


Figura 33. Productos PCR B, Pantepec. Carril 1, MPM; Carril 2, Control positivo; Carril 3, *E. coli* 042; Carril 4, PAN 001; Carril 5, PAN 003; Carril 6, PAN 004; Carril 7, PAN 005; Carril 8, PAN 006; Carril 9, PAN 007; Carril 10, PAN 008; Carril 11, PAN 009; Carril 12, PAN 010; Carril 13, PAN 011; Carril 14, PAN 013; Carril 15, PAN 014; Carril 16, PAN 015; Carril 17, PAN 016; Carril 18, PAN 017; Carril 19, PAN 018; Carril 20, PAN 020; Carril 21, PAN 021; Carril 22, PAN 022.

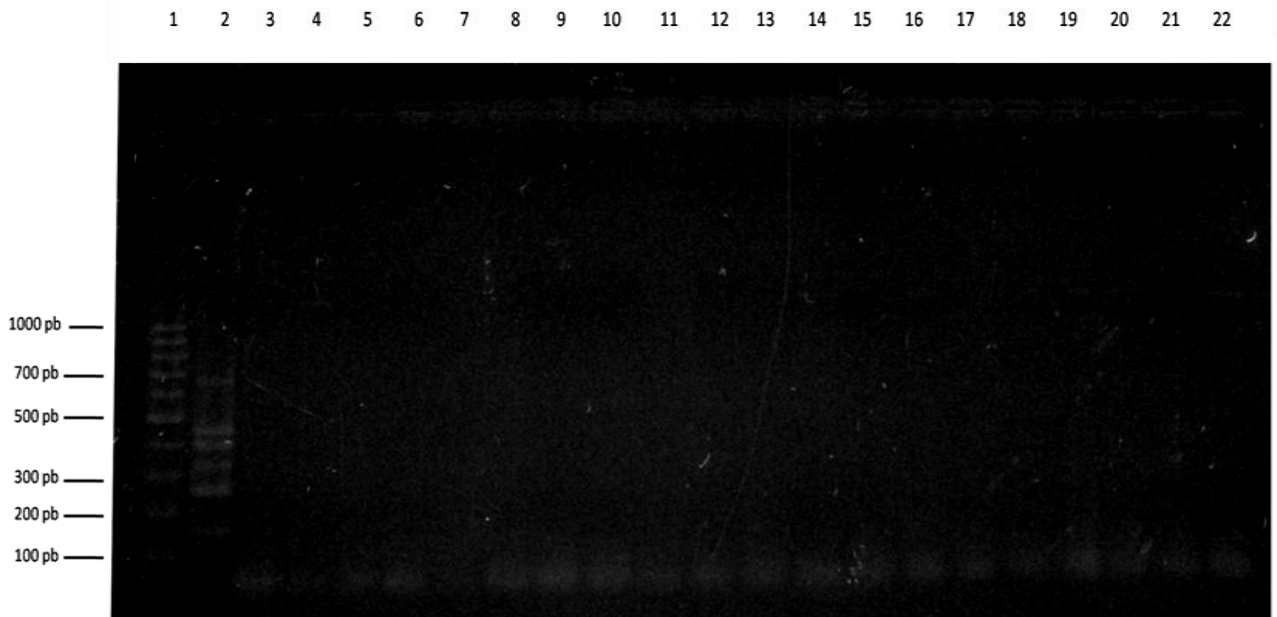


Figura 34. Productos PCR B, Pantepec. Carril 1, MPM; Carril 2, Control positivo; Carril 3, *E. coli* 042; Carril 4, PAN 026; Carril 5, PAN 028; Carril 6, PAN 029; Carril 7, PAN 030; Carril 8, PAN 031; Carril 9, PAN 032; Carril 10, PAN 033; Carril 11, PAN 034; Carril 12, PAN 036; Carril 13, PAN 037; Carril 14, PAN 029; Carril 15, PAN 040; Carril 16, PAN 041; Carril 17, PAN 066; Carril 18, PAN 067; Carril 19, PAN 068; Carril 20, PAN 073; Carril 21, PAN 080; Carril 22, PAN 089.

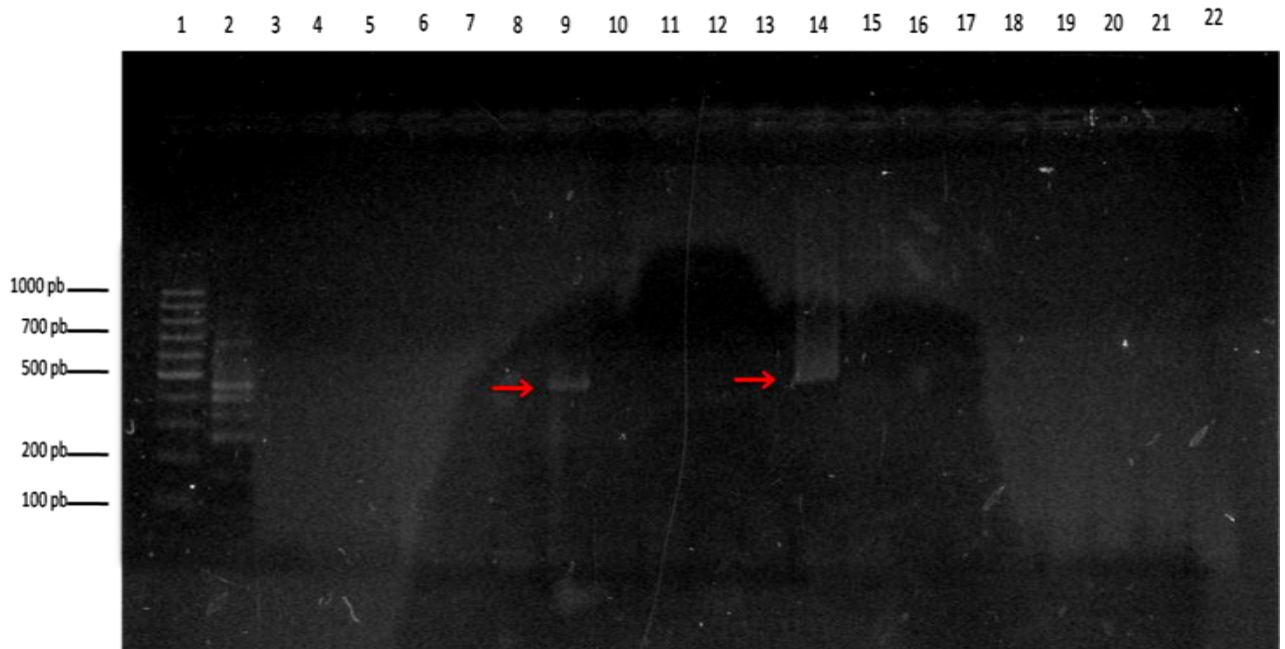


Figura 35.Productos PCR B, Chanal. Carril 1, MPM; Carril 2, Control positivo; Carril 3, *E. coli* 042; Carril 4, CHA 001; Carril 5, CHA 002; Carril 6, CHA 005; Carril 7, CHA 007; Carril 8, CHA 013; Carril 9, CHA 014; Carril 10, CHA 015; Carril 11, CHA 016; Carril 12, CHA 017; Carril 13, CHA 019; Carril 14, CHA 020; Carril 15, CHA 021; Carril 16, CHA 022; Carril 17, CHA 023; Carril 18, CHA 024; Carril 19, CHA 025; Carril 20, CHA 026; Carril 21, CHA 027; Carril 22, CHA 028.

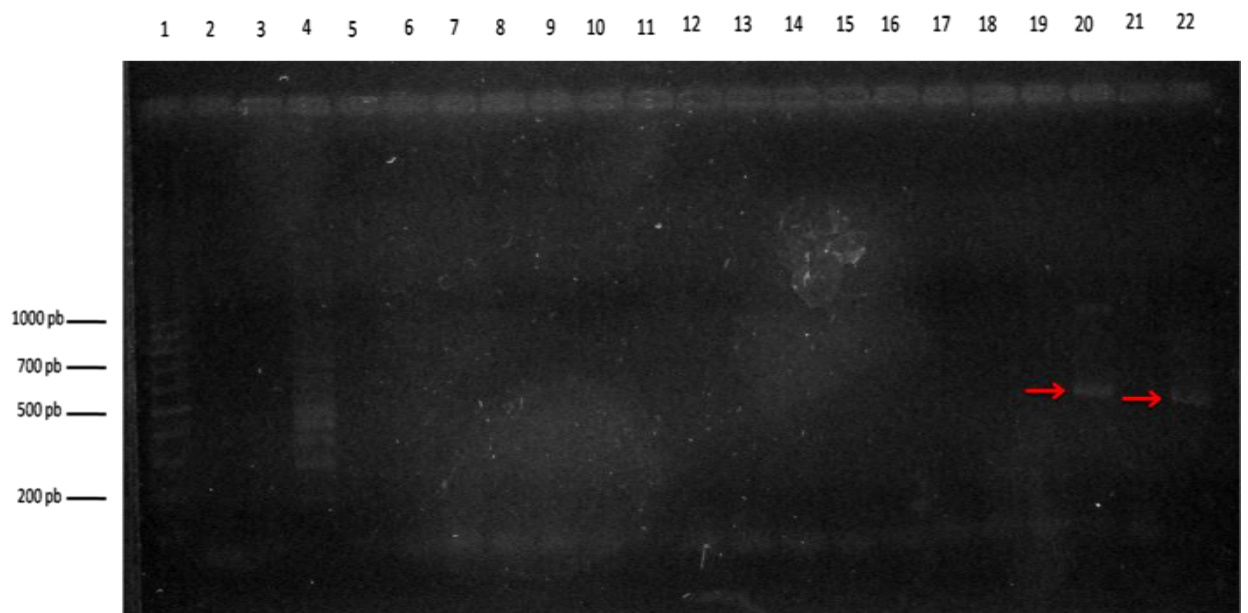


Figura 36.Productos PCR B, Chanal. Carril 1, MPM; Carril 2, CHA 029; Carril 3, CHA 030; Carril 4, Control positivo; Carril 5, *E. coli* 042; Carril 6, CHA 031; Carril 7, CHA 032; Carril 8, CHA 033; Carril 9, CHA 034; Carril 10, CHA 035; Carril 11, CHA 036; Carril 12, CHA 037; Carril 13, CHA 038; Carril 14, CHA 039; Carril 15, CHA 040; Carril 16, CHA 041; Carril 17, CHA 044; Carril 18, CHA 046; Carril 19, CHA 047; Carril 20, CHA 048; Carril 21, CHA 049; Carril 22, CHA 050.

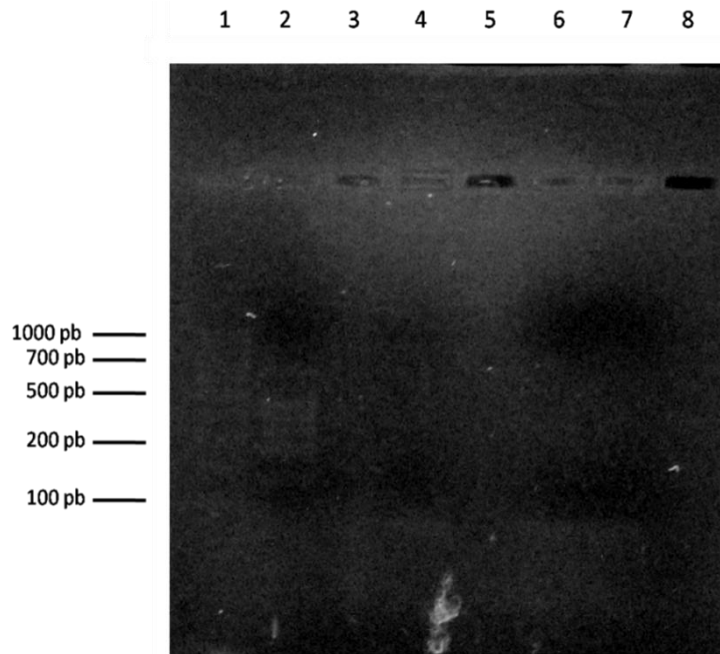


Figura 37. Productos PCR B, Chanal y Pantepec. Carril 1, MPM; Carril 2, Control positivo; Carril 3, *E. coli* 042; Carril 4, CHA 052; Carril 5, CHA 053; Carril 6, CHA 055; Carril 7, PAN 077; Carril 8, PAN 079.

6.5 *Escherichia coli* diarreogénica

De acuerdo a las Figuras 15-24 y a los resultados obtenidos en el Western blot, tan solo 5 cepas (12.5%) dieron positivo para *E. coli* enteroagregativa (figura 32).

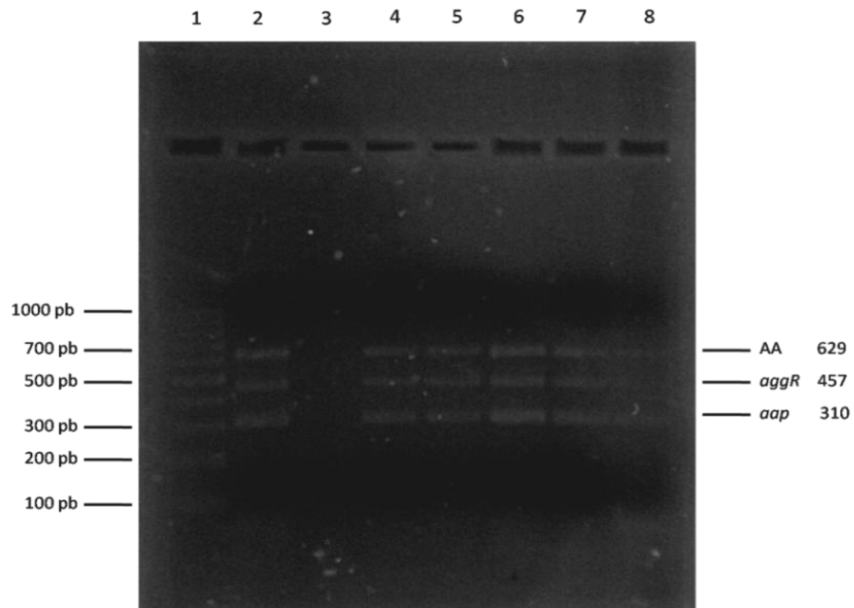


Figura 38. Productos PCR A, Positivos. Carril 1, MPM; Carril 2, *E. coli* 042; Carril 3, *E. coli* 25922; Carril 4, PAN 026; Carril 5, CHA 015; Carril 6, CHA 016; Carril 7, CHA 049; Carril 8, CHA 053.

Y en el caso de PCR B la presencia de *E. coli* diarreogénica solo se observó en 6 cepas clínicas (figura 33)

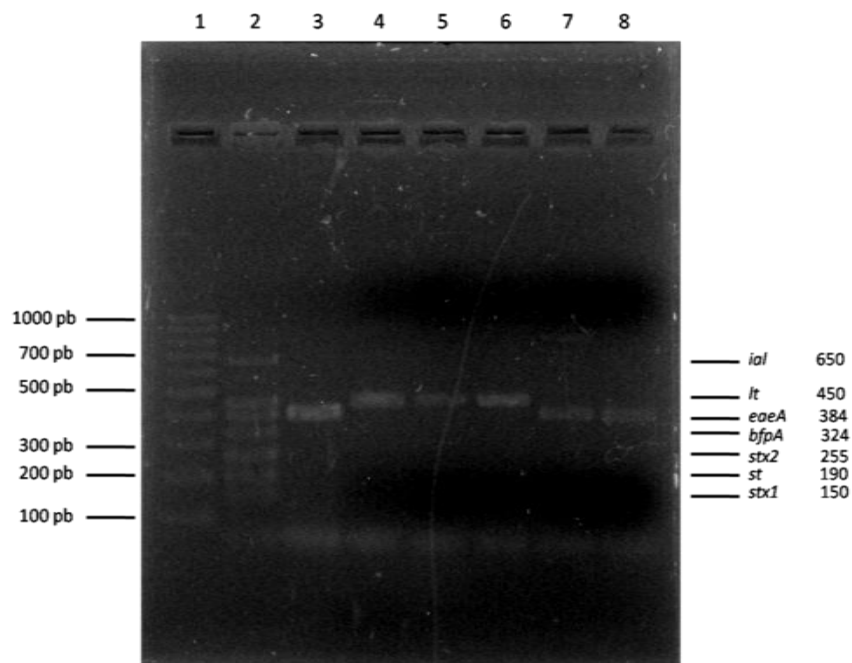
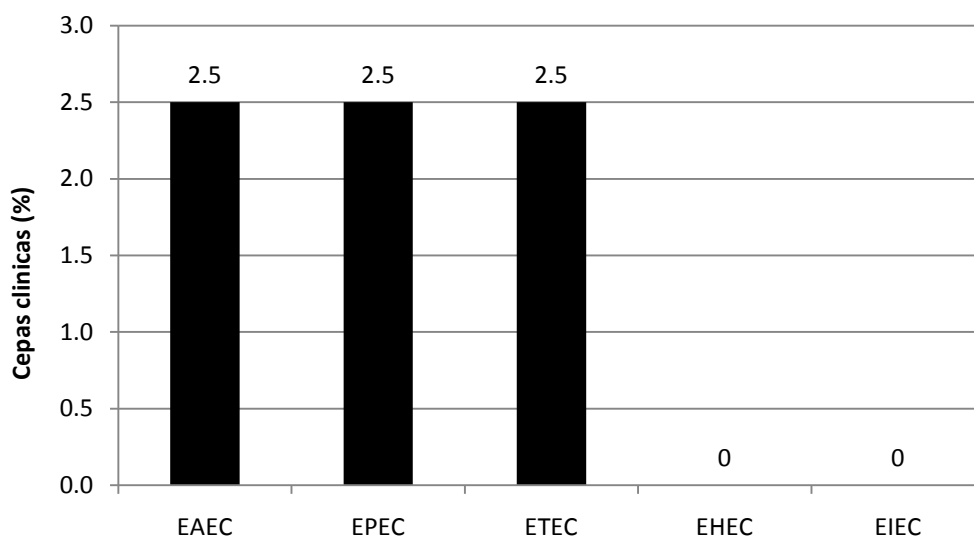


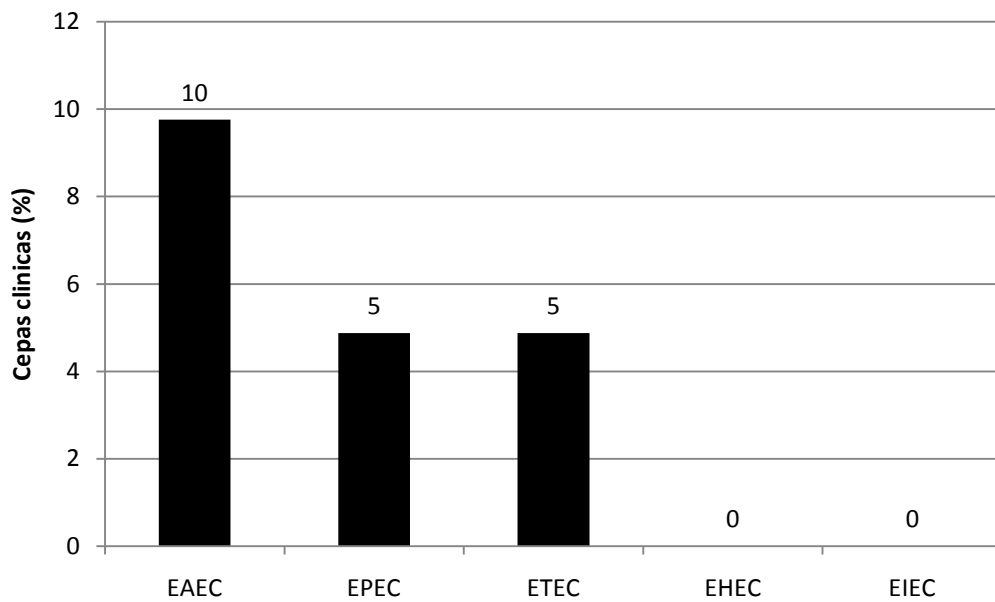
Figura 39. Productos PCR B positivos. Carril, MPM; Carril 2, Control positivo; Carril 3, PAN 014; Carril 4, PAN 018; Carril 5, CHA 014; Carril 6, CHA 020; Carril 7, CHA 048; Carril 8, CHA 050.

De acuerdo a los resultados anteriores se realizó el análisis del lugar porcentual que ocupa cada *E. coli* diarreogénica encontrada en cada uno de los municipios problema; los resultados del análisis se muestran en las gráficas 4 y 5.

Gráfica 4. Cepas clínicas Pantepec.

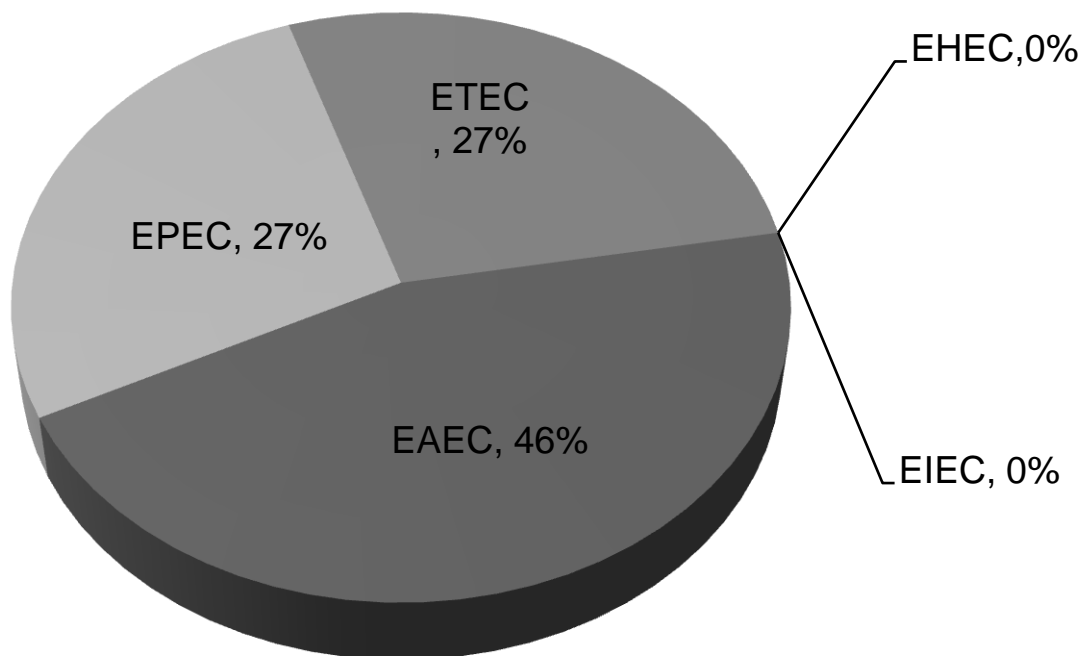


Gráfica 5. Cepas clínicas Chanal.



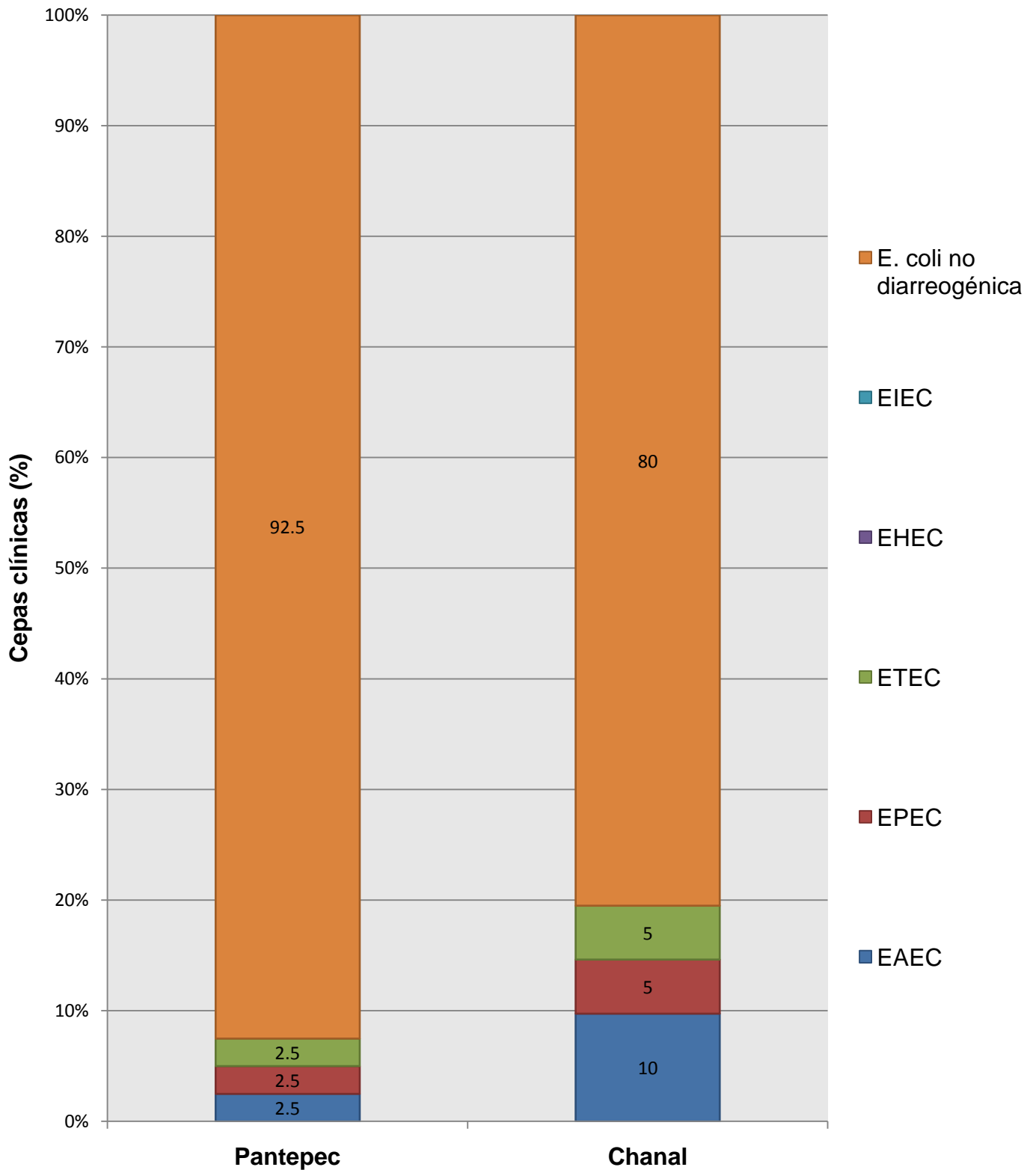
La gráfica 6 presentan el porcentaje de las cepas *E. coli* diarreogénica encontradas en los 2 municipios.

Gráfica 6. Cepas *E. coli* diarreogénica Pantepec – Chanal.



Para un enfoque más global la gráfica 7 presenta la comparación porcentual entre los municipios prioritarios, en este caso Chanal y Pantepec.

Gráfica 7. Cepas clínicas Pantepec – Chanal.



6.6 Vinculación: Desnutrición - *E. coli* diarreogénica.

Tabla 13. Asociación entre el estado nutricional y la presencia de *E. coli* diarreogénica.

| MUNICIPIO | DESNUTRICIÓN | | | PESO NORMAL | SOBREPESO | OBESIDAD | TOTAL |
|------------------------------|--------------|-----------|-----------|-------------|-----------|----------|------------|
| | Grave | Moderada | Leve | | | | |
| Pantepec | | | | | | | |
| <i>E. coli</i> diarreogénica | N (%) | N (%) | N (%) | N (%) | N (%) | N (%) | N (%) |
| Presente | 0 (0.0) | 0 (0.0) | 1 (2.5) | 2 (5.0) | 0 (0.0) | 0 (0.0) | 3 (7.5) |
| Ausente | 0 (0.0) | 2 (5.0) | 12 (30.0) | 23 (57.5) | 0 (0.0) | 0 (0.0) | 37 (92.5) |
| Total | 0 (0.0) | 2 (5.0) | 13 (32.5) | 25 (62.5) | 0 (0.0) | 0 (0.0) | 40 (100.0) |
| Chanal* | | | | | | | |
| <i>E. coli</i> diarreogénica | N (%) | N (%) | N (%) | N (%) | N (%) | N (%) | N (%) |
| Presente | 2 (5.6) | 3 (8.3) | 0 (0.0) | 1 (2.8) | 0(0.0) | 0(0.0) | 6 (16.7) |
| Ausente | 8 (22.2) | 8 (22.2) | 9 (25.0) | 5 (13.9) | 0(0.0) | 0(0.0) | 30 (83.3) |
| Total | 10 (27.8) | 11 (30.5) | 9 (25) | 6 (16.7) | 0(0.0) | 0(0.0) | 36 (100.0) |

N= niños (as)

*Cinco niños(as) no proporcionaron datos antropométricos.

Tabla 14. χ^2

| MUNICIPIO | χ^2 | GRADOS DE LIBERTAD | VALOR 0.05 |
|-----------|----------|--------------------|------------|
| Pantepec | 0.17 | 5 | 11.07 |
| Chanal | 2.78 | 5 | 11.07 |

7 DISCUSIÓN DE RESULTADOS.

En los resultados presentados en la gráfica 1 se puede observar que en el municipio de Pantepec los niños desnutridos no fueron tantos (37.5%) como en Chanal (73%) (gráfica 2), puesto que más del 50% de los niños de este municipio tuvieron un peso normal, cabe aclarar que no por eso deja de ser menos importante y preocupante el estado nutricional de esta población, ya que parte de la población infantil de este municipio presentó niveles de desnutrición considerables, siendo la desnutrición leve, la más alta (32.5%). En el caso de Chanal se observa uno de los problemas primordiales a los que se enfrenta esta comunidad, donde el peso normal en niños ocupó tan solo un 15% de la población infantil, sufriendo el resto de los niños (as) algún tipo de desnutrición, en este caso la desnutrición moderada fue la de porcentaje más alto observándose un 27%, seguido de la desnutrición grave (24%) y no muy alejado el número porcentual se encuentra la desnutrición leve con 22%. De acuerdo a la gráfica 3 se aprecia que el 55% de los niños (as) de Pantepec y Chanal tienen algún tipo de desnutrición siendo la desnutrición leve la que presenta un mayor porcentaje (27%).

De acuerdo a los resultados de PCR "A", se puede apreciar que la figura 17 muestra la presencia de los 3 genes plasmídicos (*aap*, *aggR*, AA) de *E. coli* enteroagregativa, la muestra portadora de estos genes fue una cepa, identificada como *E. coli* PAN 026; las figuras 24 y 30 muestran los amplicones de EAEC que se encontraron entre los aislados de Chanal, las cepas CHA 015 y CHA 016 tuvieron los 3 genes plasmídicos, aunque también se observó que la cepa CHA 013 solo tuvo un gen (*aap*) en la figura 30 se aprecia que en las cepas CHA 049 y CHA 053 tuvieron los 3 genes de *E. coli* enteroagregativa.; en la figura 26 se aprecia a la cepa CHA 024 la que solo presentó el gen AA ; la Figura 27 muestra la cepa , en la cual se amplificó solamente el gen *aap* ; de manera similar la figura 29 muestra la presencia del gen AA en la cepa CHA 040.

En el caso de las cepas de *E. coli* en la que se amplificó un solo gen y no siendo el *aggR* (CHA 013, CHA 024, CHA 031, CHA 040), éstas se descartaron

como EAEC dado que si no poseen este loci no se consideran como de esa variante patógena (Cerna et al, 2003). Así, las únicas cepas de *E. coli* consideradas como *E. coli* enteroagregativa fueron: PAN 026, CHA 015, CHA 016, CHA 049, CHA 053 (figura 38), es decir un 10% de las cepas clínicas analizadas. De acuerdo a los resultados obtenidos en el Western blot (figura 31 y 32) se puede apreciar que como se esperaba solo las bacterias que tenían los 3 genes plasmídicos desarrollaron la proteína Pic a excepción de CHA 053 que expresó el gen y no secretó dicha proteína.

En cuanto a los resultados obtenidos de PCR "B", la figura 33 muestra la presencia del gen *eaeA* en la *E. coli* PAN 014, y además se observa el gen *lt* de la *E. coli* PAN 018; estos genes corresponden a *E. coli* enteropatógena y *E. coli* enterotoxigénica, respectivamente. El gen *lt* se encontró en las cepas CHA 014 y CHA 020 (figura 35), finalmente, el gen *eaeA* se amplificó en las cepas CHA 048 y CHA 050 (figura 36). Es importante recalcar que no se amplificaron genes de STEC o EIEC en todas las cepas.

Las cepas de *E. coli* con genes de virulencia encontradas en las cepas clínicas de Pantepec, representan un 7.5% de las cepas clínicas analizadas de este municipio (gráfica 4), las categorías encontradas fueron *E. coli* enteroagregativa, *E. coli* enteropatógena y *E. coli* enterotoxigénica (2.5% cada una). En el caso de Chanal se encontraron exactamente las mismas variantes patógenas aunque en proporciones diferentes, siendo *E. coli* enteroagregativa la predominante (10%), *E. coli* enteropatógena y enterotoxigénica en la misma proporción (5% cada una) (gráfica 5). Tomando en cuenta solo las cepas *E. coli* diarreogénica encontradas en estos 2 municipios, se puede observar en la gráfica 6 que la variante patógena más frecuente fue *E. coli* enteroagregativa (46%), en comparación con *E. coli* enteropatógena y *E. coli* enterotoxigénica con 27% cada una. Por último se logra apreciar en la gráfica 7 que en Chanal se aisló una mayor proporción de *E. coli* diarreogénica en comparación con Pantepec, superando significativamente sus números; se observa claramente que en el caso de *E. coli* enteropatógena y *E. coli* enterotoxigénica, Chanal duplica a Pantepec, y en

cuanto a *E. coli* enteroagregativa el valor que tiene Chanal es sumamente superior al obtenido en Pantepec ocupando una cuarta parte del resultado que tiene el municipio a comparación. Para ver si hay asociación entre el diagnóstico nutricional infantil en los municipios de Pantepec y Chanal con el porcentaje de cepas de *E. coli* diarreogénica, se calculó el valor de chi cuadrada (tabla 13 y 14). De acuerdo a los valores de esta prueba estadística, no se encontró asociación entre estas variables en los municipios de Pantepec y Chanal (el valor de X^2 fue 0.17 y 2.78, respectivamente)

CONCLUSIONES

A lo largo de este proyecto se expuso la posibilidad de que la presencia de ciertas bacterias en nuestro caso *E. coli* diarreogénica, en el organismo de niños (as) de una edad de entre cero y cinco años, es sumamente perjudicial para el buen crecimiento y desarrollo de ellos, pudiendo asociarse con los grados de desnutrición que sufren los niños (as). Ante tal visión se procuró llevarla a cabo en el Estado de Chiapas, buscando la presencia de las bacterias anteriormente mencionadas, para la realización de dicho análisis se escogieron 2 municipios (Pantepec y Chanal) considerados prioritarios para el Estado, siendo primordialmente poblaciones con un alto grado de marginación, y que aunado a esto presentan una Tasa de Mortalidad Infantil significativamente mayor a la estatal como se expuso en datos presentados a lo largo del reporte del proyecto.

En Pantepec se analizaron a 40 niños(as) y en Chanal a 41. En primera instancia se procedió a analizar el estado nutricional de cada uno de los niños (as) de dichos municipios. Ambos municipios presentaron niños con diferentes niveles de desnutrición; sin embargo, Chanal fue el municipio con datos más preocupantes en comparación con Pantepec, ya que incluso presentó niños (as) que sufren un nivel de desnutrición grave.

El análisis para la presencia de *E. coli* diarreogénica dio frutos positivos; puesto que tanto en Pantepec como en Chanal se observó la presencia de dichas bacterias, las variantes de *E. coli* diarreogénica encontradas en los 2 municipios fueron: *E. coli* enteroagregativa, *E. coli* enterotoxigénica y *E. coli* enteropatógena. En el caso de las bacterias consideradas *E. coli* enteroagregativa, todas presentaron los 3 genes (*aggR*, *aap* y *AA*), sin embargo la presencia de la proteína Pic no se pudo apreciar en una cepa clínica, por lo que se concluyó que esta cepa en especial se le consideraría *E. coli* enteroagregativa atípica. En el caso de *E. coli* enteropatógena todas las cepas dieron positivo al gen *eaeA* y negativo al gen *bfpA*, considerándolas como *E. coli* enteropatógenas atípicas, finalmente las cepas

de *E. coli* enterotoxigénica solo amplificaron el gen de la toxina LT. La variante de *E. coli* que se encontró en mayor proporción fue la *E. coli* enteroagregativa (46%) y las que no se detectaron fueron *E. coli* productora de toxina Shiga (STEC) y *E. coli* enteroinvasiva (EIEC); para el caso de STEC nuestros datos son similares a lo reportado en la literatura, ya que STEC no se ha reportado en México.

Ante los resultados anteriores se procedió a evaluar si la presencia de estas bacterias podría vincularse a la desnutrición presentada en cada municipio. Luego del análisis estadístico, este nos mostró que la presencia de *E. coli* diarreogénica no se encuentra asociada a la desnutrición infantil en los municipios Chanal y Pantepec, Chiapas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Anónimo (2006). *Técnica de Western blot*. CULTEK. pp 2-9
- Arias B, Cáceres O, Figueroa M, Huguet J, Camiña M (2004). *Escherichia coli* enteroagregativa en niños con diarrea de un hospital de Lima. *Rev Perú Med Exp Salud Pública*. 21(3):176-178.
- Ávila-Curiel, et al. (1998). La desnutrición infantil en el medio rural mexicano. *Salud Pública de México*.40:150-160.
- Bolívar F. (Ed.). (2004). *Fundamentos y casos exitosos de la biotecnología moderna*. México: El Colegio Nacional
- Brooks, GF, Butel, J, Morse, S (2005). *Microbiología médica de Jawertz, Melnick y Adelberg* (18a. ed.). México: El manual moderno.
- Carrasco C. (2006). *Desnutrición, Indicaciones de soporte nutricional*. En García-Moncó J., Manual del medico de guardia (pp.502-503) España: Díaz de Santos.
- Cerna, JF, Nataro J, y Estrada-García, T (2003). Multiplex PCR for Detection of Three Plasmid-Borne Genes of Enteroaggregative *Escherichia coli* Strains. *Journal of clinical microbiology*. 41(5): 2138–2140.
- CEIEG. (2012). *Perfiles municipales, Pantepec*. Obtenido de: <http://www.ceieg.chiapas.gob.mx/perfiles/PHistoricoIndex.php?region=067&option=1#>
- CEIEG. (2012). *Perfiles municipales, Chanal*. Obtenido de: <http://www.ceieg.chiapas.gob.mx/perfiles/PHistoricoIndex.php?region=024&option=1#>
- CEIEG. (2011). *Zonas de atención prioritarias*. Obtenido de: http://www.ceieg.chiapas.gob.mx/home/?page_id=5552&maccion=5552

- Consejo Nacional de Población (CONAPO) (2006). *Índices de marginación 2005*. México.: Secretaria general del Consejo Nacional de Población.
- CONAPO (2005). *Mortalidad en hombres (estandarizada por edad) por enfermedades transmisibles, perinatales y deficiencias de la nutrición, según entidad federativa de residencia habitual 2005*. México: CONAPO.
- CONAPO (2008). *Mortalidad en mujeres (estandarizada por edad) por enfermedades transmisibles, perinatales y deficiencias de la nutrición, según entidad federativa de residencia habitual 2008*. México: CONAPO.
- CONAPO (2010) *Principales causas de mortalidad en México 1980-2007*. Nueva York: Secretaria General del consejo Nacional de Población.
- CONAPO (2008). *Tasa de mortalidad (estandarizada por edad) por grandes grupos de causas, según sexo y entidad federativa de residencia habitual 2008*. México: CONAPO.
- CONAPO (2005). *Tasa de mortalidad infantil por municipio 2005*. México: CONAPO.
- Consejo Nacional de Evaluación de la Política de Desarrollo Social (2008) *Evolución de la Pobreza e índice de Rezago Social en el estado de Chiapas 2000 y 2005*. México: CONEVAL.
- CONEVAL (2010). *Informe de Pobreza Multidimensional en México 2008*. México: CONEVAL.
- Cortés-Ortiz IA, Rodríguez-Ángeles A, Moreno-Escobar E, Tenorio-Lara J, Torres-Mazadiego, Montiel-Vázquez E (2002). Brote causado por *Escherichia coli* en Chalco, México. *Salud Pública de México*. 44:297-302.
- Encuesta Nacional de Salud y nutrición (ENSANUT) (2006). *Resultados por entidad federativa, Chiapas*. Cuernavaca: Instituto Nacional de Salud Publica-Secretaria de Salud.

- González-Parodi G., Luna- Ordoñez E. (2007) *Pobreza y Exclusión Social: agenda pendiente en los municipios*. México: UAM.
- Gómez F. (2003). Desnutrición. *Salud pública México*. 45(4):576-582.
- Graniel y Carrillo. (2006). Calidad del agua del río Zanatenco en el Estado de Chiapas. *Ingeniería Revista Académica*. 10 (3):35-42.
- Granich, et al. (1999). Patterns of health seeking behavior during episodes of childhood diarrhea: a study of Tzotzil-speaking Mayans in the highlands of Chiapas, Mexico. *Social Science & Medicine*. 48(4): 489-95.
- Gutiérrez JJ, et al. (2008). The serine protease motif of Pic mediates a dose-dependent mucolytic activity after binding to sugar constituents of the mucin substrate. *Microbial Pathogenesis*. 45:115-123.
- Gutiérrez-Jiménez J, Navarro-García F, Castro L, Salazar-Gonzalez H, Córdova V, García-Tovar (2010). Pic, an Autotransporter Protein Secreted by Different Pathogens in the *Enterobacteriaceae* Family, Is a Potent Mucus Secretagogue. *Infection and Immunity*. 78(10): 4101–4109.
- Hannaoui E, Villalobos L, Martínez R (2009). *Escherichia coli* shigatoxigénica: Patogénesis, diagnóstico y tratamiento. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*. 29:13-20.
- Harrington S, Dudley E y Nataro J (2006). Pathogenesis of enteroaggregative *Escherichia coli* infection. *FEMS Microbiology*. 254:12–18.
- Heimer SR, Mobley H, David A, Lockett C, Johnson D (2004). Autotransporter Genes *pic* and *tsh* Are Associated with *Escherichia coli* Strains That Cause Acute Pyelonephritis and Are Expressed during Urinary Tract Infection. *Infection and Immunity*. 72(1): 593-597.
- Henderson I, Czeizulin J, Eslava C, Noriega F, y Nataro J (1999). Characterization of Pic, a Secreted Protease of *Shigella flexneri* and Enteroaggregative *Escherichia coli*.

Infection and Immunity. 67(11):5587-5596.

- Huang D, DuPont HL, Mohanty A, Okhuysen P, Chiang T (2006). A review of an emerging enteric pathogen: enteroaggregative *Escherichia coli*. *Journal of Medical Microbiology*.55:1300-1311.
- INAFED, (2005) *Enciclopedia de los Municipios de México*. Obtenido de: www.e-local.gob.mx
- INEGI. (2010). *México en cifras, Chahal*. Obtenido de: <http://www.inegi.org.mx/sistemas/mexicocifras/default.aspx?e=7>
- INEGI. (2010). *México en cifras, Pantepec*. Obtenido de: <http://www.inegi.org.mx/sistemas/mexicocifras/default.aspx?e=7>
- Kayser F, Bienz K, Eckert J, Zinkernagel R. (2005). *Medical Microbiology*. New York: Thieme.
- Leotta G., Chinen I., Miliwebsky E., Rivas M., et. al. (2005) Validación de una técnica de PCR múltiple para la detección de *Escherichia coli* productor de toxina Shiga. *Revista Argentina de Microbiología*. 37:1-10.
- Londoño A., Mejía S, Gómez J (2008). Prevalencia y factores de riesgo asociados a parasitismo intestinal en preescolares de zona urbana en Calarcá, Colombia. *Revista de Salud Pública*. 11:72-81.
- López-Saucedo, et al. (2003). Single multiplex polymerase chain reaction to detect diverse loci associated with diarrheagenic *Escherichia coli*. *Emerging Infectious Diseases*. 9 (1):127-131.
- Lutter, Chaparro y Muñoz. (2011). Avance hacia el Objetivo de Desarrollo del Milenio 1 en América Latina y el Caribe: la importancia de la elección del indicador de desnutrición. *Bull World Health Organ*. 89: 22-30.
- Madigan MT, Martinko J, Parker J (2003). *Brock Biología de los microorganismos* (10a. ed.). España: Pearson.

- Martínez y García. (2007). *Desnutrición energético-proteínica*. En Casanueva E, Kaufer-orwitz M, Pérez A, Arroyo P, Nutriología médica. (pp. 263-291). México: Panamericana.
- Mathews C, Holde K, Ahern K. (2002) *Bioquímica* (3ra ed.). España: PEARSON
- Mendez-Alvarez S y Perez-Roth E (2004) La PCR múltiple en microbiología clínica. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 22(3):72-80.
- Monkemuller K y Wilcox C (2001). Gastrointestinal infections in children. *Current Opinion in Gastroenterology*. 17(1): 35-39.
- Murray, P. R., Rosenthal, K., Pfaller (2007). *Microbiología médica* (5ta. Ed.). España: Elsevier.
- Nataro J y Kaper J (1998). Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clinical microbiology Review*. 11(1):142-201.
- Nataro J, Steiner T y Guerrant R (1998). Enteroaggregative *Escherichia coli*. *Emerging Infectious Diseases*.4(2):251-261
- O'Hara C, (2005). Manual and Automated Instrumentation for Identification of Enterobacteriaceae and Other Aerobic Gram-Negative Bacilli. *Clinical Microbiology Reviews*. 18(1):147-162.
- Ochoa t, et al. (2011). Frecuencia y patotipos de *Escherichia coli* diarrogénica en niños peruanos con y sin diarrea. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*. 28(1), 13-20.
- OMS (2009). *Enfermedades diarreicas*. Obtenido de: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs330/es/index.html>
- Orozco, Ramírez y Cruz. (2008). Caracterización fisicoquímica y bacteriológica de aguas subterráneas de pozos artesanales y efluentes hídricos en la Costa de Chiapas (México). *Higiene y Sanidad Ambiental*. 8: 348-354
- Piatkin K. (1968). *Microbiología*. Moscú: MIR.
- Pichel M, Binsztein M, Qadri F, y Girón J (2002). Type IV Longus Pilus of Enterotoxigenic *Escherichia coli*: Occurrence and Association with Toxin Types and Colonization Factors among Strains Isolated in Argentina. *Journal of clinical Microbiology*. 40(2): 694–697.
- Riechmann et al. (2008). *Diarrea aguda*. Madrid: SEGHNPAEP.

- Riley, et al. (1990). Risk factors for acute infantile diarrhea in a rural community in Chiapas, Mexico. A strategy for intervention. *Boletín de la Oficina Panamericana*. 108(2):93-9.
- Rodríguez-Ángeles G (2002) Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. *Salud Pública de México*.44:464-475.
- Ruiz-Blázquez J, Vargas M, Nataro, J, Vila J, Gascón I, Brustenga J (2005) Validación de la técnica de PCR para la detección de *Escherichia coli* enteroagregativa causante de diarrea del viajero. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 23(08):479-81.
- Sánchez, Romecín, Guachalla, Iñiguez. (2004) Caracterización genotípica de aislados de *Escherichia coli* AEEC de pacientes pediátricos con procesos diarreicos infecciosos en la ciudad de La Paz: implicancias para el diagnóstico y epidemiología de las enfermedades diarreicas agudas. *Revista de la Sociedad Boliviana de Pediatría*. 43 (3). 132-43
- Sánchez-Pérez, et al. (2007). Malnutrition among children younger than 5 years-old in conflict zones of Chiapas, Mexico. *American Journal of Public Health*. 97(2): 229-232.
- Sánchez-Pérez, Vargas-Morales y Méndez-Sánchez. (2000). Calidad bacteriológica del agua para consumo humano en zonas de alta marginación de Chiapas. *Salud Pública de México*. 42:397-406
- Schael I y Martínez M. (1990). *Nutrición y diarrea agua*. Venezuela: EQUINOCCIO
- Schlegel H. (1997) Microbiología general. Barcelona: OMEGA
- Secretaria de Salud. (2006). *Salud: México 2006, Información para la rendición de cuentas*. México: Secretaria de Salud.
- Secretaria de Salud (2007). *Programa Institucional de la Secretaría de Salud 2007-2012*. México: Secretaria de Salud.
- Secretaria de Salud. (2008) *Principales causas de mortalidad en edad preescolar de 1-4 años 2008*. México: Secretaria de Salud-CONAPO 2006.
- Secretaria de Salud (2008). *Principales causas de mortalidad infantil en menores de 1 año 2008*. México: Secretaria de Salud.
- SINAIS (2008). *Indicadores básicos de Salud, mortalidad 2000-2008*. México: Secretaria de Salud. Obtenido de: <http://www.sinais.salud.gob.mx/indicadores/basicos.html>

- Spickler A, et al. (2010). *Enfermedades emergentes y exóticas de los animales*. Iowa: College of Veterinary Medicine.
- Steiner, Lima, Nataro y Guerrant. (1998). Enteroaggregative *Escherichia coli* produce intestinal inflammation and growth impairment and cause interleukin-8 release from intestinal epithelial cells. *Journal of Infectious Diseases*. 177:88-96.
- Torres A y Baca B (1995) Reacción en cadena de la polimerasa. *Elementos*. 23(3):16-21.
- UNICEF (2008). *Lineamientos Estratégicos para la Erradicación de la Desnutrición Crónica Infantil en América Latina y el Caribe*. Panamá: UNICEF.
- Valdés-Dapena (2001). *Enterobacterias*. En Llop L., Microbiología y Parasitología Médicas (pp. 251-280). Habana: Ciencias Medicas.
- Varela G, et al. (2007). *Escherichia coli* enteropatógeno clásico (EPEC) asociado a casos de diarrea en niños usuarios del Hospital Pereira Rossell. Aspectos clínicos y características de las cepas involucradas. *Revista Médica de Uruguay*. 23, 153-163
- Villaseca JM, Hernández U, Eslava C, Sainz-Espuñes TR, Rosario C (2005). Enteroaggregative *Escherichia coli* an emergent pathogen with different virulence properties. *Revista Latinoamericana de Microbiología*.47 (3-4): 140-159
- Viswanathan VK, Hodges K, y Hecht G (2008). Enteric infection meets intestinal function: how bacterial pathogens cause diarrhoea. *Nature Reviews Microbiology*. 2053: 1-10.

