

**UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRES
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACEUTICAS Y BIOQUÍMICAS
CARRERA DE BIOQUIMICA
INSTITUTO DE BIOLOGIA MOLECULAR Y BIOTECNOLOGÍA**



**“CARACTERIZACION Y EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DE LAS
INFECCIONES POR *Escherichia coli* ENTEROAGREGATIVA (EAEC) EN
NIÑOS MENORES A CINCO AÑOS DE EDAD CON PROCESOS
DIARREICOS EN LA CIUDAD DE LA PAZ-EL ALTO. 2004”**

TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE LICENCIATURA EN BIOQUIMICA

ELABORADO POR:

Oscar V. Cardenas Alegria

TUTOR:

Volga Iñiguez Rojas P.H.D.

La Paz-Bolivia

2006

**UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACEUTICAS Y BIOQUÍMICAS
CARRERA DE BIOQUIMICA
INSTITUTO DE BIOLOGIA MOLECULAR Y BIOTECNOLOGÍA**



**“CARACTERIZACION Y EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DE LAS
INFECCIONES POR *Escherichia coli* ENTEROAGREGATIVA (EAEC) EN
NIÑOS MENORES A CINCO AÑOS DE EDAD CON PROCESOS
DIARREICOS EN LA CIUDAD DE LA PAZ-EL ALTO. 2004”**

TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE LICENCIATURA EN BIOQUIMICA

ELABORADO POR:

Oscar V. Cardenas Alegria

TUTOR:

Volga Iñiguez Rojas P.H.D.

La Paz-Bolivia

2006

DEDICATORIA

El presente trabajo lo dedico a la persona que me dio la vida, me enseñó a luchar por los sueños y ha saber levantarme ante las adversidades de la vida, es para mi Mamita Encarnación, que aunque ya no esta a mi lado físicamente, siempre está en mi corazón y pensamiento.

También quiero dedicarlo a mi Papá Victor

A mis hermanos: Lizbeth (Lizbechi)

Jorge Luis (Coquito)

Rosmeri (Arrosito)

Por su apoyo moral, compañía y paciencia.

AGRADECIMIENTOS

Antes de todo quiero agradecer al Todo Poderoso quien me dio la oportunidad de vivir y poner en mi camino a todas las personas.

Es para mi haber tenido la fortuna de realizar el presente trabajo en el Instituto de Biología Molecular y Biotecnología (IBMB-UMSA), encabezado por la Dra. Volga Iñiguez a quien agradezco por su preocupación no solamente en la elaboración del trabajo sino también de mi formación académica y de mi persona.

A las personas quienes son parte activa del Instituto al Lic. Nataniel Mamani (Licen Nata) por su paciencia y orientación, Dr. Rolando Sanchez (Don Gato) como docente me enseñó las maravillas de su materia, también por la colaboración, apoyo moral y sobre todo por la paciencia que tuvo conmigo, a Kejtil por colaborar en el análisis de resultados y al Sr. Natalio Medrano (Don Natita) por su colaboración en la recolección de las muestras.

A mis compañeros de laboratorio con quienes compartí muy buenos momentos, que siempre me levantaron la moral, me orientaron y me tuvieron paciencia, agradezco: a las personas de mi unidad Enterobacterias a Miguel G., Rosalia M., Ximena A. (Susanita), Claudia R., Sergio G. y Carla C.; a los de la unidad de S.R.B. Sonia S., Karina S., Daniela A., Samanta S. y José S. (Pepe); unidad de Rotavirus a Sissy Q., Rosario R. (Charito), Ana E. (Anita); a los de la unidad de Evolución Alvaro R. (Alvaré), Julia B. (July), Carla R., Shirley A. y a todas las personas que tuve el agrado de conocerlas que fueron parte del Instituto.

A mis Familiares quienes siempre me brindaron un apoyo moral y me extendieron la mano en todo momento: A mi Abuelita Justina, Tía Fernanda, Tía Celia y mis primas Nellyda, Erika, Pamela.

También a las personas quienes me otorgaron su amistad sincera Sussy F. (Suu), Rudy, Rosenka, Claudia, Dra. Monasterios, David G., Marco P., Javier T., Dra. Alvarez, Dr Terrazas, Tatiana C., Silvia Z., Lucia G., Yaroslava P. Sergio Q., Gaby M., Gabriela L.; a mis compañeros de la Facultad quienes me apoyaron en todo momento Erick A., Pamela S., Juan Y., José G., Julio C., Moises C., Alvaro G., Dennis C., a las personas que siempre estaron a mi lado y tuve la fortuna de compartir agradables momentos Ma. de los Ángeles, Mirian, Ma. Gisela, Elizabeth, Claudia, Magda, Edwin, Ivlin, Ana Paula, Marcelo G., Freddy Velásquez gracias por tu amistad y a todos mis alumnos del Laboratorio de Biología Molecular.

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN ABSTRACT

1. INTRODUCCION	14
2. OBJETIVOS	17
2.1. OBJETIVO GENERAL.....	17
2.2. OBJETIVO ESPECIFICO	17
3. MARCO TEORICO	17
3.1. DEFINICION DE DIARREA	17
3.2. EPIDEMIOLOGIA	18
3.3. ETIOLOGIA.....	19
3.4. CLASIFICACIÓN.....	20
3.4.1. Coliforme.....	20
3.4.2. Disenteriforme	20
3.4.3. Diarrea persistente	20
3.5. MECANISMOS FISIOPATOLOGICOS	21
3.6. DIARREA PERSISTENTE.....	14
3.7. CARACTERISTICAS GENERALES DE <i>Escherichia coli</i>	16
3.8. <i>Escherichia coli</i> ENTEROAGREGATIVA.....	31
3.8.1. Epidemiología.....	32
3.8.2. Manifestaciones Clínicas y Tratamiento	33
3.8.3. Mecanismos de Patogenicidad.....	33
3.8.3.1. Adhesión.....	34
3.8.3.2. Toxinas.....	38
3.8.3.3. Respuesta Inmune.....	42
3.8.4. Métodos de Identificación de EAEC.....	44
3.8.4.1. Cultivos Celulares.....	44
3.8.4.2. Técnicas Moleculares.....	46
4. MATERIALES Y METODOS	47
4.1. POBLACION DE ESTUDIO	47
4.1.1. Criterios de Inclusión	47
4.1.2. Cepas de Referencia	47
4.2. RECOLECCION DE MUESTRAS	47
4.2.1. Cultivo de las Muestra	47
4.3. IDENTIFICACION DE GENES ASOCIADOS A <i>Escherichia coli</i> ENTEROAGREGATIVA.....	47
4.4. IDENTIFICACIÓN DE ROTAVIRUS	49
4.4.1. Extracción y electroforesis del RNA viral	49
4.5. ESTUDIO DE SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA	49
4.6. ANALISIS ESTADISTICO	49
5. DISEÑO METODOLOGICO	49
6. RESULTADOS	54
6.1. CARACTERISTICAS DE LA POBLACION ANALIZADA.....	54
6.2. POBLACION DE ESTUDIO Y PREVALENCIA DE <i>Escherichia coli</i> ENTEROAGREGATIVA.....	54
6.2.1. Frecuencia de EAEC a lo largo del estudio.....	55
6.2.2. Infección por EAEC y edad	57

6.3. INFECCION POR ROTAVIRUS Y ASOCIACION ENTRE ROTAVIRUS Y EAEC	58
6.4. CARACTERIZACIÓN GENOTÍPICA DE <i>Escherichia coli</i> ENTEROAGREGATIVA.....	62
6.5. SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA DE LAS CEPAS DE EAEC	66
6.6. DIVERSIDAD GENO-FENOTÍPICA DE EAEC	71
7. DISCUSION	72
7.1. EDA: CARACTERÍSTICAS DE LA POBLACION ANALIZADA	72
7.2. IDENTIFICACION DE EAEC	72
7.3. PREVALENCIA DE <i>Escherichia coli</i> ENTEROAGREGATIVA	73
7.4. ROTAVIRUS Y EAEC	74
7.5. CARACTERIZACION GENOTÍPICA DE EAEC	77
7.6. SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA	78
7.7. DIVERSIDAD GENO-FENOTÍPICA.....	79
8. CONCLUSIONES	80
9. RECOMENDACIONES	84
10. REFERENCIA BIBLIOGRAFICA	85
11. ANEXOS	83

INDICE DE TABLAS

TABLA 1. Patógenos más frecuentes que provocan infecciones diarreicas en niños menores de cinco años de edad.....	20
TABLA 2. Técnicas moleculares utilizadas y ha utilizar para la determinación de EAEC	47
TABLA 3. Distribución de muestras recolectadas de los Hospitales.....	48
TABLA 4. Lista de cepas de referencia utilizadas en este estudio	49
TABLA 5. Descripción de los genes y condiciones para la amplificación por PCR	52
TABLA 6. Halos de sensibilidad estándar para los semidiscos recomendados por la NCCLS	53
TABLA 7. Características de los niños menores de cinco años de edad con EDA, Enero-Diciembre. 2004	55
TABLA 8. Distribución de las muestras recolectadas y de aislados EAEC positivos a lo largo del estudio. Enero-Diciembre. 2004	56
TABLA 9. .- Infección por EAEC según género y procedencia de pacientes con procesos diarreicos infecciosos. Enero-Diciembre. 2004.....	57
TABLA 10. Infección por EAEC según la edad de la población del estudio de pacientes con procesos diarreicos infecciosos. Enero-Diciembre. 2004.....	58
TABLA 11. Infección de rotavirus y EAEC según el género de la población en estudio. Enero-Diciembre. 2004	60
TABLA 12. Infección de rotavirus y EAEC según la edad de las muestras recolectadas a lo largo del estudio. Enero-Diciembre. 2004	60
TABLA 13. Infección por Rotavirus y EAEC de las muestras recolectadas a lo largo del estudio. Enero-Diciembre. 2004	62
TABLA 14. Distribución de los genes de virulencia en cepas EAEC aisladas de pacientes con procesos diarreicos infecciosos. Enero-Diciembre. 2004.....	53
TABLA 15. Distribución de los genotipos encontrados en las cepas EAEC aislados de pacientes con procesos diarreicos infecciosos. Enero-Diciembre 2004	56
TABLA 16. Distribución de los diferentes perfiles de resistencia de los aislados EAEC positivos encontrados a lo largo del estudio. Enero-Diciembre. 2004 ...	71

TABLA 17. Distribución de las EDA y las muestras analizadas a lo largo del estudio del Hospital Boliviano Holandés y Materno Infantil. Enero a Febrero. 2004	97
TABLA 18. Características genotípicas y susceptibilidad antimicrobiana de las 103 muestras aisladas durante el tiempo de estudio.....	98
TABLA 19. Relación de los genes analizados en este estudio y los antibióticos encontrados en el presente estudio.....	102
TABLA 20. Relación de la variabilidad genotípica y los antibióticos utilizados en el presente estudio.....	111
TABLA 21. Relación de los genotipos y antibiotipos encontrados en las cepas aisladas en el periodo de estudio.....	102

INDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. Patrones de adherencia de diferentes patotipos de <i>E. coli</i> en células epiteliales HEP-2.....	28
FIGURA 2. Esquema de las diferentes formas de adhesión que realizan los diferentes patotipos de <i>E. coli</i>	30
FIGURA 3. Mecanismo de patogenicidad de los diferentes patotipos de <i>Escherichia coli</i> diarreogénica.....	30
FIGURA 4. Patrones de adherencia de <i>Escherichia coli</i> diarreogénica.....	31
FIGURA 5. Representación esquemática del plasmido <i>pAA</i>	35
FIGURA 6. Mapa de la región virulenta de <i>pAA</i> donde se encuentran los componentes codificantes de AAF II.	37
FIGURA 7. Sistema de secreción de la proteína Dispersina la cual es secretada al periplasma.....	38
FIGURA 8. Característica de la adhesión bacteriana de EAEC.....	39
FIGURA 9. Comparación de la secuencia de aminoácidos EAST1.....	40
FIGURA 10. Cinética de los mecanismos de patogenie de <i>Escherichia coli</i> diarreogenica.....	42
FIGURA 11. Característica de las Islas Genomicas (GEIs)	43
FIGURA 12. Adherencia de las bacterias con las células HEp-2.....	56
FIGURA 13. Distribución de las muestras recolectadas y de aislados EAEC positivos a lo largo del estudio. Enero-Diciembre. 2004	57
FIGURA 14. Distribución de infección por rotavirus y en EAEC en las muestras recolectadas a lo largo del estudio. Enero-Diciembre. 2004.....	59
FIGURA 15. Distribución de muestras infectadas por rotavirus y EAEC de la población en estudio según la edad. Enero-Diciembre. 2004.....	61
FIGURA 16. Distribución de las EDAs, las infecciones por rotavirus y EAEC de las muestras recolectadas a lo largo del estudio. 2004	62
FIGURA 17. Amplificación de los genes de EAEC analizados en el presente trabajo	64
FIGURA 18. Distribución de los genes analizados en cepas EAEC asiladas de pacientes con procesos diarreicos infecciosos en el tiempo de estudio	65

FIGURA 13. Resistencia antimicrobiana a siete antibióticos de aislados de EAEC provenientes de las muestras recolectadas a lo largo del estudio.....	67
FIGURA 20. Distribución del modelo de independencia de la proporción de aislados bacterianos resistentes a 1 hasta 7 antibióticos en cepas EAEC aisladas de pacientes con procesos diarreicos infecciosos	68
FIGURA 21. Multiresistencia de las muestras EAEC aisladas de pacientes con procesos diarreicos infecciosos. Enero-Diciembre. 2004.....	69
FIGURA 22. Distribución de la susceptibilidad antimicrobiana de las cepas EAEC aisladas de pacientes con procesos diarreicos infecciosos. Enero-Diciembre. 2004	70
FIGURA 23. Relación de los genes analizados y la resistencia a antibióticos de cepas EAEC aisladas de pacientes con diarrea. 2004.....	72
FIGURA 24. Características de las muestras recolectadas durante el tiempo de estudio	96
FIGURA 25. Distribución de las muestras analizadas a lo largo del estudio. Enero a diciembre 2004.....	97

INDICE DE ANEXOS

ANEXO 1: Características de las muestras recolectadas durante el tiempo en estudio.....	96
ANEXO 2: Distribución de las EDA y las muestras analizadas a lo largo del estudio del Hospital Boliviano Holandés y Materno Infantil. Enero a Febrero. 2004	97
ANEXO 3: Características genotípicas y susceptibilidad antimicrobiana de las 103 muestras aisladas durante el tiempo de estudio.....	98
ANEXO 4: Relación de los genes analizados en este estudio y los antibiotipos encontrados en el presente estudio.....	102

RESUMEN:

EAEC es una de las principales causas de diarrea en diferentes partes del mundo, el presente trabajo tiene por finalidad caracterizar la epidemiología de las infecciones por EAEC en niños menores a 5 años con diarrea, para lo cual se recolectaron 691 muestras de heces fecales de la ciudad de La Paz-El Alto, en el año 2004. En las muestras se analizó la presencia de EAEC mediante la amplificación del marcador plasmidico *pAA*. Los aislados *pAA+* fueron caracterizados respecto a la presencia de genes de virulencia (*aggR*, *aggA*, *aafA*, *astA*, *pet*, *irp* y *pic*) y se analizó con marcadores de resistencia a 7 antibióticos (TMS, AM, TET, CMP, ERY, NAL y FOX) asimismo se evaluó paralelamente las coinfecciones entre EAEC y rotavirus. EAEC presento una prevalencia del 15% observándose una distribución uniforme a lo largo del año y con mayor prevalencia en los grupos etáreos a partir de los 4 meses de edad. El 4% de las muestras presentó coinfección EAEC-rotavirus, siendo el grupo etáreo mas afectado de 7 a 12 meses de edad. La coinfecciones presentaron en los meses donde el rotavirus es prevalente desde marzo a julio y en mayor proporción en el género masculino. El análisis de la distribución de los genes de virulencia de EAEC mostró diversidad de combinaciones de los genes frecuentemente encontrados: *astA* 98%, *irp* 82% y *aggR* 72% seguido por los genes *aggA* 31%, *pet* 30%, *pic* 25% y *aafA* 21%. Se observó mayor resistencia a TMS 81.6%, AM 68% y ERY 63.1%, la multiresistencia a 5 antibióticos se observo en el 23%.

PALABRAS CLAVES: EAEC: *Escherichia coli* Enteroagrativa, rotavirus, genes de virulencia y marcadores de resistencia.

TMS: Trimetoprim-Sulfametaxazol, AM: Ampicilina, ERY: Eritromicina, CMP: Cloranfenicol, NAL: Ácido Nalidixico, FOX: Cefotaxina y TET: Tetraciclina

ABSTRACT.

EAEC is one of the main causes of diarrhea in different parts of the world, the present work has for purpose to characterize the epidemiology of the infections for EAEC in children with diarrhea minor to 5 years, for that which 691 samples of fecal of the city of La Paz-El Alto, in the 2004. In the samples you analyzes the presence of EAEC by means of the amplification of the marker plasmidico *pAA*. The isolated *pAA+* was characterized regarding the presence of genes of virulence (*aggR*, *aggA*, *aafA*, *astA*, *pet*, *irp* and *pic*) and you analyzes with resistance markers to 7 antibiotics (TMS, AMP, TET, CMP, ERY, NAL and FOX) also it was evaluated the coinfecciones parallely between EAEC and rotavirus. EAEC presents a prevalencia of 15% being observed an uniform distribution along the year and with more prevalencia in the groups etáreos starting from the 4 months of age. 4% of the samples presented coinfección EAEC-rotavirus, being the group etáreo but affected of 7 to 12 months of age. The coinfecciones presents in the months where the rotavirus is prevalente from of March to July and in more proportion in the masculine gender. The analysis of the distribution of the genes of virulence of EAEC showed diversity of combinations of the genes it frequently found: *astA* 98%, *irp* 82% and *aggR* 72% continued by the genes *aggA* 31%, *pet* 30%, *pic* 25% and *aafA* 21%. bigger resistance was observed TMS 81.6%, AMP 68% and ERY 63.1%, the multiresistencia to 5 antibiotics one observes in 23%.

KEY WORDS: EAEC: *Escherichia coli* Enteroaggregative, rotavirus, genes of virulence and resistance markers.

TMS: Trimetoprim-Sulfametaxazol, AMP: Ampicilina, ERY: Erytromicina, CMP: Chloranfenicol, NAL: Nalidix Acid, FOX: Cefotaxine and TET: Tetracyclina.

1. INTRODUCCIÓN.

Uno de los problemas de salud en los países en desarrollo son las infecciones diarreicas agudas que afectan a los niños hasta los cinco años de edad, los cuales perecen por la falta de atención médica o de tratamiento. En Bolivia la tasa de mortalidad bruta es de 8.6 por cada mil habitantes, de donde el 36% (3.1 por cada mil habitantes) de los niños menores de cinco años de edad tienen infecciones gastrointestinales (Organización Panamericana de Salud. 2002).

Escherichia coli diarreogénica es uno de los agentes causales mas comunes de procesos diarreicos dentro la diversidad bacteriana que ataca el aparato gastrointestinal, existiendo hoy en día siete patotipos de *Escherichia coli* diarreogénica. Uno de estos patotipos, *Escherichia coli* Enteroagregativa se caracteriza por presentar adherencia agregativa en pruebas de adhesión celular (células HEP-2). Diferentes trabajos epidemiológicos muestran que EAEC es una cepa emergente en las enfermedades diarreicas, afectando mayormente a niños menores a cinco años de edad en una frecuencia de 16 a 31% (Sarantuya et al. 2004; Pabst et al. 2003; Rodrigues et al. 2002; Rachtrachenchai et al. 2004). Así mismo la infección por *E. coli* Enteroagregativa se presenta en pacientes con procesos diarreicos agudos, crónicos y asintomáticos. Se observa también la asociación de EAEC con otros patógenos como EPEC y rotavirus (Okeke et al.2001) lo que involucraría a la severidad de la enfermedad, dificultaría el diagnostico y tratamiento de esta cepa.

Si bien hasta el momento la determinación de *E. coli* Enteroagregativa se basa en las características fenotípicas (adhesión celular). La heterogeneidad que demuestra esta cepa en sus factores de virulencia y en diferentes áreas geográficas, no ha permitido revelar un marcador específico para EAEC, mediante el uso de técnicas moleculares. Así en la búsqueda de obtener un marcador ideal para la identificación de las cepa EAEC se han usado diferentes factores de virulencia como el gen *aggR* (factor de transcripción para los genes de las fimbrias de adhesión AFF I/II) (Zamboni et al. 2004), el plasmido *pAA* (plásmido de adherencia agregativa)

(Piva et al. 2003) o los genes codificantes de las fimbrias de adhesión (Kahali et al. 2004).

El presente trabajo esta dirigido a determinar la prevalencia de EAEC en muestras diarreicas agudas en pacientes menores a 5 años de edad en hospitales de la ciudad de la Paz y El Alto a lo largo del periodo de enero-diciembre de 2004. Asimismo se caracterizara a las diferentes cepas de EAEC circulantes en nuestro medio mediante la identificación de genes de virulencia por características de este patotipo.

2. OBJETIVOS.

a. OBJETIVO GENERAL.

Caracterizar la epidemiología de las infecciones por *Escherichia coli* Enteroagregativa (EAEC) y la distribución del perfil genético de los aislados EAEC obtenidos de niños menores a cinco años de edad, con procesos diarreicos en la ciudad de La Paz-El Alto de muestras recolectadas en el 2004.

b. OBJETIVO ESPECIFICO.

- Determinar la prevalencia de infecciones por *E. coli* Enteroagregativa en niños con EDAs menores de cinco años.
- Determinar la coinfección de *E. coli* Enteroagregativa con rotavirus.
- Caracterizar la distribución de genes virulentos y la resistencia a antibióticos en los aislados EAEC.

3. MARCO TEORICO.

a. DEFINICIÓN DE DIARREA.

Las infecciones del tracto gastrointestinal se caracterizan por su gran uniformidad, en cuanto a síntomas y signos, independientemente del agente involucrado. Casi siempre se presentan en forma simultánea diarrea y vómitos, así como fiebre. De todos los síntomas, la diarrea es el común denominador en las infecciones gastrointestinales. La OMS-OPS define a la diarrea aguda como la presencia de 3 o más deposiciones líquidas o semilíquidas, con o sin sangre en las últimas 24 horas.

b. EPIDEMIOLOGIA.

Mundialmente las EDA causan la tercera parte de las muertes en niños menores de 5 años (Pérez et al. 2003).

La mortalidad asociada a la EDA presenta globalmente indicadores entre 3.3 hasta 6 millones de niños por año (Indian Pediatrics. 2005), esto representa 6 500 muertes por día, presentando sustancialmente variaciones regionales tanto en su incidencia como en la variedad y frecuencia relativa de los agentes etiológicos que causan la enfermedad. Así se calcula 5 millones de muertes por diarrea por año en menores de 5 años, en países en desarrollo, donde la tasa de mortalidad por diarrea se estima en 1.623 por 100.000 niños, en contraste a los países desarrollados de 2.3 por 100.000 niños.

Incidencia: Se estima que se presenta más de un billón de casos de diarrea en el mundo cada año (Pérez et al. 2003). La incidencia de la diarrea varía en diferentes regiones alcanzando 3,9 episodios/niño/año en América Latina y 2,3 episodios/niño/año en Asia.

c. ETIOLOGIA.

La mayoría de los casos de EDA son de origen infeccioso. La ruta de contaminación más común es la fecal-oral, si bien algunos virus podrían ser también transmitidos por vía respiratoria. Asimismo la infección proviene por la ingestión de alimentos o agua contaminada, la transmisión persona a persona estando esta última asociada a variaciones estacionales o a contaminación de fuentes en la comunidad (Comité de Microbiología Clínica Sociedad Chilena de Infectología. 2002).

Es claro, que la incidencia de diarrea en una población dada está directamente ligada al grado de desarrollo socioeconómico (condiciones higiénico-sanitarias), el nivel educativo y la existencia de campañas preventivas.

Otra importante condición biológica que influye en la presentación de EDA es la deficiencia nutricional, la cual predispone a contraer enfermedades infecciosas entéricas y demora la recuperación de la mucosa afectada.

Los agentes etiológicos importantes que afectan al tracto intestinal por sobre crecimiento bacteriano en intestino delgado y/o colon, permiten que se produzca la enfermedad (Torres et al. 2003). Los microorganismos mas frecuentes, entre virus, parásitos y bacterias (Sherman et al. 2005), se detallan en la Tabla 1.

TABLA 1.- Patógenos más frecuentes que provocan infecciones
diarreicas en niños menores de cinco años de edad.

MICROORGANISMOS
Virus:
• Rotavirus
• Adenovirus
• Calcivirus
• Astrovirus
Bacterias:
• <i>Escherichia coli</i> Diarreogenica (*ETEC, EPEC, EHEC, EIEC, EAEC, DAEC)
• <i>Shigella spp</i>
• <i>Salmonella spp</i>
• <i>C. jejuni coli</i>
• <i>V. cholerae</i>
• <i>Y. enterocolitica</i>
Parasitos:
• <i>G. lamblia</i>
• <i>Microsporidia</i>
• <i>E. histolitica</i>
• <i>Crystosporidium spp</i>

* ETEC: *E. coli* enterotoxigenica; EPEC: *E. coli* enteropatogena; EHEC: *E. coli* enterohemorrágica; EIEC: *E. coli* enteroinvasiva; EAEC: *E. coli* enteroagregativa; *E.coli* adhesión difusa.

FUENTE: Youssef, et al. 2005

Se ha determinado que rotavirus es uno de las principales causantes de diarrea en niños menores de edad (< 5 años de edad) en diferentes regiones del mundo. Entre los enteropatógenos bacterianos mas prevalentes se encuentran EPEC, ETEC, *Shiguella*, *Campylobacter* (Youssef et al. 2000 y Rodrigues et al. 2002), aunque se observa también el surgimiento de patotipos que están emergiendo en las

poblaciones humanas significativamente como STEC (*E. coli* Shiga Toxigénica) y EAEC (Rappelli, et al. 2005; Ratchatrachenchai et al.2004).

d. CLASIFICACION.

Los cuadros de enfermedad diarreica se pueden clasificar en tres síntomas clínicos, siendo posible clasificar a todos los pacientes con diarrea en uno de ellos (Sierra. En: <http://www.encolombia.com/vol33n3-pediatria-actualizacion2.htm>).

i. Coleriforme (diarrea líquida aguda).

Diarrea que empieza agudamente y dura menos de 14 días (la mayoría se resuelve en menos de 7 días).

Se manifiesta 3 ó más evacuaciones intestinales, líquidas o semilíquidas sin sangre visible, que puede acompañarse de vómito, fiebre baja, disminución del apetito e irritabilidad.

Agentes etiológicos asociados:

- Rotavirus
- *Escherichia coli* Enterotoxigénica (ETEC)
- *Escherichia coli* Enteropatógena (EPEC)
- *Shigella spp.*
- *Campyobacter jejuni*
- *Vibro cholera*
- *Yersinia enterocolítica*

ii. Disenteriforme.

Se caracteriza por la presencia de sangre visible en las heces. Sus efectos importantes incluyen: anorexia, pérdida de peso, daño de la mucosa intestinal causada por bacterias invasoras.

Agentes etiológicos asociados:

- *Shigella spp*
- *Escherichia Coli* enteroinvasiva (EIEC)
- *Escherichia Coli* enterohemorrágica (EHEC)
- *Entamoeba hystolítica*
- *Salmonella spp*

iii. Diarrea persistente.

Se inicia como un episodio agudo de diarrea líquida o disentería, pero persistente por 14 ó más días. En estos casos ocurre frecuentemente pérdida marcada de peso, existiendo asociación con la desnutrición.

En estos pacientes el volumen de la pérdida fecal puede ser grande, pudiendo causar deshidratación.

Agentes etiológicos asociados:

- *Escherichia Coli* Enteroinvasiva (EIEC)
- *Escherichia Coli* Enteroagregativa (EAEC)
- *Shiguella spp*
- *Cryptosporidium*

e. MECANISMOS FISIOPATOLOGICOS.

La función de absorción-secreción normalmente existe un balance, esta función se pierde cuando hay desequilibrio en que se disminuye la absorción, aumenta la secreción o ambas. En conclusión la diarrea se produce por una ruptura del equilibrio absorción-secreción.

Las diarreas se clasifican según sean producidas por una alteración de la absorción (mala absorción) o por secreción activa (diarrea secretoria).

Los mecanismos asociados a la patogenicidad de los microorganismos asociados a las enfermedades diarreicas agudas comprenden (Uzzua et al 2000):

1. Producción de toxinas: en el lumen las bacterias secretan toxinas que afectan a los enterocitos apicales, que son eminentemente absorptivos, impidiendo su ciclo metabólico, pero fundamentalmente estimulando la secreción activa como Cl^- , Na^+ y agua. Los microorganismos prototipo que producen las **diarreas secretoras** son *E. coli* Enterotoxigénica (toxinas termoestables-ST y termolábiles-LT I-LT II), *E. coli* Enteroagregativa (toxinas EAST1, Pet y Pic) y *Vibrio cholerae* (con la toxina-CT). Las diarreas son abundantes y persistentes (tanto, como que pueden llevar al choque y a la muerte en cuestión de horas).

2. Daño directo al enterocito: Se produce en el borde del cepillo absorptivo, ocasionando un déficit de las enzimas localizadas e impidiéndose por lo tanto la absorción intestinal. Tanto el sustrato alimenticio como los electrolitos, al no digerirse ni absorberse se acumulan en la luz intestinal, aumentando la osmolaridad intraluminal que arrastra agua desde la pared intestinal. Los patógenos prototipo de la **diarreas osmótica** son *E. coli* Enteropatogénica y los virus (rotavirus y norpovirus).

Shigella spp, puede clasificarse dentro de este grupo fisiopatológico como en el siguiente. Una vez que se encuentra en el interior del enterocito, lo lesiona por medio de la citotoxina (shiga toxina) desencadenando reacción inflamatoria en la membrana basal. El ataque se realiza del sentido proximal al distal, invadiendo de un enterocito al otro enterocito contiguo, hasta finalmente llegar al colon. El mecanismo fundamental de *Shigella spp* es la diarrea osmótica, con componente disentérico y se asocia a la respuesta sistémica por la liberación de la toxina (shiga) a la circulación sanguínea.

3. Invasión: Producido por bacterias invasivas que tienen su localización en proximidades de la válvulas ileocecal y en sentido distal hacia el colon, que invaden enterocitos, produciendo allí reacción inflamatoria y migran a continuación a los ganglios linfáticos mesentéricos, en donde son objeto de un intento de

eliminación, con la consecuente reacción inflamatoria. Mientras ocurre el paso por el enterocito, la diarrea ocasionada es de tipo osmótico que rápidamente va cambiando a la formación de moco, sangre y en ocasiones pus. En la submucosa se encuentran los plexos mesentéricos de Meissner y Auerbach, donde los impulsos aferentes y eferentes que controlan la motilidad intestinal, se ven afectados por la reacción inflamatoria y la liberación de prostaglandinas. El efecto final es un estado de hiperexcitabilidad de dichos plexos que conducen a la hiperexcitabilidad intestinal, diarrea disenteriforme y un estado de reactividad sistémica (fiebre, taquicardia, leucocitos) por el flujo de todas los metabolitos, producidos en la reacción sistémica. Son prototipos de este tercer grupo *Shigella spp* y *E. coli* Enterohemorrágica (verotoxina 1 y 2), *Yersinia* enterocolítica (enteroxina termoestable) y *Salmonella spp* (enterotoxina).

En el aspecto clínico, las diarreas de los grupos 1 y 2 son llamadas "**enteriformes o coleriformes**", explosivas por el abundante contenido líquido, de un mal olor suigeneris (fermento) dependiendo de los macronutrientes que se están mal absorbiendo, producen déficit hidroelectrolítico a veces severo y en ocasiones queman el área del pañal. El promedio de pérdida de sodio es del orden de los 50 mEq/litro, son igualmente las que mayores desplomes nutricionales ocasionan. (Sierra. En: <http://www.encolombia.com/vol33n3-pediatria-actualizacion2.htm>).

Entre las defensas naturales frente a los patógenos ingeridos se encuentran a: 1) jugo gástrico ácido; 2) capa viscosa de moco que recubre el intestino; 3) las enzimas pancreáticas líticas y detergentes biliares y 4) los anticuerpos IgA secretados. Las prostaglandinas constituyen el mayor mecanismo de defensa del hospedero que se observa cuando hay incremento de secreción de Cloro por el cual se induce a la sobre regulación del Receptor de Galanin 1 (Gal1R), para que se activen otros mecanismos de defensa como segundos mensajeros, citoquinas factores de inflamación y otros (Hecht, et al. 1999). Los anticuerpos IgA son elaborados por células B localizados en los tejidos linfoides asociados a la mucosa (MALT), que están cubiertos por una única capa de células especializadas

denominadas células M los cuales son importantes para el transporte de varios antígenos hacia MALT.

Es importante anotar que si el estado inmune del paciente afectado es competente, se logra finalmente la eliminación del germen en los ganglios linfáticos regionales.

f. DIARREA PERSISTENTE.

Se denomina diarrea persistente (DP) a la causada presumiblemente por agentes infecciosos y que a pesar de su carácter agudo tiene una duración de 14 días o más. Estudios realizados en países en desarrollo en niños menores de 5 años con episodios diarreicos agudos muestran que han provocado 35 % de las defunciones en ese grupo etáreo revelado que de estos el 3 a 20% se tornan diarreas persistentes. El tratamiento de las diarreas persistentes consiste en terapia de rehidratación oral y alimentación continuada, que por sí sola no basta para prevenir las complicaciones y la muerte, por lo que se requiere una dieta alimentaría adecuada y en algunas situaciones la utilización de antimicrobianos (González et al 2002).

Se han identificado los siguientes factores de riesgo asociados a la DP:

- Edad: Frecuente en niños menores de 1 año.
- Evaluación nutricional: La desnutrición afecta la evolución de la diarrea, pues aumenta su frecuencia, gravedad y duración.
- Estado inmunológico: Común en niños con inmunidad celular alterada.
- Infecciones: El riesgo de presentar DP se incrementa después de haber padecido previamente enfermedad diarreica aguda o persistente. La mayoría de las bacterias y parásitos que ocasionan diarrea aguda, han sido aislados en los casos DP, pero predominantemente *Escherichia coli* (enteroagregativa, enteroadherente y enteropatógena),

Shigella spp, *Salmonella spp* y *Cryptosporidium* (en niños inmunodeprimidos).

- Lactancia artificial: La DP tiende a producirse en lactantes recientemente alimentados con sucedáneos de la leche.
- Uso de medicamentos: Se ha observado con mayor frecuencia después del empleo de medicamentos antiprotozoarios, principalmente el metronidazol.

Teóricamente, la enfermedad diarreica aguda (EDA) puede prolongarse por los siguientes factores (Ruíz et al. 2004):

- Lesión de la mucosa intestinal de forma continua, persistencia de infección por gérmenes que invaden la mucosa o se acoplan a la superficie luminal; proceso que debilita la barrera mucosa y la incapacidad de los mecanismos inmunológicos para la depuración microbiológica. Igualmente, los disacáridos de la dieta (especialmente la lactosa) y las proteínas de origen animal pueden ser causas potenciales del daño continuo de la mucosa, pues uno de los factores que más comúnmente prolongan la diarrea es la intolerancia transitoria a la lactosa, que aparece como complicación de los episodios agudos (mal absorción después de enteritis).
- Defecto en la reparación del daño después de un episodio agudo.

En ambas situaciones, como persiste una absorción dificultosa o secreción anormal de agua y solutos, la diarrea se mantiene por más tiempo; razón por la cual adquiere suma importancia la aplicación de un régimen dietético precoz y adecuado para garantizar un rápido y eficaz restablecimiento (González et al. 2002).

g. CARACTERISTICAS GENERALES DE *Escherichia coli*.

Escherichia coli es un bacilo gram negativo, anaerobio facultativo de la familia *Enterobacteriaceae*, grupo *Escherichia*, con características bioquímicas particulares. Esta bacteria coloniza el intestino del hombre pocas horas después del nacimiento y se considera un microorganismo de la flora normal, pero hay cepas que pueden ser patógenas y causar diarrea.

Para determinar el grupo patógeno al que pertenecen Kauffman desarrolló un esquema de serotipificación que continuamente varía y que comprende gran variedad de antígenos somáticos (O), flagelares (H) y capsulares (K). El antígeno “O” es el responsable del serogrupo; la determinación del antígeno somático y flagelar (O: H) indica el serotipo, el cual en ocasiones se asocia con un cuadro clínico en particular.

Existen distintas y diversas categorías de *E. coli* Diarreogénicas hasta el momento encontradas. Cada patotipo es definido por una característica determinada por los factores virulentos que presenta, los cuales influyen clínicamente en la patología del paciente.

Los factores virulentos determinados de cada patotipo de *E. coli* son distintos; pueden ser factores de colonización (o adhesinas) y otros que son capaces de unirse al mucus del intestino siendo resistentes a la movilidad del intestino, también se pueden secretar diferentes toxinas, las cuales interfieren con la fisiología normal de las células del hospedero (Wilson et al. 2002).

En la actualidad se distinguen los siguientes “patotipos” de *Escherichia coli*.

1. *Escherichia coli* Enterotoxigenica (**ETEC**)
2. *Escherichia coli* Enteroinvasiva (**EIEC**)
3. *Escherichia coli* Enteropatogenica (**EPEC**)

4. *Escherichia coli* Enterohemorrágica (**EHEC**)
5. *Escherichia coli* Enteroagregativa (**EAEC**)
6. *Escherichia coli* con Adherencia Difusa (**DAEC**)
7. Toxina Dilatadora Citoletal producido por *Escherichia coli* (**CDT**)

El desarrollo de la patogenicidad de *Escherichia coli* Diarreogénica se inicia por lo general con la adhesión de la bacteria en el tracto digestivo (tracto intestinos), en la figura 1 se muestra a tres patotipos de *E. coli* (EPEC, EAEC y DAEC) donde se puede diferenciar la adherencia a células epiteliales.

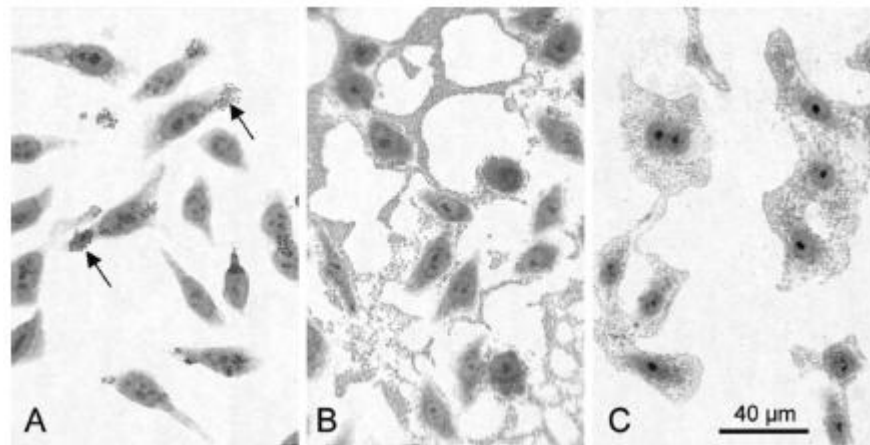
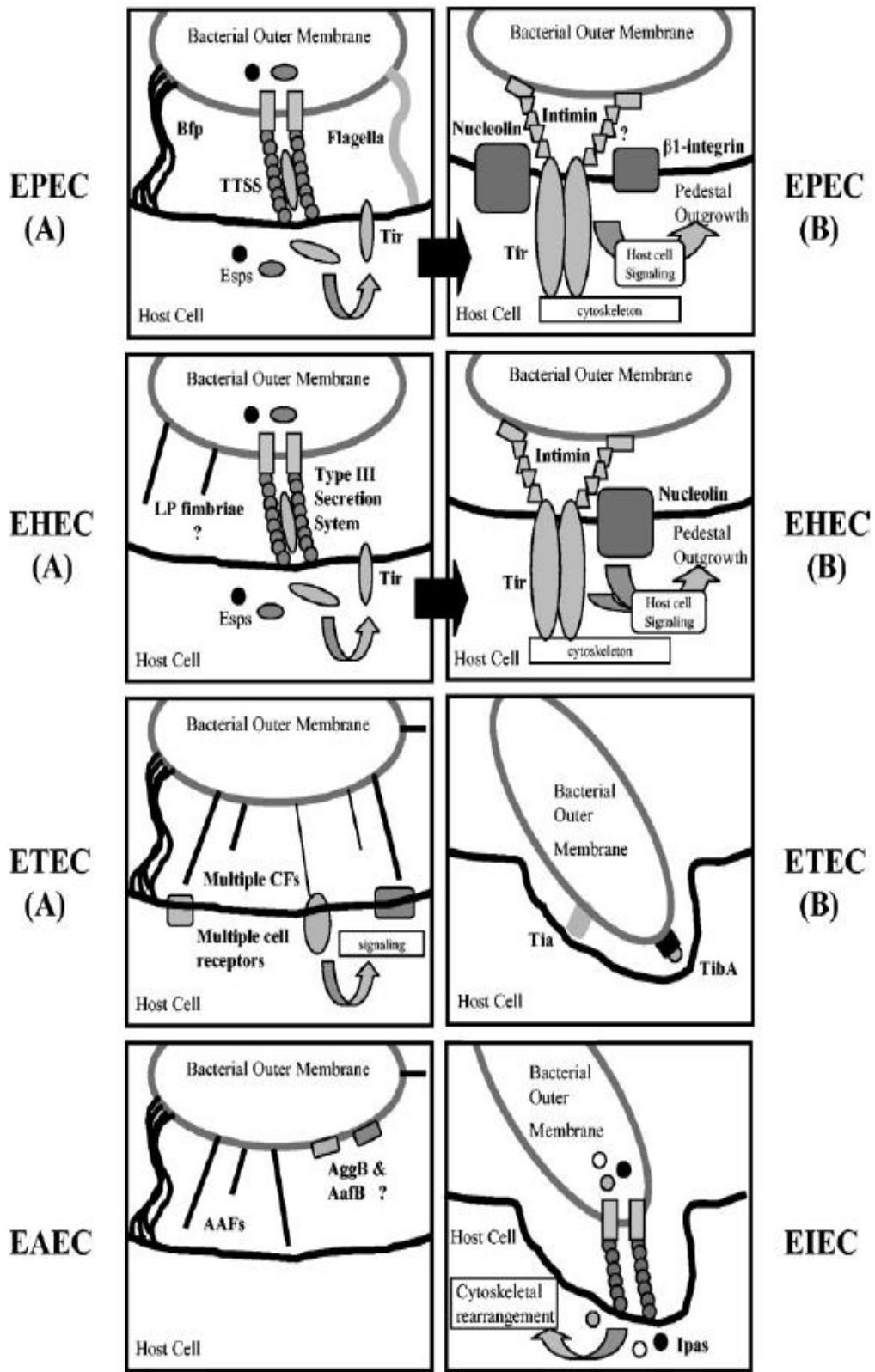


Figura 1.- Patrones de adherencia de diferentes patotipos de *E. coli* en células epiteliales HEP-2. A. patrones de adherencia localizada de EPEC; B. patrones de adherencia agregativa de EAEC; C. Patrones de adherencia difusa DAEC. (Robins et al. 2002).

Las diferencias marcadas que presentan en la adhesión celular, se debe a diferentes mecanismos moleculares que cada patotipo de *E. coli* presenta (figura 2). Por ejemplo ETEC contiene factores de colonización (CFA), EAEC hace uso de fimbrias de adhesión y otros (Torres et al. 2005). Sin embargo el proceso no es el único mecanismo de patogenicidad por el cual se desarrolla la enfermedad sino también por la producción de citotoxinas que dañan al tejido intestinal, la invasión al enterocito, o por procesos de defensa del organismo agredido por el patógeno (Figura 3).



(Continua)

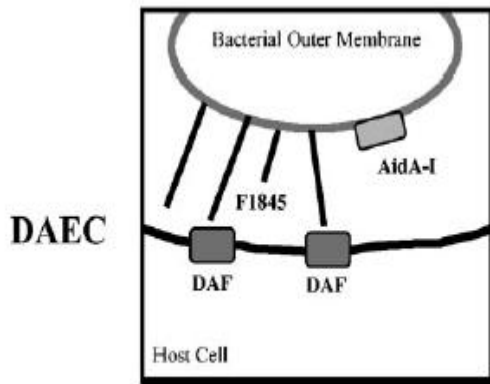


FIGURA 2.- Esquema de las diferentes formas de adhesión que realizan los diferentes patotipos de *E. coli* en el huésped. Bfp: plasmido formador de pedestal; Tir: receptores translocador de intimina; Esps: A,B y D: proteínas secretadas con actividad hemolítica; Fimbria LP: fimbria larga polar; Multiplex CFs: multiples Factores de Colonización; Tia/b: Loci de invasión toxigénico a/b; Ipas: antígeno del plasmido de invasión; DAF: factor de acceso-decaimiento; F1845: fimbria 1845 (Torres, et al. 2005).

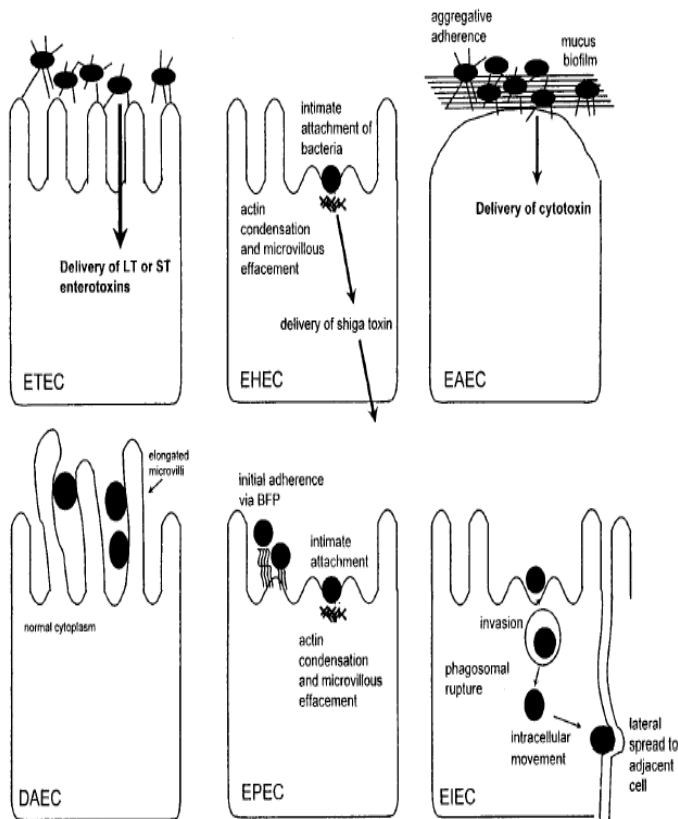


FIGURA 3.- Mecanismo de patogenicidad de los diferentes patotipos de *Escherichia coli* diarreogénica. ETEC: *E. coli* toxigenica; LT: toxina termolábil; ST: toxina termo estable; *E. coli* hemorrágica; EAEC: *E. coli* entero agregativa; *E. coli* adherencia difusa; EPEC: *E. coli* entero patogénica; *E. coli* enteroinvasiva.

h. *Escherichia coli* ENTEROAGREGATIVA.

Escherichia coli Enteroagregativa (EAEC o ECEAgg) es uno de los patógenos importantes causante de EDA y diarrea persistente en niños, adultos y pacientes con VIH. Este patógeno es categorizado en la lista de organismos infecciosos potencialmente importantes dentro de la categoría B por el Instituto Nacional de Salud de USA (National Institutes of Health) (Huang et al. 2004).

La identificación de este microorganismo fue realizada por Cravioto, 1979 cuando estudiaba la adherencia de EPEC en células epiteliales HEP-2 que presentan un patrón de adherencia “adherencia localizada”, encontrándose otro patrón definida como “difusa” que luego fue subdividida como “difusa verdadera” y “agregativa” (Nataro et al. 1998). La prueba de adhesión celular se la consideró como de referencia para poder determinar y diferenciar a las categorías de adherencia. (Figura 4).

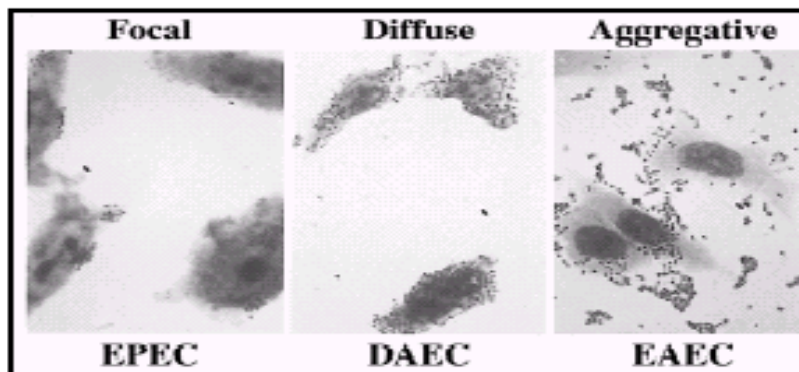


FIGURA 4.- Tres patrones de adherencia de *Escherichia coli* diarreogénica en células HEp2. DAEC—diffusely adherent *E. coli*; EAEC—enteroaggregative *E. coli*; EPEC—enteropatogenica *E. coli* (Mohamend et al. 2002).

La adherencia agregativa de EAEC se caracteriza por un patrón particular de esta cepa denominado “ladrillos apilados” (*stacked-brick*) (Huang et al. 2004). La determinación de EAEC se basa en los patrones de adherencia en las células HEp-2, sin embargo el uso de técnicas moleculares han ayudado a diferenciar a este patógeno de otros con mayor rapidez (Scalesky et al. 2002). Recientemente se ha observado otra

variable de adhesión de EAEC “adhesión tipo cadena” (Chain Like Adherence) (Villaseca et al. 2005).

i. Epidemiología.

EAEC causa diarrea aguda y diarrea persistente (≥ 14 días) es un agente etiológico principal de infecciones gastrointestinales en diferentes partes del mundo principalmente en infantes, adultos y también pacientes infectados con VIH, afectando a países en desarrollo y los países desarrollados (Villaseca et al. 2005).

Los niños menores a cinco años de edad son los más afectados por EAEC observándose en los países en desarrollo una frecuencia de 8-32% casos de diarrea aguda a comparación de 20-30% de casos por diarrea persistente. En Latinoamérica (Chile, Brasil y Venezuela) se reportaron 20 a 68% de casos de diarrea aguda y persistente, en Asia, India, Irak 8 a 30% casos de diarrea aguda y persistente (Huang et al. 2004).

La mayor prevalencia de EAEC se presenta en poblaciones de niños menores a dos años de edad (Okeke et al 2000); entre los serogrupos más frecuentes se encuentran O44, O55, O56, O111, O125, O126 y O128 involucrados en diferentes brotes a nivel mundial (Nataro et al. 1998).

Brotes reportados a causa de EAEC se produjeron en Japón en 1993 afectando a 2 697 escolares por una contaminación de alimentos por la cepa EAST1+, en Serbia en 1995 donde 19 neonatos y 15 infantes (≤ 6 meses) presentaron diarrea aguda (16/19) y persistente (3/19); diarrea acuosa y mucosa (3/19), en este estudio se reportó diversidad de cepas EAEC (Okeke et al. 2001), lo que dificultó su análisis epidemiológico.

Se observa la asociación de EAEC con otros patógenos como EPEC y rotavirus. En Alemania en un estudio realizado por Huppertz, et al en 798 niños con diarrea encontró 16(2%) casos de asociación con otros patógenos (Okeke et al.2001).

Otros estudios realizados en Europa muestran que la infección por EAEC es común en diferentes edades (Villaseca et al. 2005).

ii. Manifestaciones Clínicas y Tratamiento.

EAEC puede estar asociada a la diarrea aguda tanto como persistente (≥ 14 días). La diarrea ocasionada es de característica acuosa, secretora y mucoide. EAEC coloniza y se multiplica en la superficie del intestino y evade la respuesta inmunológica del huésped (Mohammed et al. 2002). En algunos casos se observa que hay disminución o ausencia de fiebre, algunos pacientes presentan vómitos, la presencia de sangre en las heces fecales se da en 1 a 3 casos y también se observa elevadas concentraciones de Lactoferrina e Interleucina 8 (IL-8).

Se demostró en voluntarios adultos que la ingesta de 10^{10} Unidades Formadoras de Colonia (UFC) es necesaria para poder desarrollar la diarrea. El tratamiento de pacientes infectados por EAEC incluye sales de rehidratación, en algunos caso se administra Rifamixinina o Ciproflaxacina. Se observó en diferentes trabajos la prevalencia de multiresistencia que presenta EAEC a Sulfonamidas, Trimetoprim, Ampicilina y Cloranfenicol (Villaseca, et al. 2005).

En adultos la protección inmune adquirida ayuda a contrarrestar la enfermedad en relación a los niños.

iii. Mecanismos de Patogenicidad.

En cortes histológicos de pacientes se observa la inflamación del intestino delgado, englobamiento de las vellosidades, exceso de mucus (gel-like matrix), lesión y necrosis del tejido.

La forma como EAEC provoca el daño es mediante una variedad de factores virulentos, presente mayormente en islas de patogenicidad (PAI).

En la revisión de Huang (Huang et al. 2004) se indica que el desarrollo de la diarrea se debe a tres pasos que involucran a diferentes factores virulentos que tiene la bacteria.

- Adherencia en la mucosa intestinal por las fibras de adherencia agregativa (AAF) y/o otros factores de adhesión los cuales confieren a la bacteria un mayor potencial de unión con la célula huésped, por otro lado existen otro tipo de proteínas superficiales de membrana o la presencia de flagelos, los cuales son codificados en su mayoría por plásmidos.
- Incremento de la producción de mucus en el hospedero mediante la formación de una biopelícula de mucus atrapando a la bacteria que esta adherida en las células. Es posible que el mucus pueda conferir una ventaja para EAEC, como una evasión de la respuesta inmunológica (Khan et al. 2002).
- Respuesta inflamatoria con la liberación de citotoxinas de la bacteria, intoxicación de las mucosas y secreción intestinal de fluidos.

La patogénesis de EAEC es compleja por la variabilidad de las cepas que contienen diferentes factores virulentos que están integrados en su material genético plásmidico (*aafA*, *aggA*, *aggR*, *astA*, *pet*, *aspU* y *shf*) y/o cromosomal (*irp2*, *astA*, *pet* y *pic*).

1. Adhesión.

Se observo que EAEC tiene una actividad de hemoaglutinación manosa resistente (MRHA), estos receptores pueden ser para de EAEC en eritrocitos y posiblemente en el mucus del intestino. La observación por microscopia electrónica se han encontrado fimbrias morfológicamente diferentes (7 a 2 nm de largo), codificadas por un plásmido de 60-65 MDa (*pAA*), el cual lleva los genes virulentos para la codificación de las fimbrias de adherencia agregativa (*aafA*, *aggA*, *aggR*), figura 5.

La fimbria I adherencia agregativa codificada por el gen *aggA* (AAF/I) y fimbria II adherencia agregativa codificada por el gen *aafA* (AAF/II). El gen *aggR* es un activador transcripcional de AAF I y AAF II que da paso a la colonización de las células en el intestino, se ha observado que *aggR* es parte de la familia de activadores *araC/XyIS* (reguladores positivos del operon: arabinosa y xilosa), sin embargo *aggR* no es el único gen regulador y puede ser sustituido por otro gen activador de la misma familia denominado *rns*, (Munson, et al. 2001).

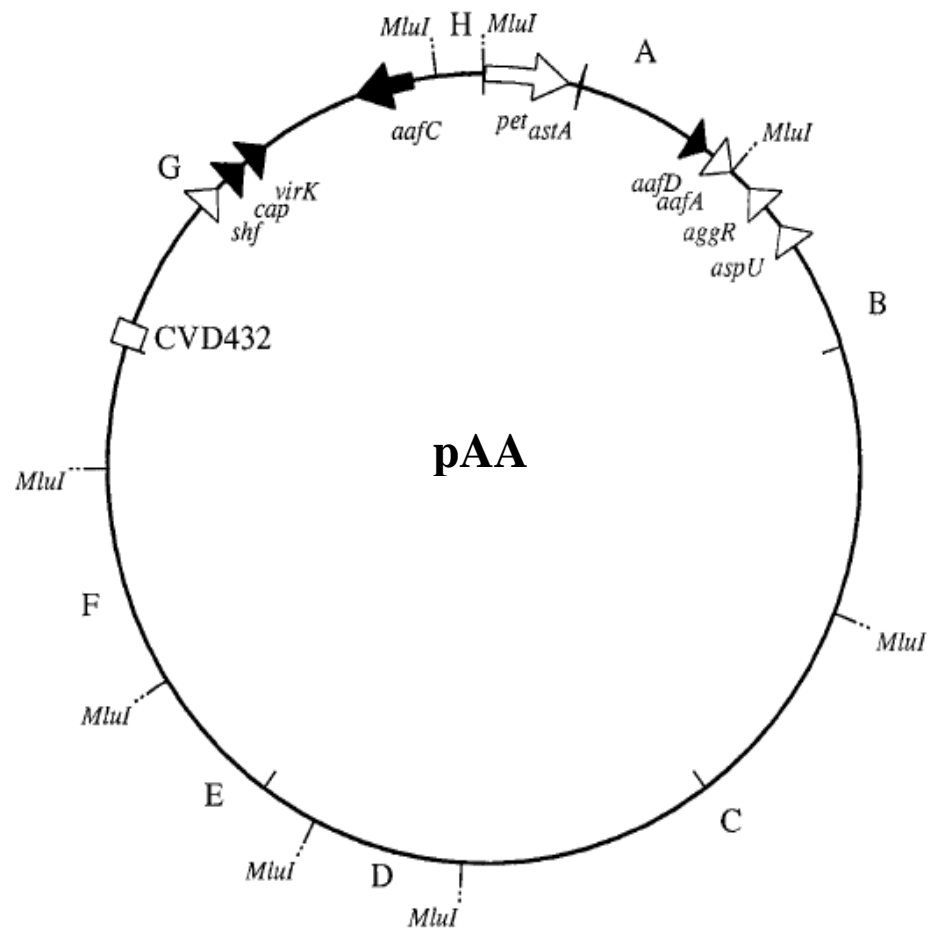


FIGURA 5.- Representación esquemática del plásmido *pAA* y la posición de algunos genes virulentos. *aspU*: proteína U secretada por EAEC; *aggR*: gen regulador de la transcripción; *aafA*: gen de la fimbria tipo II; *aafD*: gen de chaperona; *astA*: gen de la Toxina termo estable; *pet*: plásmido codificador de toxina; *aafC*, *virK*: genes homólogos reguladores; *shf*: ORF de *Shigella flexneri*; CVD432: fragmento del plásmido de adherencia agregativa (Czeczulin, et al. 1999)

La **Fimbria de Tipo I (AAF I)** está codificada por un segmento que presenta dos regiones separadas por 9Kb, el gen *aggA* se ubica en la primera región y en la segunda región el gen regulador. La AAF I es una de las adhesinas más comúnmente encontradas en todas las Enterobacteriaceae, pertenece a la familia de adhesinas *Dr* (grupo de adhesinas que se caracteriza por la habilidad de adherirse al grupo Dr de los glóbulos rojos) (Torres, et al. 2005) y usualmente es observada en comensales y patógenos de *E. coli*. Esta fimbria es usualmente codificada por el operón *fim* que está compuesto de nueve genes (*fimA*, *fimB*, *fimC*, *fimD*, *fimE*, *fimF*, *fimG*, *fimH* y *fimI*). En los patrones de adherencia agregativa (AA) en las cepas de EAEC puede observarse residuos de manosa en el antígeno O de los lipopolisacáridos bacterianos; es así que AAF I es responsable del primer paso para la unión a la mucosa intestinal seguido de otros factores de adhesión que presenta la bacteria (Moreira et al. 2003).

Un segundo componente es la **Fimbria II** que está codificada por dos segmentos separados por un segmento de 15 Kb, en donde está presente la información necesaria para codificar la fimbria. Los genes encargados de la formación íntegra de la fimbria son: *aafD*, *aafA* y *aafC/aggR* o *fis*, (figura 6). Esta fimbria también está relacionada con la familia de adhesinas *Dr*. Estudios realizados por Waldir (1999) indican que todo este grupo de genes pueden estar integrados en un segundo plásmido de virulencia (*pAA2*) que no solamente contiene los genes necesarios de AAF/II sino también otras enterotoxinas (Pet y EAST).

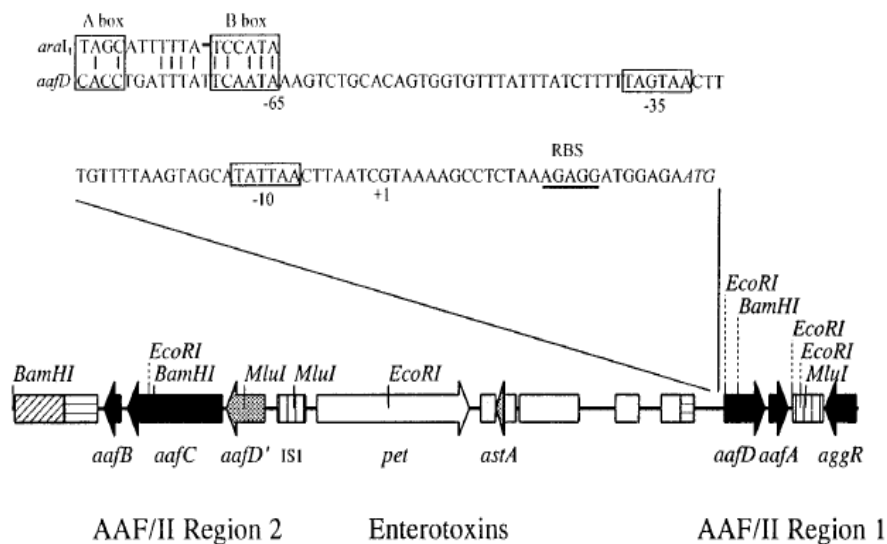


FIGURA 6.- Mapa de la región virulenta de *pAA* donde se encuentran los componentes codificantes de AAF II, los genes virulentos *astA* y *pet* con elementos de inserción (IS). Se observa las secuencias donde las proteínas AggR/AraC se unen para cumplir su función (Elias et al. 1999)

Se ha establecido que las cepas que no presentan fenotípicamente los factores de adhesión, AAF/I y AAF/II, en líneas celulares son denominadas como “EAEC atípicas” (Nishi et al. 2003) sin embargo se ha descrito por Bernier un tercer tipo de fimbria (AAF III) que esta presente en EAEC codificada por el gen *agg3*

Existe otro factor de adhesión la fimbria (AfaD-III) codificada por los genes *agg* y *aaf* (operones de adhesión) que fue identificada primeramente en *E. coli* Uropatogénica (UPEC) en células HeLa (Torres et al. 2005). La adherencia entre bacterias (autoagregación bacteriana) esta mediada por fimbrias denominadas FimH (Schembri et al. 2001)

La adhesión en el intestino no solo depende de las fimbrias sino también de otras moléculas superficiales de la membrana bacteriana como la **Dispersina**; que es una proteína superficial codificada por el gen *aap* (proteína anti-agregativa) que por su estructura hidrofílica permite una mejor colonización en la superficie intestinal, ya que las fimbrias son hidrofóbicas y darían paso a una autoaglutinación que no permitiría una buena adhesión de la bacteria a las células del huésped, el gen *aap* se encuentra muy

cerca del gen regulador *aggR* que permite la regulación de la proteína Dispersina (Sheitkh et al. 2002). El mecanismo por el cual esta proteína se incorpora en la superficie externa de la bacteria se observa en la figura 7.

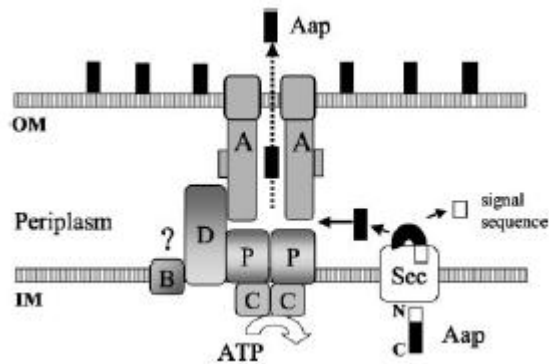


FIGURA 7: Sistema de secreción de la proteína Dispersina la cual es secretada al periplasma de forma independiente. El complejo Aat es un grupo de componentes los cuales permiten la translocación de la Dispersina y el paso al exterior de la bacteria. Se observa que el sistema Sec de secreción reconoce la secuencia señal para iniciar la secreción de la proteína para luego seguir el transporte por el complejo AatA que forma por un canal en el periplasma hacia el exterior de la célula. AatP tiene función de una permeasa, AatC tiene la función de una ATPasa. SE desconoce la función de todos estos componentes AatB/D. Todos estos componentes son homólogos a los sistemas de transporte ABC. (Nishi et al. 2003).

Las **proteínas asociadas a la membrana (MAPs)** participan también en la adhesión. La proteína de 58 KDa, denominada **Ap58** (proteína agregativa 58), ubicada en la superficie de la membrana externa de la bacteria con lo que puede unirse a receptores específicos de la célula (fibronectina o integrinas). Otros factores de adhesión como las proteínas de membrana externa (**OMPs**) de 16, 30 y 38KDa también confieren la propiedad de adherencia agregativa a EAEC, la presencia de flagelinas (FliC-EAEC) podría también coadyuvar a la adherencia con la célula del huésped. Por otra parte se observó que los lipopolisacáridos (LPS) no participan en los procesos de adherencia (Monteiro et al. 2003).

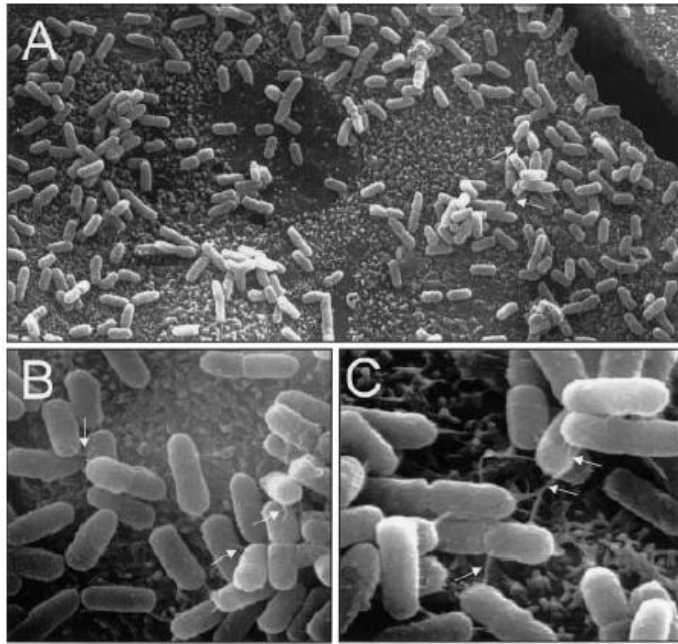


FIGURA 8.- Característica de la adhesión bacteriana de EAEC, fotografía con ayuda de un microscopio electrónico cepa 236 (Monteiro et al. 2003)

2. Toxinas.

EAST1 (toxina enteroagregativa termo estable) es codificada por el gen *astA*, está presente en un 40% de las cepas EAEC, se ha reportado con mayor frecuencia en cepas de EHEC, ETEC y asociada a *E. coli* no patógena, el gen puede estar en el cromosoma o plásmido en algunos casos en ambos con una o diversas copias, codifica 38 aminoácidos con un peso de 4.1 KDa y presenta cuatro residuos de cisteínas los cuales permiten la formación de dos puentes disulfuro, dando mayor estabilidad a la molécula. En experimentos con ratones se observó que la presencia de proteasas no inhibe su función (Ménard et al. 2004).

Este oligopéptido de 38 aminoácidos es homólogo a la toxina ST de ETEC y sobre todo con el péptido guanilina (Uzzua et al. 2000), figura 9. Su mecanismo de acción se da por la unión a los receptores de guanilato ciclasa activando la cascada del sistema GMPC para la liberación de Ca^{+2} y la fosforilización de proteínas (Savarino et al. 1993).

Guanylin		P	N	T	C	E	I	C	A	Y	A	A	C	T	G	C						
EAST1	...	A	S	S	Y	A	S	C	I	W	C	T	-	T	A	C	A	S	C	H	G	...
STp		N	T	F	Y	C	C	E	L	C	C	N	P	A	C	A	G	C	Y			
NAG-ST		I	D	C	C	E	I	C	C	N	P	A	C	F	G	C	L	N				
Y-ST	...	S	S	D	Y	D	C	C	D	V	C	C	N	P	A	C	A	G	C	Y		
STh		N	S	S	Y	C	C	E	L	C	C	N	P	A	C	T	G	C	Y			

FIGURA 9.- Comparación de la secuencia de aminoácidos EAST1 (residuos 1-16) con guanilina, STp, *V. cholerae* non-O1 (NAG-ST), *Yersinia enterocolitica* ST (Y-ST) (residuos 3-20) y STh. Las secuencias comunes están enmarcadas (Savarino et al. 1993)

Otro tipo de toxinas que produce EAEC son las secretadas por el sistema de secreción de tipo V (autotransporte) varias toxinas son secretadas de esta forma por diferentes bacterias, se denomina a esta familia como Autotransportadores Serin Proteasa de *Enterobacteriaceae*. (SPATE).

Dutta (2002) que realizó un estudio comparativo con diferentes toxinas de la familia de proteínas SPATEs, en especial con Pet y Pic, indica que estas proteínas varían en su efecto en las células HEp-2 y tienen varios sustratos específicos en esta, por lo cual hay una diversidad de sitios activos. Existe un ancestro común de la familia SPATE que con el pasar del tiempo se ha podido ir diversificando de acuerdo a su nicho biológico.

Pet (Toxina codificada en plásmido): Esta proteína pesa aproximadamente 108 KDa, es codificada por el gen *pet* que está ubicado en el plásmido (60 MDa) de adherencia agregativa (AA) de la bacteria (Bellini et al. 2005). Presenta un precursor de 146.5 KDa antes de salir a la superficie de la célula. Se halla frecuente en las cepas entre un 10-20% e incluso hasta en un 50%.

Es capaz de unirse y cortar proteolíticamente a la fodrina (proteína del citoesqueleto), en un sitio específico de un motivo serin-proteasa (unido a un dominio de calmodulina) del citoesqueleto, lo que produce la degradación y daño de la actina que hace colapsar la célula epitelial. Las células epiteliales afectadas muestran contracción del citoesqueleto y pérdida de las fibras de tensión, provocando un redondeamiento de la célula. Pet se interna por un transporte retrogrado vía Aparato de

Golgi en las células para poder producir el daño celular en un tiempo de aproximadamente de 3 horas (Navarro et al. 2004).

Para la internalización de Pet a la célula huésped necesita que esta se pliegue en el periplasma de la bacteria y luego sale de una forma activa a la superficie de la bacteria, lo que sugiere la presencia de dominios importantes para el desarrollo de su actividad (Quan et al. 2003). Pinaki (2003) determinó la ubicación de un dominio con actividad proteolítica, el cual está ubicado en la posición 260.

La toxina ocasiona en el huésped provoca necrosis, ulceraciones, respuesta inflamatoria con presencia de linfocitos, células plasmáticas y eosinófilos.

Pic (Proteína involucrada en la colonización intestinal): Es otra toxina que esta codificada en el cromosoma por el gen *pic*, ubicado en la isla de patogenicidad SHI-1, el peso de la toxina es de 108 KDa y su precursor de 140 KDa que antes de salir a la superficie bacteriana presenta una gran homología con la toxina de UPEC (PicU) de infecciones urinarias y con la toxina *She* de *S. flexneri*; está presente en un 40 % de las cepas de EAEC, su mecanismo es similar a Pet de unión, internalización y degradación en el interior de la célula del huésped, además de inducir secreción intestinal, aumento de AMPc/GMPc y atrapar al grupo Hem de los eritrocitos, la actividad proteolítica de Pic se caracteriza por tener como sustrato a la pepsina, la espectrina y la mucina lo que le confiere una ventaja en los procesos de colonización, los efectos en concentraciones bajas de la toxina puede aun desarrollar la actividad en el huésped (Parham et al. 2004)

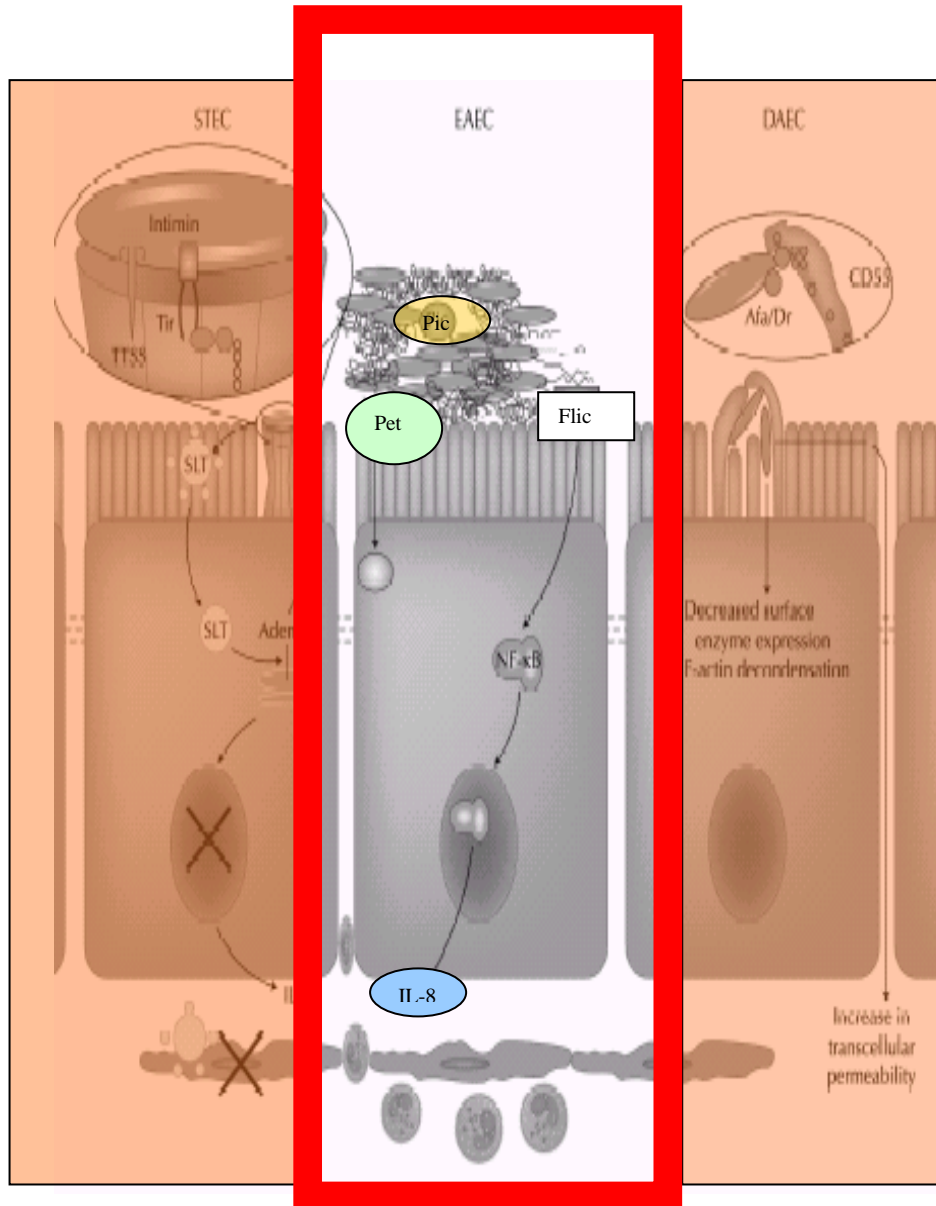


FIGURA 10: Cinética de los mecanismos de patogenicie de *Escherichia coli* diarreogenica STEC—shigatoxigenica *E. coli*; Tir—translocated intimin receptor;TTSS—Sistema de secreción tipo tres., EAEC —enteroagregative *E. coli*; Flic—flagellin; IL-8; Pet—toxina codificada por plásmido; Pic—Pic mucinasa; SLT—shiga-toxina y DAEC— *E. coli* de adherencia difusa (Mohamend et al . 2002).

Otra de las toxinas que también puede estar presente en EAEC es la Shiga toxina (Stx2) de EHEC y en algunos casos existe procesos invasivos de las células en estudios *in vitro* (Villaseca et al. 2005).

La presencia de lectinas en EAEC tiene un efecto citotóxico observado en células HEP-2 donde se promueve la respuesta inmune, efecto de las estructuras de las fimbrias donde subunidades como las pilinas presentan unidades repetitivas de azúcares unidas a oligopéptidos que brindan mayor eficacia en la unión de receptores (Basu et al. 2004).

Los genes virulentos pueden ser transferidos lateralmente entre bacterias de la misma o diferente especie. Así las islas genómicas (GEIs) que contienen genes virulentos son referidos como Islas de Patogenicidad (PAIs), figura 11 (Oelschlaeger et al. 2004; Stuart et al. 2001). La adquisición de Islas de Patogenicidad de *Yersinia* a *E. coli* promueve a la formación de otra toxina, como es el caso de la toxina *Yerseniabactin* (Ybt) que puede ser codificada por los genes *irp1-irp5*, *irp6-irp8* y *irp9* (biosíntesis de Ybt) regulados por el gen *ybt* (AraC) ubicado en el cromosoma de la bacteria (Hu et al. 2005). La característica de este factor de patogenicidad es la utilización del grupo Hem del hospedero, por un mecanismo de sideroporos que forman un quelante que pueden atrapar el hierro del huésped por receptores que están presentes en la superficie de la membrana de la bacteria (Okeke et al 2004), la existencia de Irp en *E. coli* es un factor influyente de la evolución de las cepas.

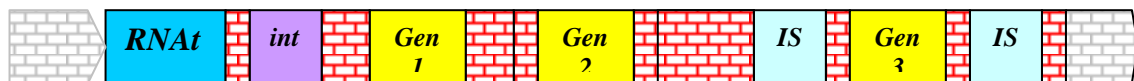


FIGURA 11: Característica de las Islas Genómicas (GEIs) y las funciones que pueden codificar. Las GEIs son unidades discretas que están ubicadas dentro de regiones que contienen genes (tRNA) y secuencias repetitivas (DR). Los GEIs contienen genes específicos para una función o pueden contener genes virulentos. También pueden contener elementos genéticos móviles como integrasas (*int*) y elementos de inserción (*IS*)

3. Respuesta Inmune.

La respuesta inmune juega un papel importante en la manifestación de la enfermedad en los pacientes. Se ha observado que existen pacientes que pueden ser asintomáticos (Villaseca et al. 2005).

Según estudios realizados en el Brasil por Bellini (Bellini et al. 2005) ambas toxinas Pet y Pic presentan respuesta de anticuerpos (IgG, IgM y IgA), existiendo una mayor eficacia en Pic que en Pet, esto se debe a reacciones cruzadas por otras toxinas homologas (PicU), a comparación de Pet que solo se observa en pacientes con procesos diarreicos, en Pic se presenta en pacientes con/sin diarrea, en ambos casos se tiene un incremento de IgA por la infección de EAEC, no solo las toxinas inducen a la secreción de IgA sino también las OMPs de EAEC como indica el trabajo de Sutjita (Sutjita et al. 2000).

Las toxinas además producen una respuesta inflamatoria, observándose infiltración de mononucleares y polimorfonucleares, Pet induce a un aumento de leucocitos y la quimiotaxis sobretodo para los neutrófilos.

La respuesta inmune a consecuencia de las moléculas que sintetiza EAEC, estimulan la producción de factores proinflamatorios, se observó en pacientes el incremento de los niveles de lactoferrina, interleucinas (IL-8, IL-1ra y IL- β) determinadas en heces fecales y la producción de otros moduladores de la inflamación como el Factor de Necrosis tumoral (TNF α), oxido nítrico y otros. En pacientes asociados con diarrea causados por EAEC se encuentra que la IL-8 está incrementada en heces, este dato permite ayudar a determinar patogrupos (entre EAEC y ETEC), por la presencia de factores virulentos comunes que promueven un mayor producción de IL-8 (Huang et al. 2003).

La presencia de factores de virulencia *aggA* y *aafA* inducen a la secreción de interleucinas IL-8, INF- γ ; *aafA* induce a IL-1 β y *aap* a IL-1ra (Harrington et al 2005).

Otro mecanismo de EAEC es la señal vía TLR (toll-like receptors), los TLR son una familia de moléculas superficiales de las células cuyo dominio extracelular es rico en leucinas y presentan en el dominio citoplasmático regiones homólogas a los receptores toll/interleukin-1. Reportes indican (Mizel et al. 2003) que las flagelinas de bacterias Gram negativas activan la respuesta inflamatorias vía señales TLR5, debido a la estructura de las flagelinas para facilitar esta interacción (las regiones carboxi-teminal de los residuos de las flagelinas son repeticiones en heptámeros de aminoácidos

hidrofóbicos) (Mizel et al. 2003; Meghan et al. 2002). A través de la activación de TLR5 se activa una cascada de señales (p38 MAPK y NF- κ B) para la producción de IL-8 induciendo la transcripción de RNAm en las células epiteliales, NF- κ B es un mediador central en las señales en la respuesta inmune adaptativa del hospedero (Khan et al. 2004)

iv. Métodos de Identificación de EAEC.

Los métodos de identificación de EAEC están basan en las características de adherencia (cultivos celulares), marcadores moleculares (genes virulentos) y otros que se detallan a continuación.

1. Cultivos Celulares.

Desde el descubrimiento de EAEC se ha mantenido el uso de la técnica de adherencia celular con HEp-2 de las bacterias por presentar una característica propia de esta cepa “ladrillo apilados” que se diferencia de la adherencia difusa que presenta DAEC (figura 12). Se ha observado en otros estudios similar adherencia con otro tipo de líneas celulares diferentes a HEp-2. La desventaja de esta técnica es que consume mucho tiempo, es muy laboriosa y de mayor cuidado por la contaminación por otros gérmenes que afecten al cultivo y se necesita de la experiencia en el análisis de las células. El uso de formalina en la fijación de la placa ha permitido tener mayor sensibilidad (95%–98%) y una especificidad del 100%, considerándose como el método estándar en la detección de EAEC. En un trabajo de Wakimoto et al (2004) se reporta una modificación de esta prueba utilizando la formación de biofilm que realiza EAEC (midiendo esta capacidad por la técnica de ELISA, OD₅₇₀), este ensayo es rápido y permite trabajar con mayor cantidad de muestras y permite realizar una diferenciación de otras cepas de *E. coli*.

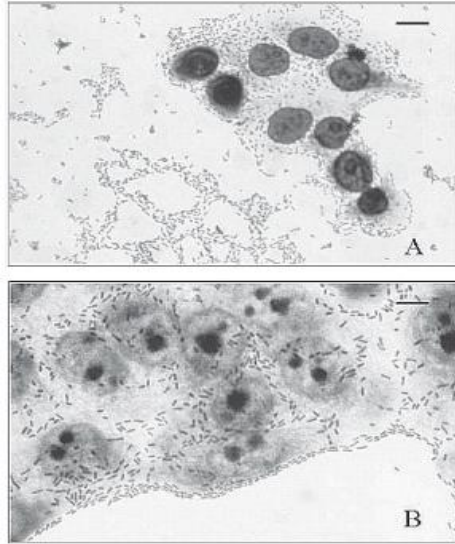


FIGURA 12: Adherencia de las bacterias con las células HEp-2. A adherencia de *Escherichia coli* Enteroagregativa se puede observar la característica de adhesión “ladrillos apilados”. B adherencia de la cepa de *Escherichia coli* de Adherencia Difusa (Rodrigues et al. 2002)

2. Técnicas Moleculares.

Los diferentes ensayos moleculares utilizados para la determinación de EAEC están asociados a los genes virulentos que puede presentar la cepa, es así que *irp2*, *astA*, *shf* y *pic* han sido observados en estudios epidemiológicos en un 70.6%, 64.7%, 55.9% y 55% respectivamente (Waldir et al. 2002). Sin embargo la búsqueda de un óptimo marcador molecular específico para EAEC ha involucrado varios estudios, pruebas realizadas con hibridización indican que la determinación del fragmento en el plasmido pCVD432 resulta ser sensible y específico (17-2 EcoRI-Pst1).

El uso de técnicas moleculares ha permitido tener resultados rápidos para realizar una diferenciación en muestras donde puede existir una coinfección por *E. coli* diarreogénicas así como para la caracterización de las cepas de EAEC. En la Tabla 2 se detallan diferentes técnicas moleculares utilizadas para la determinación de EAEC.

TABLA 2.- Técnicas moleculares utilizadas y ha utilizar para la determinación de EAEC.

PRUEBA	ORIGEN	DESCRIPCION
Prueba DNA	Bacteria	Se basa en rastrear un fragmento 1.0 Kb del plasmido de 60MDa (pCVD432). Sensibilidad 15-89% y especificidad del 99% comparado con el ensayo de adherencia celular (con HEp-2)
PCR	Bacteria	Se basa en la amplificación de un segmento del plasmido pCVD432, con la ayuda de un par de cebadores. Sensible 86% y específico en 96%.
ELISA	Heces	Detección cuantitativa de la secreción de IgA contra EAEC.
Multiplex ELISA	Heces	Determinación de citoquinas (IL-8 y IL-1 β) que permite ayudar a diferenciar de otros patógenos diferentes a EAEC (Bouckenooghe et al. 2000)
Microarray	Bacteria	Uno de los posibles usos para poder determinar y realizar un screening de aislados de EAEC de otro patógenos y también poder realizar una caracterización mas extensiva

FUENTE: Huang et al. 2004

La determinación de EAEC por la amplificación de PCR de diferentes genes, se realiza de forma independiente para cada gen o de forma conjunta (PCR multiplex) (Cerna et al. 2003; Bouzari et al. 2005). Así se puede diferenciar a EAEC de otros patotipos de *E. coli*, la ventaja de este tipo de técnicas es la rapidez y en ciertos casos el abaratamiento de costos en el diagnostico (Toma et al. 2003; Lopez et al. 2003).

Hasta la fecha se ha desarrollado diferentes tipos de variables de PCR para la ampliación de diferentes genes o secuencias de estudio, el uso del real-time PCR (PCR tiempo real) desarrollado por Bischoff y colaboradores (2005), permite una mayor sensibilidad en la determinación de los genes. La utilización de microarrays para la determinación de islas de patogenicidad, permite una rápida caracterización de las cepas en estudio (Jenkins et al.2005).

4. MATERIALES Y METODOS.

a. POBLACION DE ESTUDIO.

El estudio fue realizado entre Enero a Diciembre del 2004, en los centros Hospitalarios de la ciudad de La Paz (Hospital Materno Infantil, Hospital del Niño, Hospital La Paz y Hospital San Gabriel) y de la ciudad de El Alto (Hospital Boliviano Holandés). La distribución de muestras recolectadas por hospitales se presenta en la Tabla 3.

TABLA 3.- Distribución de muestras recolectadas de los Hospitales incluidos en el estudio durante los meses de Febrero a Diciembre del 2004.

HOSPITAL	N° DE MUESTRAS
Boliviano Holandés	198
Materno Infantil	302
Niño Ovidio Aliaga	103
La Paz-Garita	73
San Gabriel	15
TOTAL	691

i. Criterios de Inclusión.

Niños con procesos diarreicos agudos de 0 a 5 años de edad, que acudieron a los centros hospitalarios por causa de diarrea aguda durante el periodo de estudio.

ii. Cepas de Referencia.

Las cepas clínicas de referencia analizadas en este ensayo (Tabla 4) fueron proporcionadas por el Instituto de Biología Molecular y Biotecnología (Universidad Mayor de San Andrés, Carrera de Biología, La Paz-Bolivia).

TABLA 4.- Lista de cepas de referencia utilizadas en el presente estudio.

CEPA DE REFERENCIA	GENOTIPO
<i>E. coli</i> 042 (O44:H18)	<i>pAA, astA, aggR, aggA, aafA, pet, pic e irp</i>
<i>E. coli</i> 17 – 2	<i>pAA, astA, aggR, aggA y aafA</i>
<i>E. coli</i> K12	-

b. RECOLECCION DE MUESTRAS.

Se recolectó un total de 691 muestras de heces fecales, de niños menores de cinco años de edad, con proceso diarreico agudo (tabla 3), por el personal de salud de los centros hospitalarios. Las muestras fueron trasladados en el tiempo mas corto posible (entre 1 a 3 horas) al Laboratorio de Biología Molecular y Biotecnología, área de Enterobacterias, donde fueron procesadas inmediatamente.

i. Cultivo de las Muestras.

Las muestras fecales fueron inoculadas sobre placas de agar Mac Conkey y cultivadas durante una noche a 37° C. Pasado el periodo de incubación, un barrido de colonias Lac+ fueron inoculadas en viales de agar soft y guardadas a temperatura ambiente (4° a aprox. 17° C) (enero del 2004 hasta febrero del 2005), hasta su caracterización posterior por PCR.

c. IDENTIFICACION DE GENES ASOCIADOS A *Escherichia coli* ENTEROAGREGATIVA.

Los aislados Lac+ fueron inicialmente analizados para la presencia del gen *pAA* (plasmido de virulencia de EAEC) por PCR. Las colonias individuales *pAA*+ fueron rpecharacterizadas por PCR para la identificación de los siguientes factores: la

detección de las adhesinas a través del gen *aggR* (regulador de las fimbria de adhesión); del gen *aggA* (AFF I) y del gen *aafA* (AAF II). Se analizó también la presencia de los genes que codifican citotoxinas *astA* (Enterotoxina termo estable), *pet* (toxina codificada en plasmido), *irp2* (Yerseniabactin) y *pic* (Proteína implicada en la colonización).

Para la extracción del material genético se tomaron cinco colonias aisladas se suspendieron en 50 µl de agua estéril en un tubo de 200 µl estéril, se realizó un boiling (15 minutos a 100° C pasado el tiempo se guardó inmediatamente a -20° C hasta su utilización). Los genes detectados, cebadores y las condiciones óptimas para el PCR, se presentan en la tabla 5.

Una vez obtenidos los productos amplificados por PCR, se realizó la corrida electroforética en geles de agarosa al 1.5%. Posteriormente se realizó la tinción con bromuro de etidio y la visualización en el transiluminador de luz UV.

d. IDENTIFICACION DE ROTAVIRUS.

El análisis molecular para el diagnóstico de Rotavirus en las muestras recolectadas en la ciudad de La Paz y El Alto en el periodo de estudio fue realizado en el área de Rotavirus del Instituto de Biología Molecular y Biotecnología de la UMSA.

i. Extracción y electroforesis del RNA viral.

En un tubo ependorl de 1.5 ml se suspendió 0.1mg ó 100µg de muestra en 200 µl de Solución de lisis (SDS 1%, Acetato de sodio 0.1M, β-mercaptoetanol 0.25%, Triton 1%), se procedió a la homogenización en vortex por 2 minutos para producir la disrupción del virus y producir la extracción del RNA viral con 200 µl de fenol-cloroformo vol/vol. La suspensión fue precipitada luego por centrifugación (12 000g/5min), obteniéndose una fase acuosa.

La fase acuosa fue utilizada para la corrida electroforética del RNA viral para la cual de 10 a 50 µl fueron mezclados con 2 µl de buffer de siembra 6X (0.25% de Azul de Bromofenol y 40% de Sacarosa).

El RNA viral fue separada en geles de poliacrilamida al 7% (Acrilamida 30%, bis-acrilamida 0.8%), polimerizados con Persulfato de Amonio (PSA 0.05% p/vol) y Tretametil-etilendiamino (N,N,N,N TEMED 0.01% p/vol) en buffer TBE 1X (TBE 5X; 54g Tris base, 27.5g de Ácido Bórico y 2ml de EDTA 0.5M pH 8) sometido ha condiciones de corriente eléctrica de 20 voltios por el tiempo de 12 horas.

Pasado el tiempo de corrida se realizó la Tinción del gel, donde los geles fueron sumergidos en una solución de fijación 5X y 1X respectivamente (etanol 50%, Ácido Acético 2.5%) 15 minutos cada uno; la tinción fue realizada con Nitrato de Plata 0.011M por 30 minutos, seguido del revelado con NaOH 0.75M y Formaldehído 0.3%.

e. ESTUDIO DE SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA.

Se determinó los patrones de resistencia de los aislados bacterianos por el método de difusión de Agar según las Normas del NCCLS; para el control de calidad se usaron las cepas *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922 y la cepa *Escherichia coli* ATCC 35218, con los cuales se comparó las dimensiones de las zonas de inhibición para los discos de Ampicilina, Tetraciclina, Eritromicina, Ácido Nalidixico, Cefotaxina, Cloranfenicol y Trimetoprim Sulfametoxazol. Los agentes antimicrobianos en discos utilizados se describen en la tabla 6.

f. ANALISIS ESTADISTICO.

Los datos obtenidos fueron adjuntados en una base de datos para ser analizados utilizando el programa Epi Info 2000 versión 3.2 del CDC. Para este estudio se utilizo el test de chi-square, P exacto de Fisher.

TABLA 5.- Descripción de los genes y condiciones para la amplificación por PCR para la determinación y caracterización de *Escherichia coli* Enteroagregativa, utilizados en el presente estudio.

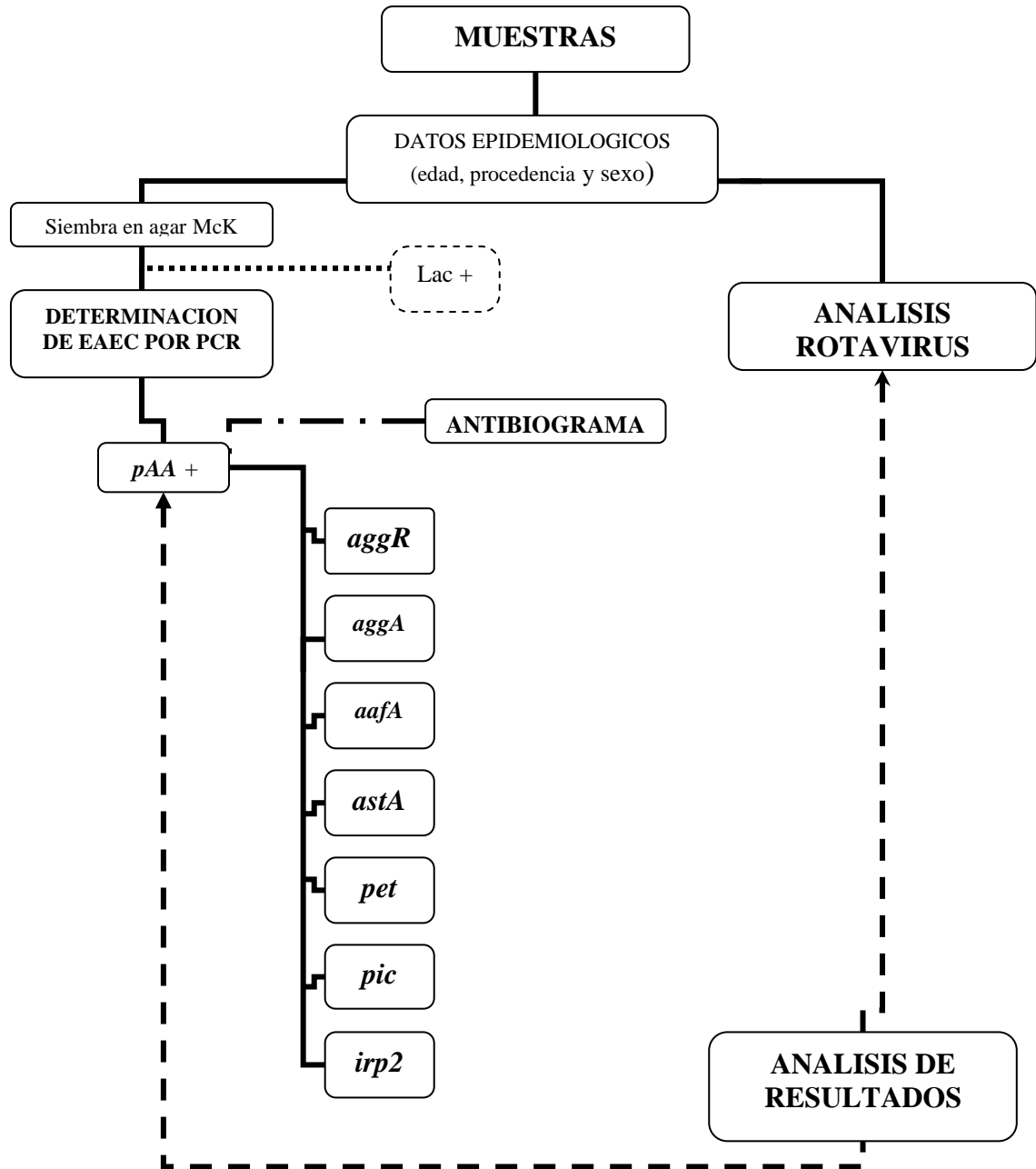
DESIGNACION	TARGET	DESCRIPCIÓN	LOCALIZACION	CEBADORES (5' - 3')	TAMAÑO DEL AMPLICON (pb)	CONDICIÓN	REFERENCIA
Paa	<i>pAA</i>	Plasmido que lleva los genes virulentos	PLASMIDO	CTGGCGAAAGACTGTATCAT CAATGTATAGAAATCCGCTGTT	630	94° C/ 1 min, 55° C/ 1min, 72° C/ 1min	Presterl et al. 2003
EAST1	<i>astA</i>	Toxina termo estable Agregativa	PLASMIDO / CROMOSOMA	GCCATCAACACAGTATATCC GAGTGACGGCTTTGTAGTCC	106	94° C/ 1 min, 55° C/ 1min, 72° C/ 1min	Yatsunagi et al. 2002
AAFs	<i>aggR</i>	Activador transcripcional de AAF/I y AAF/II	PLASMIDO	CTAATTGTACAATCGATG ATGAAGTAATCTTGAAT	308	94° C/ 1 min, 55° C/ 1min, 72° C/ 1min	Czeczulin et al. 1999
AAF/I	<i>aggA</i>	Subunidad de la Fimbria AAF/I	PLASMIDO	GCTAACGCTGCGTTAGAAAGACC GGAGTATCATTCTATATTCGCC	421	94° C/ 1 min, 55° C/ 1.5min, 72° C/1.5min	Piva et al. 2003
AAF/II	<i>aafA</i>	Subunidad de la Fimbria AAF/II	PLASMIDO	GACAACCGCAACGCTGCGCTG GATAGCCGGTGTAAATTGAGCC	233	94° C/ 1 min, 55° C/ 1.5min, 72° C/1.5min	Piva et al. 2003
Pet	<i>Pet</i>	Plasmido codificante de toxina	PLASMIDO	TCATTTCCAGCACTTCCTGT CTCCGACAGTATTTGCTCGT	442	94° C/ 1 min, 55° C/ 1.5min, 72° C/1.5min	Yatsunagi et al. 2002
Pic	<i>Pic</i>	Proteína implicada en la colonización	CROMOSOMA	TTCAGCGGAAAGACGAA TCTGCGCATTACATCCA	517	94° C/ 1 min, 55° C/ 2 min, 72° C/ 3min	Piva et al. 2003
Irp	<i>irp2</i>	Biosíntesis del sideroporo Yerseniabactin(Ybt)	CROMOSOMA	AAGGTTGCTGTTACCGGAC TCGTCCGGCAGCGTTTCTTCT	267	94° C/ 1 min, 55° C/ 2 min, 72° C/ 3min	GenBank N°: L18881

TABLA 6.- Halos de sensibilidad estándar para los semidiscos recomendados por la NCCLS.

ANRIBIOTICOS	CONCENTRACION	RESISTENTE	SENSIBLE
Acido Nalidixico (NAL)	30 µg	≤13	≥19
Cloranfenicol (CMP)	30 µg	≤12	≥18
Cefotaxina (FOX)	30 µg	≤13	≥18
Trimetroprim Sulfametoxazol (TMS)	30 µg	≤10	≥16
Ampicilina (AM)	10 µg	≤13	≥17
Eritromicina (ERY)	15 µg	≤13	≥17
Tetraciclina (TET)	30 µg	≤14	≥19

Fuente: Boletín de Medicamentos esenciales Organización Mundial de la Salud.2000

5. DISEÑO METODOLOGICO.



6. RESULTADOS.

a. CARACTERISTICAS DE LA POBLACION ANALIZADA.

En este estudio se analizo un total de 691 muestras clínicas de heces fecales de niños menores a cinco años de edad con procesos diarreicos infecciosos colectadas durante el año 2004, de estas muestras 508(73%) pertenecen a pacientes hospitalizados y 183(26%) a pacientes ambulatorios.

Con respecto al género de los pacientes se observa que existe una relación de 1.3 entre sexo masculino a femenino (Tabla 7).

Los meses donde se obtuvo un mayor número de muestras fueron de febrero a julio, septiembre, octubre y noviembre. Se observa en la tabla 8 (Figura 13 y 16).

Respecto a la edad se observó que los niños entre 7 a 12 meses (36%) y 13 a 24 meses de edad (28%) fueron los más afectados por el síndrome diarreico agudo. Tabla 10.

TABLA 7.- Características de los niños menores de cinco años de edad con EDA, Enero-Diciembre. 2004.

GENERO	HOSPITALIZADOS	AMBULATORIOS	Nº de pacientes analizados
Masculino	286	99	391
Femenino	212	76	292
S/D	-	-	8
TOTAL	508	183	691*

* De las 691 muestras, en 8 de ellas no se cuenta con el dato de procedencia ni sexo.

b. POBLACION DE ESTUDIO Y PREVALENCIA DE *Escherichia coli* ENTEROAGREGATIVA.

Un total de 103 (15%) aislados de 691 muestras (IC: 12.1% - 17.5%, $p < 0.05$) evidenció la presencia del plásmido *pAA*, considerándose estos aislados de *Escherichia coli* como EAEC.

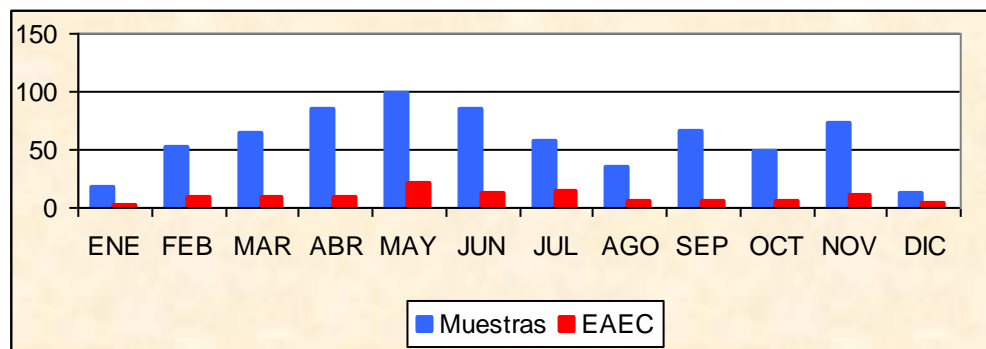
i. Frecuencia de EAEC a lo largo del estudio.

Como se observa en la tabla 8 (Figura 13) la distribución de EAEC presentó una variación a lo largo del estudio con un porcentaje desde 9% a 25% con diferencias significativas [$t = 4.782$, $p > 0.01$, $gl = 22(2.508)$], en los meses de Mayo (20 cepas *pAA+*, 20%), Junio (11 cepas *pAA+*, 14%), Julio (14 cepas *pAA+*, 25%) y Noviembre (10 cepas *pAA+*, 14%). Se aislaron muestras EAEC positivas a lo largo de todo el año de estudio. No se consideró relevante la frecuencia de aislados EAEC positivos en el mes de Diciembre (25%) por la baja cantidad de muestras recolectadas.

TABLA 8.- Distribución de las muestras recolectadas y de aislados EAEC positivos a lo largo del estudio. Enero-Diciembre. 2004.

MESES	Nº DE MUESTRAS (%)	Nº DE MUESTRAS EAEC POSITIVAS (%)
ENERO	18 (3)	2 (11)
FEBRERO	51 (7)	8 (16)
MARZO	64 (9)	8 (13)
ABRIL	85 (12)	8 (9)
MAYO	98(14)	20 (20)
JUNIO	85(12)	12 (14)
JULIO	57 (8)	14 (25)
AGOSTO	35 (5)	6 (17)
SEPTIEMBRE	65 (9)	6 (9)
OCTUBRE	49 (7)	6 (12)
NOVIEMBRE	72 (1)	10 (14)
DICIEMBRE	12 (2)	3(25)
TOTAL (%)	691 (100)	103

FIGURA 13: .- Distribución de las muestras recolectadas y de aislados EAEC positivos a lo largo del estudio. Enero-Diciembre. 2004.



El análisis de los individuos infectados con EAEC positivos según el sexo mostró que los del género masculino (55%) están en mayor proporción que los del femenino (44%); existiendo una relación (M/F) de 1.3.

Con respecto a la procedencia del paciente se observó que existe una mayor proporción de individuos hospitalizados (76%) infectados por EAEC que ambulatorios (24%); en comparación a la población analizada se observó 15% (78/508) y 13% (25/183) respectivamente. La relación general de pacientes Hospitalizados a Ambulatorios H/A es de 2.8 (tabla 9). Entre los pacientes hospitalizados el género masculino (62%) tiene mayor proporción que el género femenino (37%).

TABLA 9.- Infección por EAEC según género y procedencia de pacientes con procesos diarreicos infecciosos. Enero-Diciembre. 2004.

GENERO	AMBULATORIO (%)	HOSPITALIZADO (%)	TOTAL (%)
Femenino	16 (64)	29 (37)	45 (44)
Masculino	9 (36)	48 (62)	57 (55)
S/D	-	1 (1)	1 (1)
TOTAL (%)	25 (24)	78 (76)	103 (100)

S/D No se tiene el dato del aislado

$\chi^2 = 5.31$ gl = 1 (3.841, $p > 0.05$) P = 0.0285

ii. Infección por EAEC y edad.

Se observó que existe una distribución relativamente uniforme de infección por EAEC en los diferentes grupos etáreos, encontrándose un porcentaje de 17% en las edades entre 7 a 12 meses, seguidos de 16% en 25 a 60 meses de edad, 15% en 4 a 6 meses de edad y menor porcentaje en las edades 13 a 24 meses (14%). En edades menores a los cuatro meses de edad se observó que el porcentaje de infecciones por EAEC es del 10%. Tabla 10.

TABLA 10.- Infección por EAEC según la edad de la población del estudio de pacientes con procesos diarreicos infecciosos. Enero-Diciembre. 2004.

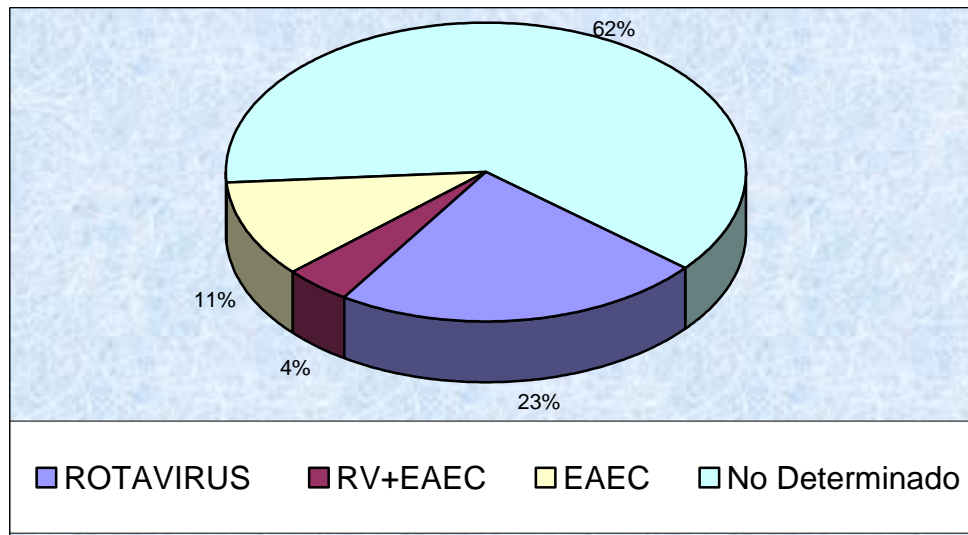
EDAD (en meses)	Nº DE MUESTRAS (%)	Nº DE MUESTRAS EAEC (%)
0 – 3	52(7)	5(10)
4 – 6	80(12)	12(15)
7 – 12	249(36)	42(17)
13 – 24	192(28)	27(14)
25 – 60	89(13)	14(16)
*S/D	29(4)	3(10)
TOTAL	691(100)	103

* S/D no se tiene el dato de edad de los aislados

c. INFECCION POR ROTAVIRUS Y ASOCIACION ENTRE ROTAVIRUS Y EAEC.

El análisis de la coinfección entre EAEC y rotavirus a lo largo del estudio mostró que 30(4%) aislados presentaron coinfección en el huésped, en contraste a 73(11%) aislados EAEC que no presentaron rotavirus y 159(23%) individuos que presentaron infección con rotavirus Figura 14. Entre las muestras EAEC positivas (103 aislados) se observó que un 30% (30/103) presentó coinfección con rotavirus.

FIGURA 14.- Distribución de infección por rotavirus y en EAEC en las muestras recolectadas a lo largo del estudio. Enero-Diciembre. 2004.



Entre los individuos infectados por ambos patógenos se observó que existe mayor porcentaje del género masculino que femenino, presentando coinfecciones en 23 individuos en relación al género femenino que solo se observaron 7 casos. Siendo estas diferencias significativas en relación a la infección por rotavirus o por EAEC por separado ($\chi^2 = 5.346$; gl = 1 (3.841); P = 0.017). Tabla 11. Con respecto a los casos de coinfección y la procedencia del paciente se observó que existe mayor proporción de pacientes hospitalizados (25/30), de los cuales 20 pacientes son del género masculino, 5 del género femenino y solo 5 de 30 pacientes con coinfección son ambulatorios (3 son del género masculino y 2 del género femenino) siendo estas diferencias no significativas por el número de muestras analizadas para este grupo.

TABLA 11.- Infección de rotavirus y EAEC según el genero de la población en estudio.
Enero-Diciembre. 2004.

AGENTE INFECCIOSO	N° DE PACIENTES			TOTAL
	MASCULIN O	FEMENINO	S/D	
Rotavirus	87	70	2	159
EAEC	34	38	1	73
Rotavirus + EAEC	23	7	-	30
TOTAL	144	115	3	262

S/D no se tiene el dato de las muestras

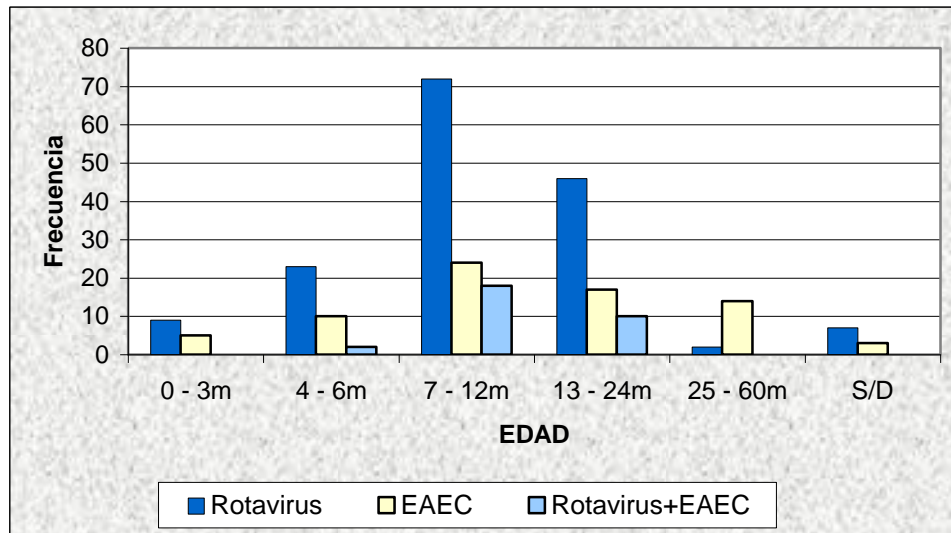
Con respecto a la coinfección de EAEC y rotavirus según la edad, se observó que los niños de edades entre 4 a 24 meses presentaron coinfecciones (3% a 7%), estos grupos son los mas afectados por la infección por EAEC y rotavirus, en contraste con las edades entre 0 a 3 meses y 25 a 60 meses. Tabla 12 y figura 15.

TABLA 12.- Infección de rotavirus y EAEC según la edad de las muestras recolectadas a lo largo del estudio. Enero-Diciembre. 2004.

Edad (meses)	FRECUENCIA		
	Rotavirus (%)	EAEC (%)	Rotavirus – EAEC (%)
0 – 3m	9 (17)	5 (10)	-
4 – 6m	23 (29)	10 (13)	2 (3)
7 – 12m	72 (29)	24 (10)	18 (7)
13 – 24m	46 (24)	17 (9)	10 (5)
25 – 60m	2 (2)	14 (16)	-
S/D	7 (0.1)	3 (10)	-
TOTAL	159	73	30

S/D No se tiene el dato de las muestras

FIGURA 15.- Distribución de muestras infectadas por rotavirus y EAEC de la población en estudio según la edad. Enero-Diciembre. 2004.



S/D No se tiene el dato de las muestras

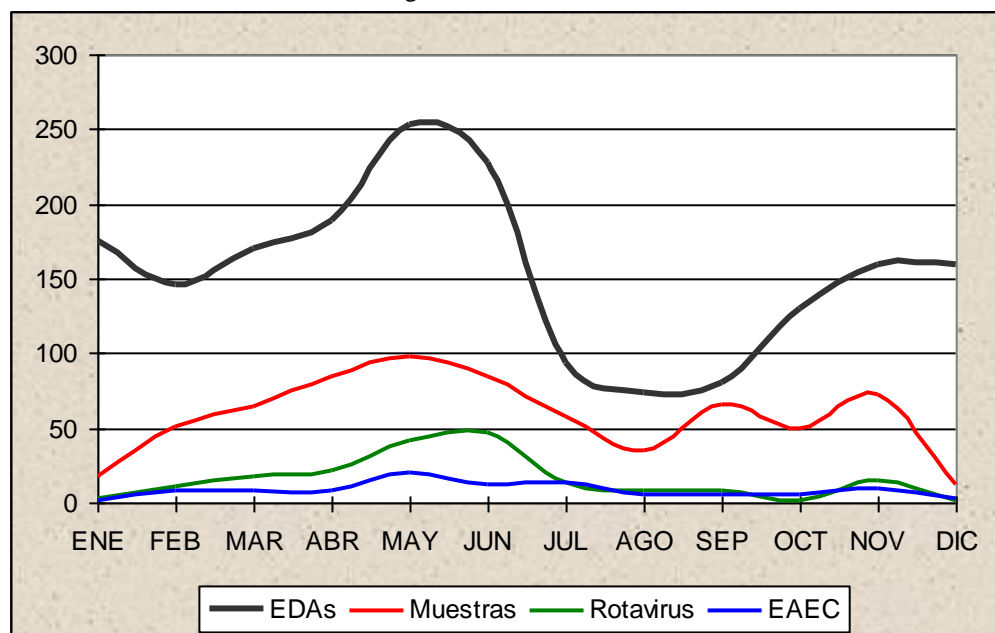
La coinfección por EAEC-rotavirus a lo largo del estudio se observó en ocho meses (Febrero a Agosto y Noviembre) cinco de los cuales coinciden con el brote estacional de infección por rotavirus, marzo a julio, observándose una mayor frecuencia de coinfección en el mes de mayo (11%) donde también se observó la mayor prevalencia de rotavirus (31%). Tabla 13.

En la frecuencia de las muestras recolectadas en el tiempo de estudio, en relación a las infecciones por rotavirus y EAEC se observa que existe un contraste con el promedio de EDAs reportadas en el Hospital Boliviano Holandés de la ciudad de El Alto y Hospital Materno Infantil de la ciudad de La Paz. Figura 16.

TABLA 13.- Infección por Rotavirus y EAEC de las muestras recolectadas a lo largo del estudio. Enero-Diciembre. 2004.

Nº DE PACIENTES			
TIEMPO	ROTAVIRUS (%)	EAEC (%)	ROTAVIRUS- EAEC (%)
ENERO	3 (17)	2 (11)	-
FEBRERO	9 (18)	6 (18)	2 (4)
MARZO	13 (20)	3 (5)	5 (8)
ABRIL	18 (21)	5 (6)	3 (3)
MAYO	30 (31)	9 (9)	11 (11)
JUNIO	43 (51)	8 (9)	4 (5)
JULIO	12 (21)	12 (21)	2 (3)
AGOSTO	6 (17)	4 (11)	2 (6)
SEPTIEMBRE	8 (12)	6 (9)	-
OCTUBRE	2 (4)	6 (12)	-
NOVIEMBRE	14 (19)	9 (13)	1 (2)
DICIEMBRE	1(8)	3 (25)	-
TOTAL	159	73	30

FIGURA 16.- Distribución de las EDAs, las infecciones por rotavirus y EAEC de las muestras recolectadas a lo largo del estudio. Enero-Diciembre. 2004.



d. CARACTERIZACIÓN GENOTÍPICA DE *Escherichia coli* ENTEROAGREGATIVA.

La determinación de genes virulentos en 103 colonias EAEC (*pAA+*) aisladas, se muestra en la tabla 14 (Figuras 17), donde 101(98%) aislados presentaron el gen *astA*, 84(82%) el gen *irp2*, 72(70%) el gen regulador *aggR*, seguidos de *aggA* y *pet* con 32(31%) y 31(30%) aislados respectivamente. Los genes *pic* y *aafA* se encontraron en menor frecuencia 25% y 21% respectivamente.

TABLA 14.- Distribución de los genes de virulencia en cepas EAEC aisladas de pacientes con procesos diarreicos infecciosos. Enero-Diciembre. 2004.

FACTORES VIRULENTOS	NUMERO (%)
<i>astA</i>	101(98)
<i>irp2</i>	84(82)
<i>aggR</i>	74(72)
<i>aggA</i>	32(31)
<i>Pet</i>	31(30)
<i>pic</i>	26(25)
<i>aafA</i>	22(21)

Entre los genotipos encontrados en los 103 aislados EAEC se observó en mayor porcentaje la presencia de tres (30%) y cuatro (26%) genes virulentos entre los que resaltan las combinaciones entre genes *astA*, *irp2*, *aggR* (56%). Asimismo 3 aislados presentaron conjuntamente seis genes de virulencia. Tabla 15.

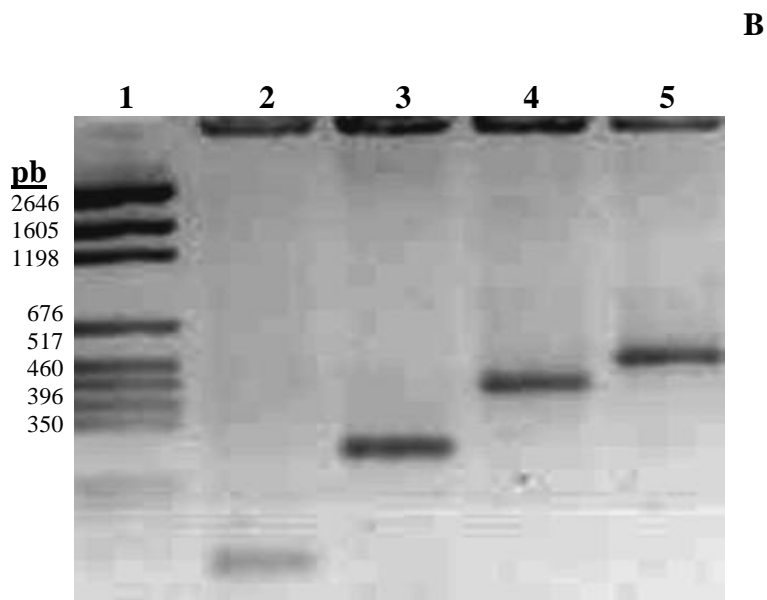
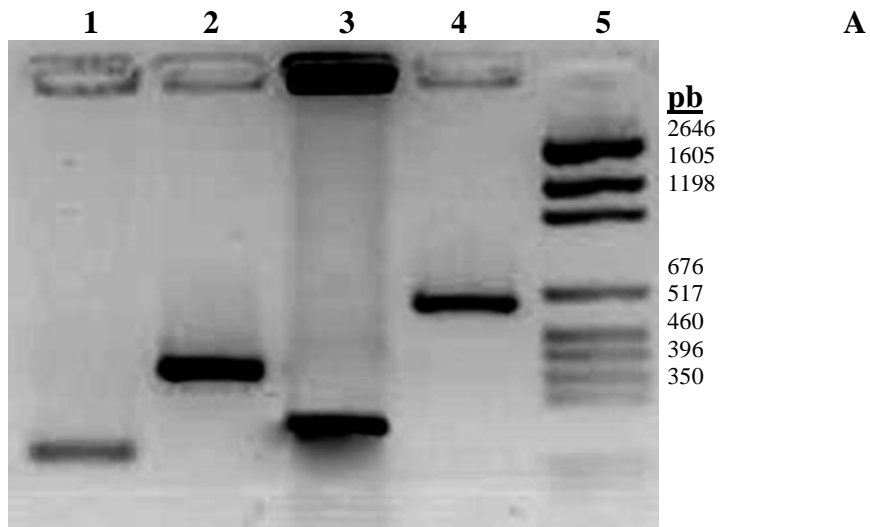


FIGURA 17.- Amplificación de los genes de EAEC analizados en el presente trabajo. **A:** Carriles: 1 *aafA* (233pb); 2 *aggA* (308pb); 3 *aggR* (421pb); 4 *pAA* (630pb) y 5 marcador de peso molecular pGem. **B:** Carriles: 1 Marcador de peso molecular pGem; 2 *astA* (106pb); 3 *irp2* (267pb); 4 *pet* (442pb) y 5 *pic* (517).

No existe una relación significativa entre los genes analizados, con excepción de *pet* y *pic* ($\chi^2 = 4.37$; $gl = 1$ (3.841); $P = 0.037$)

En la Figura 18 se aprecia la similitud de la distribución de los genotipos en relación a la frecuencia de genes comunes compartidos donde la mayor variación entre los aislados estará dada por la distribución de los genes *pet*, *aggA*, *aafA* y *pic*.

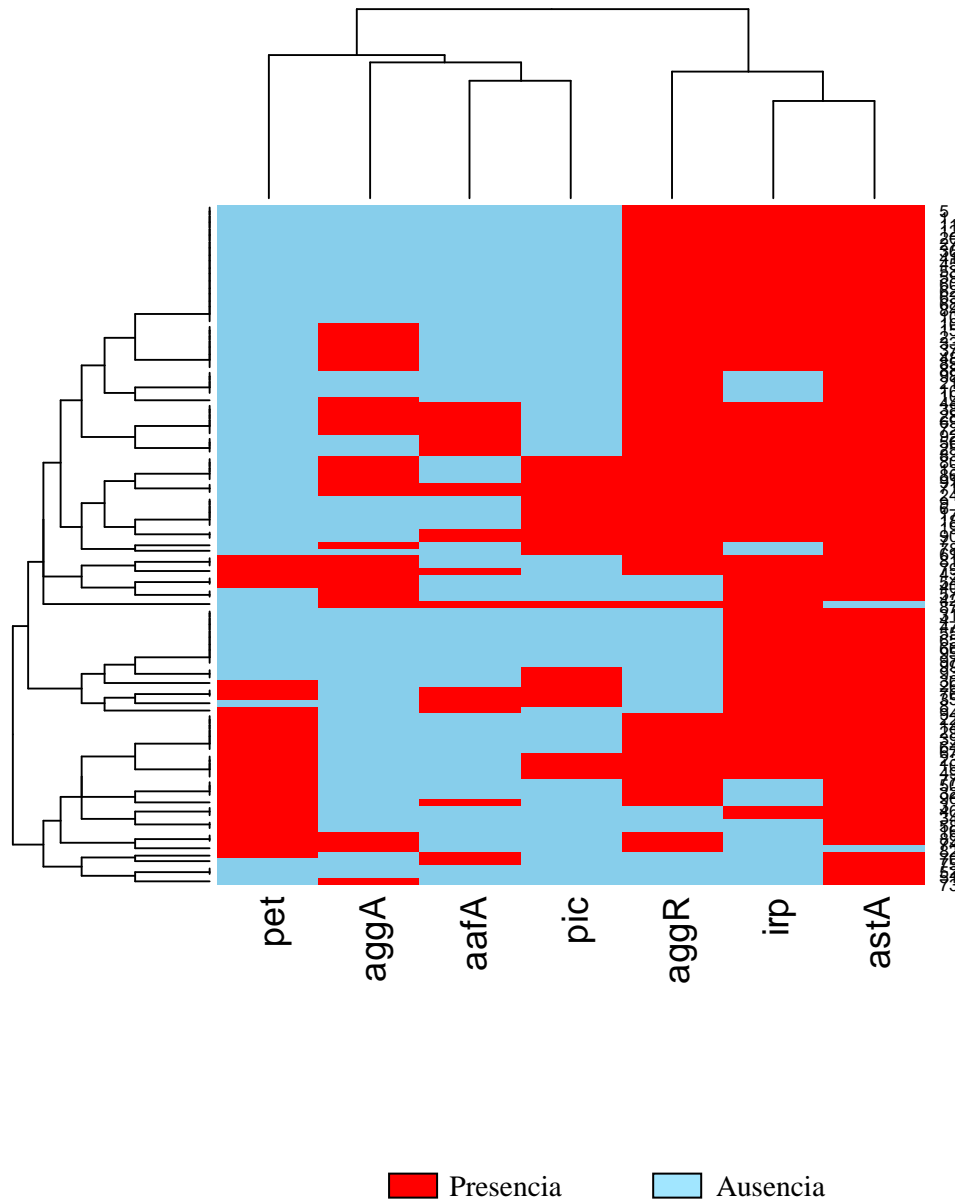


FIGURA 18.- Distribución de los genes analizados en cepas EAEC aisladas de pacientes con procesos diarreicos infecciosos. Enero-Diciembre. 2004. Análisis realizado por el programa R.

TABLA 15.- Distribución de los genotipos encontrados en las cepas EAEC aislados de pacientes con procesos diarreicos infecciosos. Enero-Diciembre 2004.

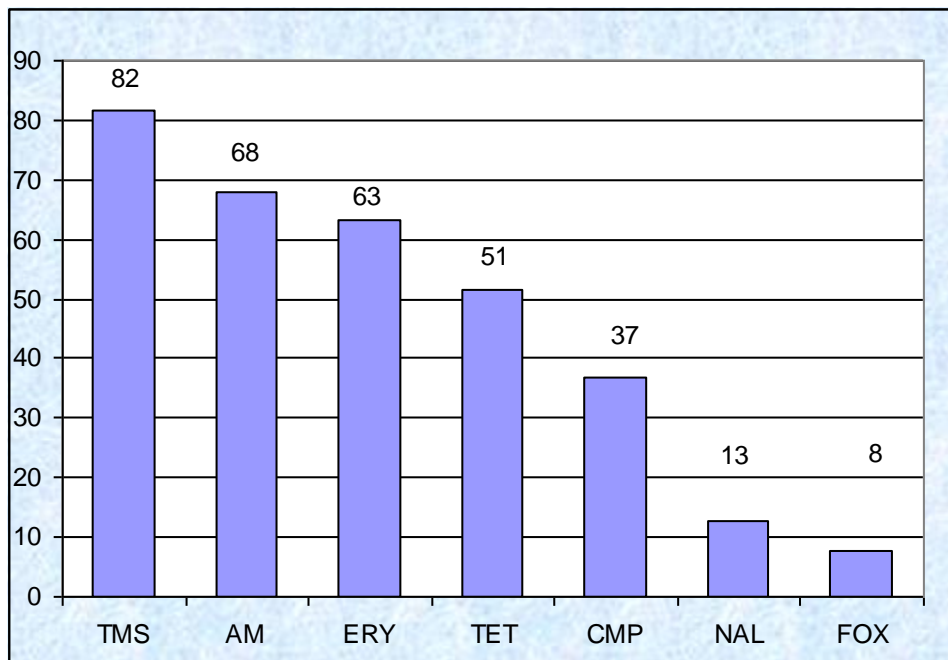
GENOTIPOS	FRECUENCIA (%)
<i>astA, aggR, irp2, aggA, aafA, pic</i>	2(1.9)
<i>astA, aggR, irp2, aggA, aafA, pet</i>	1(0.9)
<i>astA, aggR, irp2, aggA, aafA</i>	5(4.8)
<i>aggR, irp2, aggA, aafA, pic</i>	1(0.9)
<i>astA, aggR, irp2, aggA, pic</i>	4(3.9)
<i>astA, aggR, irp2, aggA, pet</i>	2(1.9)
<i>astA, aggR, irp2, aafA, pic</i>	2(1.9)
<i>astA, aggR, irp2, pet, pic</i>	4(3.9)
<i>astA, aafA, pet, pic, irp</i>	2(1.9)
<i>astA, aggR, aggA, pet</i>	2(1.9)
<i>astA, aggR, aggA, pic</i>	1(0.9)
<i>astA, aggR, irp2, aggA</i>	7(6.8)
<i>astA, aggR, irp2, aafA</i>	3(2.9)
<i>astA, aggR, irp2, pic</i>	5(4.8)
<i>astA, aggR, irp2, pet</i>	6(5.8)
<i>astA, aggR, aafA, pet</i>	1(0.9)
<i>astA, aggA, pet, irp2</i>	2(1.9)
<i>astA, aggA, pic, irp2</i>	1(0.9)
<i>astA, aafA, pet, irp2</i>	1(0.9)
<i>astA, pet, pic, irp2</i>	1(0.9)
<i>astA, aggR, aggA</i>	1(0.9)
<i>aggR, aggA, pet</i>	1(0.9)
<i>astA, aggR, pic</i>	1(0.9)
<i>astA, aggR, pet</i>	3(2.9)
<i>astA, aggR, irp2</i>	18(16.5)
<i>astA, aggA, irp2</i>	2(1.9)
<i>astA, aafA, pet</i>	1(0.9)
<i>astA, pet, irp2</i>	2(1.9)
<i>astA, pic, irp2</i>	2(1.9)
<i>astA, aggR</i>	4(3.9)
<i>astA, aggA</i>	1(0.9)
<i>astA, aafA</i>	1(0.9)
<i>astA, pet</i>	2(1.9)
<i>astA, irp2</i>	9(8.7)
<i>astA</i>	2(1.9)
TOTAL	103 (100)

e. SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA DE LAS CEPAS DE EAEC.

Los resultados obtenidos en el análisis de resistencia a siete antibióticos en los aislados de EAEC, demuestran que existe una mayor resistencia a Trimetroprim-Sulfametaxazol (TMS) en 84(82%) de los aislados, seguido de Ampicilina (AM) con 70(68%), Eritromicina (ERY) y Tetraciclina (TET) en 65(63%) y 53(51%) respectivamente.

La resistencia para Cloranfenicol (CMP) 38(36.9%), Ácido Nalidixico (NAL) 13(13%) y Cefotaxina (FOX). 8(8%) fue significativamente menos frecuente. Figura 19.

FIGURA 19.- Resistencia antimicrobiana a siete antibióticos* de aislados de EAEC provenientes de las muestras recolectadas a lo largo del estudio, Enero-Diciembre. 2004.



* TMS: Trimetroprim Sulfametaxazol; AM: Ampicilina; ERY: Eritromicina; TET: Tetraciclina; CMP: Cloranfenicol; NAL: Ácido Nalidixico; FOX: Cefotaxina.

El análisis estadístico de la distribución del porcentaje de aislados resistentes al número de antibióticos analizados, mostró que en conjunto la proporción de resistencia fue significativamente diferente a los valores esperados ($p < 0.05$), bajo un modelo de independencia. Esto es evidente sobre todo para los valores de resistencia 1 a 6 antibióticos. Así la distribución del porcentaje de aislados resistentes a 1, 2, 5 y 6 antibióticos estuvo encima de los valores esperados menores que para 3 y 4 antibióticos esta se encontró debajo de los valores esperados. Figura 20.

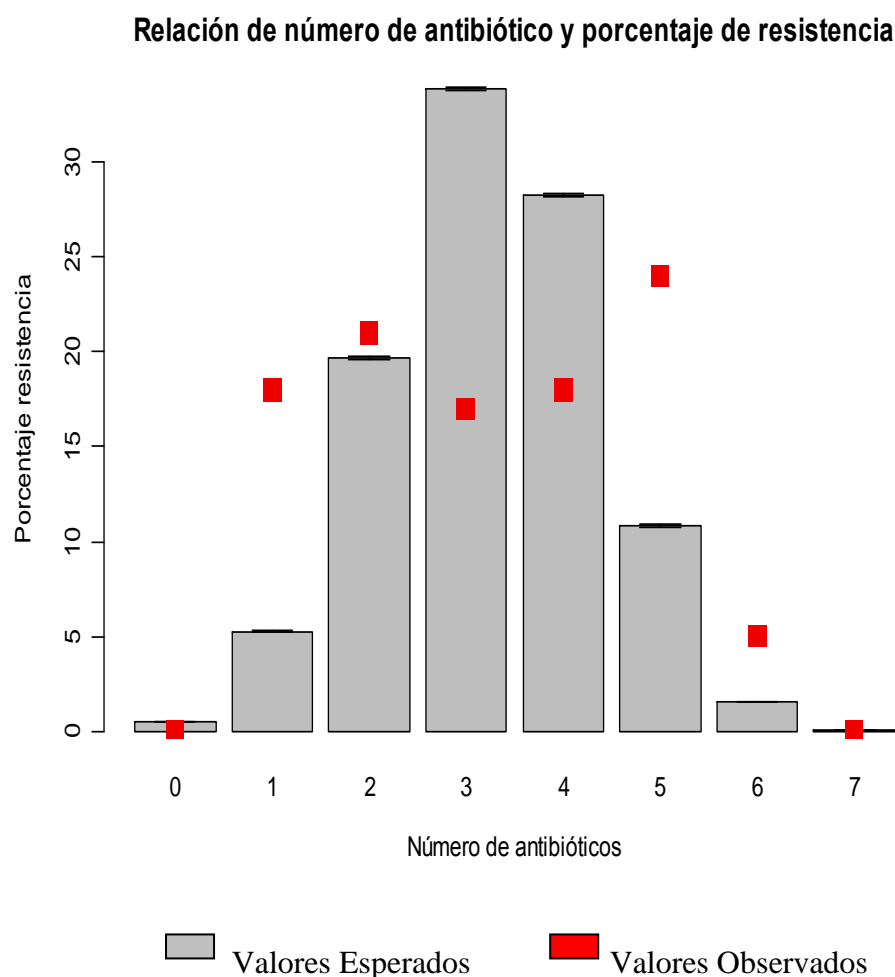
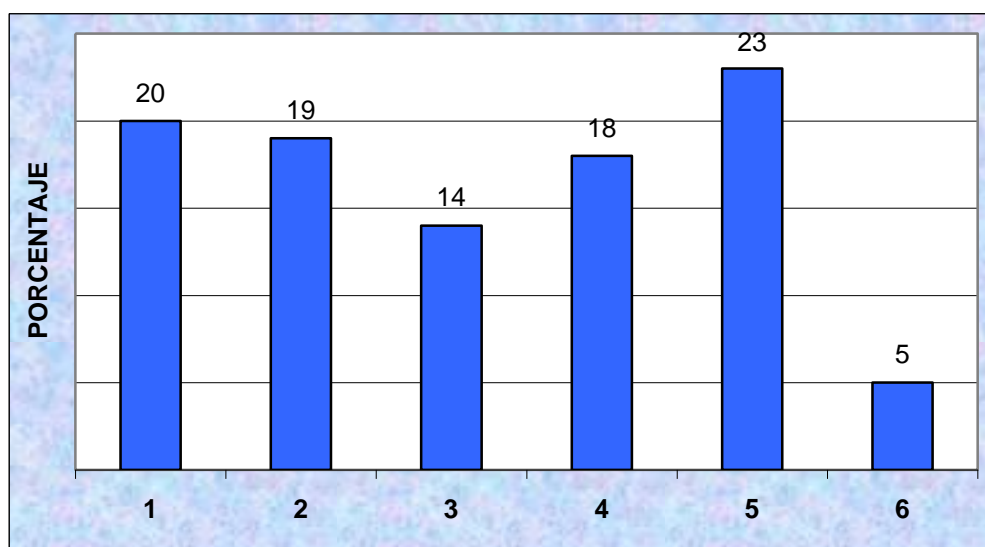


FIGURA 20.- Distribución del modelo de independencia de la proporción de aislados bacterianos resistentes a 1 hasta 7 antibióticos en cepas EAEC aisladas de pacientes con procesos diarreicos infecciosos. Enero-Diciembre. 2004.

La multiresistencia a siete antibióticos encontrada en los aislados de EAEC mostró que el 23% de los aislados es resistente a cinco antibióticos analizados, seguido de los aislados resistentes a 5(23%) y 2(19%) antibióticos. (Figura 21).

Las combinaciones de resistencia más frecuentes comprenden a los siguientes antibióticos TET, TMS, ERY y AM se encuentran en el 36% de los aislados (Tabla 16, figura 21).

FIGURA 21.- Multiresistencia de las cepas EAEC aisladas de pacientes con procesos diarreicos infecciosos. Enero-Diciembre. 2004.



La tabla 16 y figura 22 muestran la diversidad fenotípica entre las cepas aisladas con relación a la resistencia/sensibilidad de los antibióticos analizados.

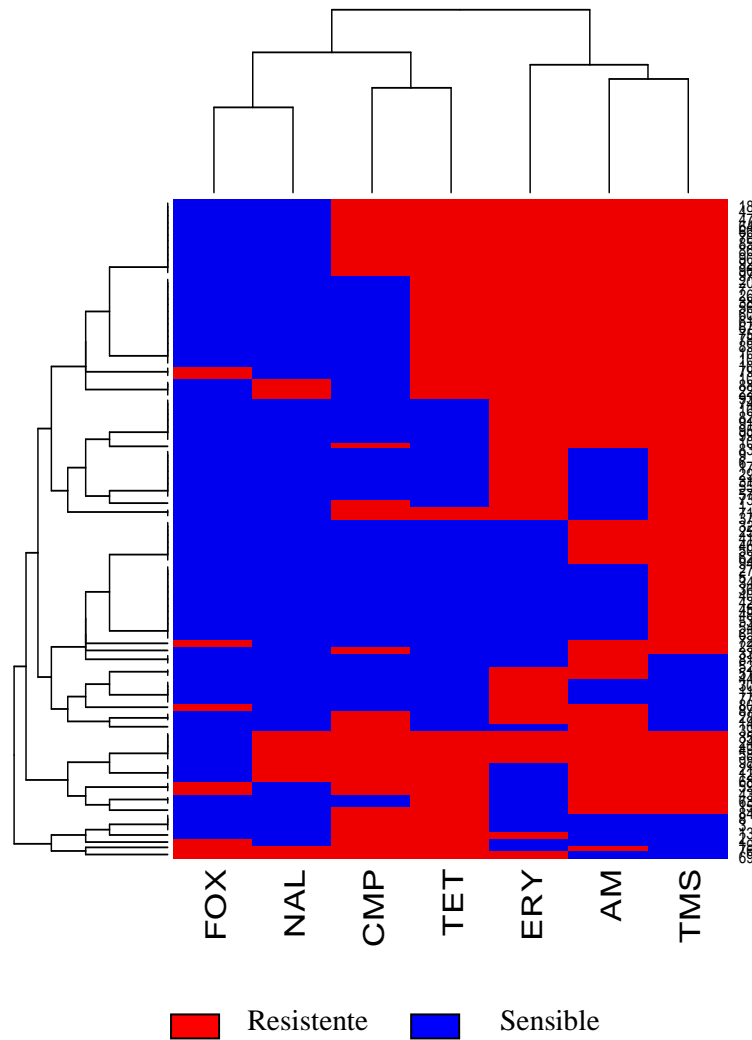


FIGURA 22.- Distribución de la susceptibilidad antimicrobiana de las cepas EAEC aisladas de pacientes con procesos diarreicos infecciosos. Enero-Diciembre. 2004. Análisis realizado por el programa R.

TABLA 16.- Distribución de los diferentes perfiles de resistencia de los aislados EAEC positivos encontrados a lo largo del estudio. Enero-Diciembre. 2004.

ANTIBIOTIPOS	FRECUENCIA (%)
TET, NAL, TMS, ERY, CMP, AM	5 (4.8)
TET, TMS, ERY, CMP, AM	13 (12.6)
TET, TMS, ERY, FOX, AM	1 (0.9)
TET, NAL, TMS, CMP, AM	3 (2.9)
TET, NAL, TMS, ERY, AM	3 (2.9)
TET, TMS, FOX, CMP, AM	2 (1.9)
TET, NAL, ERY, FOX, CMP	1 (0.9)
TET, NAL, FOX, CMP, AM	1 (0.9)
TET, TMS, ERY, AM	15 (14.6)
TET, TMS, ERY, CMP	2 (1.9)
TMS, ERY, CMP, AM	1 (0.9)
TET, TMS, CMP, AM	1 (0.9)
TMS, ERY, CMP	1 (0.9)
TET, ERY, CMP	1 (0.9)
ERY, CMP, AM	3 (2.9)
TMS, ERY, AM	6 (5.8)
TMS, FOX, AM	1 (0.9)
TMS, CMP, AM	1 (0.9)
TET, TMS, AM	1 (0.9)
TET, CMP	4 (3.9)
TMS, ERY	6 (5.8)
TMS, AM	8 (7.8)
ERY, AM	2 (1.9)
TMS	14 (13.6)
ERY	4 (3.9)
AM	3 (2.9)
TOTAL	103 (100)

f. DIVERSIDAD GENO-FENOTÍPICA DE EAEC.

La figura 23 muestra la diversidad geno-fenotípica encontrada en las cepas EAEC con relación al total de marcadores analizados (siete genes de virulencia y siete antibióticos) observándose dos tipos de aislados asociados por un lado a los genes de virulencia y la de resistencia a antibióticos de mayor frecuencia y por otro a los de menor frecuencia. El 70% de los cuales representan variantes de una combinación de genes de virulencia con los fenotipos de resistencia a antibióticos, los cuales 18%(12/72) presentan combinaciones de genes asociados únicas a diferentes perfiles de resistencia a antibióticos.

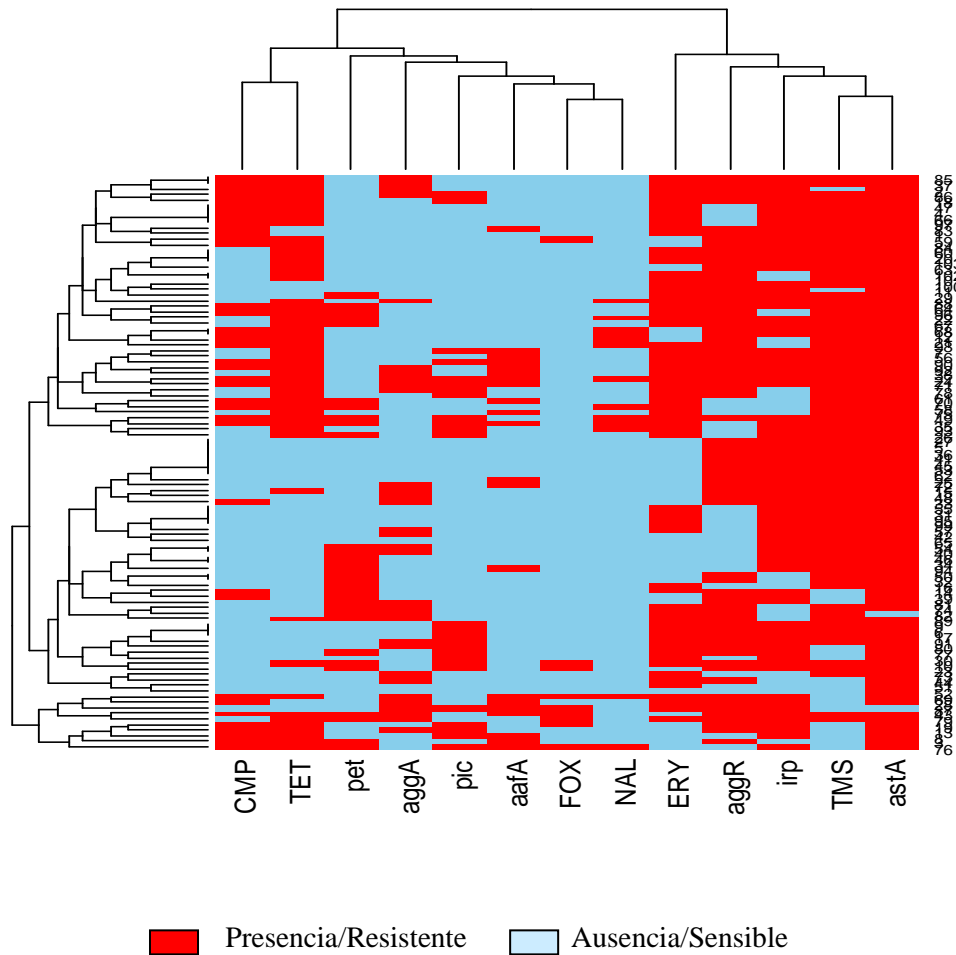


FIGURA 23.- Relación de los genes analizados y la resistencia a antibióticos de cepas EAEC aisladas de pacientes con procesos diarreicos infecciosos. Enero-Diciembre. 2004. Análisis realizado por el programa R.

7. DISCUSION.

a. EDA: CARACTERISTICAS DE LA POBLACION ANALIZADA.

En la ciudad de La Paz en el periodo de estudio se registró un 32% de niños menores de cinco años que acudieron al servicio de salud por causa de infecciones diarreicas (SEDES La Paz, 2004), de los cuales el 47.7% corresponde a niños entre uno a cuatro años de edad y el 26% pertenece a menores de un año.

De acuerdo a estos datos anteriormente nombradas el grupo etáreo más afectado y con mayor riesgo a contraer enfermedades diarreicas agudas (EDA) está entre los menores de dos años de edad, lo cual concuerda con los resultados obtenidos en este trabajo donde se destaca un mayor porcentaje de diarrea en niños con edades de 7 a 12 meses (36%) seguido de niños entre 13 a 24 meses (28%), datos similares se observaron en un trabajo realizado en Jordania donde la mayor frecuencia de diarreas está entre las edades de 6 a 11 meses (35%) y 12 a 23 meses (20%) de edad (Youssef et al. 2000), de forma similar en Tailandia se observaron 25% de casos en niños menores a un año de edad (Ratchtrachenchai et al.2004).

La proporción encontrada de niños afectados según género (1.3:1 M/F) en La Paz es similar a los datos obtenidos por Mamani anteriormente (Mamani. 2005) así como en Jordania (Youssef et al. 2000).

La mayor cantidad de muestras recolectadas fueron en los meses de abril a junio en el tiempo de estudio, los picos están correlacionados con el número de casos de EDA reportados en el tiempo que duro el estudio.

b. IDENTIFICACION DE EAEC.

La determinación de EAEC para este estudio se basó en la amplificación por PCR de un segmento del plasmido de adherencia agregativa (*pAA*) que lleva parte de los genes de virulencia. Se eligió este método por su rapidez, costo, reproducibilidad y

por presentar menos limitantes que las pruebas de adhesión (Huang et al. 2003) al ser EAEC una cepa genéticamente muy heterogénea.

El uso del segmento pCVD432 del plásmido de adhesión agregativa (*pAA*) es muy utilizado en general para la detección de EAEC en diferentes reportes (Okeke et al. 2000; Shazberg et al. 2003), en otros estudios se empleó al gen *aggR* por su prevalencia (Young et al 2005; Toma et al. 2003) o la combinación de *aggR* y *astA* (Ratchtrachenchai et al. 2000; Cerna et al. 2003).

c. PREVALENCIA DE *Escherichia coli* ENTEROAGREGATIVA.

En el presente trabajo se encontró a EAEC en un 15% de los casos de niños menores a cinco años con EDA, considerando que de todas las muestras recolectadas en el tiempo de estudio no se evaluaron al 22% de las mismas (debido a contaminación y/o ausencia de crecimiento bacteriano, ver anexo 1), la frecuencia encontrada podría estar sobre o subestimada. Valores de prevalencia de EAEC similares (14.6%) se encontró en un estudio realizado en Brasil en niños con diarrea menores a tres años de edad (Mangia et al. 2004) y en Jordania (10.2%) en niños menores a cinco años de edad (Youssef et al. 2000).

Estudios realizados en pacientes asintomáticos en Argentina muestran 31.4% de casos infectados por EAEC en niños menores a 20 meses de edad (Quiroga et al. 2000), así como en Brasil (11.1%) en niños menores a tres años de edad (Mangia et al. 2004). Sin embargo en un estudio de Suecia se ha observado que EAEC está mas asociada a niños menores a 5 años de edad con diarrea que sin diarrea (Pabst et al. 2003).

Si bien en el presente trabajo no se evaluó en paralelo la prevalencia de infección con otros patotipos de *E. coli*, la frecuencia encontrada de EAEC es mayor a los reportes para EPEC (6.3%), EHEC (0.4%) (Sanchez. 2002), ETEC (9.4%) (Mamani. 2005) encontrada en la ciudad de la Paz. En otros trabajos (Ratchtrachenchai et al.

2004; Okeke et al. 2000) también se observa frecuencias mayores de EAEC respecto a otros patotipos DEC.

La infección de EAEC a lo largo de los meses de estudio muestra que existe una distribución relativamente constante en el transcurso del año sin variaciones estacionales claras. Los meses donde se observó mayor proporción de aislados de EAEC fueron Mayo (20%), Julio (25%) y Diciembre (25%) que corresponde a diferentes épocas del año (invierno y verano). Sin embargo en Japón se observó mayor número de casos de EAEC en verano en los meses de agosto y septiembre (Nishikawa et al. 2002).

El análisis de individuos infectados por EAEC según el sexo mostró que existe mayor proporción del género masculino que el femenino que estaría en relación a la población estudiada. En relación a las diferencias encontradas entre la infección por EAEC en casos hospitalizados (76%) en contraste a los pacientes ambulatorios (24%), estas podrían deberse a que también existe una mayor proporción de pacientes hospitalizados que ambulatorios en la población estudiada o que EAEC presentaría una diarrea con mayor severidad. Será necesario valorar estas posibles asociaciones en un mayor número de muestras ambulatorias así como distinguir la relación entre diarreas por EAEC y malnutrición y/o diarrea persistente en pacientes hospitalizados, ya que otros estudios muestran la relación de EAEC con la diarrea persistente (González et al. 2002).

La distribución de la infección de EAEC según la edad encontrada en el presente trabajo es relativamente similar en los grupos etáreos de 4 a 60 (14% a 17%) meses de edad. En otros trabajos (Ratchatrachenchai et al.2004; Scaletsky et al. 2002, Mangia et al. 2004; Quiroga et al. 2000) se observa mayor proporción de infecciones por EAEC en edades menores a un año de edad, entre los 6 a 12 meses de edad. En comparación a otros patógenos DEC en trabajos realizados en la Ciudad de La Paz se observó que existe mayor infección por ETEC a partir de los 7 a 24 meses de edad

(Mamani. 2005) en cambio para las infecciones por EPEC se encontró mayor proporción a los 48 meses de edad (Sanchez. 2002).

d. ROTAVIRUS Y EAEC.

La infección por rotavirus y por EAEC es de 23% y 11% respectivamente donde el 4% de los casos presentaron coinfección (EAEC-rotavirus) en las muestras recolectadas a lo largo del estudio. Entre los patógenos principales que afectan a los niños menores de edad se encuentra rotavirus que es el agente principal causal de diarrea en niños menores de cinco años de edad. En Bolivia la prevalencia de casos de rotavirus encontrada en el año 2001 es de 23% y 25% en hospitales de El Alto y La Paz respectivamente (Encinas. 2005) que coinciden con los datos reportados en el presente trabajo.

Trabajos similares reportan en el Sudeste de Brasil en Botucatu mayor presencia de EAEC (20.4%) en comparación a rotavirus (14.8%) encontrándose un 16% de casos de coinfección EAEC-rotavirus (Rodrigues et al. 2002). En Maputo, Mozambique se observó la presencia de coinfecciones EAEC-rotavirus en un 4.7% de niños con diarrea (Rappelli et al. 2005) y en otro estudio en el noreste de Brasil-Río Grande en niños de 2 años se observó 0.8% de casos de coinfección (Scaletsky et al. 2002) en Hanoi Vietnam se encontró en niños menores de cinco años de edad 5.3 casos de coinfecciones EAEC-rotavirus en contraste las coinfecciones EPEC-rotavirus 3.4% (Nguyen et al. 2004).

Entre los individuos que presentan coinfección se observó mayor frecuencia de niños que niñas (23/144 y 7/115 respectivamente), que no coincide con lo observado por la infección por solo rotavirus o EAEC donde no existen diferencias significativas asociadas al género. Con respecto a la procedencia del paciente en las coinfecciones se observó mayor número de pacientes hospitalizados que ambulatorios donde se encontró mayor número de niños hospitalizados que niñas, esto podría deberse al número de muestras recolectadas en el tiempo de estudio, sin embargo podría existir una diferencia según el género en la maduración linfocitaria de los pacientes para que se observe

mayor severidad de la enfermedad en pacientes del género masculino que el femenino. Se debería realizar en futuras experiencias estudios con un mayor número de muestras según el género y condición del paciente con procesos diarreicos.

La coinfección EAEC-rotavirus se observó en niños entre 7 a 24 meses de edad y estaría relacionada a la infección por rotavirus donde existe mayor prevalencia en edades de los 4 meses hasta los 24 meses de edad. Se podría inferir que a medida que el niño va creciendo incrementa sus defensas frente a la reinfección por rotavirus que causa diarrea en contraste a EAEC (Valentiner et al. 2003), en cambio para los niños en edades tempranas (0 a 6 meses de edad) esas infecciones son poco frecuentes esto podría deberse porque los niños son alimentados con leche materna por donde le pasaría componentes biológicamente activos niño (Jiménez et al. 2001).

El análisis de la infección por rotavirus a lo largo de los meses en estudio y en contraste con EAEC, muestra un brote estacional en los meses de marzo a julio (transición otoño invierno) que coincide con los estudios realizados previos en Bolivia (Encinas. 2005). El 19% de los casos de coinfección EAEC-rotavirus encontrados en el presente trabajo coincide con el brote estacional de infección por rotavirus (mayo a julio). En el sudeste de Brasil en Botucatu se observó brotes estacionarios en los meses de agosto a noviembre (transición otoño invierno) donde coincide con el máximo pico de rotavirus y EAEC, sin embargo en los meses de enero a marzo (invierno) se observó un brote estacional por EAEC y no así por rotavirus (Rodrigues et al. 2002).

En otros reportes se ha observado la presencia de EAEC en niños menores a cinco años con otros patotipos DEC u otros patógenos, en algunos casos encontrándose coinfecciones con mas de un patógeno (Pabst et al. 2003). En niños mayores a dos meses de edad se encontró la presencia de 0.3% de EPEC-EAEC (Keskimaki et al.2001) así como un 2% de coinfecciones DAEC-EAEC y *Salmonella*-EAEC (Rodríguez et al. 2002), lo que sugeriría que EAEC podría ser un patógeno oportunista, se tendría que realizar estudios con casos controles para poder ver la relación existe de EAEC en las infecciones gastrointestinales. De acuerdo a un trabajo realizado por

Nguyen en niños menores de cinco años de edad indica que las coinfecciones no ocasionan un incremento en la severidad de los síntomas clínicos comparado con los niños infectados solo con rotavirus o con otro patógeno, las coinfecciones es una problemática en términos de diagnóstico y tratamiento de la diarrea en los niños (Nguyen et al. 2004).

e. CARACTERIZACION GENOTIPICA DE EAEC.

Los genes plasmídicos (*aggR*, *aggA*, *aafA*, *pet*, *astA* y otros) y cromosomales (*irp2* y *pic*) de EAEC, que están asociados a la virulencia de las cepas, presentan distribución variable en las cepas circulantes en diferentes partes del mundo, lo que ha dificultado la caracterización de EAEC.

En este estudio el gen *astA* fue encontrado en casi todos los aislados (98%). En Brasilia en pacientes con EDA menores a 2 años de edad este gen se presentó en el 82% de las cepas EAEC (Piva et al. 2003), en contraste a otros reportes del Brasil (26%) (Zamboni et al 2004), de la India (29.8%) (Kahali et al. 2004) y del Japón en un brote infeccioso en escolares (27%) (Ishiguro et al. 2005). En todos estos trabajos como en el presente, la presencia del gen *astA* es mayor en comparación a los demás genes virulentos de EAEC. Otros reportes señalan la presencia de este gen en cepas como EPEC, ETEC, EHEC, DAEC así como en cepas de *E. coli* no diarreogénica (Yatsuyanagi et al. 2003; Presteri et al. 2003), siendo asociado inclusive a un grupo nuevo (EAST1EC) reportado en brotes esporádicos en Osaka-Japón (Nishikawa et al. 2002).

El segundo gen (*irp2*) mas frecuentemente encontrado (82%), es otro de los factores virulentos que expresa EAEC que habría sido adquirido de islas de patogenicidad de *Yersinia spp* (Hu et al. 2005). Si bien hasta el momento no esta claro como interviene en la patogenie que produce EAEC, se ha reportado la presencia de este gen en pacientes con diarrea en cepas EAEC provenientes de Nigeria y Brasil 85% (Okeke et al. 2004), dato casi similar observado al de este trabajo. En otras regiones se reportan frecuencias menores; en Brasil en niños con EDA menores a dos años (57%)

(Zamboni et al. 2004), en niños menores a 4 años en Chile (12.5%) (Suzart et al. 2001) y en la India (47%) (Kahali et al. 2004).

Con respecto a los genes codificantes de las fimbrias, si bien el 72% de los aislados presentaron el gen regulador *aggR*, no se encontró en igual proporción a los genes *aggA* y *aafA*. Las frecuencias de los genes de adhesión reportados varían en aislados de diferentes regiones. En Brasil se encontró al gen *aggR* en un 88% de los aislados y a los genes de las fimbrias I y II en un 18% - 12% respectivamente (Zamboni et al. 2004), en la India *aggR* (65.3%) y *aggA* (9.1%) en contraste a *aafA* (1.7%) (Kahali et al 2004).

La presencia de los genes de adhesión y la prueba de adhesión celular han permitido clasificar a las cepas de EAEC en típicas y atípicas. Así las cepas que presentan el plásmido *pAA* y presentan adhesión celular si existe el gen de regulación de las fimbrias de adhesión (*aggR*) son consideradas como cepas EAEC típicas y aquellas que no presenten ningún gen de adhesión son consideradas como cepas EAEC atípicas (Bouzari et al. 2005). En el presente estudio 72% de los aislados demostraron por la presencia de este gen adhesión por lo que podrían representar cepas típicas EAEC. Sin embargo no se realizó la prueba de adhesión celular, por lo que deberá considerarse este ensayo en futuros trabajos.

Así mismo deberá determinarse la distribución de otros factores de adhesión (*aap* y *agg3*) no analizados así como su rol con las EDA. Se ha reportado en cepas que no presentaban adhesión celular la existencia del gen *affA* (Bouzari et al. 2001; Zamboni et al. 2004) que estaría mas asociado a los casos de EDA (Suzart et al. 2001) que a casos asintomáticos (Piva et al. 2003). Los factores *aggA* y *aggR* estarían relacionados con la respuesta inmune que se produce por la infección de EAEC (Jiang et al.2002) y *aggA* estaría más asociado a los casos de diarrea siendo considerado como un marcador conveniente para la identificación de EAEC (Huang et al. 2003; Tsai et al. 2003). Los datos del presente trabajo donde se observan bajas frecuencias encontradas de los genes *aggA* y *aafA* en las cepas analizadas, lo que indicaría la presencia de otros

factores de adhesión que estarían presentes en el plasmido de virulencia (Piva et al. 2003), similar a lo observado en otros trabajos (Young et al. 2005) asimismo podrían existir otros genes reguladores que desempeñen el mismo papel que *aggR* para que se produzca la infección por EAEC (Munson et al. 2001) aunque el desarrollo de la enfermedad esta influenciada por la inflamación ocasionado por EAEC (Huang et al. 2003).

Otros factores virulentos analizados en el presente trabajo son *pet* (30%) y *pic* (25%), presentan distribuciones menores en comparación a los otros genes virulentos similar a lo observado en otras regiones como la India (30.6% y 21.5% respectivamente) (Kahali et al. 2004). En ambos genes no se observa una relación con los factores de adhesión (Sarantuya et al. 2004; Zamboni et al. 2004), sin embargo se ha reportado la presencia del gen *pic* en cepas de EAEC con adherencia positiva en un 100% (Suzart et al. 2001), a diferencia de *pet* (74%), a demás de mostrar asociación con DAEC (Presteri et al. 2003; Bouzari et al. 2005; Bellini et al. 2005).

La distribución más frecuente (56%) de los genes observada en el presente trabajo esta dada por *astA*, *irp2* y *aggR* mientras que *aggA*, *pet*, *pic* y *affA* tienen una distribución más heterogénea. En otros estudios se observa combinaciones de genes diferentes como *irp2*, *astA*, *shf* y *pic* y en menor frecuencia combinaciones con el gen *aggA* (Elias et al. 2002). En otro estudio se observa la combinación de *aggR*, *irp2* en un 59% seguido de *aggR*, *shf* (44%) también se observa en menor proporción las combinaciones de los genes de citotoxinas (Zamboni et al. 2004).

f. SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA

Se analizó en el presente trabajo la resistencia a siete antibióticos, encontrándose entre los aislados frecuencias de resistencia por encima del 51% para: Trimetropim Sulfametaxazol, Ampicilina, Eritromicina y Tetraciclina; en menores frecuencias se encuentra Cloranfenicol (36.9%), Ácido Nalidixico (12.6%) y Cefotaxina (7.8%). Se observa una elevada resistencia a los antibióticos frecuentemente utilizados en pediatría (Trimetropim-Sulfametaxazol, Ampicilina, Eritromicina y Tetraciclina)

similar a otros estudios (Ishiguro et al. 2005; Estrada et al. 2005). En México en un estudio realizado en niños menores a 5 años de edad con diarrea se observa en aislados EAEC frecuencias elevadas de resistencia frente a Tetraciclina (94%), Trimetroprim-Sulfametaxazol (88%), Ampicilina (81%) y Cloranfenicol (19%) (Estrada et al. 2005). En la India se observó en cepas EAEC, una mayor resistencia para Ampicilina (86.8%), seguido de Ácido Nalidixico (84.3%), Tetraciclina (79.3%) y Cotrimoxazol (70.2%) (Kahali et al.2004); en otro trabajo en Suecia en niños con diarrea se observó 100% de sensibilidad frente a Cefotaxina (Presteri et al. 2003).

Los aislados analizados presentan resistencia a más de dos antibióticos en un 60%, observándose la resistencia a 5 antibióticos en un 23%, las cepas en estudio presenta mayoritariamente un patrón conservado de resistencia a por la combinación de cuatro antibióticos (TMS, TET, AM y ERY). En cepas EAEC aisladas en México se observa una multiresistencia a mas de tres antibióticos en un 69% (Estrada et al. 2005), en otro trabajo en la India se analizó la susceptibilidad a quince antibióticos encontrándose que un 76% de los aislados presentaban resistencia a mas de 5 antibióticos (Kahali et al. 2004), en Inglaterra se observó que el 19% de las cepas presentaban resistencia a mas de 4 antibióticos (Wilson et al. 2001), estos datos sugieren un monitoreo de los antibióticos frecuentemente utilizados y poder seleccionar los antibióticos con poco valor terapéutico en el tratamiento pediátrico para su correspondiente eliminación.

En comparación a otros trabajos realizados con otros patotípos DEC en nuestro medio se observó mayor resistencia en cepas de ETEC a Ampicilina (85%) seguido de Trimetroprim-Sulfametaxazol (83%) donde existe mayor multiresistencia a tres antibióticos (36%) en cambio para cinco antibióticos (6%) es baja la frecuencia (Mamani. 2005); en cepas de EPEC se encontró mayor resistencia para Estreptomina (90%), Ampicilina (82%), seguido de Tetraciclina (80%) y Trimetroprim (78%) con una mayor multiresistencia a cinco antibióticos 28.9% (Sanchez. 2002). En otro trabajo se observó que la multiresistencia antimicrobiana encontrada en aislados de *Shigella spp*, *E. coli* no diarreogénica y EPEC hay mayor resistencia a mas de tres antibióticos

en contraste a cepas de ETEC y EHEC que presentaron menor proporción de resistencia a antibióticos (Rodas. 2005).

g. DIVERSIDAD GENOTÍPICA Y FENOTÍPICA.

Las cepas EAEC analizadas por la presencia de genes de virulencia y de marcadores de resistencia a antibióticos muestran en conjunto una distribución muy variable de los mismos, observándose agrupaciones de la asociación de genes y marcadores de resistencia más frecuentes. Aunque en el presente estudio no se realizó un análisis con técnicas que midan el polimorfismo, se observó variación de los perfiles geno-fenotípicos, en otros trabajos la utilización de técnicas como el PFGE (electroforesis de campo pulsante) demuestran diversos perfiles con la existencia de diferentes serotipos, antibiogramas y de genes virulentos en la mayoría de los aislados EAEC demostrando que este patotipo de *E. coli* es altamente heterogéneo en su composición genética (Kahali et al. 2004, Sarantuya et al. 2004); también se observó una expansión clonal de EAEC en algunos brotes en casos esporádicos en la ciudad de Osaka (Nishikawa et al. 2002) y diferentes perfiles entre las cepas aisladas en diferentes regiones geográficas (Kahali et al. 2003; Jiang et al. 2002).

En varios estudios como en el presente se observa la heterogeneidad que presentan las cepas EAEC mediada por los factores cromosomales y plasmídicos (Zamboni et al. 2004). Las cepas *pAA+* de niños y adultos con diarrea presentan perfiles diferentes de los marcadores de virulencia y de los serogrupos (Piva et al. 2003), el plásmido de adherencia agregativa lleva una gran parte de los genes virulentos y está sometido a procesos de transferencia horizontal y/o vertical (Czeczulin et al. 1999; Presteri et al. 2003). La transferencia horizontal puede promover las herramientas necesarias para ocupar un nuevo nicho ecológico (Gozarten et al. 2005) también las secuencias de inserción (*IS*) presentes en los genes *astA*, *pet*, *irp* y *pic* podrían haber sido adquiridos de la misma u otras especies bacterianas (Baquero 2004). Se han observado bloques conservados de genes virulentos en cepas de EAEC (Jenkins et al. 2005) que podrían ser adquiridos por estos procesos evolutivos.

8. CONCLUSIONES.

Las características epidemiológicas más importantes encontradas de la diarrea asociada a EAEC fueron las siguientes:

- La infección por EAEC en el periodo de estudio en niños menores a cinco años fue de 15%
- .
- La frecuencia de EAEC presentó una distribución relativamente uniforme a lo largo de los meses de estudio.

- Se observó una distribución de la infección por EAEC en los diferentes grupos etáreos a partir de los 4 meses de edad.

- Se observó un 4% de coinfecciones EAEC-rotavirus a lo largo del estudio.

- La coinfección EAEC-rotavirus se encontró principalmente en niños entre 7 a 12 meses de edad y en los meses de marzo a julio que coincide con los grupos etáreos más prevalentes y con los picos estacionarios asociados a rotavirus.

- Se observó mayor proporción de pacientes del género masculino que femenino.

Entre las características geno-fenotípicas más relevantes de los aislados de EAEC se destaca:

- Los genes mas frecuentemente encontrados fueron *astA*, *irp2* y *aggR*.
- Las cepas EAEC presentaron mayor proporción de resistencia a tres antibióticos: Trimetoprim-Sulfametoxazol, Ampicilina y Eritromicina.
- Las cepas EAEC aisladas presentan un alto grado de variación en la distribución de los marcadores de virulencia y resistencia a antibióticos analizados.

9. RECOMENDACIONES

Diseñar un estudio con casos control sobre las enfermedades Diarreicas agudas por EAEC en niños menores a cinco años de edad asociados a casos:

- * con diarrea aguda
- * con diarrea persistente
- * Asociación con procesos de desnutrición

Relacionar la severidad del proceso diarreico con la caracterización genética en las cepas EAEC

Evaluar la asociación con otros patógenos.

10. REFERENCIA BIBLIOGRAFICA.

- Affonso Scaletsky Isabel Cristina, Fabbriotti Sandra Hilde, Bigelli Carvalho Rozane de Lima. 2001. **Diffuse and Enteroaggregative patterns of Adherence of Escherichia coli Isolated from stools of children in Northeastern Brazil.** Brazilian Journal of Microbiology. Vol. 32:313-319.
- Basu Sulagna, Ghosh Sujata, Ganguly N. K. and Mahundar S. 2004. **A Biologically active of enteroaggregative *Escherichia coli*.** Biochimie. Vol. 86: 657-666.
- Baquero Fernando. 2004. **From pieces to patterns: evolutionary engineering in bacterial pathogens.** Nature Review Microbiology. Vol. 2: 510-518.
- Bellini Estela M., Waldir P. Elias, Gomez Tania A.T., Tanaka Tania L., Taddei Carla R., Huerta Rocio, Navarro-Garcia Fernando, Martinez Marina B. 2005. **Antibody response against plasmid-encoded toxin (Pet) and the protein involved in intestinal colonization (Pic) in children with diarrhea produced by enteroaggregative Escherichia coli.** FEMS Immunology and Medical Microbiology Vol.43: 259–264.
- Bischoff C., Luthy J., Altwegg M. and Baggi F. 2005. **Rapid detection of diarrheagenic E. coli by real-time PCR.** Journal of Microbiological Methods. Vol. 61:335– 341.
- Bouckennooghe Alain, Dupont Herbert, Dong Jiang Zhi, Adachi Javier, Mathewson Jhon, Verenicás Mangala, Rodrigues Savio and Steffen Robert. 2000. **Markers of enteric inflammation in Enteroaggregative *Escherichia coli* diarrhea in travelers.** Am. J. Tropical Medical Hyg. Vol. 62(6): 711-713.
- Bouzari, Jafari, Azizi, Oloomi and Nataro. 2001. **Short report: Characterization of Enteroaggregative *Escherichia coli* isolates from Iranian children.** Am. J. Trop. Med. Hyg.. Vol. 65(1): 13-14.
- Bouzari, Jafari and Zarepour. 2005. **Distribution of virulence related genes among enteroaggregative *Escherichia coli* isolates: using multiplex PCR and hybridization.** Infections, Genetics and evolution. Vol. 5: 79-83
- Cerna Jorge, Nataro James and Estrada-Garcia Teresa. 2003. **Multiplex PCR for Detection of three Plasmid-Borne Genes of Enteroaggregative *Escherichia coli* Strains.** Journal of Clinical Microbiology. Vol. 41(5): 2138-2140.
- Comité de Microbiología Clínica Sociedad Chilena de Insectología, Laboratorio de Referencia de Bacteriología, Instituto de Salud Pública, Instituto de Ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina, Universidad de Chile. 2002. **Síndrome diarreico agudo: Recomendaciones para el diagnóstico microbiológico.** Rev. Chilena de Infectología. Vol. 19(2).
- Czczulin John, Whittam Thomas, Henderson Ian, Navarro-Garcia Fernando and Nataro James. 1999. **Phylogenetic Analysis of Enteroaggregative and Diffusely Adherent *Escherichia coli*.** Infection and Immunity. Vol. 67(6): 2692-2699.
- Donnelly Meghan and Steiner Theodore. 2002. **Two Nonadjacent Regions in Enteroaggregative *Escherichia coli* Flagelin are Required for Activation of Toll-like Receptor 5.** The Journal of Biological Chemistry. Vol. 277(43): 40456-40461.

- Dutta Pinaki, Capello Renato, Navarro-Garcia Fernando and Nataro James. 2002. **Funcional Comparison of Serine Protease Autotransporters of *Enterobacteriaceae***. Infection and Immunity. Vol. 70(12): 7105-7113.
- Dutta Pinaki, Quan Sui Bao and Nataro James. 2003. **Structure-Function of the Enteroaggregative *Escherichia coli* Plasmid-encoded Toxin Autotransporter Using Scanning Linker Mutagenesis**. The Journal of Biological Chemistry. Vol. 278(41): 39912-39920.
- Elias Waldir, Czeizulin John R., Henderson Ian, Trtabulsi Luiz and Nataro James. 1999. **Organization of Biogenesis Genes for Aggregative Adherence Fimbriae II Defines Gene Cluster in Enteroaggregative *Escherichia coli***. Journal of Bacteriology. Vol. 181(6): 1779-1785.
- Encinas Ponce Ana. 2005. **Prevalencia y Caracterización molecular de cepas de Rotavirus en niños menores de 5 años, en las ciudades de la Paz y El Alto**. Tesis de Maestría. UMSA.
- Estrada García Teresa, Cerna Jorge, Paheco Gil Leova, Velázquez Raúl, Ochoa Theresa, Torres Javier and DuPont Herbert. 2005. **Drug-resistant Diarrheogenic *Escherichia coli*, Mexico**. Emerging Infections Diseases. Vol. 11(8).
- Field Michael. 2003. **Intestinal ion transport and pathophysiology of diarrhea**. J. Of Clinical Investigation. Vol. 111(7): 931-943.
- González Enrique y Curil Susana. 2002. **Diagnóstico y tratamiento de la diarrea persistente en un servicio de enfermedades diarreicas agudas**. MEDISAN. Vol. 6(2):42-49.
- Gozarten J. Meter and Townsend Jeffred. 2005. **Horizontal Genes Transfer Genome Innovations and Evolutions**. Nature Review. Vol. 3: 679-687.
- Khan Mohammed, Kang Jian and Steiner Theodore. 2004. **Enteroaggregative *Escherichia coli* flagelin-induced interleukin-8 secretion requires Toll-like receptor 5-dependent p38 MAP kinase activation**. Immunology. Vol. 112: 651-660.
- Harrington Susan, Strauman Maura, Abe Cecilia and Nataro James. 2005. **Aggregative adherence fimbriae contribute to the inflammatory response of epithelial cells infected with enteroaggregative *Escherichia coli***. Cellular Microbiology. Vol. 7(11): 1565-1578.
- Hecht Gail, Marrero Jorge A., Danilkovich Alexey, Markowskyj Kristina, Savkovic Suzanna, Koutsouris Athanasia and Benya Richard. 1999. **Pathogenic *Escherichia coli* increase Cl secretion from intestinal epithelia by upregulating galanin-1 receptor expression**. The Journal of Clinical Investigation. Vol 104(3): 253-262.
- Huang David, DuPont Herbert, Jiang Zhi-Dong, Carlin Lily and Okhuyesen Pablo. 2003. **Interleukin-8 Responses in an Intestinal HCT-8 Cell Line Infected with Enteroaggregative and Enterotoxigenic *Escherichia coli***. Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology. Vol. 11(3): 548-551.
- Huang David, Jiang Zhi-Dong and Dupont Herbert. 2003. **Association of virulence factor-positive and negative enteroaggregative *Escherichia coli* and occurrence of clinical illness in travelers from the United States to Mexico**. Am. J. Trop. Hyg. Vol. 69(5): 506-508.
- Huang David B., Okhuyesen Pablo C., Jiang Zhi-Dong and DuPont Herbert. 2004. **Enteroaggregative *Escherichia coli*: An Emerging Enteric Pathogen**. American Journal Gastroenterology. Vol. 10: 383-388.

- Hu Jing, Kan Biao, Liu Zhi-Huan and Yu Shou-Yi. 2005. Enteroaggregative *Escherichia coli* from Chinese diarrhea patients with high-pathogenicity island of *Yersenia* is involved in synthesis of siderophore yerseniabactin. R. World J. Gastroenterol. Vol. 11(37): 5816-5820.
- Ishiguro Fubito, Kyota Yoshito, Mochizuki Michio and Horikawa Takeo. 2005. **An Outbreak of diarrhea Caused by *Escherichia coli* Harboring a coding gene for Enteroaggregative *E. coli* Heat-Stable Enterotoxin I (*astA*) in Fukui Prefecture.** Jpn. J. Infect. Dis. Vol. 58.
- Jenkins Claire, van Ijperen Carola, Dudley Edward, Chart Henrik, Willshaw Geraldine, Cheasty tom, Smith Henry and Nataro James. 2005. **Use of a microarray to assess the distribution of plasmid and chromosomal virulence genes in strains of enteroaggregative *Escherichia coli*.** FEMS Microbiology Letters.
- Jiménez Baró L., Martínez-Férez y Boza. 2001. **Bioactive compounds derived from human milk.** Ars. Pharmaceutica. Vol. 42(1): 21-38.
- Kahali Soumen, Sarkar Bhaswati, Chakraborty Subhara, Macaden Ragini, Deokule, Ballal Mamatha, Nandy Ranjan, Bhattacharya, Takeda Yoshifumi and Ramamuthy. 2004. **Molecular epidemiology of Diarrhoeagenic *Escherichia coli* associated with sporadic cases and outbreaks of diarrhoea between 2000 and 2001 in India.** European Journal of Epidemiology. Vol. 19:473-479.
- Kahali Soumen, Sarkar Bhaswati, Rajendran, Yamasaki Shinji, Nandy Ranjan, Bhattacharya and Ramamurthy. 2004. **Virulence Characteristics and Molecular epidemiology of Enteroaggregative *Escherichia coli* Isolated from Hospitalized Diarrheal Patients in Kolkata, India.** Journal of Clinical Microbiology. Vol. 42(9): 4111-4120.
- Keskimäki Markku, Eklund Marjut, Pesonen Heidi, Heiskanen Tarla Siitonen Anja the Study Group. 2001. **EPEC, EAEC and STEC in stool specimens: Prevalence and molecular epidemiology of isolates.** Diagnostic Microbiology and Infections Disease. Vol.40(2): 151-156.
- Letters to the Editor. 2000. **Genetic Diversity within *Escherichia coli*.** Applied and Environmental Microbiology. Vol. 66(11): 5104-5105.
- Letters to the Editor. 2005. **Enteroaggregative *Escherichia coli* Diarrhea in Manipal.** Indian Pediatrics. Vol. 42: 722-723.
- López-Saucedo Catalina, Cerna Jorge, Villegas-Sepulveda Nicolas, Thompson Rocio, Velazquez Raul, Torres Javier, Tarr Phillip and Estrada-Garcia Teresa. 2003. **Single Multiplex Polymerase Chain Reaction to detect Diverse Loci Associated with Diarrheagenic *Escherichia coli*.** Emerging Infections Diseases. Vol.8: 427-431.
- Mamani Huarani Rosalia. 2005. ***Escherichia coli* Enterotoxigenica (ETEC): Características Patogénicas y Epidemiología.** Tesis de Maestría. UMSA.
- Mangia Regua A., Gomes T. A. T., Viera M. A. M., Andrade J., Irino K., and Teixeira L.. 2004. **Frecuency and characteristics of diarrhoeagenic and without diarrhoea in Rio de Janeiro, Brasil.** Journal of Infection. Vol. 48: 161-167.
- Manrique-Abril Fred G., Billon Y Tigne Diane, Bello Sandra E. and Ospina Juan M. 2006. **Diarrhoea-causing agents in children aged less than five in Tunja, Colombia.** Rev. salud pública. Vol. 8(1).
- Ménard Louis-Philippe, Lussier Jacques, Lépine Francois, Paiva de Sousa Cristina and Dubreuil Daniel. 2004. **Expression, purification, and biochemical characterization of aggregative**

- Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1.** Protein Expression and Purification. Vol. 33: 223-231.
- Mizel Steven B., Phillip West A. and Hantgan Roy R.. 2003. **Identification of Sequence in Human Toll-like Receptor 5 Required for the Binding of Gram-negative Flagellin.** The Journal of Biological Chemistry. Vol. 278 (26): 23624-23629.
 - Monteiro-Neto Valerio, Bando Silvia, Moreira-Filho Carlos and Girón Jorge. 2003. **Characterization o fan outer membrana protein associated with haemagglutination and adhesive properties of anteroaggregative *Escherichia coli* O111:H12.** Cellular Microbiology. Vol. 5(8): 533-547.
 - Moreira Cristiano G., Carneiro Sylvia M. Nataro James P., Trabulsi Luiz R., Elias Waldir P. 2003. **Role of type I Fimbriae in the aggregative adhesion pattern of enteroaggregative *Escherichia coli*.** FEMS Microbiology Letters. Vol. 226: 79-85.
 - Munson George, Holcomb Lisa and Scott June R.. 2001. **Novel grupo of Virulence Activators within the AraC Family That Are Not Restricted to Upstream Binding Sites.** Infections and Immunity. Vol. 69(1): 186-193.
 - Navarro-Garcia Fernando, Canizalez-Roman Adrian, Bao Quan Sui, Nataro James P. And Azamar Yenya. 2004. **The Serine Protease Motif of EspC from Enteropathogenic *Escherichia Coli* Epithelial Damage by a Mechanism Different from That of Pet Toxin from Enteroaggregative *E. Coli*.** American Society for Microbiology. Vol. 72(6): 3609-3621.
 - Navarro-Garcia Fernando, Eslava Carlos, Villaseca Jorge, Lopez-Revilla Ruben, Czeczulin John, Srinivas, Nataro James and Cravioto Alejandro. 1998. **In vitro Effects of a High-Moplecular-Weight Heat-Labile Enterotoxin from Enteroaggregative *Escherichia coli*.** Infection and Immunity. Vol. 66(7): 3149-3154.
 - Nataro James, Steiner Theodore and Guerrant Richard. 1998. **Enteroaggregative *Escherichia coli*.** Emerging Infectious Diseases. Vol. 4(2).
 - Nguyen Trung Vu, Le Van Phung, Chinh Le Huy and Weintraub Andrej. 2004. **Diarrhea Caused by Rotavirus in Children Less than 5 Years of Age in Hanoi, Vietnam.** Journal of Clinical Microbiology. Vol. 42(12): 5745-5750.
 - Nishi Junichiro, Sheikh Jalaluddin, Mizuguchi Kenji, Luisi ben, Burland Valerie, Boutin Adam, Rose Debra J., Blattner Frederick R. And Nataro Janes P.. 2003. **The Export of Coat Protein from Enteroaggregative *Escherichia coli* by a Specific ATP-binding Cassette Trransporter System.** The Journal of Biological Chemistry. Vol. 278(46):45680-45689.
 - Nishikawa Yoshikazu, Zhou Zhijiang, Hase Atsushi, Ogasawara Jun, Kitase Teruyo, Abe Niichiro, Nakamura Hiromi, Wada Takayuki, Ishii Eiji, Haruki Koseku and Surveillance Tean. 2002. **Diarrheagenic *Escherichia coli* Isolated from Stools of Sporadic Cases of Diarrheal Illnes in Osaka City, Japan between 1997 and 2000: Prevalence of Enteroaggregative *E. coli* Heat-Stable Enterotoxin 1 Gene-possessing *E. coli*.** Jpn. J. Infect. Vol. 55: 183-190.
 - Okeke Iruka N., Adebayo Lamikanra, Czeczulin John, Dubovsky Filip, Karper James B. And Nataro James P.. 2000. **Heterogeneous Virulence of Enteroaggregative *Escherichia coli* Strains Isolated from Children in Southwest Nigeria.** The Journal of Infections Diseases. Vol. 181: 252-260.

- Okeke Iruka, Scaletsky Isabel, Soars Elizabeth, Macfarlane Louissa and Torres Alfredo. 2004. **Molecular Epidemiology of the Iron Utilization Genes of Enteroaggregative *Escherichia coli***. Journal of Clinical Microbiology. Vol. 42(1): 36-44.
- Okeke Iruka N., Lamikanra Adebayo, Steinruck Hartmut and Kaper James B. 2000. **Characterization of *Escherichia coli* Strains from Cases of Childhood Diarrhea in Provincial Southwestern Nigeria**. Journal of Clinical Microbiology. Vol. 38(1):7-12.
- Okeke Iruka, Ojo Oladipupo, Lamikanra and Kaper James. 2003. **Etiology of Acute Diarrhea in Adults in Southwestern Nigeria**. Journal of Clinical Microbiology. Vol. 41(10): 4525-4530.
- Okeke Iruka and Nataro James. 2001. **Enteroaggregative *Escherichia coli***. The Lancet Infectious Diseases. Vol. 1: 304-312.
- Oelschlaeger Tobias A. and Hacker Jorg. 2004. **Impact of pathogenicity islands in bacterial diagnostics**. APMIS. Vol. 112: 930-936.
- Organización Panamericana de Salud. 2002. **Análisis Coyuntural de la Mortalidad en Bolivia**. Boletín Informativo. Vol. 23(2).
- Pabst Werner, Altwegg Martin, Kina Christian, Mirjanic Slavko, Hardegger Daniel and Nadal David. 2003. **Prevalence of Enteroaggregative *Escherichia coli* among Children with and without Diarrhea in Switzerland**. Journal of Clinical Microbiology. Vol. 41(6): 2289-2293.
- Parham Nick J., Srinivasan Usha, Desvaux Mickael, Foxman Betsy, Marrs Carl and Henderson Ian. 2004. **PicU, a second serine protease autotransporter of uropathogenic *Escherichia coli***. FEMS Microbiology Letters. Vol. 230: 73-83.
- Pérez Cristian, Herrera Marco, Moya Tatiana y Campos Marlen. 2003. **Análisis epidemiológico de los principales microorganismos aislados, de heces en el Hospital Nacional de Niños, Dr. Carlos Sáenz Herrera, Enero de 1995-abril de 2003**. Rev. Med. Hosp. Nac. (Cost Rica). Vol. 38 (1-2).
- Piva Iriane, Pereira Alex, Ferraz Lucia, Silva Rejane, Vieira Ataiza, Blanco Jesús, Blanco Miguel, Blanco Jorge and Giugliano Lorena. 2003. **Virulence Markers of Enteroaggregative *Escherichia coli* Isolated from Children and Adults With Diarrhea in Brasilia, Brasil**. Journal of Clinical Microbiology. Vol. 41(5): 1827-18332.
- Presterl Elisabeth, Zwick Ralph H., Reichmann Sonja, Aichelburg Alexander, Winkler Stefan, Kremsner Peter G. and Graninger Wolfgang. 2003. **Frequency and Virulence properties of Diarrheagenic *Escherichia coli* in Children with Diarrhea in Gabon**. Am. J. Trop. Med. Hyg.. Vol. 69(4): 406-410.
- Quan Sui Bao, Dutta Pinaki and Nataro James. 2003. **Intracellular Expresión of the Plasmad-Encoded Toxin from Enteroaggregative *Escherichia coli***. Infection and Immunity. Vol. 71(9): 5364-5370.
- Quiroga Marina, Oviedo Patricia, Chinen Isabel, Pegels Eduardo, Husulak Binztein, Rivas Marta, Schiavoni Lydia and Vergara Marta. 2000. **Asymtomatic infections by diarrheagenic *Escherichia coli* in children from misiones, Argentina, during the first twenty months if their lives**. Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo. Vol. 42(1): 9-15.
- Rappelli Paola, Folgosa Elena, Solinas Maria Letizia, Da Costa Joao Leopoldo, Pisanu Claudia, Sidat Moshin, Melo Josefa, Cappuccinelli Piero and Colombo Mauro Maria. 2005. **Pathogenic**

- enteric *Escherichia coli* in children with and without diarrhea in Maputo, Mozambique.** FEMS Immunology and Medical Microbiology. Vol. 43: 67–72.
- Ratchtrachenchai Orn-Anong, Subpasu Sarayoot, Tto Kenitiro. 2000. **Investigation on Enteroaggregative *Escherichia coli* Infection by Multiplex PCR.** Journal of Medical Microbiology.
 - Ratchtrachenchai Orn-Anong, Subpasu Sarayoot, Hayashi Hideo and Ba-Thein William. 2004. **Prevalence of childhood diarrhoea-associated *Escherichia coli* in Thailand.** Journal of Medical Microbiology. Vol. (53): 237–243.
 - Robins-Brown Roy M and Hartland Elizabeth L. 2002. Advances in Pediatric Gastroenterology and Hepatology: ***Escherichia coli* as a cause of diarrhea.** *Journal of Gastroenterology and Hepatology.* Vol. 17: 467-475.
 - Rodas Miranda Claudia. 2005. **Evaluación de la Multiresistencia Antimicrobiana en Enteropatógenos y *Escherichia coli* de flora normal en relación a la presencia y distribución de Integrones en niños menores de cinco años de edad en la ciudad de La Paz-Bolivia.** Tesis de Licenciatura. UMSA.
 - Rodríguez-Ángeles Guadalupe. 2002. **Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*.** Salud Pública Méx. Vol. 44:464-475.
 - Rodrigues J., V.C1, J.M.G. Candeias, Souza L.O. and Filho F.J.C. 2002. **Prevalence of diarrheogenic *Escherichia coli* and rotavirus among children from Botucatu, São Paulo State, Brazil.** Brazilian Journal of Medical and Biological Research. Brazilian Journal of Medical and Biological Research. Vol.35: 1311-1318.
 - Ruiz de Villa Martínez Yoycet, Guerrero Soler Cecilia, Medina Alí Frank E.y Álvarez Curtis José. 2004. **Diarrea persistente. Principales causas y factores asociados en nuestro medio.** Acta Pediatr Mex. Vol. 25(2):81-84.
 - Sanchez Ricardo, Echeverry Jairo y Pardo Rodrigo. 2004. **Perímetros Braquial y Cefálico como Indicadores de Pobreza y Enfermedad Diarréica Aguda en Niños Menores de 5 Años, en Bogotá.** Rev. Salud Publica. Vol. 6(2): 167-182.
 - Sanders John, Putnam Shannon, Gould Philip, Kolisnyk John, Merced Norma, Barthel Vincent, Rozmajzl Patrick, Shaheen Hind, Fouad Salwa and Frenck Robert. 2005. **Diarrheal Illness among deployed U.S. military personnel during operation Bright Star 2001-Egypt.** Diagnostic Microbiology and Infections Disease. Vol. 52: 85-90.
 - Sanchez Alarcon Samanta. 2002. **Caracterización Molecular del locus del Esfacelamiento del enterocito (LEE) *E. coli* Enteropatógena y Enterohemorrágica en niños con procesos diarreicos infecciosos en la ciudad de La Paz.** Tesis de Licenciatura. UMSA.
 - Sarantuya Jav, Nishi junichiro, Wakimoto Naoko, Erdene Shirchin, Nataro James, Sheikh Jalaluddin, Iwashita Mayumi, Manago Kunihiro, Tokuda Koichi, Yoshinaga Masao, Miyata Koichiro and Kawano Yoshifumi. 2004. **Typical Enteroaggregative *Escherichia coli* Is the Most Prevalent Pathotype among *E. coli* Strains Causing Diarrhea in Mongolian Children.** Journal of Clinical Microbiology. Vol. 42(1): 133-139.
 - Savarino Stephen, Fasano Alessio, Watson John, Martin Brian, Levine Myron, Guandalini Stefano and Guerry Patricia. 1993. **Enteroaggregative *Escherichia coli* Heat-stable**

- enterotoxin i represents another subfamily of *E. coli* heat-stable toxin.** Microbiology. Vol. 90: 3093-3097.
- Scaletsky Isabel C. A., Fabbriotti Sandra H., Aranda Katia R., Morais Mauro B. And Fagundes-Neto Ulysses. 2002. **Comparison of DNA Hybridization and PCR Assays for Detection of Putative Pathogenic Entero adherent *Escherichia coli*.** Journal of Clinical Microbiology. Vol. 40(4): 1254-1258.
 - Scaletsky Isabel, Fabbriotti Sandra, Carvalho Rozane, Nunes Claudia, Maranhao Helcio, Morais Mauro and Fagundes-Neto Ulysses. 2002. **Diffusely dherent *Escherichia coli* as a Cause of Acute Diarrhea in Young Children in Northeast Brazil:a Case-Control Study.** Journal of Microbiology. Vol. 40(2): 645-648.
 - Schembri Mark, Chritiansen Gunna and Klemm Per. 2001. **FimH-mediated autoaggregation of *Escherichia coli*.** Molecular Microbiology. Vol. 41(6): 1419-1430.
 - Shazberg Gila, Schmidt Herbert, Sechter Iancu, Gottesman Giora and Miron Dan. 2003. **Enteroaggregative *Escherichia coli* serotype O126:H27,Israel.** Emergign Infections Diseases. Vol. 9(9): 1170-1173.
 - Sherman Philip M and Tarr Phillip I. 2005. **Confirmation of an Old adage: you find what you seek.** J Pediatric. Vol.146:11-3.
 - Sheikh Jalaluddin, Czeczulin John R., Harrington Susan, Hicks Susan, Henderson Ian R., Bouguéneq Chantal Le, Gounon Pierre, Phillips Alan and Nataro Janes. 2002. **A novel dispersin protein in Enteroaggregative *Escherichia coli*.** Journal Clin. Invest.. Vol. 110:1329-1337.
 - Schmidt Herbert and Hensel Michael. 2004. **Pathogenicity Islands in Bacterial Pathogenesis.** Clinical Microbiology Reviews. Vol. 17(1): 14–56.
 - Sierra Pedro. **Actualización del control de enfermedades diarreica aguda en pediatría, prevención, diagnostico y tratamiento.** Hosp. De la Misericordia. En: <http://www.encolombia.com/vol33n3-pediatria-actualizacion2.htm>.
 - Stuart C. Clarke. 2001. **Diarrhoeogenic *Escherichia coli* an emergimg problem?.** Diagnostic Microbiology and Infectious Disease. Vol. 41: 93-98.
 - Sousa C. P. 2003. **EAST1 toxin and its presence in a changing microbial world.** J. Venom.Anim. incl. Trop. Dis.. Vol. 9(1).
 - Sutjita Made, Bouckenoghe Alain, Adachi Javier, Dong Jiang Zhi, Mathewson John, Ericsson Charles and DuPont Herbert. 2000. **Intestinal secretory Inmunoglobulin A Response to Enteroaggregative *Escherichia coli* in Travels with Diarrhea.** Clinical and Diagnostic Laboratory Inmunology. Vol. 7(3): 501-503.
 - Suzart Sergio, Guth Beatriz, Pedroso Margareth, Okafor Udenma and Gomes Tania. 2001. **Diversity of surface structures and virulence genetic markers among enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC) strains with and without the EAEC DNA probe sequence.** FEMS Microbiology Letters Vol. 201: 163-168.
 - Teng Lee-Jene, Hsuch Po-Ren, Liaw Shwu-Jen, Ho Shen-Wu and Tsai Jui-Chang. 2004. **Genetic detection of diarrheagenic *Escherichia coli* isolated from children with sporadic diarrhea.** J. Microbiol Inmunol Infect. Vol. 37: 327-334.
 - Tsai Cheng-hih, Chen Shu-Yu and Tsen Hau-Yang. 2003. **Screening the enteroaggregative *Escherichia coli* activity and detection ef the aggA, aafA and astA genes with novel PCR**

- primers for the *Escherichia coli* isolated from diarrhea cases in Taiwan. Bacteriology. Vol. 46: 159-165.
- Toma Claudia, Lu Yan, Higa Naomi, Nakasone Noboru, Chinen Isabel, Baschkier Ariela, Rivas Marta and Iwanaga Masaaki. 2003. **Multiplex PCR Assay for Identification of Human Diarrheogenic *Escherichia coli***. Journal of Microbiology. Vol. 41(6): 2669-2671.
 - TorresLafredo G., Xin Zhou and Kaper James B. 2005. **Adherence of Diarrheogenic *Escherichia coli* strains to Epithelial Cells**. Infection and Inmunit. Vol. (6): 18-29.
 - Torres Rita, Torres Lam, Raúl León Barúa, Roberto Berendson Seminario, Walter Curioso Vílchez, Eduardo Roe Battistini, Max Biber Poillevard. 2003. **Sobre crecimiento Bacteriano en el Intestino Delgado en pacientes con Diarrea Crónica y Sujetos Control**. REV. Gastroenterol. Vol. 23: 111-114.
 - Uzzua Sergio Fassano Alessio. 2000. **Cross-Talk between enteric pathogenic and the intestine**. Cellular Microbiology. Vol. 2 (2): 83-89.
 - Villaseca Hernández, Sainz-Espuñes, Rosario C. and Eslava. 2005. **Enteroaggregative *Escherichia coli* an emergent pathogen with different virulence properties**. Rev. Latinoamericana de Microbiología. Vol. 47 (3-4): 140 - 159.
 - Waldir P. Elias, Samar F. Barros, Moreira Cristiano G. Trabulsi Luis R. 2002. **Enteroaggregative *Escherichia coli* Strains among Classical Enteropathogenic *Escherichia coli* O Serogroups**. Journal of Clinical Microbiology. 3540-3541.
 - Wakimoto Naoko, Nishi Junichiro, Sheikh Jalaluddin, Nataro James, Sarantuya Jav, Iwashita Mayumi, Manago Kunihiro, Tokuda Koichi, Yoshinaga Masao and Kawano Yoshifumi. 2004. **Quantitative biofilm assay using a microtiter plate to screen for Enteroaggregative *Escherichia coli***. Am. J. Trop. Med. Hyg. Vol. 71(5): 687-690.
 - Wilson A., Evans, Chart H., Cheasty T., Wheeler J.G., Tompkins D. and Smith. 2001. **Characterization of strains of Enteroaggregative *Escherichia coli* isolated during the infections intestinal disease study in England**. European Journal of Epidemiology. Vol. 17: 1125-1130.
 - Wilson J.M., Schurr M. J., LeBlanc C. L., Ramamurthy R., Buchanan K. L. and Nickerson C. A.. 2002. **Mechanisms of bacterial pathogenicity**. Postgrad Med. Vol. 78: 216-224.
 - Yatsuyanagi Jun, Salto Shioko, Sato Hiriyasu, Miyajima Yashimichi, amano Ken-Ichi and Enomoto Katsuhiko. 2002. **Characterization of Enteropathogenic and Enteroaggregative *Escherichia coli* Isolated from Diarrheal Outbreaks**. Journal of Clinical Microbiology. Vol. 40(1): 294-297.
 - Yatsuyanagi Jun, Saito Shioko, Miyajima Yoshimichi, amano Ken-Ichi and Enomoto Katsuhiko. 2003. **Characterization of Atypical Enteropathogenic *Escherichia coli* Starins Harboring the *astA* Gene That Were associated with a Waterborne outbreak of Diarrhea in Japan**. Vol. 41(5): 2033-2039.
 - Young Moon Ji, Hopng Park Jae, Bu Kim Yung. 2005. **Molecular epidemiological characteritics of virulence factors on enteroaggregative *E. coli***. FEMS Microbiology Letters. Vol. 253: 215-220.
 - Youssef Mohammad, Shurman Abdallah, Bougnoux Marie-Elisabeth, Rawashdeh Mohammad, Bretagne Stephane, Strockbine Nancy.2000. **Bacterial, viral and parasitic enteric pathogens**

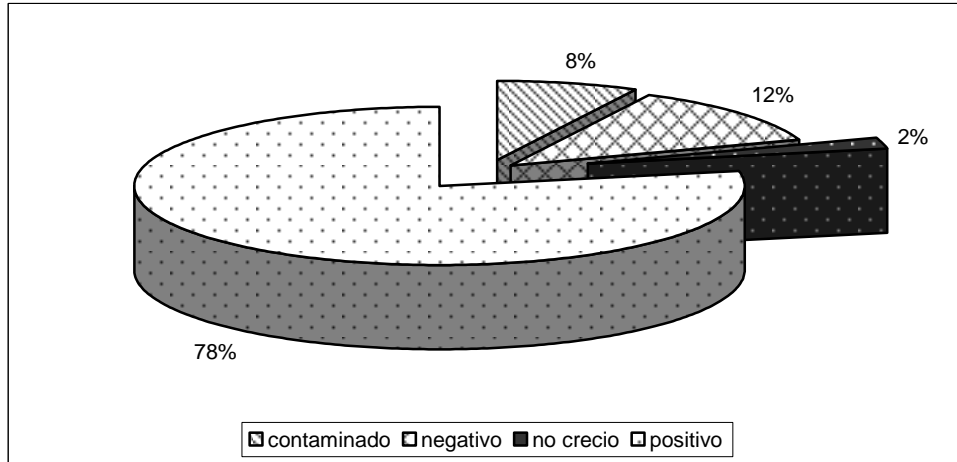
- associated with acute diarrhea in hospitalized children from northern Jordan.** FEMS Immunology and Medical Microbiology. Vol. 28: 257-263.
- Zamboni Andresa, Fabbricotti Sandra H., Fagundes-Neto Ulysses and Scaletsky Isabel C. A. 2004. **Enteroaggregative *Escherichia coli* Virulence Factors Are Found To Be Associated with Infantile Diarrhea in Brazil.** Journal of Clinical Microbiology. Vol. 42(3):1058–1063.
 - Zhi-Dong Jiang, Greenberg David, Nataro James P., Steffen Robert and DuPont Herbert. 2002. **Rate of Occurrence and Pathogenic Effect of Enteroaggregative *Escherichia coli* Virulence Factors in International Travelers.** Journal of Clinical Microbiology. Vol. 40(11): 4185-419

11.

ANEXOS

ANEXO 1.

FIGURA 24.- Características de las muestras recolectadas durante el tiempo en estudio



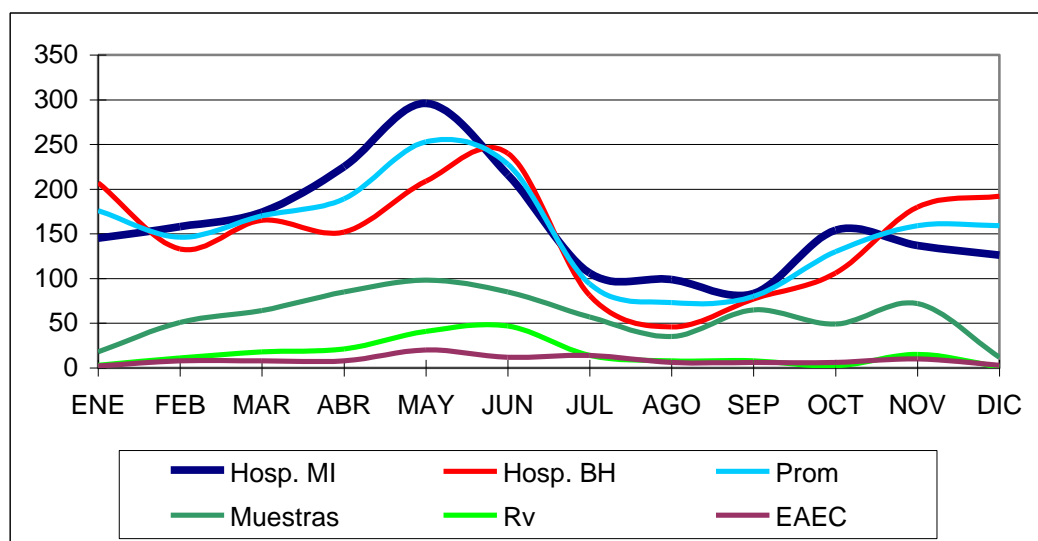
En la presente gráfica se observa las características de todas las muestras analizadas, de las 691 muestras recolectadas se observa que el 78% de las mismas presentaban características propias de *E. coli* (lactosa positivas; lac +) y fueron analizadas para la determinación de EAEC, un 12% presentaban contaminación en el medio de crecimiento (lac +/lac -), 8% no fermentaban lactosa (lac -) y en el 2% de los casos no hubo desarrollo de crecimiento.

ANEXO 2.

TABLA 17.- Distribución de las EDA y las muestras analizadas a lo largo del estudio del Hospital Boliviano Holandés y Materno Infantil Enero a Febrero. 2004

MESES	Hosp. MI	Hosp. BH	Promedio	Muestras	Rotavirus	EAEC
ENE	145	207	176	18	3	2
FEB	158	133	146	51	11	8
MAR	174	165	170	64	18	8
ABR	225	152	189	85	21	8
MAY	296	209	253	98	41	20
JUN	216	240	228	85	47	12
JUL	106	81	94	57	14	14
AGO	99	46	73	35	8	6
SEP	83	77	80	65	8	6
OCT	154	106	130	49	2	6
NOV	137	180	159	72	15	10
DIC	126	192	159	12	1	3
TOTAL	1919	1788	1854	691	189	103

FIGURA 25.- Distribución de la muestras analizadas a lo largo del estudio. Enero a diciembre 2004.



ANEXO 3.

TABLA 18.- Características genóticas y susceptibilidad antimicrobiana de las 103 muestras aisladas durante el tiempo de estudio.

Nº	NºIBMB	GENOTIPOS							ANTIBIOTIPOS						
		<i>astA</i>	<i>aggR</i>	<i>aggA</i>	<i>aafA</i>	<i>pet</i>	<i>pic</i>	<i>irp</i>	TET	NAL	TMS	ERY	FOX	CMP	AM
1	34	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	1	0
2	594	1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0
3	494	1	1	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0
4	120	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	1	1
5	684	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0
6	430	1	1	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	0
7	398	1	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	0	0	1
8	337	1	0	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0	1	0
9	254	1	1	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	0
10	673	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1
11	464	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0
12	588	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1
13	330	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1	0
14	246	1	1	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	1	1
15	101	1	1	1	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	1
16	642	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1
17	641	1	1	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	0
18	657	1	1	0	0	0	1	1	1	0	1	1	0	1	1
19	265	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	0
20	145	1	1	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	0	1
21	462	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1
22	650	1	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1
23	388	1	1	0	0	1	1	1	0	0	1	0	1	0	1
24	454	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1
25	95	1	1	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1
26	460	1	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	0	0	1
27	644	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0
28	16	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	1	1

29	413	1	1	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	0	0
30	385	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0
31	218	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0
32	202	1	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1
33	435	1	1	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1
34	432	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0
35	450	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1
36	215	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0
37	591	1	1	1	0	0	0	1	1	0	1	1	0	1	0
38	230	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	0	0	1
39	38	1	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	1
40	30	1	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0
41	618	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1
42	195	1	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0
43	589	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	1	1	1
44	438	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1
45	82	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0
46	61	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1
47	240	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	1	1
48	160	1	1	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0
49	275	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1
50	441	1	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1
51	150	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1
52	71	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
53	517	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0
54	307	1	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0
55	540	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0
56	628	1	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	0	0	1
57	582	1	0	1	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0
58	542	1	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1
59	607	1	1	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	1	1
60	625	1	1	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	0	1
61	171	1	1	0	0	0	1	0	1	0	1	1	0	0	1
62	10	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1
63	289	1	1	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	1

64	549	1	1	0	0	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1
65	279	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0
66	598	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	1	1
67	50	1	1	0	0	1	0	1	1	0	1	1	0	0	1
68	618	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1
69	291	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	1	0
70	537	1	0	0	1	1	0	0	1	0	1	1	0	1	1
71	295	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0	1	0
72	294	1	1	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0
73	347	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0
74	264	1	1	1	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1
75	368	1	0	0	1	0	0	0	1	0	1	1	0	0	1
76	272	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1
77	270	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0
78	260	1	1	1	0	0	1	0	1	0	1	1	0	0	1
79	231	1	1	1	0	1	0	1	1	0	1	1	1	0	1
80	281	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0
81	233	1	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1
82	51	0	1	1	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1
83	300	1	1	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	1	1
84	393	1	1	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	1
85	56	1	1	1	0	0	0	1	1	0	1	1	0	1	1
86	395	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	0	1	1
87	262	0	1	1	1	0	1	1	0	0	0	1	1	0	1
88	374	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	1
89	100	1	1	1	0	1	0	0	1	0	1	1	0	0	1
90	118	1	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	0	1	1
91	151	1	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1
92	321	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	0	1	1
93	643	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1
94	213	1	0	0	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1
95	561	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	1
96	420	1	1	0	0	1	0	0	1	0	1	1	0	1	1
97	421	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	1	1
98	408	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1

99	431	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	1
100	62	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	1
101	20	1	1	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	1
102	360	1	1	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	1
103	709	1	1	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	0	1

1/ **1** PRESENCIA / RESISTENCIA

0/ **0** AUSENCIA / SENSIBLE

ANEXO 4.

TABLA 19.- Relación de los genes analizados en este estudio y los antibiótipos encontrados en el presente estudio.

GENOTIPOS	ANTIBIOTIPOS							N°
<i>astA, aggR, irp, aggA, aafA, pic</i>	TMS	AM	ERY	TET	CMP		NAL	1
	TMS		ERY	TET	CMP			1
<i>astA, aggR, irp, aggA, aafA, pet</i>	TMS	AM		TET	CMP	FOX		1
<i>astA, aggR, irp, aggA, aafA</i>		AM	ERY		CMP			1
	TMS	AM	ERY	TET				1
	TMS		ERY	TET	CMP		NAL	1
	TMS							1
	TMS	AM	ERY	TET	CMP			1
<i>aggR, irp, aggA, aafA, pic</i>		AM	ERY				FOX	1
<i>astA, aggR, irp, aggA, pic</i>				TET	CMP			1
			ERY					1
	TMS	AM	ERY					1
	TMS	AM	ERY	TET	CMP			1
<i>astA, aggR, irp, aggA, pet</i>	TMS	AM	ERY	TET			FOX	1
		AM						1
<i>astA, aggR, irp, aafA, pic</i>	TMS	AM	ERY	TET				1
	TMS	AM	ERY	TET	CMP			1
<i>astA, aggR, irp, pet, pic</i>	TMS	AM	ERY	TET			FOX	1
	TMS						FOX	1
	TMS	AM	ERY	TET	CMP		NAL	1
			ERY					1
<i>astA, aafA, pet, pic, irp</i>	TMS	AM	ERY	TET	CMP		NAL	1
		AM	ERY	TET	CMP	FOX	NAL	1
<i>astA, aggR, aggA, pet</i>				TET	CMP			1
	TMS	AM	ERY	TET				1
<i>astA, aggR, aggA, pic</i>	TMS	AM	ERY	TET				1
<i>astA, aggR, irp, aggA</i>			ERY	TET	CMP			1
	TMS	AM		TET				1

	TMS	AM	ERY	TET	CMP		1
	TMS	AM	ERY	TET		NAL	1
	TMS	AM			CMP		1
	TMS		ERY	TET	CMP		1
	TMS						1
<i>astA, aggR, irp, aafA</i>	TMS	AM					1
	TMS	AM	ERY	TET			1
	TMS	AM	ERY		CMP		1
<i>astA, aggR, irp, pic</i>	TMS		ERY				3
	TMS	AM	ERY	TET	CMP		1
				TET	CMP	FOX	1
<i>astA, aggR, irp, pet</i>		AM	ERY		CMP		1
	TMS	AM		TET		FOX NAL	1
	TMS		ERY				1
		AM			CMP		1
	TMS	AM	ERY	TET	CMP		1
	TMS	AM	ERY	TET			1
<i>astA, aggR, aafA, pet</i>				TET	CMP		1
<i>astA, aggA, pet, irp</i>	TMS						2
<i>astA, aafA, pic, irp</i>				TET	CMP		1
<i>astA, aafA, pet, irp</i>	TMS	AM					1
<i>astA, pet, pic, irp</i>	TMS	AM	ERY	TET			1
<i>astA, aggR, aggA</i>		AM	ERY				1
<i>aggR, aggA, pet</i>	TMS	AM	ERY				1
<i>astA, aggR, pic</i>	TMS	AM	ERY	TET			1
<i>astA, aggR, pet</i>	TMS	AM					2
	TMS	AM	ERY	TET	CMP		1
<i>astA, aggR, irp</i>	TMS		ERY		CMP		1
	TMS						6
			ERY				1
	TMS	AM		TET	CMP	NAL	2
	TMS	AM	ERY	TET			2

		AM			CMP		1	
		TMS	AM				2	
		TMS	AM		TET	CMP	FOX	1
		TMS	AM		TET	CMP		1
		TMS	AM	ERY				1
<i>astA, aggA, irp</i>	TMS							1
	TMS		ERY					1
<i>astA, aafA, pet</i>	TMS	AM	ERY	TET	CMP			1
<i>astA, pet, irp</i>	TMS							1
	TMS	AM						1
<i>astA, pic, irp</i>			ERY					1
	TMS	AM	ERY	TET		NAL		1
<i>astA, aggR</i>	TMS	AM		TET	CMP	NAL		2
	TMS	AM	ERY	TET				2
<i>astA, aggA</i>	TMS		ERY					1
<i>astA, aafA</i>	TMS	AM	ERY	TET				1
<i>astA, pet</i>	TMS	AM	ERY					1
	TMS	AM	ERY	TET	CMP	NAL		1
<i>astA, irp</i>	TMS	AM	ERY	TET	CMP			4
	TMS		ERY					2
	TMS							1
	TMS	AM	ERY					2
<i>astA</i>		AM	ERY					1
		AM						1

**UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACEUTICAS Y BIOQUÍMICAS
CARRERA DE BIOQUIMICA
INSTITUTO DE BIOLOGIA MOLECULAR Y BIOTECNOLOGÍA**



**“CARACTERIZACIÓN Y EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DE
LAS INFECCIONES POR *Escherichia coli*
ENTEROAGREGATIVA (EAEC) EN NIÑOS MENORES A
CINCO AÑOS DE EDAD CON PROCESOS DIARREICOS EN
LA CIUDAD DE LA PAZ-EL ALTO. 2004”**

**ELABORADO POR:
Oscar V. Condori Alegria
TUTOR:
Volga Iñiguez Rojas P.H.D.**

INTRODUCCIÓN

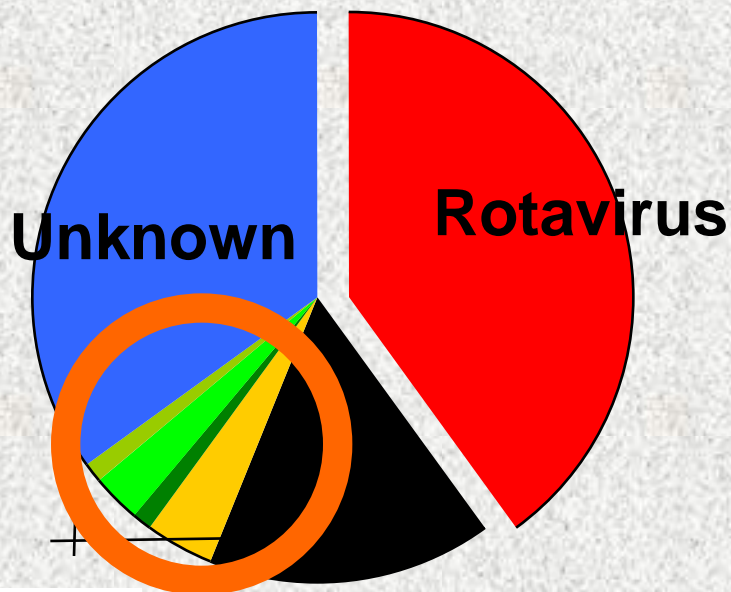
- ✱ En Bolivia niños la tasa de mortalidad es de 72 por cada mil nacidos vivos en <5 años de edad, el 36% es por infecciones gastrointestinales (OPS. 2002).
 - ✱ Los principales agentes de las EDA son los virus (rotavirus) y enterobacterias (*Escherichia coli* diarreogénica).
-

INTRODUCCIÓN

- ✱ En niños <5 años de edad con EDA en Jordania se encontró Rotavirus 32% y enterobacterias 30.6% (DEC 17.4%) (Youssef et al. 2000)
 - ✱ En niños <5 años de edad con EDA en Colombia se encontró Rotavirus 42% y enterobacterias 17.5% (DEC 13.9%) (Manrique et al. 2006)
-

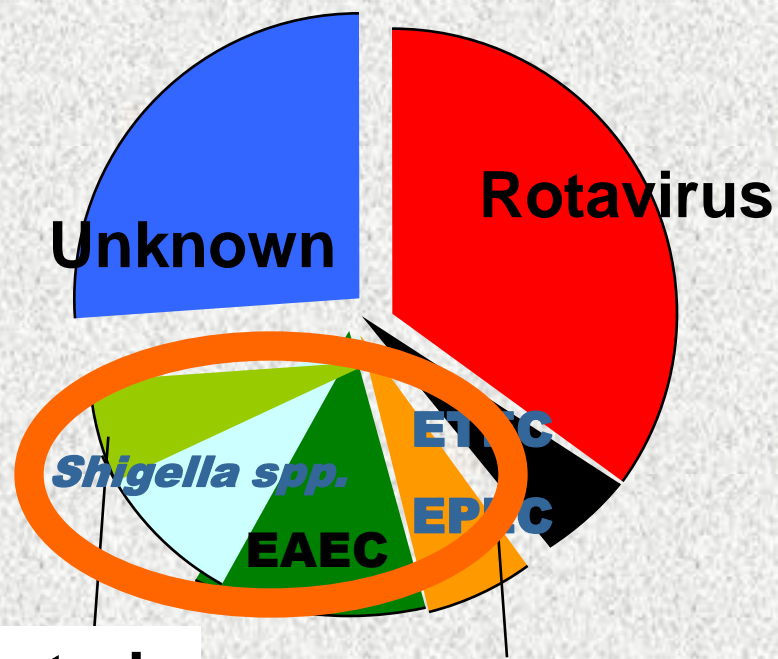
Etiología de las infecciones diarreicas en niños menores de 5 años de edad.

* Países desarrollados



Bacteria

* IBMB, Bolivia-UMSA



Bacteria

Patógenos más frecuentes que provocan infecciones diarreicas en niños menores de 5 años de edad.

MICROORGANISMOS

Virus:

- Rotavirus
- Adenovirus
- Calcivirus
- Astrovirus

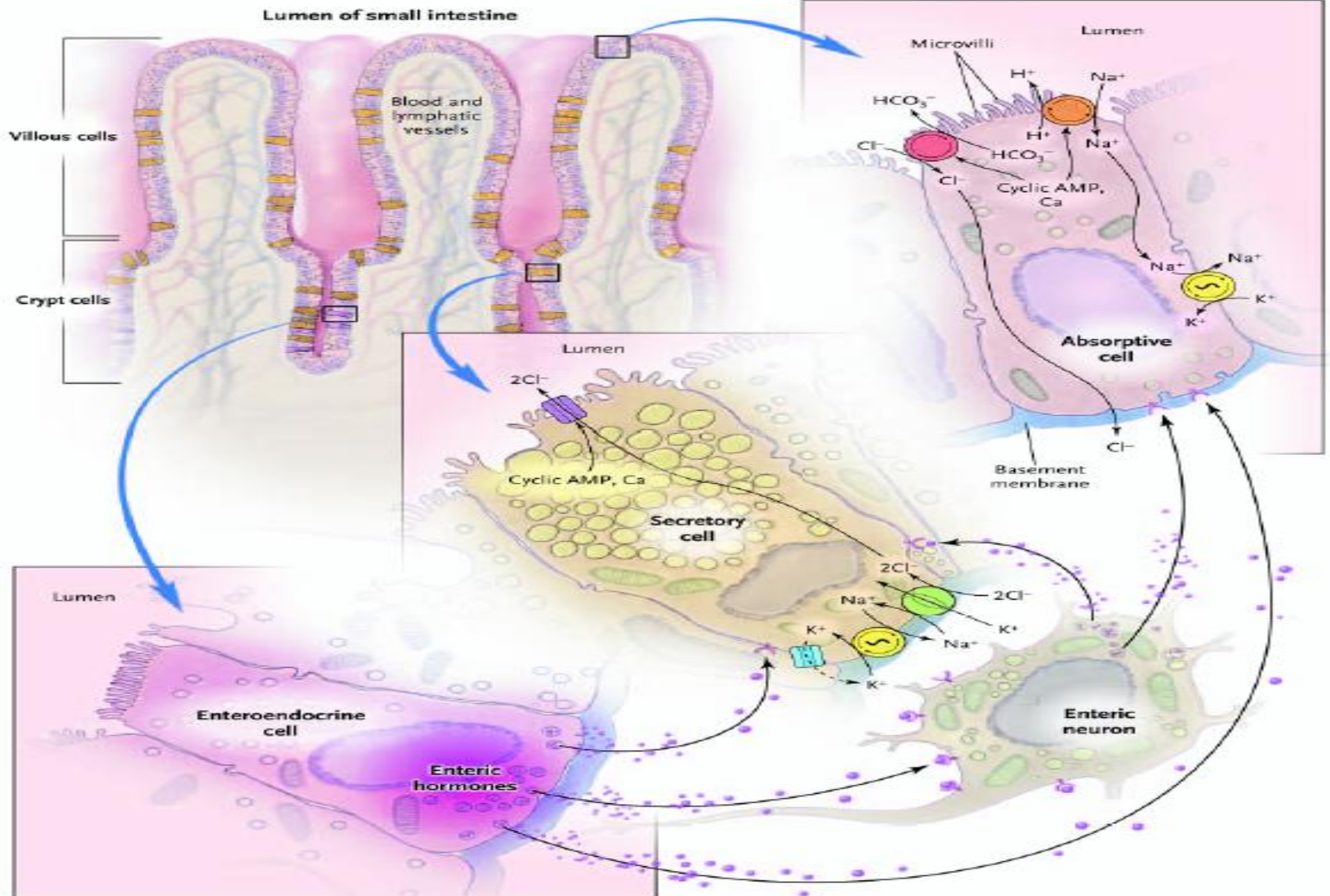
Bacterias:

- *E. coli* Diarreogénica (EAEC, ETEC, EPEC, EHEC, EIEC, DAEC)
- *Shigella spp*
- *Salmonella spp*
- *C. jejuni coli*
- *V. cholerae*
- *Y. enterocolitica*

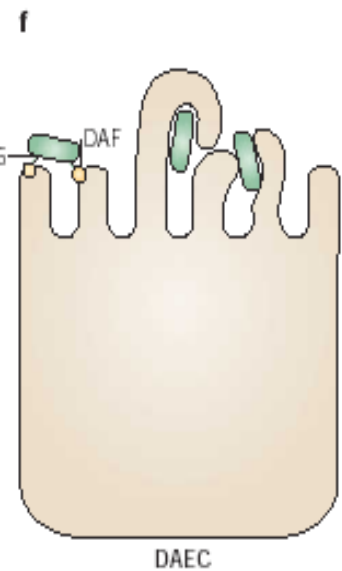
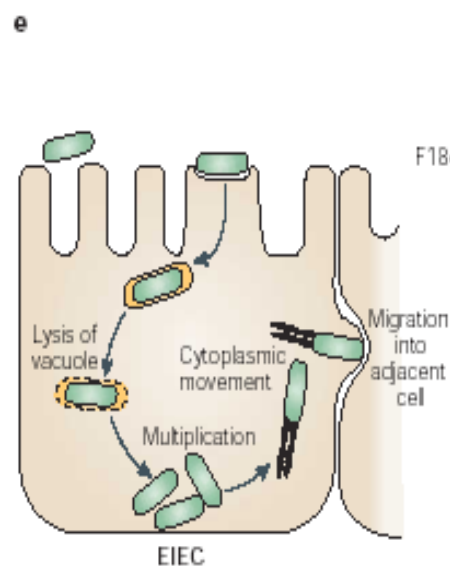
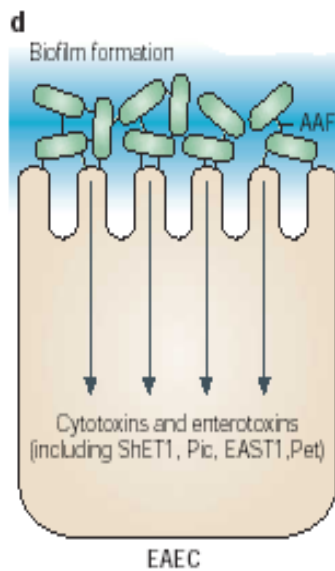
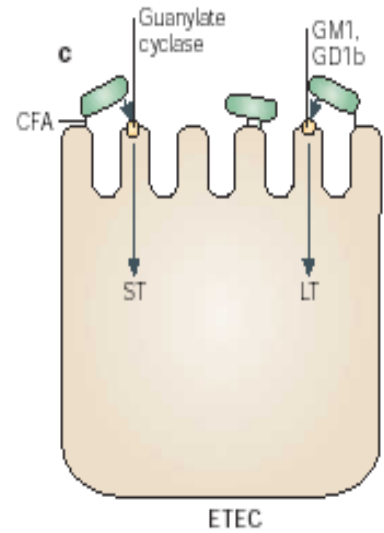
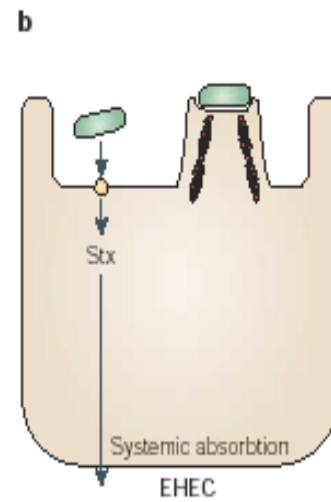
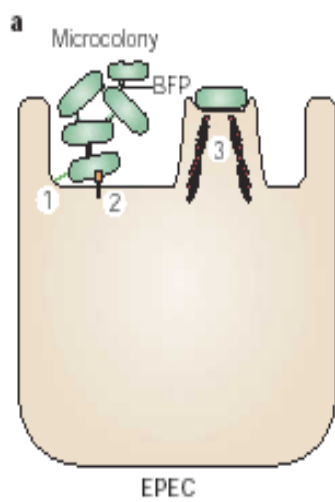
Parasitos:

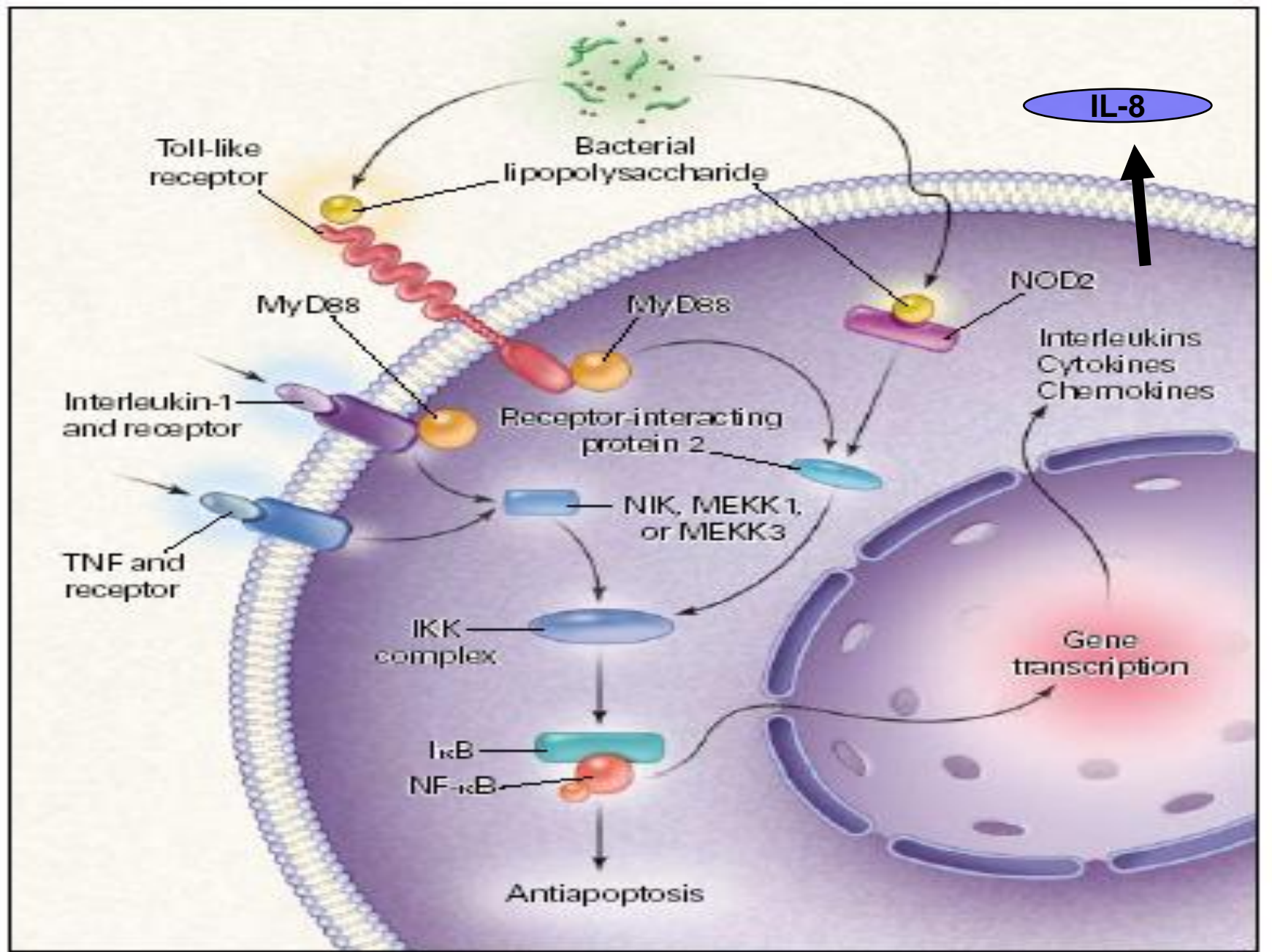
- *G. lamblia*
- *Microsporidia*
- *E. histolitica*
- *Crystosporidium spp*

Enfermedades Diarreicas Agudas



Bacteria

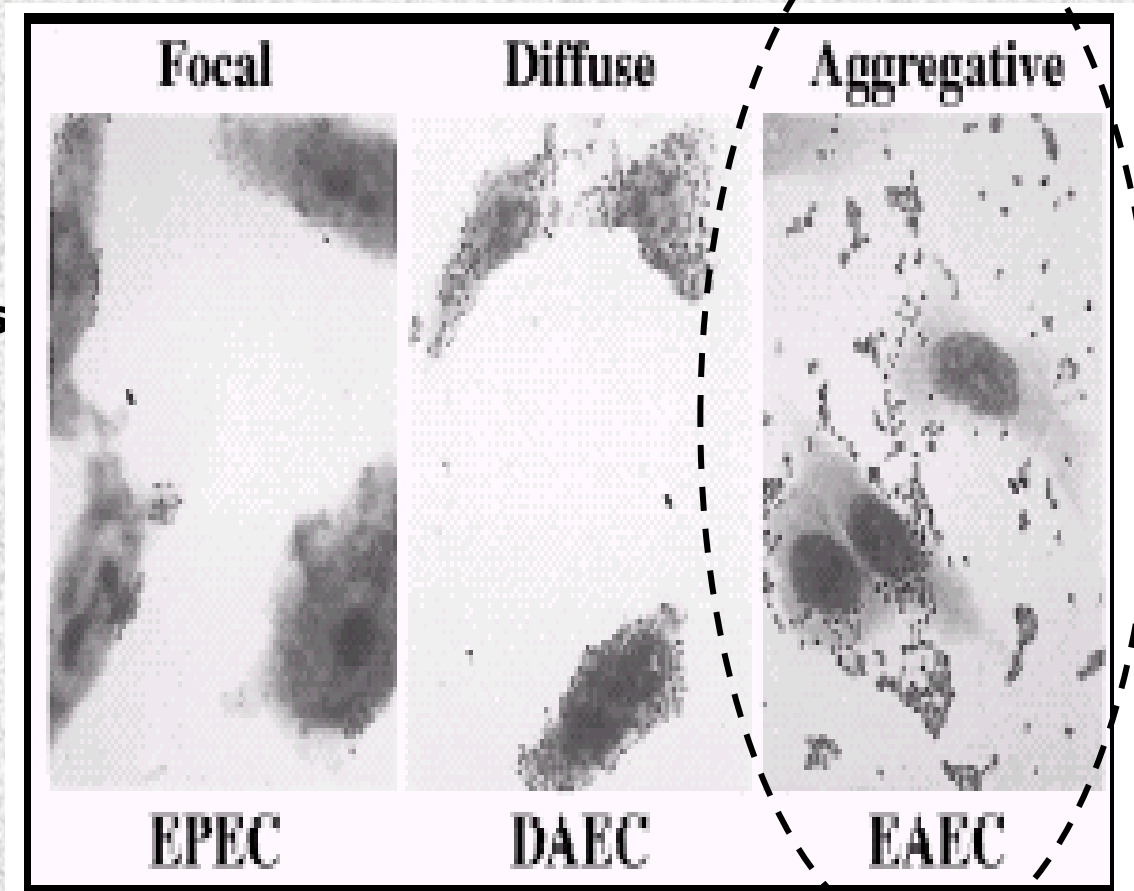




***Escherichia coli* Enteroagregativa (EAEC)**

- * **Cravioto 1979.**
- * **Nataro 1998.**
- * **Ladrillos apilados
(stacked-brick),
HEp-2.**

(Mohamend et al. 2002)



EPIDEMIOLOGIA

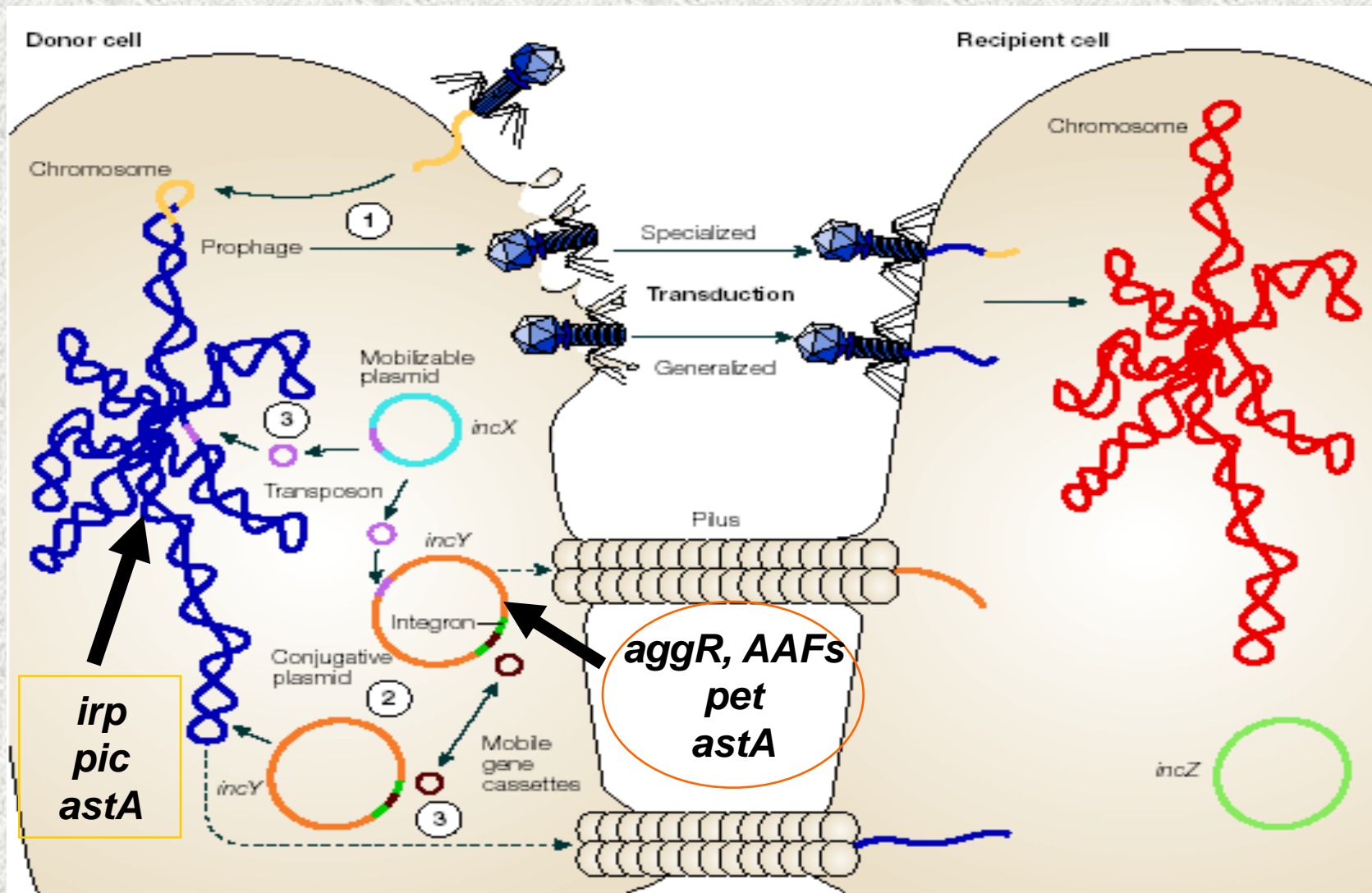
E. coli Enteroagregativa (EAEC):

- * En niños menores a 5 años de edad en frecuencia de 8-32% en países en desarrollo (Huang et al. 2004).
 - * Brasil en niños <3 años 14.6% (Mangia et al. 2004), Jordania en niños <5 años 10.2% (Youssef et al. 2002), Inglaterra (5.1%), Alemania (2%) en niños <5 años (Okeke et al. 2001).
 - * En México niños <2 años 51%, en Brasil niños <5 años 20% (Villaseca et al. 2005) asociado a DP.
 - * Relacionado también con la diarrea del viajero.
-

EPIDEMIOLOGIA

- * Dosis oral de infección 10^{10} UFC.
 - * Transmisión fecal-oral.
 - * Factores de riesgo:
 - * Falta de higiene
 - * Contaminación de alimentos y agua
 - * Pacientes con inmunodeficiencias(Okeke et al. 2001; Huang et al. 2004)
 - * Diarrea acuosa mucoide, con/sin sangre, dolor abdominal, náuseas, vómitos y bajo grado de fiebre. (Huang et al. 2004)
-

GENES DE PATOGENICIDAD

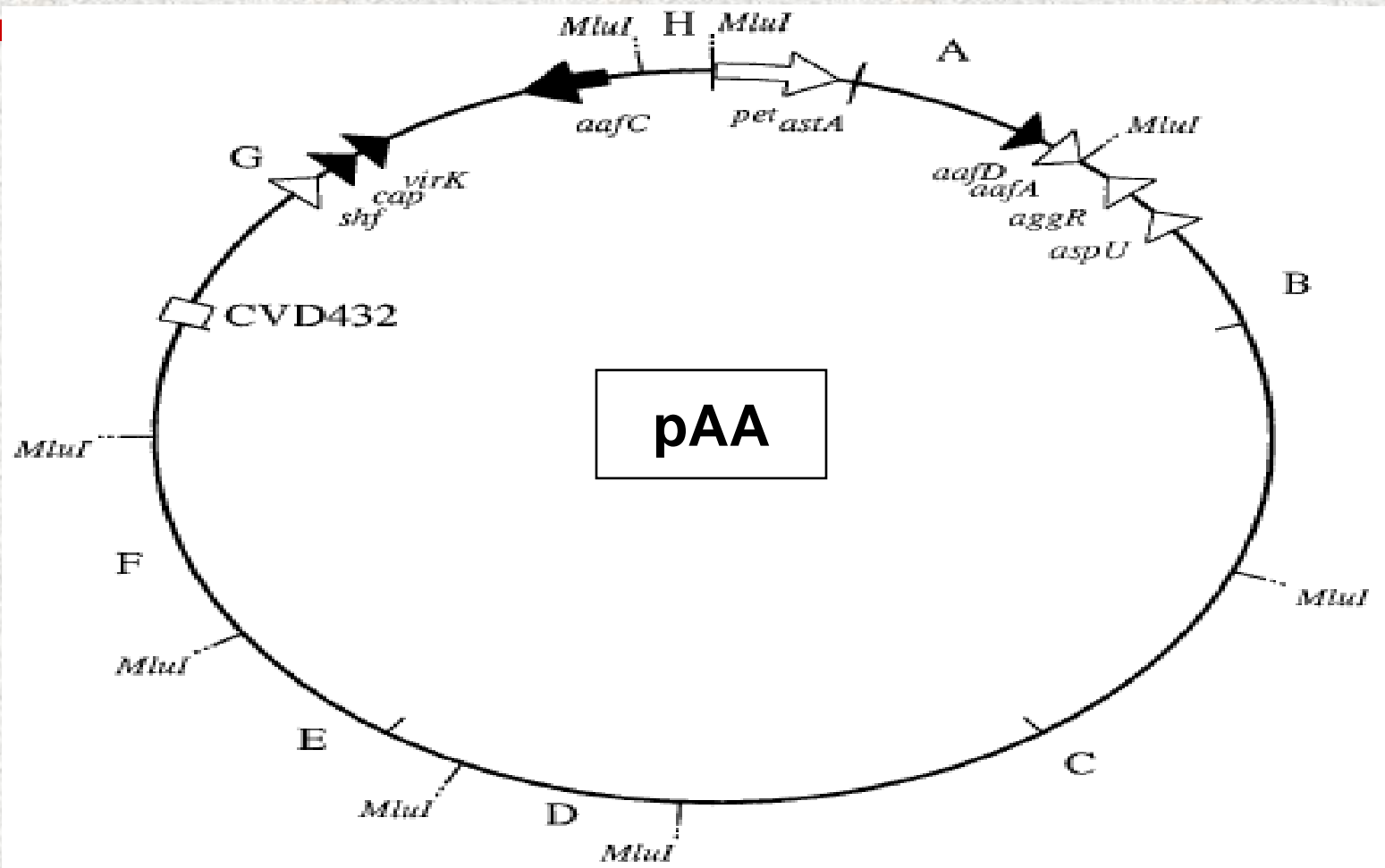


GENES DE PATOGENICIDAD

- ✳ La adquisición de Islas de Patogenicidad de *Yersinia* a *E. coli* resulta la toxina ***Yerseniabactin*** (Hu et al . 2005).

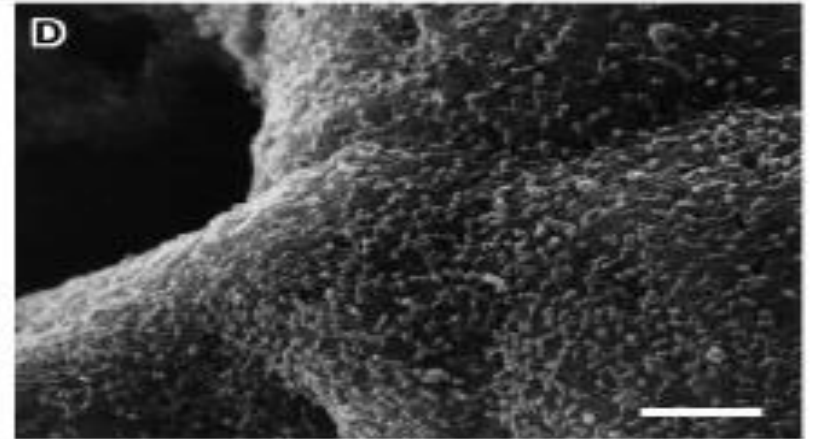
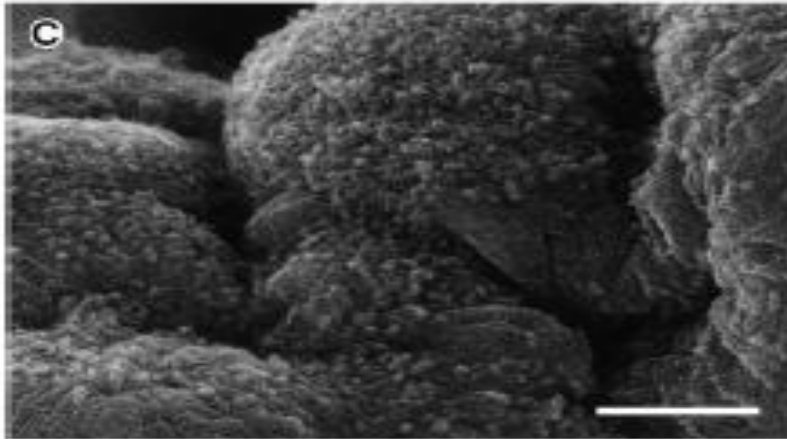
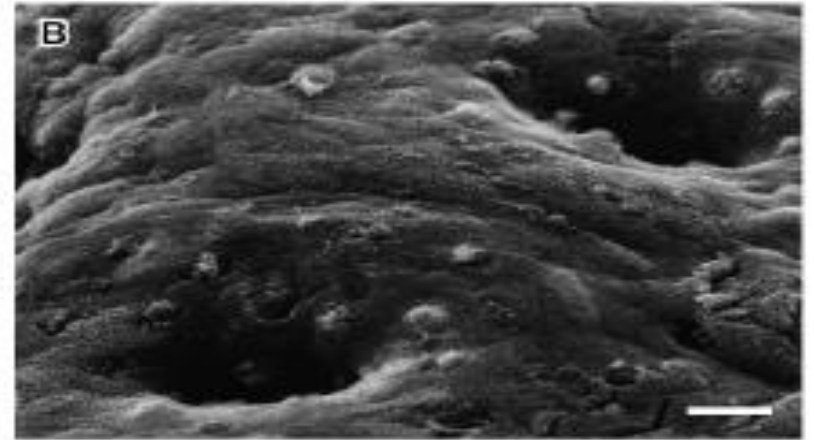
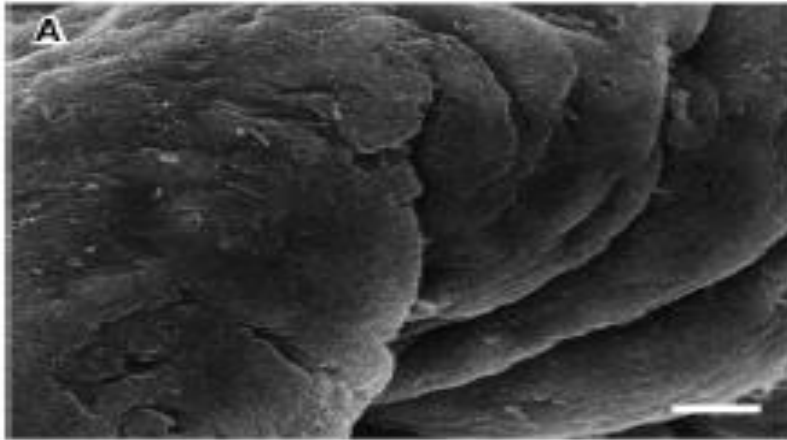


GENES DE PATOGENICIDAD



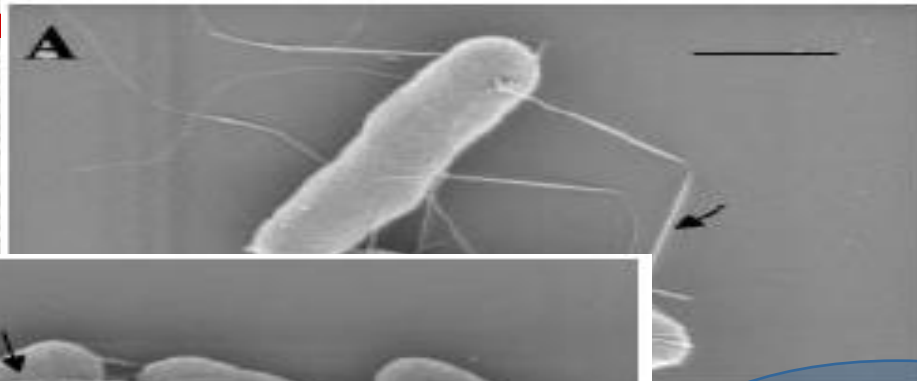
(Czeczulin, et al. 1999; Elias et al. 1999)

a. Adhesión.

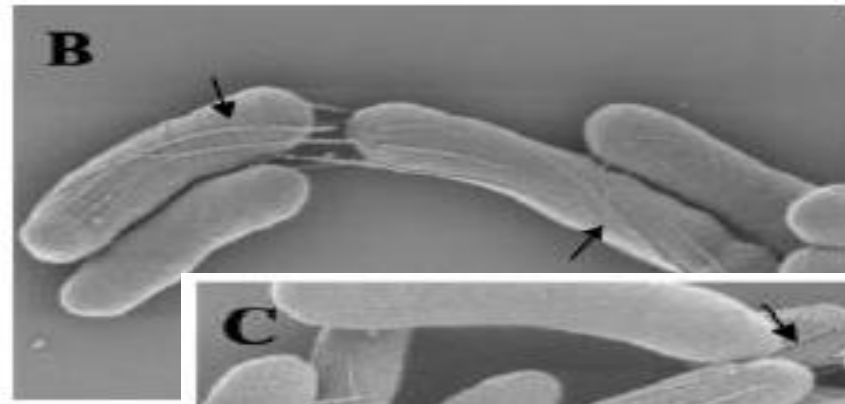


(Monteiro et al. 2003)

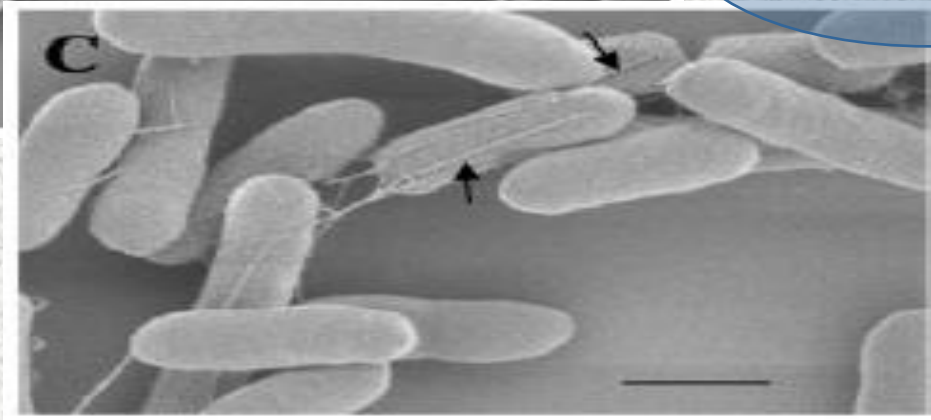
a. Adhesión.



AAF I (*aggA*),
AAF II (*aafA*),
AAFIII (*agg3*)



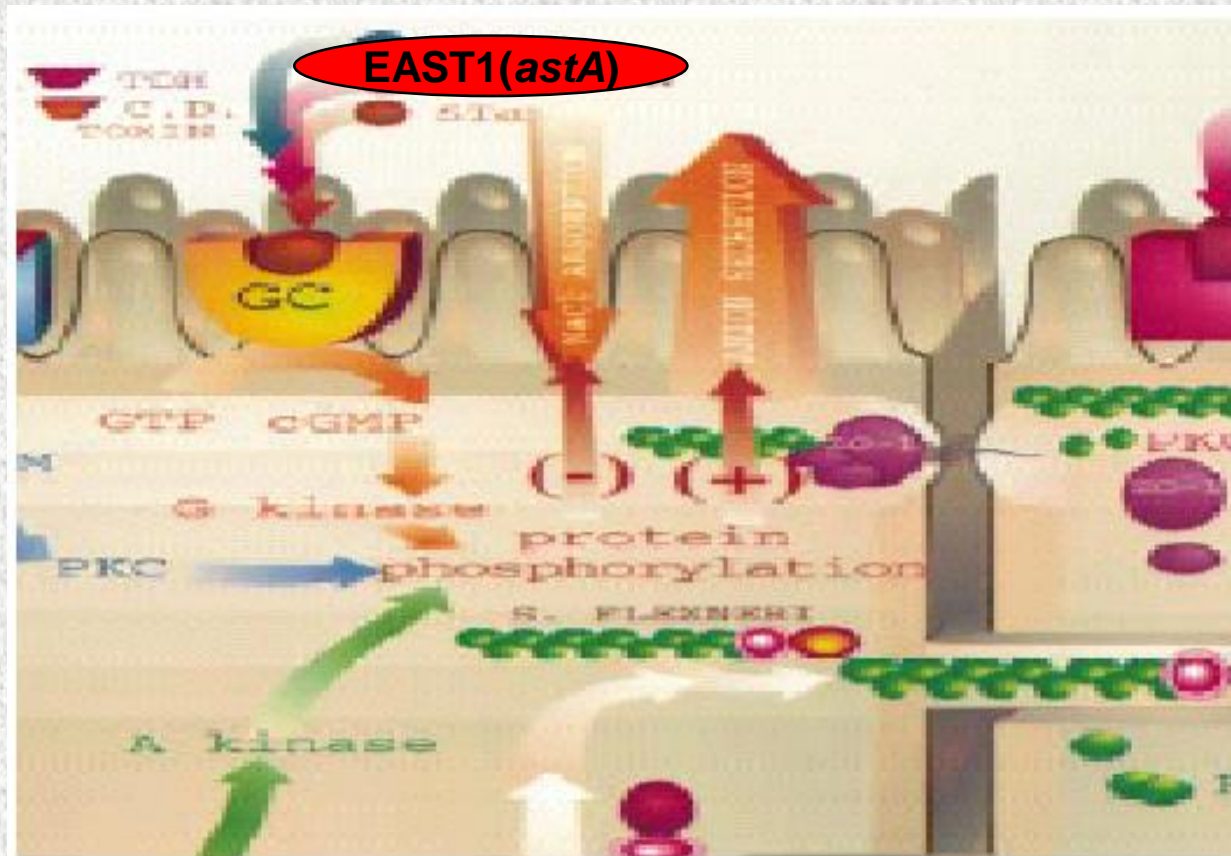
Dispersina (*aap*)



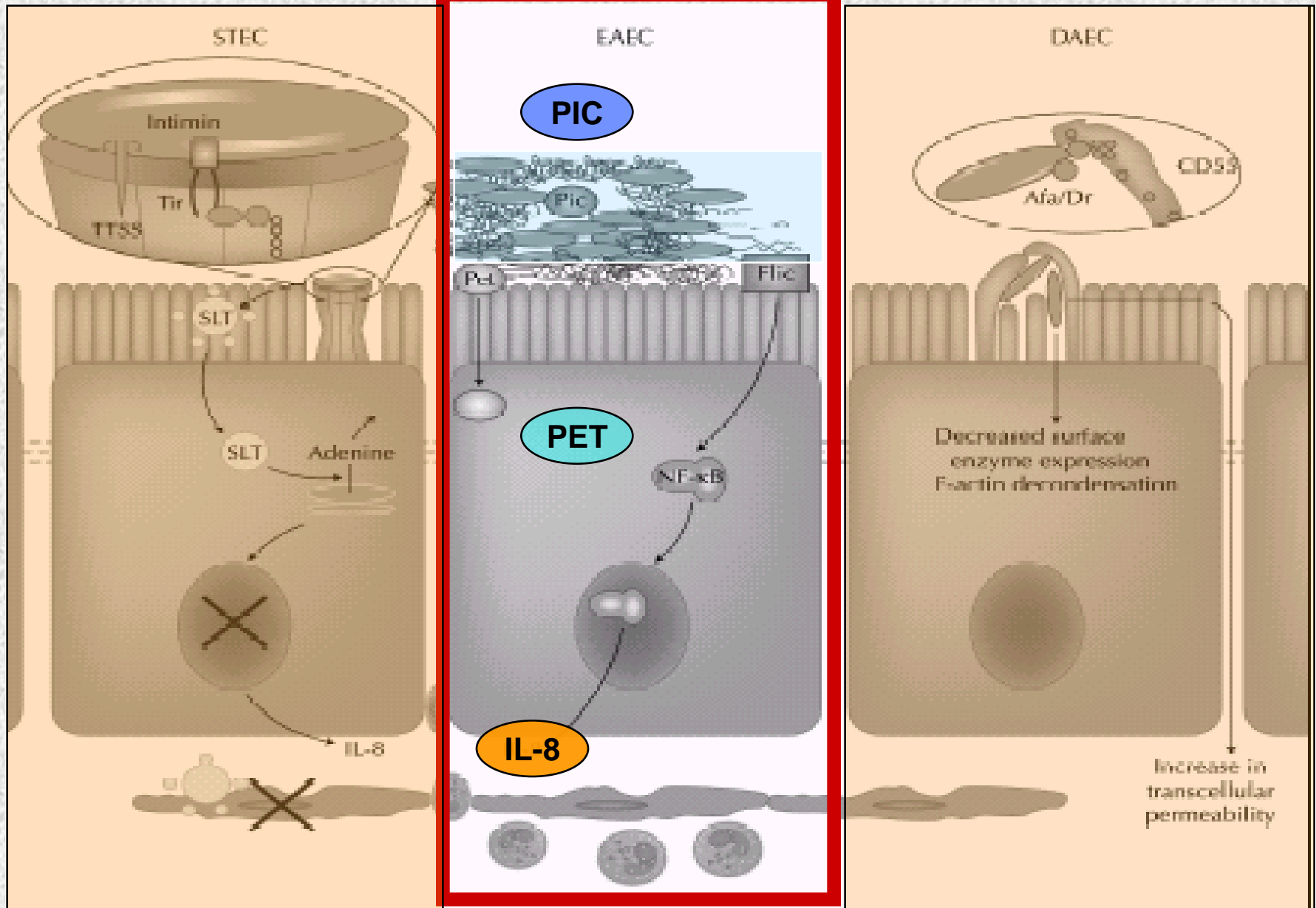
MAPs (Ap58), OMP
FliC-EAEC

(Nishi et al. 2003)

b. Toxinas.

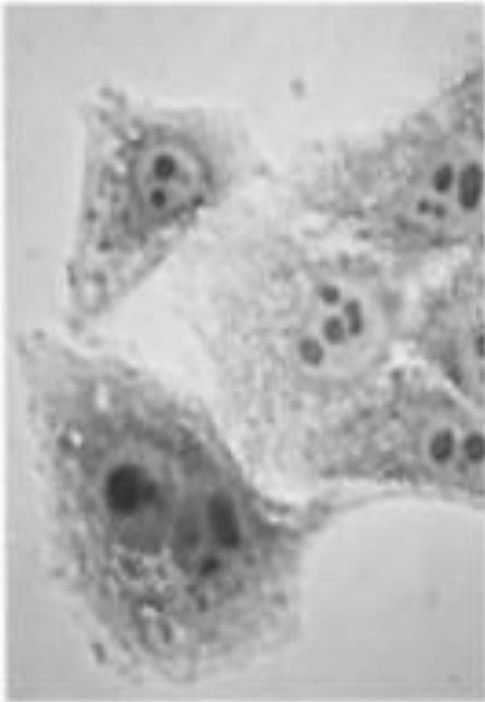


b. Toxinas.

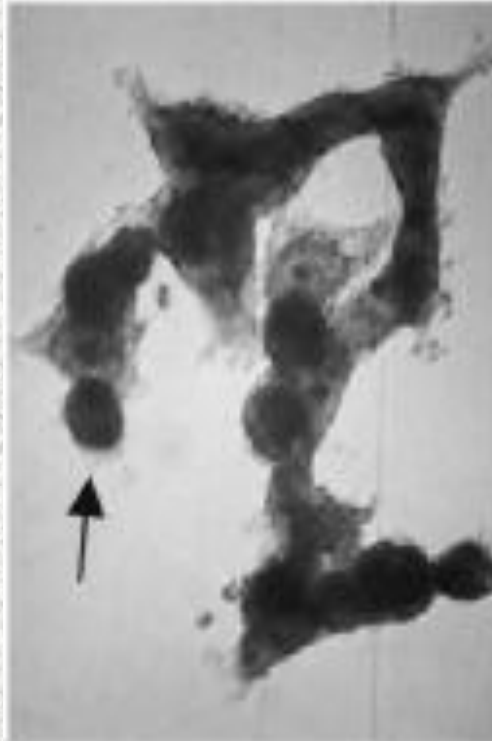


b. Toxinas.

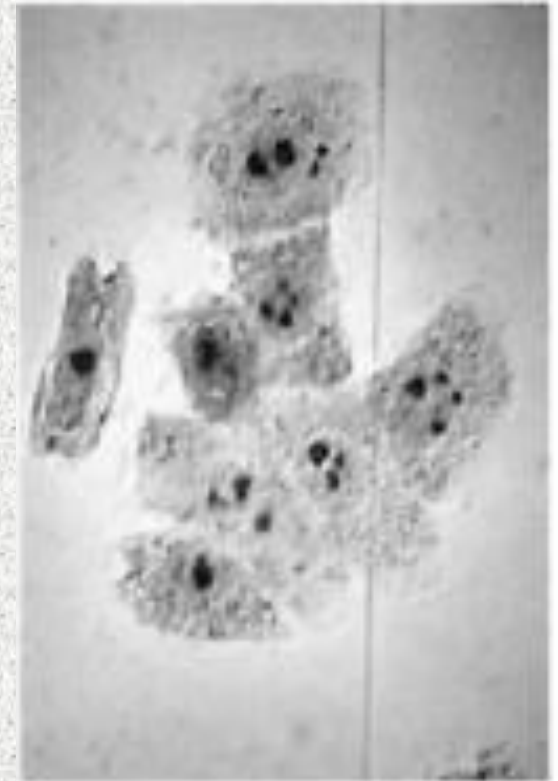
Untreated
HEp-2 cells



Pet



Pic



(Dutta et al. 2002)



OBJETIVOS

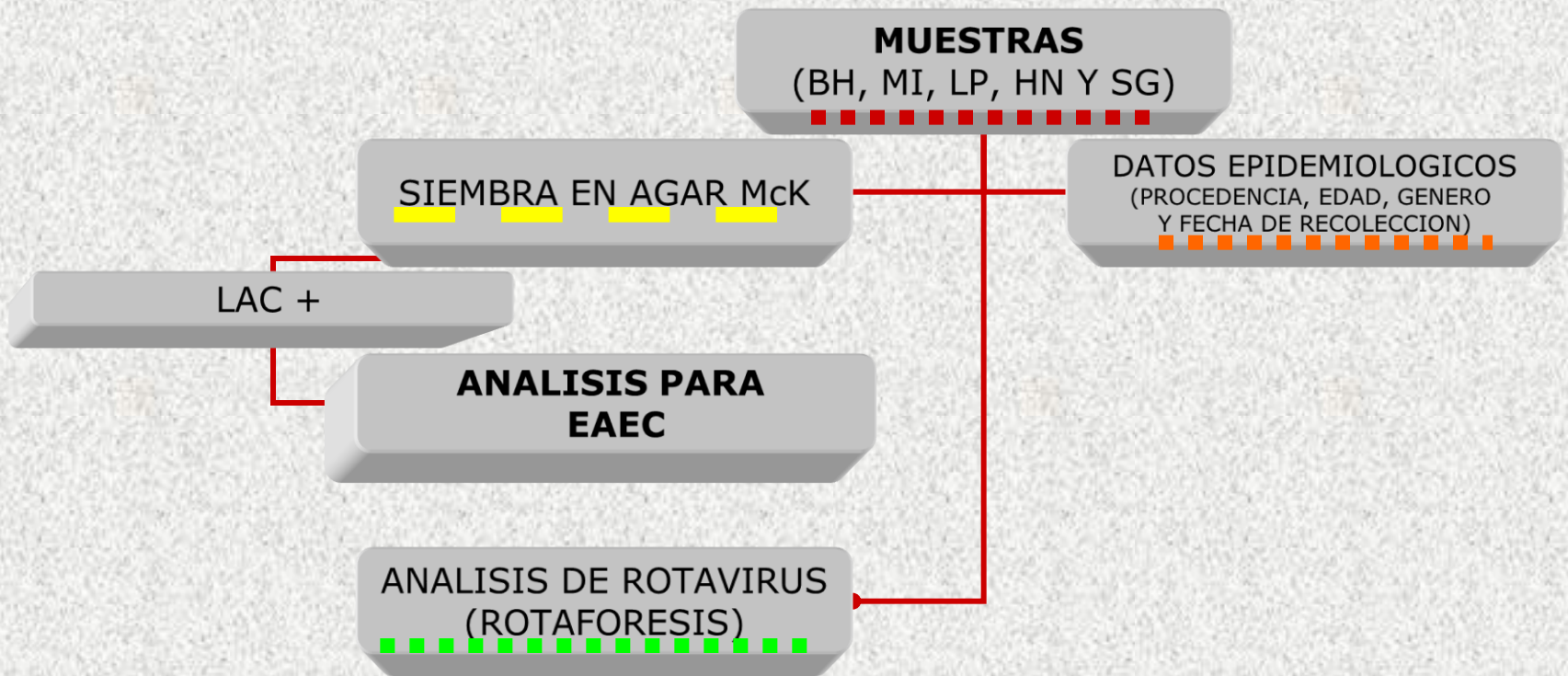
OBJETIVO GENERAL.

- Caracterizar la epidemiología de las infecciones por *Escherichia coli* Enteroagregativa (EAEC) y la distribución del perfil genético de los aislados EAEC obtenidos de niños menores a cinco años de edad con procesos diarreicos en muestras colectadas en las ciudades de La Paz y El Alto el 2004.
-

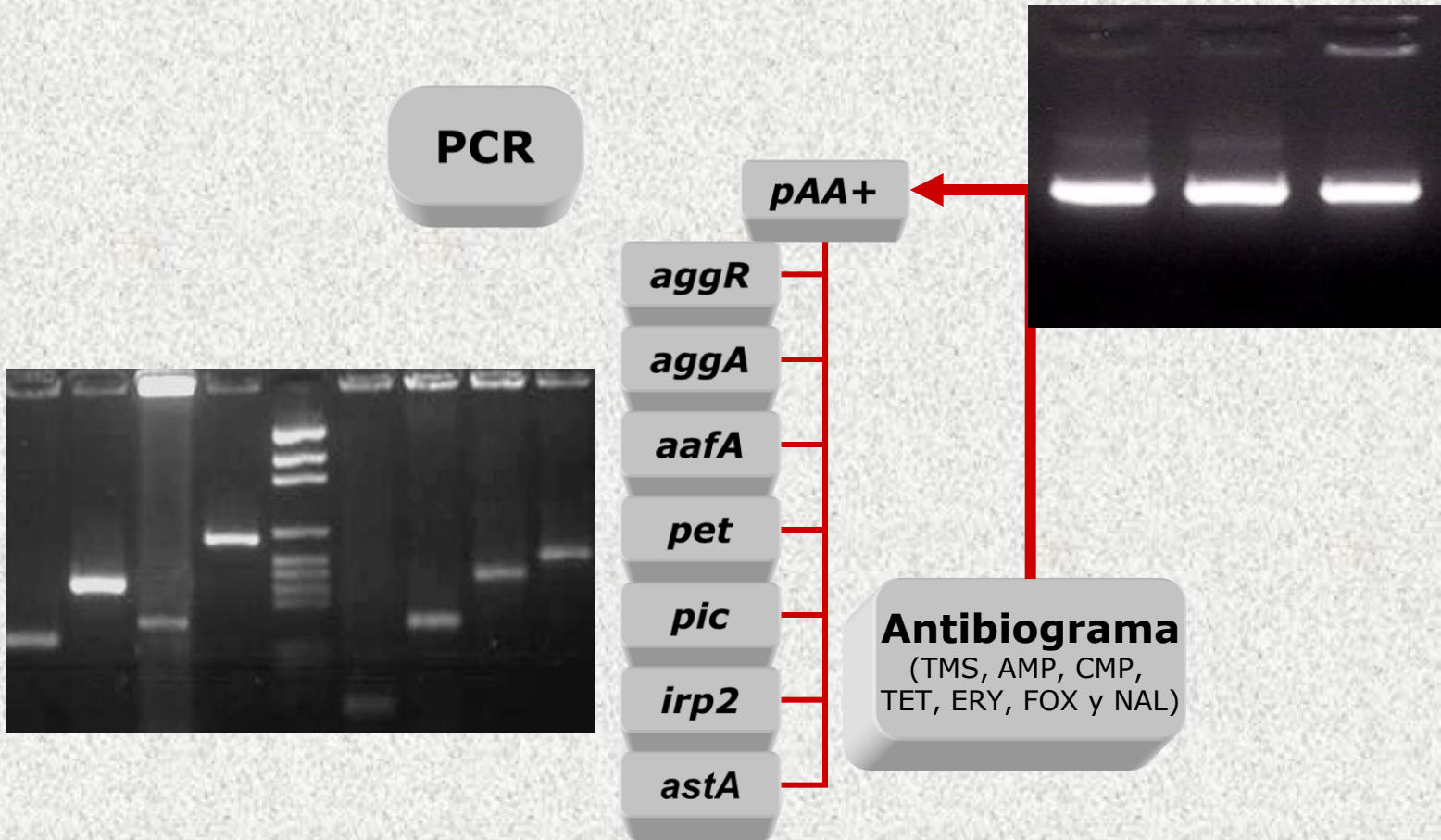
OBJETIVOS ESPECIFICOS.

- Determinar la prevalencia de infecciones por *E. coli* Enteroagregativa en niños con EDAs menores de cinco años.
 - Determinar la coinfección de *E. coli* Enteroagregativa con Rotavirus.
 - Caracterizar la distribución de genes virulentos y la resistencia a antibióticos en los aislados EAEC.
-

MATERIALES Y METODOS



MATERIALES Y METODOS

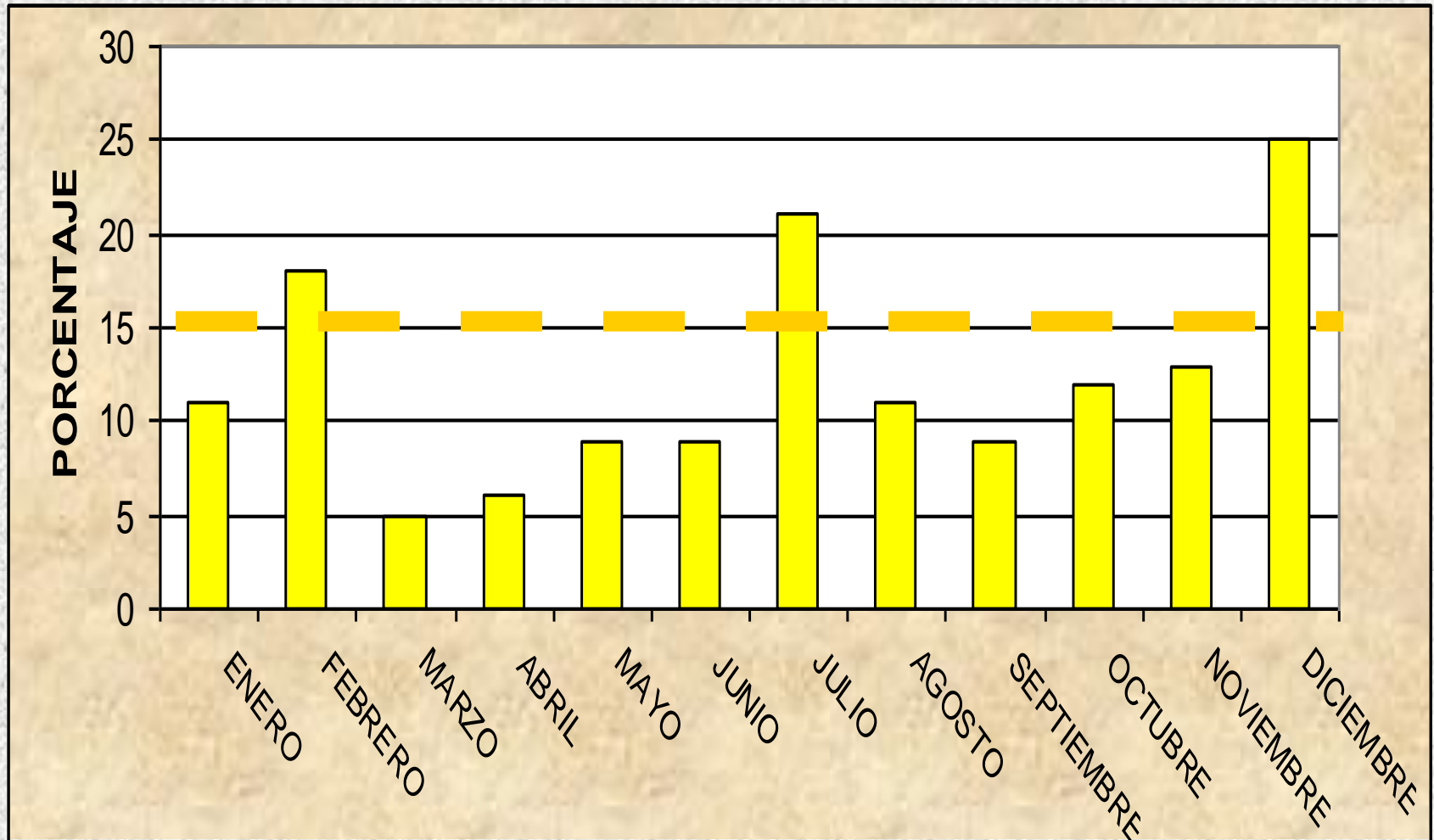


RESULTADOS

CARACTERISTICAS DE LA POBLACION ANALIZADA

GENERO	Nº de pacientes analizados	HOSPITALIZADOS	AMBULATORIOS
Masculino	391	286	99
Femenino	292	212	76
S/D	8	-	-
TOTAL	691*	508	183

PREVALENCIA DE EAEC



Infección por EAEC según género y procedencia

GENERO	AMBULATORIO (%)	HOSPITALIZADO (%)	TOTAL (%)
Femenino	16 (64)	29 (37)	45 (44)
Masculino	9 (36)	<u>48 (62)</u>	<u>57 (55)</u>
S/D	-	1 (1)	1 (1)
TOTAL (%)	25 (24)	78 (76)	103 (100)

$$\chi^2 = 5.31$$

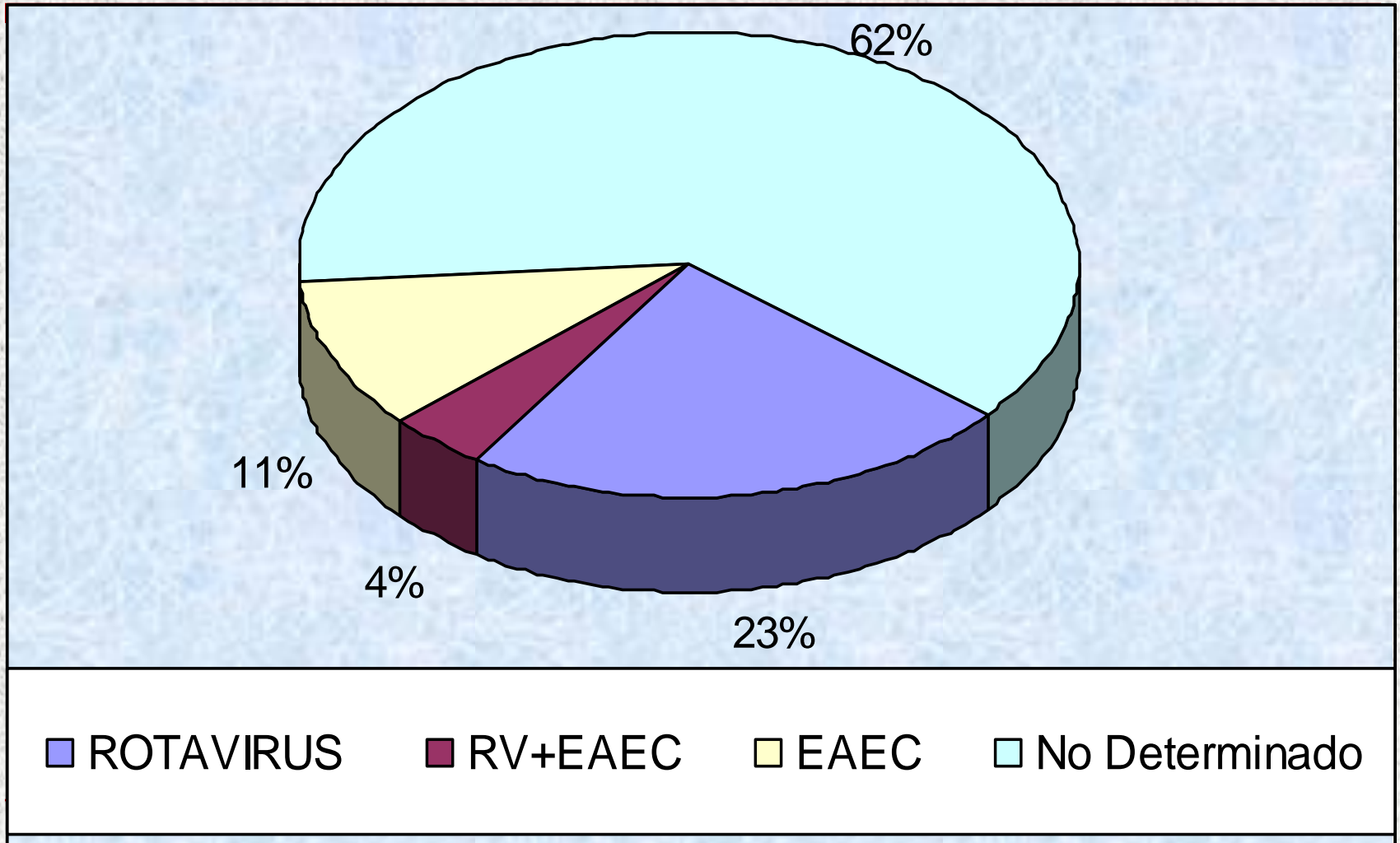
$$gl = 1 (3.841, p > 0.05)$$

$$P = 0.0285$$

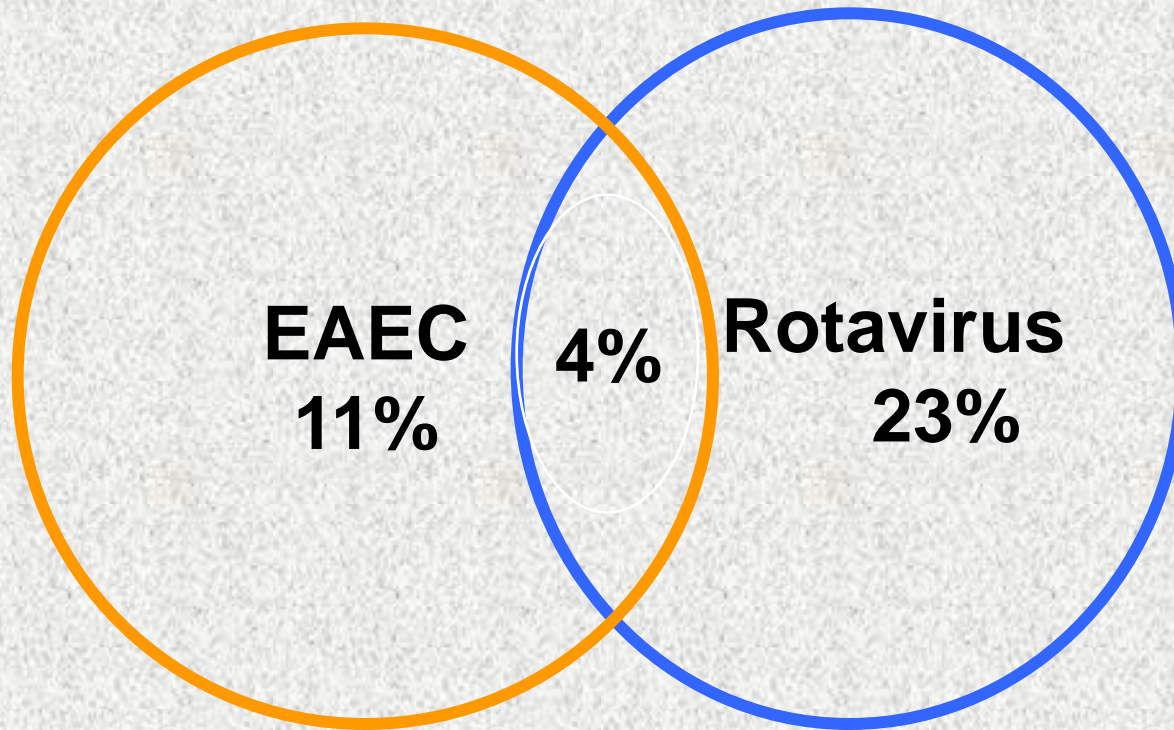
Infección por EAEC y edad.

EDAD (en meses)	Nº DE MUESTRAS (%)	Nº DE MUESTRAS EAEC (%)
0 – 3	52(7)	5(10)
4 – 6	80(12)	12(15)
7 – 12	249(36)	42(17)
13 – 24	192(28)	27(14)
25 – 60	89(13)	14(16)
*S/D	29(4)	3(10)
TOTAL	691(100)	103

INFECCIÓN POR ROTAVIRUS Y COINFECCIÓN ENTRE ROTAVIRUS- EAEC



INFECCIÓN POR ROTAVIRUS Y COINFECCIÓN ENTRE ROTAVIRUS- EAEC



Infección de rotavirus y EAEC según el género

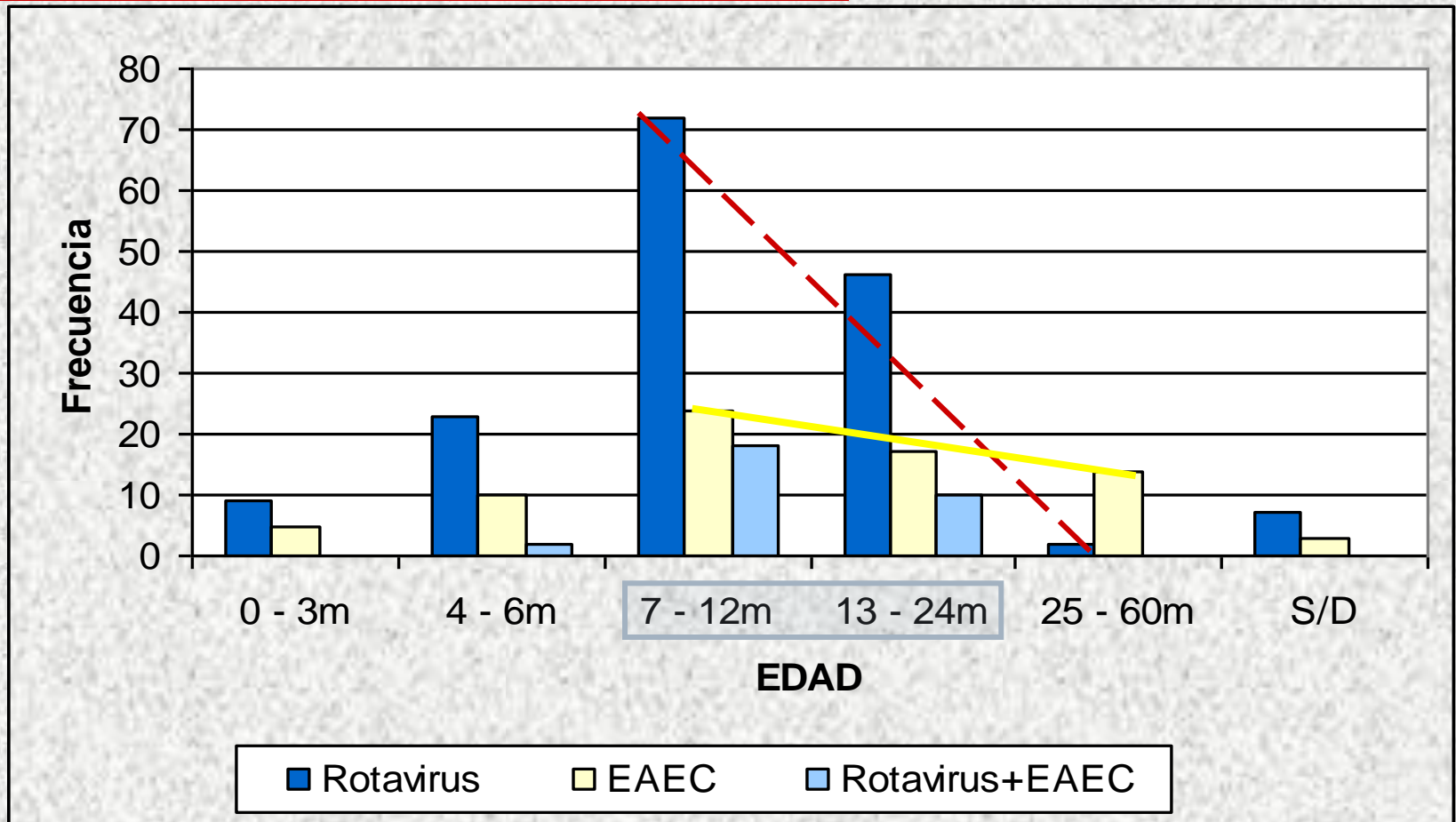
AGENTE INFECCIOSO	Nº DE PACIENTES			
	MASCULINO	FEMENINO	S/D	TOTAL
Rotavirus	87	70	2	159
EAEC	34	38	1	73
Rv + EAEC	23	7	-	30
TOTAL	144	115	3	262

$$\chi^2 = 5.346$$

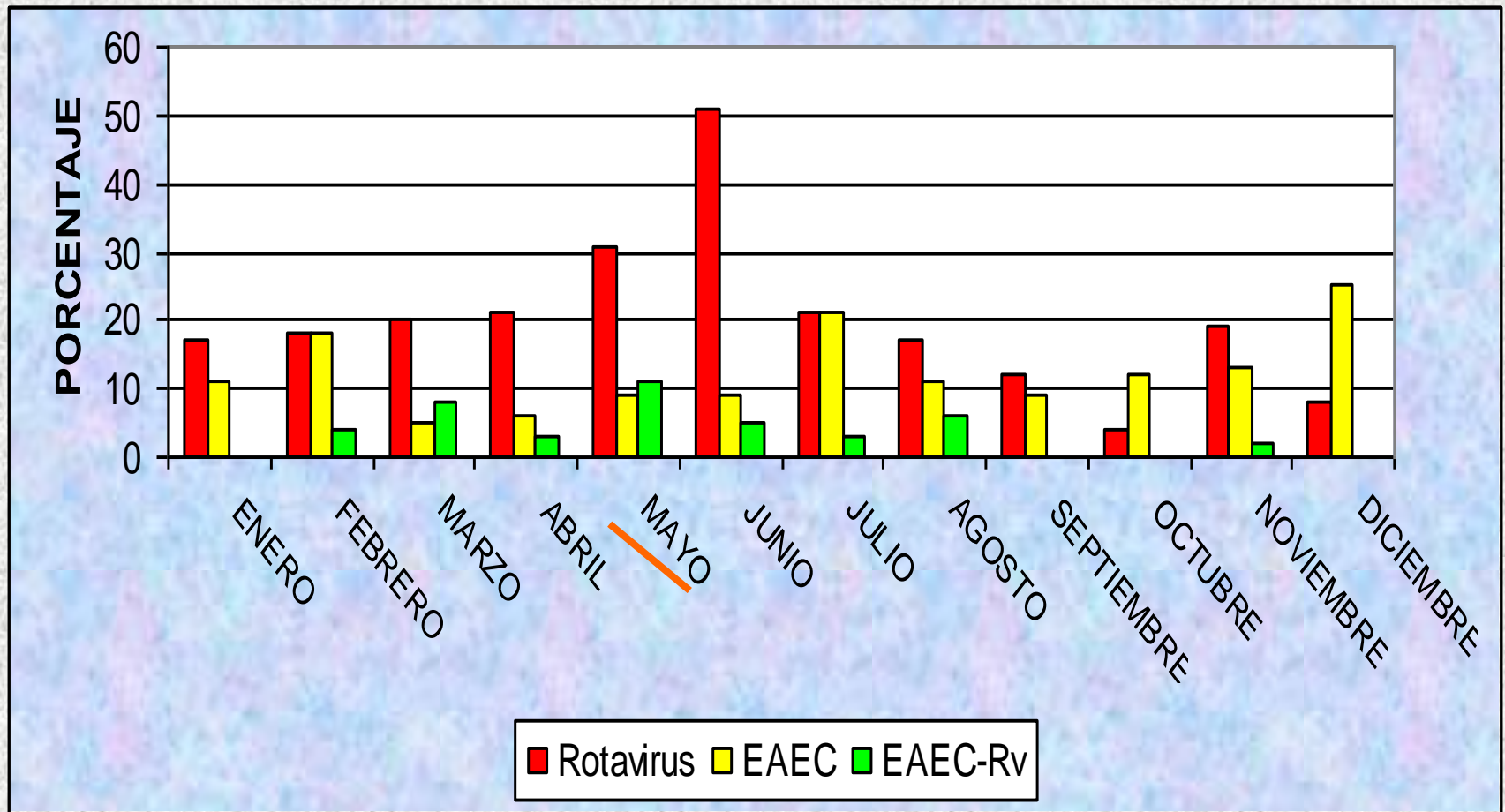
$$gl = 1 (3.841, p > 0.05)$$

$$P = 0.017$$

Distribución de rotavirus y EAEC según la edad.



Infección por Rotavirus-EAEC de las muestras recolectadas a lo largo del estudio



CARACTERIZACIÓN GENOTÍPICA DE EAEC

FACTORES VIRULENTOS	NUMERO (%)
<i>astA</i>	101(98)
<i>irp2</i>	84(82)
<i>aggR</i>	74(72)
<i>aggA</i>	32(31)
<i>pet</i>	31(30)
<i>pic</i>	26(25)
<i>aafA</i>	22(21)

Distribución de los genes analizados

GENOTIPOS	FRECUENCIA (%)
<i>astA, aggR, irp2, aggA, aafA, pic</i>	2(1.9)
<i>astA, aggR, irp2, aggA, aafA, pet</i>	1(0.9)
<i>astA, aggR, irp2, aggA, aafA</i>	5(4.8)
<i>aggR, irp2, aggA, aafA, pic</i>	1(0.9)
<i>astA, aggR, irp2, aggA, pic</i>	4(3.9)
<i>astA, aggR, irp2, aggA, pet</i>	2(1.9)
<i>astA, aggR, irp2, aafA, pic</i>	2(1.9)
<i>astA, aggR, irp2, pet, pic</i>	4(3.9)
<i>astA, aafA, pet, pic, irp</i>	2(1.9)
<i>astA, aggR, aggA, pet</i>	2(1.9)
<i>astA, aggR, aggA, pic</i>	1(0.9)
<i>astA, aggR, irp2, aggA</i>	7(6.8)
<i>astA, aggR, irp2, aafA</i>	3(2.9)

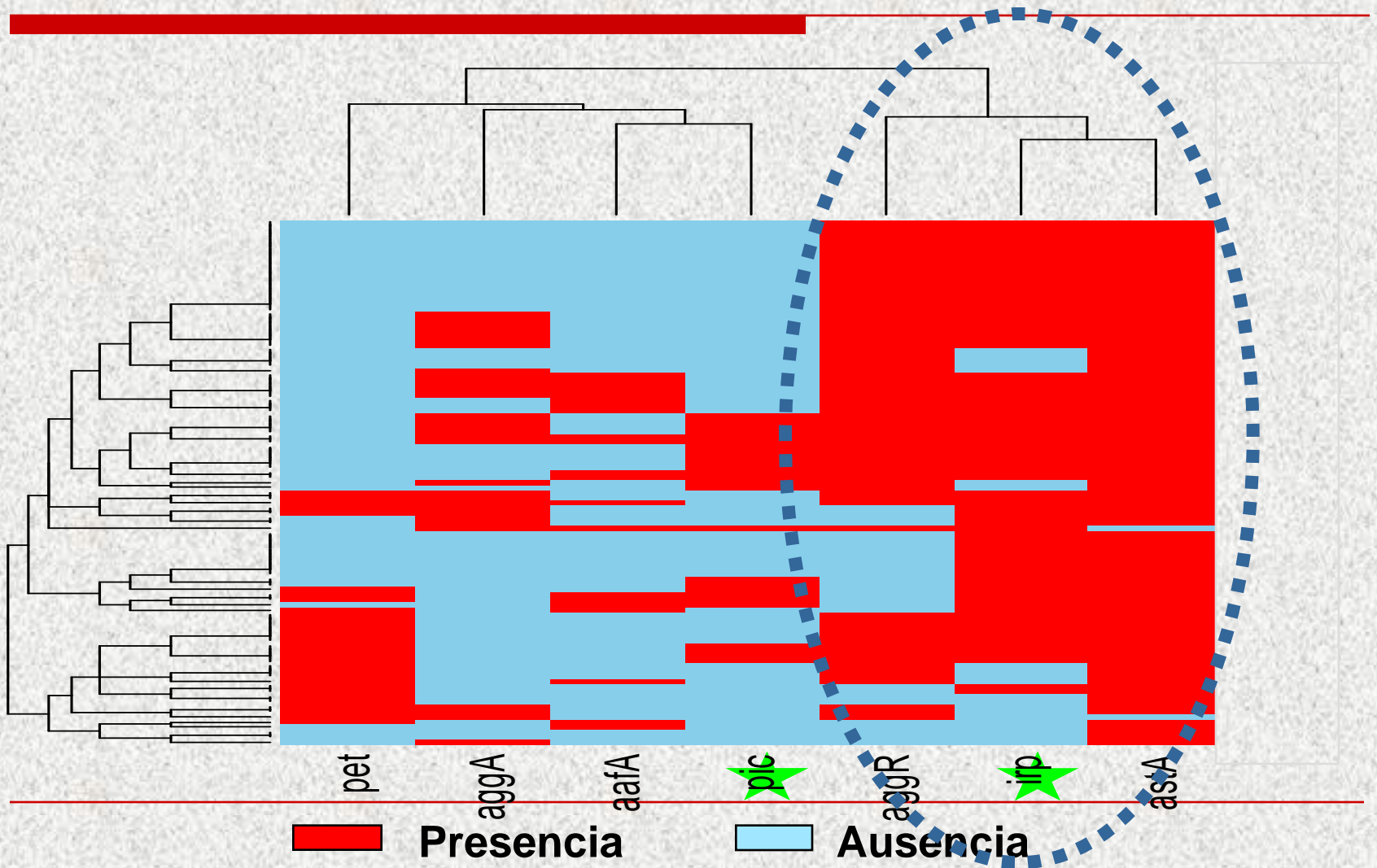
Distribución de los genes analizados

GENOTIPOS	FRECUENCIA (%)
<i>astA, aggR, aggA</i>	1(0.9)
<i>astA, aggR, pic</i>	1(0.9)
<i>astA, aggR, pet</i>	3(2.9)
<i>astA, aggR, irp2</i>	18(16.5)
<i>astA, aggA, irp2</i>	2(1.9)
<i>astA, aafA, pet</i>	1(0.9)
<i>astA, pet, irp2</i>	2(1.9)
<i>astA, pic, irp2</i>	2(1.9)
<i>astA, aggR</i>	4(3.9)
<i>astA, aggA</i>	1(0.9)
<i>astA, aafA</i>	1(0.9)
<i>astA, irp2</i>	9(8.7)
<i>astA</i>	2(1.9)

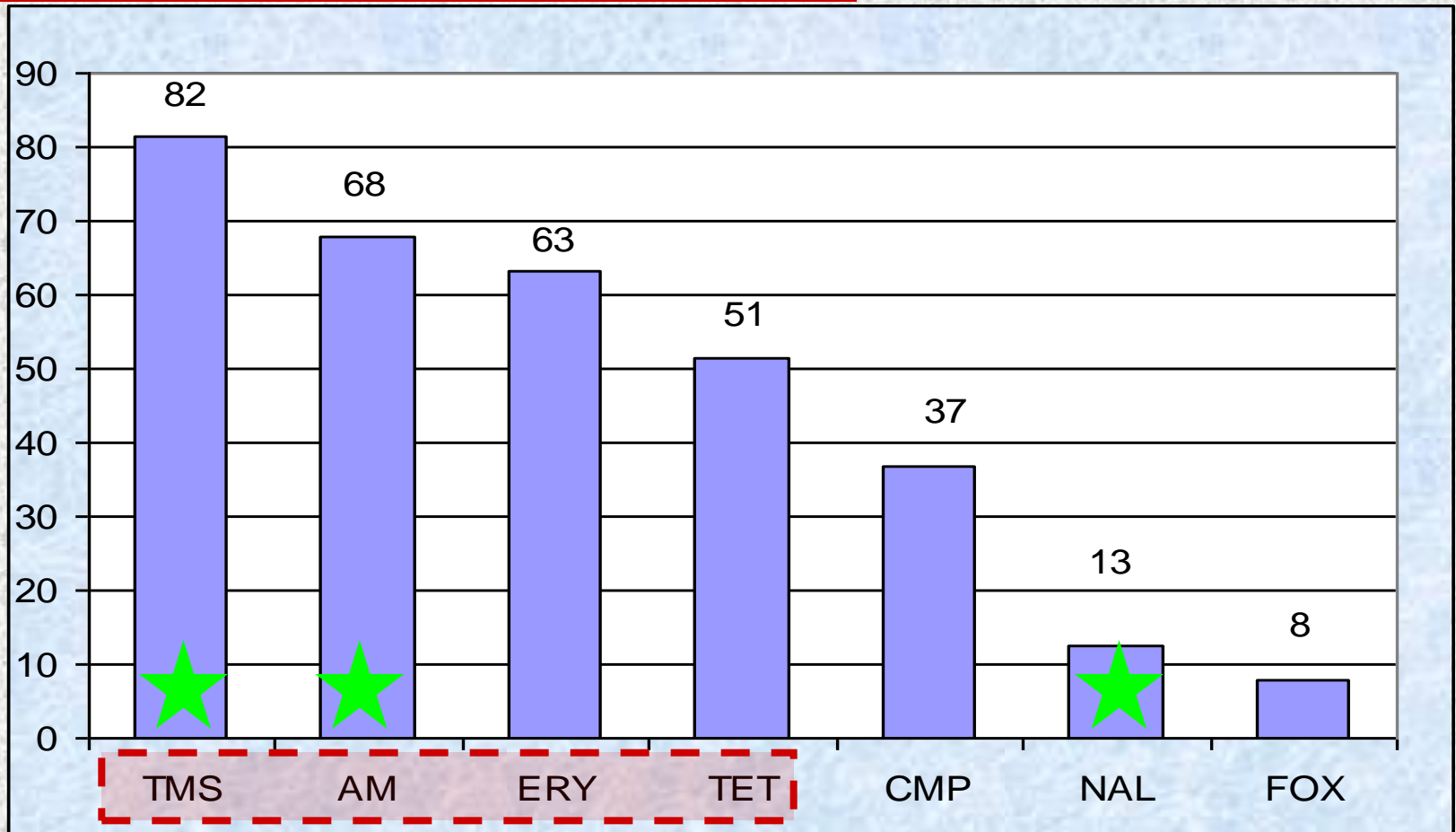
Distribución de los genes analizados.

GENOTIPOS	FRECUENCIA (%)
<i>astA, aggR, aggA, pet</i>	2(1.9)
<i>astA, aggR, aggA, pic</i>	1(0.9)
<i>astA, aggR, irp2, aggA</i>	7(6.8)
<i>astA, aggR, irp2, aafA</i>	3(2.9)
<i>astA, aggR, irp2, pic</i>	5(4.8)
<i>astA, aggR, irp2, pet</i>	6(5.8)
<i>aggR, aggA, pet</i>	1(0.9)
<i>astA, aggR, pic</i>	1(0.9)
<i>astA, aggR, pet</i>	3(2.9)
<i>astA, aggR, irp2</i>	18(16.5)
<i>astA, aggA, irp2</i>	2(1.9)
<i>astA, aafA, pet</i>	1(0.9)

Distribución de los genes analizados

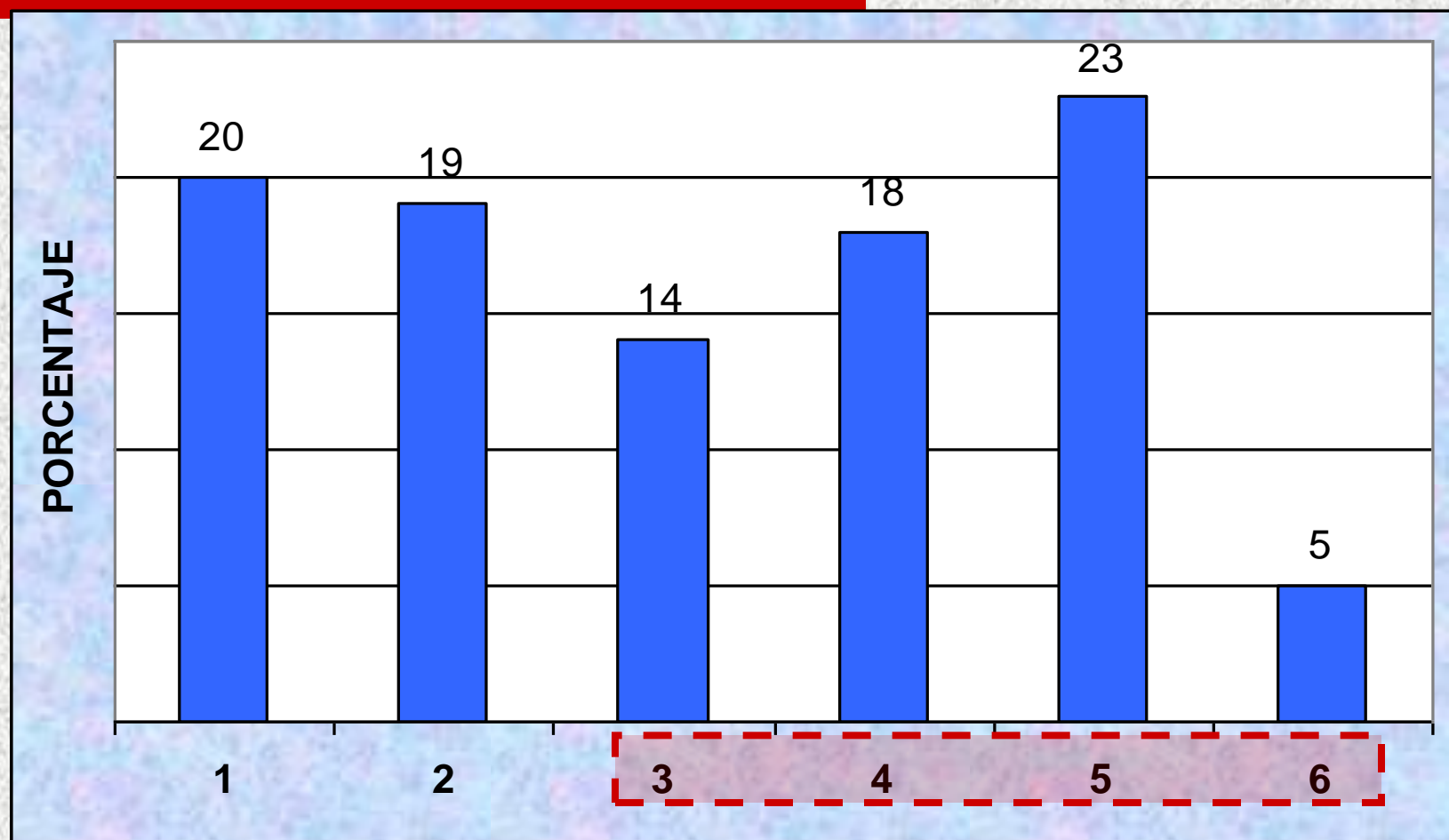


SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA DE LAS CEPAS EAEC



* TMS: Trimetoprim Sulfametaxazol; AM: Ampicilina; ERY: Eritromicina; TET: Tetraciclina; CMP: Cloranfenicol; NAL: Ácido Nalidixico; FOX: Cefotaxina

Multiresistencia de los aislados EAEC



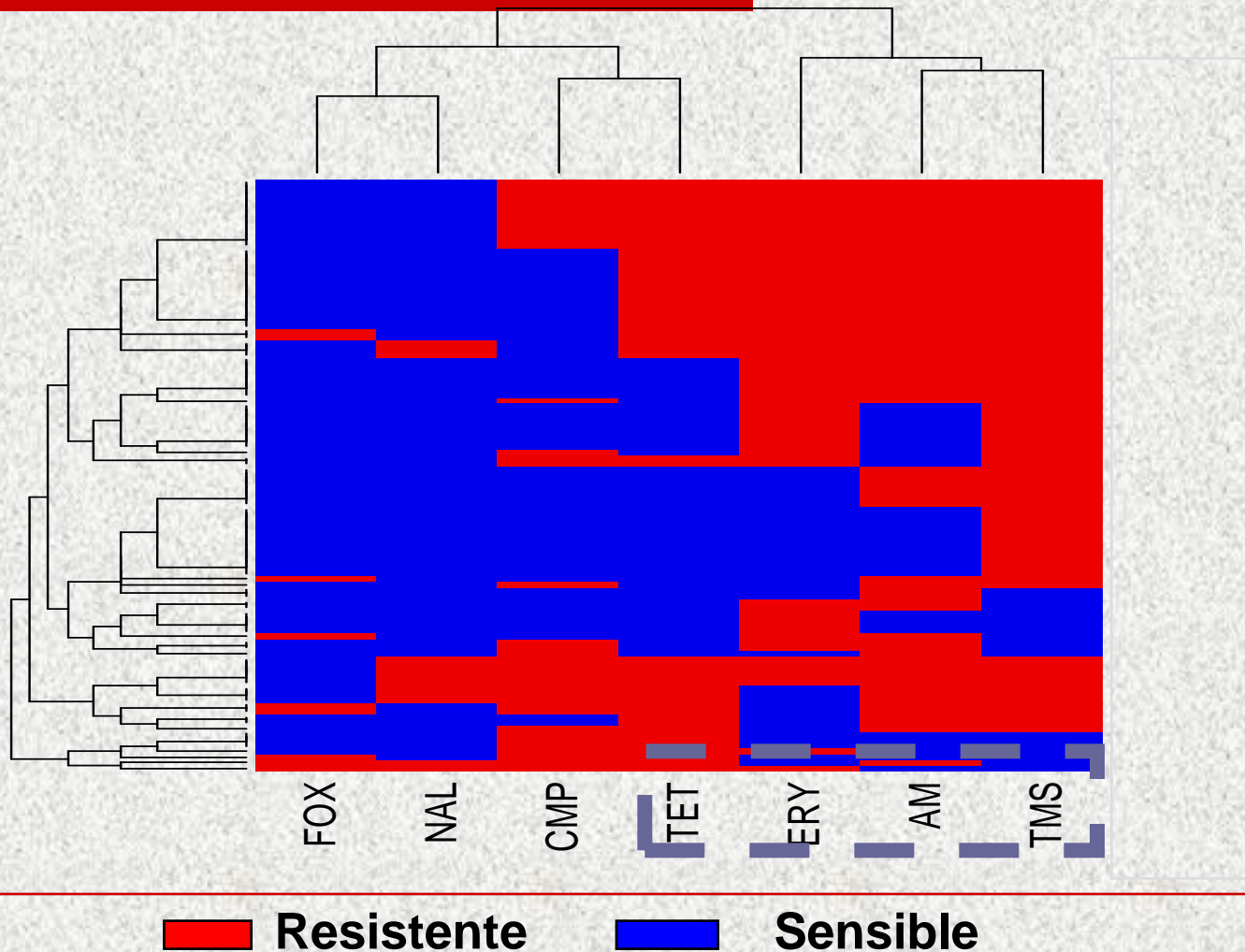
Distribución de la susceptibilidad antimicrobiana de los aislados EAEC.

ANTIBIOTIPOS	FRECUENCIA (%)
TET, NAL, TMS, ERY, CMP, AM	5 (4.8)
TET, TMS, ERY, CMP, AM	13 (12.6)
TET, TMS, ERY, FOX, AM	1 (0.9)
TET, NAL, TMS, CMP, AM	3 (2.9)
TET, NAL, TMS, ERY, AM	3 (2.9)
TET, TMS, FOX, CMP, AM	2 (1.9)
TET, NAL, ERY, FOX, CMP	1 (0.9)
TET, NAL, FOX, CMP, AM	1 (0.9)
TET, TMS, ERY, AM	15 (14.6)
TET, TMS, ERY, CMP	2 (1.9)
TMS, ERY, CMP, AM	1 (0.9)
TET, TMS, CMP, AM	1 (0.9)

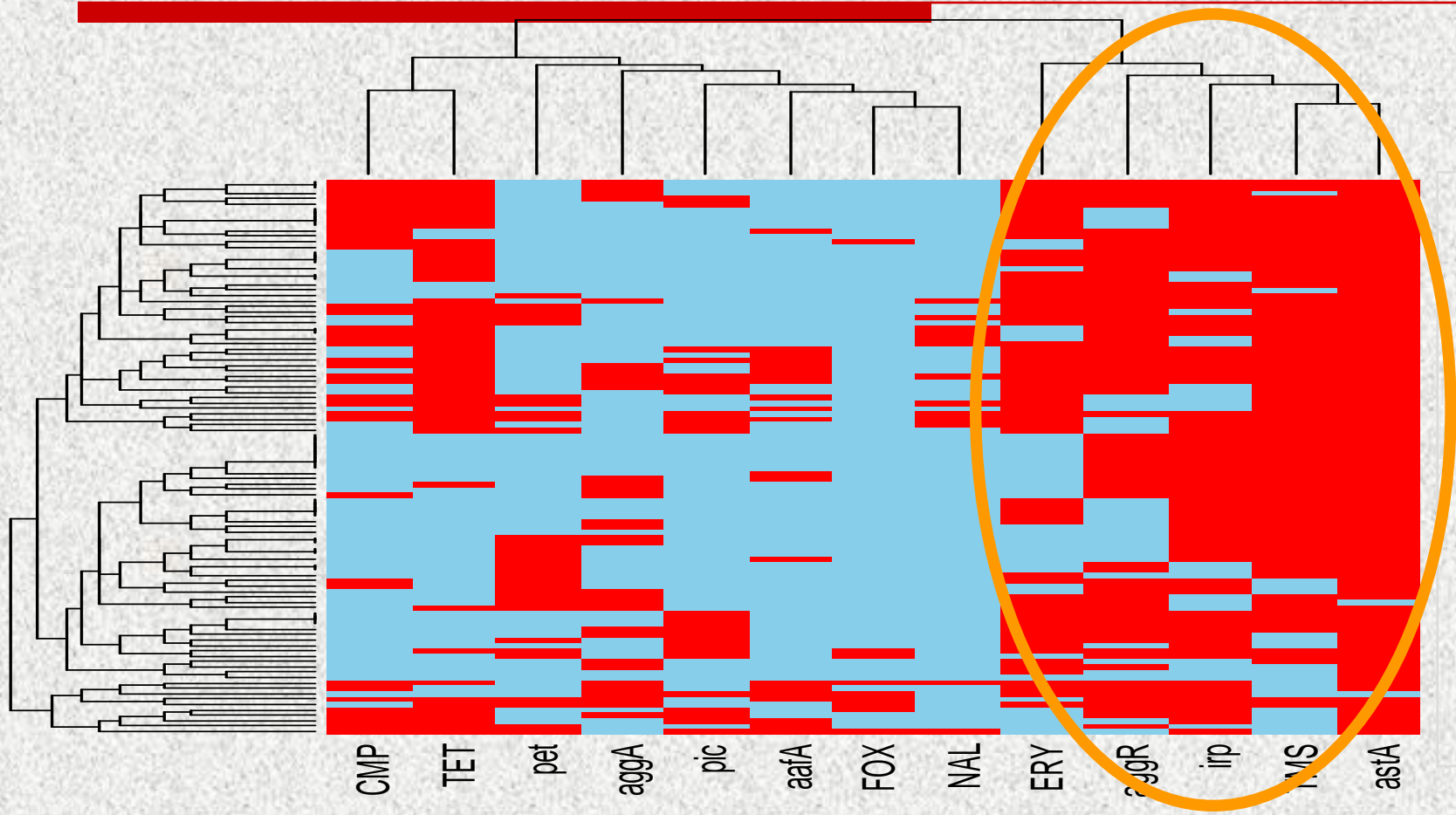
Distribución de la susceptibilidad antimicrobiana de los aislados EAEC

ANTIBIOTIPOS	FRECUENCIA (%)
TMS, ERY, CMP	1 (0.9)
TET, ERY, CMP	1 (0.9)
ERY, CMP, AM	3 (2.9)
TMS, ERY, AM	6 (5.8)
TET, TMS, AM	1 (0.9)
TET, CMP	4 (3.9)
TMS, ERY	6 (5.8)
TMS, AM	8 (7.8)
ERY, AM	2 (1.9)
TMS	14 (13.6)
ERY	4 (3.9)
AM	3 (2.9)

Distribución de la susceptibilidad antimicrobiana de los aislados EAEC



DIVERSIDAD GENO-FENOTIPICA DE EAEC



■ Presencia/Resistente **□ Ausencia/Sensible**

CONCLUSIONES

- ✱ La infección por EAEC en el periodo de estudio presento de 15%.
 - ✱ Presentó una distribución relativamente uniforme a lo largo de los meses de estudio.
 - ✱ La infección por EAEC en los diferentes grupos etáreos está a partir de los 4 a 60 meses de edad.
-

CONCLUSIONES

- ✱ Se observó un 4% de coinfecciones EAEC-rotavirus a lo largo del estudio.
 - ✱ La coinfección se encontró principalmente en niños entre 7 a 12 meses de edad y en los meses de marzo a julio, que coincide con rotavirus.
 - ✱ Se observó mayor proporción de pacientes del género masculino que femenino.
-

CONCLUSIONES

- ✱ Los genes mas frecuentemente encontrados fueron *astA*, *irp2* y *aggR*.
 - ✱ Presentaron mayor proporción de resistencia a: Trimetroprim-Sulfametoxazol, Ampicilina y Eritromicina.
 - ✱ Las cepas presentan un alto grado de variación en la distribución de los marcadores de virulencia y resistencia a antibióticos analizados.
-

RECOMENDACIONES

- * Diseñar un estudio caso control de las EDA x EAEC en niños menores a 5 años de edad:
 - * diarrea persistente
 - * Asociación con procesos de desnutrición
-

RECOMENDACIONES

- ✳ Relacionar la severidad del proceso diarreico con la caracterización genética en los aislados EAEC.
 - ✳ Evaluar la asociación con otros patógenos.
-

GRACIAS.....