

UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS  
FACULTAD DE Cs. FARMACEUTICAS Y BIOQUIMICAS  
INSTITUTO DE SELADIS



Comparación de la técnica de Serología con la técnica Reacción en cadena de la polimerasa para la detección y caracterización de EPEC y EIEC en muestras clínicas de pacientes con procesos diarreicos agudos.

**TESIS DE POST GRADO PARA OPTAR EL TITULO DE ESPECIALIDAD DE DIAGNOSTICO DE LABORATORIO EN SALUD, MENCIÓN: MICROBIOLOGIA.**

**Postulante: Rosalía Mamani Huarani**

**Asesores: Volga Iñiguez Ph. D.  
Raquel Calderón M.Sc.**

**La Paz- Bolivia  
2007**

## RESUMEN

Las cepas de *E. coli* causantes de las enfermedades gastrointestinales se dividen en 6 categorías, en base a sus mecanismos de patogenicidad, EPEC y EIEC son una de las categorías patogénicas que son identificadas mediante diferentes técnicas, como patógenos causantes de diarrea. Es así, que en el presente trabajo se realizó la comparación de la técnica de Serología y PCR en la detección y caracterización de EPEC y EIEC, a partir de 71 muestras de heces de pacientes menores a 15 años con procesos diarreicos agudos que fueron atendidos en el hospital del niño, el estudio fue realizado durante el periodo del 2001. Mediante la técnica de serología se identificó 50% de muestras positivas para EPEC y 55% de muestras positivas para EIEC, en cambio mediante la técnica de PCR, amplificando el gen *eae* se obtuvo una frecuencia de infección para EPEC de 14% y de 10% para EIEC mediante la amplificación del locus *ial* y esta frecuencia de infección fue mayor en los niños menores a 2 años que en otros grupos etáreos tanto para EPEC como para EIEC. Comparando resultados de ambas técnicas solo 3 muestras fueron positivas para EPEC y 2 muestras para EIEC, por otra parte, una gran mayoría de las muestras positivas para EPEC y EIEC por serología fueron negativas por PCR. Solo 6% de las cepas EIEC fueron positivas para la fijación del rojo congo, característica que esta relacionada con la patogenicidad de EIEC, por otro lado, la sensibilidad y especificidad de la técnica de serología fue baja además, esta técnica presentó un valor predictivo positivo de 20% y valor predictivo negativo de 88% para la detección de EPEC, mientras, que para EIEC fue de 18% y 89%. Con este trabajo se busca mejorar el diagnóstico de patógenos que causan las infecciones diarreicas como EPEC y EIEC por otra parte, también es importante conocer la incidencia real de estos patógenos para poder enfocar aspectos tan importantes como la profilaxis, además de que servirá de base para futuros estudios.

A mis padres Ernesto Mamani y Mercedes Huarani por todo su cariño y por estar siempre a mi lado apoyándome en las buenas y en las malas

A mis hermanos Verónica, Francisco y Sonia por todo su apoyo y cariño

A mis sobrinos Emma, Kevin, Chavelita, Ángel, Carla y Maya por darme su cariño y por ser mis preciosos niños buenos

Sobre todo esta tesis y las otras siempre serán dedicadas a mi hermanita Maria Isabel el ángel que guía mi camino y la de mi familia desde cielo.

## **AGRADECIMIENTO**

Un agradecimiento sincero a mis asesores. Dra. Volga Iñiguez y Dra. Raquel Calderón, por todas sus enseñanzas, por su apoyo en la realización de este trabajo y sobre todo por acogerme en el laboratorio de Biología Molecular y Seladis.

De la misma manera, mis agradecimientos a las Doctoras: Jhaquelin Calla y Mery Illanes y al Doctor Roger Carvajal, por todas sus enseñanzas y su apoyo durante la residencia en Seladis.

Al Dr. Rolando Sánchez, Lic. Nataniel Mamani, Juan Pablo Torrico, Rosario Rivera, Julia Barreta y Samanta Sánchez por su apoyo incondicional que me brindaron en el Laboratorio de Biología Molecular y sobre todo orientándome en la realización de este trabajo.

A mis compañeros de Residencia, por todo su apoyo y por estar conmigo en las buenas y en las malas durante los dos años de residencia a Marcelina Condori, Wandali Mercado, Lila Espinoza, Karina Delgado, Sorka Castillo, Rafael Tejada y Milton Lobo.



## INTRODUCCION

Las enfermedades gastrointestinales en especial la enfermedad diarreica aguda (EDA), constituye la segunda causa de mortalidad infantil después de las infecciones respiratorias agudas (IRA) (Victoria *et al.*, 2001).

La enfermedad diarreica aguda es una entidad nosológica de gran importancia en nuestro país, tanto por su prevalencia como por su morbilidad, siendo una de las causas que presenta mayor demanda en asistencia primaria. En los niños menores de 5 años la diarrea constituye la primera causa de muerte (Jiménez *et al.*, 1998).

Las causas infecciosas de la enfermedad diarreica aguda en niños, guarda estrecha relación con diversos factores epidemiológicos como son: la zona geográfica, la estación del año donde se produce la diarrea y la situación socioeconómica familiar, factores que por si solos determinan en buena medida la prevalencia de uno u otro germen (Jiménez *et al.*, 1998).

La diarrea esta causada por agentes bacterianos, virales y parasitarios. A mediados de los años 40 aparecieron en la literatura medica los primeros reportes sobre la capacidad de las cepas de *Escherichia coli* para causar diarrea severa en niños. Se aislaron estas cepas como único germen en coprocultivos, obtenidos de niños pequeños. Su virulencia se demostró por la diarrea que desencadenaron en voluntarios, así como por la respuesta inmunológica sistémica que desarrollaron estos, contra la exposición al antígeno somático de las cepas con las que fueron desafiados (Bray, 1945; Varela *et al.*, 1946).

Las cepas de *E. coli* causantes de las enfermedades gastrointestinales se dividen en 6 categorías, en base a sus mecanismos de patogenicidad: *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC), *Escherichia coli* enteroinvasiva (EIEC), *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC), *Escherichia coli* enterotoxigénica (ETEC), *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC), *Escherichia coli* de adherencia difusa (DAEC) (Comba *et al.*, 1998; Nataro *et al.*, 1998).

Uno de los grandes problemas en nuestro medio es el uso inapropiado de los medicamentos, que provoca el aumento de resistencia de las bacterias al tratamiento con antibióticos, por lo tanto, para dar un tratamiento adecuado se debe identificar correctamente la bacteria y para ello se debe contar con métodos de diagnóstico de alta sensibilidad y especificidad. Desde el decenio de 1980, las técnicas del DNA recombinante se empezaron a utilizar en las diferentes investigaciones sobre la fisiopatología de enfermedades que afectan al sistema gastrointestinal. Como resultado surgieron grandes avances en el Diagnóstico Molecular de los enteropatógenos (Pandero *et al.*, 1998).

Así, al clonarse y secuenciarse los diferentes genes de enteropatógenos, empezaron a acumularse conocimientos y a integrarlos con conceptos bioquímicos, fisiológicos y estructurales para entender el proceso fisiopatológico a nivel molecular, que es parte fundamental del diagnóstico y de las nuevas alternativas de tratamiento (Pandero *et al.*, 1998). En 1986 surge una nueva técnica Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), esta técnica se basa en la amplificación enzimática exponencial de un fragmento específico de DNA blanco (Mullis *et al.*, 1994). Desde entonces la técnica de PCR ha sido empleada en numerosas aplicaciones de ciencias biológicas y médicas, por su elevada especificidad y sensibilidad.

## JUSTIFICACION

La enfermedad diarreica aguda (EDA) es un problema relevante de salud pública, es un motivo frecuente de consulta en pediatría y una de las principales causas de morbilidad y mortalidad infantil en el mundo (Jiménez *et al.*, 1998; OMS, 2003).

Debido a las deficiencias sanitarias y la desnutrición, la diarrea es la principal causa de mortalidad infantil en los países en vías de desarrollo, la cual contribuye anualmente a la muerte de 4,6 a 6 millones de niños en Asia, África y América Latina (Torres *et al.*, 2001; Klaus *et al.*, 2001) y se calcula que se producen entre 2 a 12 episodios de diarrea por niño por año, presentándose en mayor frecuencia durante los primeros dos años de vida (Klaus *et al.*, 2001). En estos países los patógenos mas asociados a la diarrea son: *Rotavirus*, *Escherichia coli* *Diarreogenicas*, *Vibrión cólera*, *Salmonella spp* y *Shigella spp* (Birmingham *et al.*, 1997; Thielman *et al.*, 2004).

Bolivia con más de 8 millones de población, presenta una alta tasa de mortalidad infantil de 60 por cada 1.000 nacidos vivos. Una de las principales causas de esta alta mortalidad infantil son las enfermedades diarreicas agudas y se estima que alrededor del 29% de los niños menores de 5 años sufrieron enfermedad diarreica aguda, este porcentaje es mayor en niños que viven en las zonas rurales aproximadamente 40% mayor que en las zonas urbanas (Instituto Nacional de Estadística, 2004).

En Bolivia cerca del 70% de los niños menores de 9 años viven en hogares extremadamente pobres que no tiene acceso adecuado a los servicios básicos de alcantarillado, agua potable y menos a los servicios de salud, adolecen de desnutrición crónica. Esta población esta mas expuesta a las enfermedades gastrointestinales (Instituto Nacional de Estadística, 2004). La diarrea es producida por infecciones bacterianas como las causadas por *Escherichia coli* *Diarreogenicas* e infecciones virales como *Rotavirus*. Cuanto menos edad tenga el niño, mas graves

son las consecuencias de la diarrea (Nataro *et al.*, 1998). Por lo tanto, es importante conocer su epidemiología, etiología, diagnóstico, prevención y tratamiento de la diarrea.

En nuestro medio el diagnóstico de la diarrea es fundamentalmente clínico en base a los síntomas y en la mayoría de los casos no se utilizan pruebas complementarias, como el coprocultivo y el coproparasitológico. El coprocultivo es utilizado como método de diagnóstico solo para los casos de mayor gravedad (duración prolongada de la diarrea y brotes epidemiológicos). Por otra parte, en la mayoría de los laboratorios clínicos, solo se busca cepas de *Salmonella* y *Shigella* como causantes de la diarrea y no así, las cepas de *Escherichia coli* *Diarreogénicas* que también son causantes de la diarrea, pero que no se pueden identificar mediante pruebas bioquímicas.

En la actualidad para el diagnóstico de esta enfermedad, se siguen utilizando métodos convencionales, que presentan limitaciones y dificultades para la correcta identificación de las diferentes categorías de *E. coli* patogénicas y a la vez, diferenciarlas de las cepas no patógenas. Una de estas técnicas, son los ensayos inmunológicos de aglutinación con antisueros, que presentan baja especificidad y reacción cruzada. Por lo tanto, es necesario implementar nuevas técnicas de diagnóstico de alta sensibilidad y especificidad que permita dar el correcto resultado del patógeno causante de la diarrea. De esta manera, se evitan interpretaciones erróneas de los resultados obtenidos por los laboratorios que pueden llevar a un diagnóstico y tratamiento no adecuado de las enfermedades gastrointestinales.

Por esta razón, en el presente trabajo se busca mejorar el diagnóstico de patógenos que causan las infecciones diarreicas como *Escherichia coli* *enteropatógena* y *enteroinvasiva*, mediante la comparación de la capacidad de detección de la técnica de Serología y la técnica Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), ya que en nuestro medio la técnica de Serología es utilizada en todos los laboratorios de microbiología para el diagnóstico de las diferentes

categorías de *Escherichia coli* *Diarreogenicas*, de esta manera, se pretende contribuir a que se de el resultado correcto del agente causal de la diarrea.

Por otra parte, también es necesario conocer la incidencia real de estos dos patógenos en nuestro medio así, como también los factores de virulencia que es imprescindible para un conocimiento preciso de la patología y para poder enfocar aspectos tan importantes como la profilaxis mediante vacunas específicas, que de alguna manera permitan disminuir la alta morbilidad y mortalidad infantil en Bolivia.

## **OBJETIVOS.**

### **OBJETIVO GENERAL.**

Comparar la técnica de Serología de Aglutinación con la técnica Reacción en cadena de la polimerasa (PCR), para la detección y caracterización de *Escherichia coli enteropatogenica* (EPEC) y *Escherichia coli enteroinvasiva* (EIEC) en muestras clínicas aisladas de pacientes menores a 15 años con procesos diarreicos agudos.

### **OBJETIVOS ESPECIFICOS.**

- Determinar EPEC y EIEC por aglutinación con antisueros polivalentes en muestras clínicas procedentes de procesos diarreicos de pacientes menores a 15 años.
- Determinar los genes de patogenicidad que caracterizan a EPEC y EIEC, en las muestras clínicas procedentes de procesos diarreicos de pacientes menores a 15 años.
- Determinar la fijación de Rojo Congo en las cepas de *E. coli* aisladas de las muestras clínicas.
- Determinar la sensibilidad, especificidad, eficiencia, valores predictivos y la concordancia de la técnica de Serología para la detección de EPEC y EIEC.

## **MARCO TEORICO**

### **1.1. ENFERMEDAD DIARREICA AGUDA (EDA).**

Las enfermedades diarreicas agudas constituyen una de las consultas más frecuentes en los centros hospitalarios, especialmente en niños menores a 5 años y debido a las deficiencias sanitarias, la diarrea es la causa principal de la mortalidad infantil en los países en desarrollo (Jiménez *et al.*, 1998; Casburn-Jones *et al.*, 2004). A pesar de la reducción de la mortalidad a nivel mundial, la diarrea es aun responsable de mas 2 millones de muertes anualmente (Nathan *et al.*, 2004).

La diarrea es una enfermedad gastrointestinal que se manifiesta con un aumento anormal en el contenido liquido de las heces, asociado a un aumento en el numero de deposiciones (tres o mas veces por día), que suele acompañarse de dolores cólicos, nauseas, vómitos, calambres abdominales, síntomas sistémicos significativamente clínicos o malnutrición (Jiménez *et al.*, 1998; Thielman *et al.*, 2004).

Conocer la fisiopatología de las enfermedades diarreicas, constituye un elemento importante para su tratamiento efectivo. Por lo cual, es necesario conocer las funciones fisiológicas intestinales, relacionadas con la absorción y secreción del agua y los electrolitos (Riverón, 1999).

#### **1.1.1. Mecanismos Fisiopatologicos**

La diarrea se produce por una ruptura del equilibrio absorción-secreción del intestino delgado o grueso, disminuyéndose la absorción y/o aumentándose la secreción. Como resultado de esta alteración se produce un aumento de la frecuencia, cantidad y volumen de las heces, así como cambios en su consistencia, por el incremento de agua y el contenido de electrolitos, todo esto condiciona un riesgo, la deshidratación y los trastornos del equilibrio hidromineral (Sierra, 1992; Reverón, 1999).

Los mecanismos patológicos que ocasionan diarrea, dependen de los agentes causales que la producen y se describen varios mecanismos que son de tipo osmótico, secretor, exudativo y funcional (Nataro *et al.*, 1998).

### **1.1.2. Osmótico**

La diarrea de tipo osmótico daña directamente al enterocito y el borde en cepillo, provocando un déficit de las enzimas localizadas en el lugar e impidiendo la absorción intestinal. Al no digerirse ni absorberse tanto el sustrato alimenticio como los electrolitos, se acumulan en la luz intestinal, aumentando la osmolaridad intraluminal y por gradientes osmóticos arrastran agua desde la pared intestinal hacia la luz, produciendo diarreas osmóticas (Nataro *et al.*, 1998).

La necrosis de la porción superior (ápex) de las vellosidades, da lugar a que en un periodo de 12 a 40 horas los enterocitos secretores de las criptas, cubran las vellosidades y de lugar a áreas donde hay secreción de líquidos y la absorción esta disminuida o ausente. El microorganismo que provoca este tipo de diarrea es *E. coli enteropatogénica* (con su mecanismo de adherencia y esfacelamiento A/E) y por agentes virales, principalmente *Rotavirus* (Sierra, 1998; Riverón, 1999).

### **1.1.3. Secretor**

Los microorganismos asociados a la diarrea secretoria se localizan en plena luz intestinal y desde allí bombardean a los enterocitos apicales, que son eminentemente absorptivos, con sustancias (enterotoxinas) que invierten su ciclo metabólico, impidiendo la absorción, pero fundamentalmente estimulando la secreción activa de agua y electrolitos (Sierra, 1998).

La diarrea secretora, es una diarrea acuosa abundante que produce deshidratación con trastornos del equilibrio hidroelectrolítico y ácido básico, que es producida principalmente por el *Vibrio cholerae* y *Escherichia coli enterotoxigenica*, bacterias como *Shigella spp*, *Yersinia enterocolitica* y las *Aeromonas* también pueden producir este tipo de diarrea (Field, 2003).

#### **1.1.4. Exudativo**

Las bacterias invasivas que provocan la diarrea exudativa, tienen su localización en proximidades de la válvula ileocecal y en la parte distal del colon. Al invadir a los enterocitos, se traslocan a la submucosa, produciendo reacciones inflamatorias y posteriormente migrando a los ganglios linfáticos mesentéricos, donde se incrementa la reacción inflamatoria (Jiménez *et al.*, 1998; Sierra, 1998).

En la submucosa se encuentran los plexos mesentéricos de Meissner y Auerbach (estación neurológica de impulsos aferentes y eferentes que controlan la motilidad intestinal), que se ven afectados por la reacción inflamatoria y la liberación de prostaglandinas. El efecto final, es un estado de hiperexcitabilidad de los plexos que provoca la hiperexcitabilidad intestinal y un estado de reactividad sistémica (fiebre, taquicardia, leucocitos). Son prototipos de este grupo bacterias como *E. coli enterohemorrágica* (verotoxinas) y *Salmonella* (enterotoxina) (Sierra, 1998).

#### **1.1.5. Funcional**

La diarrea funcional se debe a un aumento de la motilidad del intestino, que se traduce en una disminución de la absorción. Este mecanismo está presente en patologías orgánicas como: Diabetes e Hipertiroidismo. Se debe sospechar alteración de la motilidad una vez excluidos los otros mecanismos propuestos, debido a lo dificultoso de demostrar la alteración funcional en una diarrea (Jiménez *et al.*, 1998).

#### **1.1.6. Epidemiología**

En países en vías de desarrollo, los virus son responsables de 40% de los casos de diarrea severa en niños y las bacterias provocan un gran número de episodios de variable severidad; entre estos las especies de *Shigella*, *Campylobacter* y *Escherichia coli* patogénicas, que son responsables de la diarrea infantil en muchos países en desarrollo (Davidson *et al.*, 2002).

En nuestro país, aproximadamente el 29% de los niños menores a 5 años presentaron enfermedad diarreica aguda y se calcula un promedio de 5 episodios diarreicos por niño por año. La mortalidad infantil en estos niños es alrededor de 15.000 muertes anuales (Instituto Nacional de Estadística 2004).

### 1.1.7. Etiología

La causa más común de diarrea aguda en nuestro medio, es de origen infeccioso y estos microorganismos asociados a la diarrea utilizan dos mecanismos principales.

1) Inflamatorio: Caracterizado por un cuadro de tipo exudativo, siendo los microorganismos *Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia*, *Campylobacter* y *Escherichia coli* enteroinvasiva.

2) No inflamatorio: Causado por toxinas bacterianas que estimulan la secreción o por embotamiento de las microvellosidades intestinales que inhiben la absorción (virus). Los microorganismos mas asociados son: *Staphylococcus aureus*, *Vibrión colera*, *E. coli* enterotoxigenica, *Clostridium perfringens*, *Rotavirus*, *Adenovirus* y *Giardia* (Jiménez *et al.*, 1998).

## 1.2. ENTEROBACTERIACEAE.

La familia Enterobacteriaceae es el grupo mas grande y heterogéneo de bacilos gram negativos con importancia clínica. En la actualidad se han descrito por lo menos 27 géneros y 102 especies. Estos géneros se han clasificado sobre la base de la homología del DNA, propiedades bioquímicas, reacciones serologicas, susceptibilidad a bacteriófagos y patrones de susceptibilidad a los antibióticos (Nataro *et al.*, 1998).

Las enterobacterias son microorganismos ubicuos que se encuentran en el suelo, en el agua y la vegetación. Forman parte de la flora microbiana normal del hombre y de la mayoría de los animales. Son responsables del 30 al 50% de todas

las septicemias y más del 70% de las infecciones del tracto urinario y de las infecciones intestinales (Murray, 1998).

### 1.2.1. Fisiología y Estructura

Estos microorganismos son bacilos gram negativos de tamaño moderado (0,3-1,0  $\mu\text{m}$  por 1,0–6,0  $\mu\text{m}$ ), usualmente móviles con flagelos peritricos y no forman esporas. Todos ellos crecen en aerobiosis o anaerobiosis facultativa y en una variedad de medios de cultivo no selectivos (agar sangre, nutritivo) y selectivos (agar Mac Conkey, Eosina azul de metileno). Tienen requerimientos nutricionales simples, fermentan la glucosa, reducen el nitrato, presentan reacción positiva a la catalasa y negativa a la oxidasa (Koneman, 1999; Rodríguez, 2002).

La característica morfológica en medios selectivos diferenciales como Mac Conkey y Eosina Azul de Metileno, han permitido diferenciar entre cepas fermentadoras de lactosa (*E.coli*, *Klebsiella*, *enterobacter*) y no fermentadoras de lactosa (*Salmonella*, *Shigella*). Esta identificación debe realizarse con mucha precaución ya que cerca del 90% de las cepas de *E. coli* son lactosa positiva y el restante es lactosa negativa (Murray, 1998).

### 1.2.2. Estructura antigénica

En ciertas especies de las enterobacterias, las características antigénicas desempeñan un papel importante en la epidemiología y en la clasificación. Los principales componentes antigénicos de la célula bacteriana son: antígeno O, antígeno H y antígeno K, los cuales son utilizados para la tipificación serológica de las cepas (Wolfgang *et al.*, 1992; Rodríguez, 2002).

#### a) Antígenos capsulares

Los antígenos K o capsulares son polisacáridos que se encuentran en algunos géneros como *Klebsiella*, que permite tipificar a las cepas mediante una reacción quelante. El antígeno K, puede bloquear la reacción del antígeno O y para evitar este efecto, se realiza el calentamiento de la cepa (Rodríguez, 2002).

### b) Antígeno flagelar

Los antígenos H o flagelares, son proteínas que presentan variaciones antigénicas que permiten la serotipificación de las cepas (Rodríguez, 2002).

### c) Antígeno somático

Los antígenos O o somáticos, son lipopolisacáridos de la pared celular y esta compuesto de tres regiones diferentes 1) el lípido A hidrofóbico, 2) el polisacárido central y 3) el antígeno O hidrofílico o polisacárido específico. En lo que respecta a la membrana exterior, la porción lípido A de la molécula esta embebida en la hoja exterior y el antígeno O se extiende en dirección distal desde la superficie de la membrana. Es así, que la porción hidrofóbica de la molécula ocupa el lugar de los fosfolípidos en la hoja exterior de la bicapa de la membrana (Rodríguez, 2002).

Esta porción de la molécula de LPS consiste de un disacárido glucosamina, cuyos grupos hidroxilos están esterificados con ácidos grasos B-hidroxilo. A la vez, esta se encuentra unida a un trisacárido del ácido 2 ceto-3desoxioctonoico (KDO), un azúcar de 8 carbonos exclusivos del LPS y presente solo en los procariotas gramnegativos. El polisacárido central externo une la región del lípido A al polisacárido antígeno O, el antígeno O esta formada por unidades repetidas de tetrasacáridos o pentasacárido y estas unidades repetidas presentan mucha variación que permite realizar la serotipificación de las especies gram negativas (Rodríguez, 2002).

### **1.2.3. Patogénesis.**

Entre los factores de virulencia más importantes de las enterobacterias se encuentran: endotoxinas, cápsulas, variación de la fase antigénica, producción de exotoxina y expresión de factores de adherencia.

### **1.2.3.1. Endotoxinas**

La porción lipopolisacárida de la pared celular se denomina endotoxina, es un factor de virulencia compartido por todas las bacterias aerobias y anaerobias gram negativas. La toxicidad reside en el lípido A, del lipopolisacárido que es liberado cuando la célula muere y experimenta lisis. Muchas de las manifestaciones sistémicas se deben a la infección por bacterias gram negativas que liberan endotoxina y provocan una variedad de efectos como fiebre, shock, alteraciones leucocitarias y alteraciones en la respuesta del huésped a la infección (Nataro *et al.*, 1998).

### **1.2.3.2. Cápsula**

Las enterobacterias encapsuladas son protegidas de la fagocitosis, puesto que los antígenos capsulares hidrofílicos, repelen la superficie hidrofóbica de las células fagocíticas. Asimismo, los antígenos capsulares tienen poca capacidad inmunogénica y de activación del complemento. Sin embargo, cuando se desarrollan anticuerpos anticapsulares específicos, disminuye el valor protector de la cápsula (Nataro *et al.*, 1998).

### **1.2.3.3. Variación de la fase antigénica**

La expresión del antígeno capsular K y flagelar H se encuentra bajo control genético. Todos esos antígenos se pueden expresar de forma alternativa (variación de fase), lo que protege a la bacteria de la respuesta inmune (Rodríguez, 2002).

### **1.2.3.4. Producción de exotoxinas**

Se han identificado varias toxinas, entre las que se incluyen las enterotoxinas termoestable, termolábil, Shiga y por último las verotoxinas que producen un efecto citopático pronunciado en los cultivos tisulares (Kenneth, 1997). La toxina termoestable es una proteína de bajo peso molecular con numerosos enlaces disulfuro que le proporcionan estabilidad frente al calor. Esta toxina estimula una diarrea secretora al aumentar la actividad de la guanilato ciclasa (Nuria, 1996).

La toxina Shiga es neurotóxica y citotóxica en modelos animales (Nataro *et al.*, 1998).

#### **1.2.3.5. Expresión de Factores de adherencia**

La adherencia de las bacterias a las células huésped está mediada por fimbrias. La mayoría de las enterobacterias expresan fimbrias comunes de tipo I, capaces de unirse a diversas células huésped. Los antígenos factores de colonización son fimbrias que pueden ser de diferentes tipos (CFA/I, CFA/II, CFA/III y CFA/IV), que se encuentran en cepas de *E. coli enterotoxigenicas* causantes de gastroenteritis (Rudin, 1996; Wolf, 1997).

#### **1.2.4. Diagnóstico**

Los miembros de la familia Enterobacteriaceae crecen con facilidad en medios de cultivos. La morfología de las colonias en medios sólidos, son relativamente grandes, de color gris, opacos y secas en agar sangre. La hemólisis en agar sangre es variable y no distintiva. Sin embargo, la diferenciación de las enterobacterias se basa principalmente en la presencia o ausencia de diferentes enzimas codificadas por el material genético de los cromosomas bacterianos (Rodríguez, 2002).

Para la identificación definitiva se requiere realizar pruebas bioquímicas como la fermentación de azúcares. Los sustratos con los cuales reaccionan estas enzimas son incorporados al medio de cultivo, junto con indicadores de pH, observándose cambios de color a medida que se forman los productos ácidos. Las pruebas bioquímicas más utilizadas son: Hierro tres azúcares (TSI), Agar hierro lisina (LIA), Citrato Simmons, Indol hierro motilidad (SIM), Urea, Rojo de metilo (RM), Voges Proskauer (VP) y Fenil alanina (Koneman, 1999).

### 1.2.5. Antibiograma

La identificación de un microorganismo que ha sido recuperado de un espécimen clínico, debe tener en cuenta las dos piezas de información más importantes para un clínico (Koneman, 1999).

- a) Si existe un agente infeccioso presente
- b) Que antimicrobiano brindara tratamiento adecuado.

En la mayor parte de las situaciones, una prueba de difusión en discos o en caldo es adecuada para guiar el tratamiento clínico. Se debe tomar en cuenta las siguientes facetas normatizadas para la prueba de susceptibilidad de Kirby-Bauer

1) Medio de crecimiento: El agar Mueller Hinton ha sido seleccionado para las pruebas de aislamiento porque promueve el desarrollo de la mayoría de los aislamientos bacterianos clínicamente significativos. Lo importante es la composición del agar que se puede controlar más uniformemente de una partida a otra, de manera que los microorganismos utilizados para las pruebas de control de calidad dan virtualmente idéntica reactividad de un lote de medio de cultivo al siguiente. Es importante que el medio alcance en la placa un espesor uniforme de 4mm, porque si el espesor es mayor a 4mm, se produce una mayor difusión del antibiótico hacia abajo con tendencia a estrechar las zonas de inhibición (Koneman, 1999).

2) Inoculo: Se debe controlar la concentración bacteriana en el inóculo, se pueden producir significativas variaciones en las zonas de inhibición microbiana.

3) Discos: En el método de Kirby-Bauer se utilizan los discos de “alto poder”, la concentración de antibióticos en el disco debe ser lo suficientemente grande como para producir una difusión homogénea y fácilmente reproducible (Koneman, 1999).

### **1.3. *Escherichia coli***

El género *Escherichia* presenta 5 especies y una de ellas es *Escherichia coli* la más aislada en los laboratorios clínicos. *E. coli* ocupa una posición única entre los bacilos entéricos oportunistas ya que ciertas cepas son capaces de causar enfermedades intestinales primarias así como infección extraintestinal. *E. coli* crece en muchos medios de cultivos comúnmente utilizados, son móviles, fermentan la lactosa y producen gas por fermentación de glucosa (Murray, 1999).

En base a su mecanismo de patogenicidad y cuadro clínico, las cepas de *Escherichia coli* causantes de diarrea se clasifican en 6 categorías: *Escherichia coli* enterotoxigena (ETEC), *Escherichia coli* enteroinvasiva (EIEC), *Escherichia coli* enteropatogénica (EPEC), *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC), *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC) y *Escherichia coli* de adherencia difusa (DAEC), cuyas características se describen en la tabla 1 (Rodríguez, 2002).

#### **1.3.1. *Escherichia coli* Enteropatogénica (EPEC)**

*Escherichia coli* Enteropatogénica es una categoría importante de las *E. coli* Diarreogénicas, que está asociada con la diarrea infantil en países en desarrollo. La infección por EPEC, es una enfermedad que se presenta en niños menores de 2 años y con mayor frecuencia en los niños menores a 6 meses (Nataro *et al.*, 1998). Se han presentado casos de brotes epidémicos en adultos debido a un inóculo grande a partir de una fuente común. También se presentaron casos en adultos inmunológicamente comprometidos, principalmente de edad avanzada (Cravioto, 1992).

##### **1.3.1.1 Consideraciones clínicas**

EPEC produce una diarrea líquida, la fiebre y los vómitos son síntomas comunes de la infección. Biopsias realizadas del intestino delgado proximal, muestran bacterias fuertemente adheridas a las células epiteliales, esta es una de las características de la clásica lesión histopatológica de adherencia y esfacelamiento (E/A), lo cual está asociado con la mala absorción de nutrientes (Nataro *et al.*, 1998).

TABLA 1. Características de los grupos de *Escherichia coli* causantes de diarrea

GRUPO	LUGAR DE ACCION	ENFERMEDAD	FACTORES DE PATOGENICIDAD
ETEC	Intestino delgado	Diarrea del viajero, diarrea infantil en países subdesarrollados, diarrea acuosa, retorcijones y nauseas	Enterotoxina termoestable y/o termolabil CFA
EIEC	Intestino grueso	Diarrea acuosa, seguido por cuadros disentérico con heces sanguinolentas escasas	Invasión y destrucción de las células epiteliales. Plásmido de 140 MDa.
EPEC	Intestino delgado	Diarrea infantil con fiebre, nauseas, heces sin sangre	Adherencia, esfacelamiento y destrucción de las células epiteliales BFP EAE de 50 – 70 MDa.
EHEC	Intestino grueso	Colitis hemorragica con retorsijones intensos, diarrea acuosa al principio seguido por heces teñido por sangre, síndrome hemolítico uremico	Daño por toxinas de células endoteliales vasculares, verotoxinas Adherencia y esfacelamiento
EAEC	Intestino delgado	Diarrea infantil persistente a veces teñida con sangre, fiebre ligera	Adherencia agregativa mediada por plásmido 60 Mda. Fimbria AAFI y II EASTI Proteína Pet y Pic
DAEC	Intestino delgado	Diarrea infantil en niños de 1 a 5 años de edad	Adherencia difusa sin formar microcolonias ni agrupaciones. Fimbria F1815 OMP

CFA = Antígeno factor de colonización

BFP = Pili con forma rizada

EAE = Adherencia esfacelamiento de EPEC

OMP = Proteína de la membrana externa

EAST = toxina ST de cepas enteroagregativas

Fuente: Rodríguez, 2002

### 1.3.1.2 Mecanismos de patogenicidad de EPEC

*Escherichia coli* enteropatogénica produce infección debido a su capacidad de adherencia histopatológica, la cual se puede observar en biopsias intestinales de pacientes o animales infectados y puede reproducirse en cultivos celulares. También se reportó que el 80% de las cepas EPEC forman microcolonias en cultivos de células Hep-2, característica que no se observa en las otras categorías patogénicas de *E. coli* asociadas a la producción de diarrea (Cravioto, 1992).

En necropsias realizadas del intestino delgado de niños muertos a consecuencia de diarrea de cuyas heces se aislaron EPEC, se encontraron alteraciones histológicas importantes entre las que predominaba la inflamación aguda de grandes porciones del intestino delgado, así como el adelgazamiento de la mucosa intestinal (Gravioto, 1992). Investigaciones posteriores, incluyendo estudios con microscopía electrónica, revelaron que las cepas EPEC se encontraban adheridas a la membrana del enterocito de manera íntima con destrucción importante de las microvellosidades intestinales y esta adherencia presenta dos fases: a) Una inicial mediada por adhesinas de tipo fimbrial que permiten a la bacteria acercarse a sus receptores celulares, b) una segunda de adherencia íntima, la cual se relaciona con el esfoliamento del epitelio, la pérdida de las microvellosidades y la formación de un pedestal (Gravioto, 1992; Nataro *et al.*, 1998).

La fase íntima de adherencia, se ha relacionado con la expresión de una proteína de 94 kilodaltons (Kda) denominada intimina, cuya expresión está controlada genéticamente por un locus en el cromosoma de la bacteria denominada *eaeA* y *eaeB*. Para la expresión de este locus se requiere que estén presentes ciertos genes en el plásmido, que poseen información que codifica la adherencia localizada y la producción de haces de fimbrias en las cepas EPEC, además, este proceso de adherencia íntima da lugar a que en las células epiteliales se acumule actina, talina y serina, lo cual refleja los cambios intracelulares importantes (Nataro *et al.*, 1998).

Las alteraciones ultraestructurales observadas en las células epiteliales infectadas por las cepas EPEC, se deben a la fosforilación de las proteínas que conducen a la elevación del calcio intracelular, a través del sistema proteína-Kinasa C, lo cual da lugar a un incremento de la salida del agua, cloro y potasio. Este incremento de la secreción en conjunto con la disminución de la capacidad de absorción del intestino, por falta de las microvelocidades da lugar a la diarrea secretora aguda (Gravioto, 1992; Nataro *et al.*, 1998; Rodríguez, 2002).

El proceso de adherencia íntima entre la bacteria y la membrana de las células epiteliales, seguida de la destrucción de las microvelocidades con alteración del citoesqueleto en el sitio de unión de la bacteria, ha sido denominado adherencia y esfacelamiento (A/E). Los cambios celulares ocasionados en la fase de adherencia íntima se han podido evidenciar mediante un sistema de marcaje fluorescente de faloidina y actina (FASD), que ha permitido medir los acumulos de actina polimerizada asociada con lesiones de adherencia y esfacelamiento (Cravioto, 1992; Nataro *et al.*, 1998).

#### **1.3.1.3. Etapas de patogénesis de EPEC**

1) Adherencia localizada.- La habilidad de EPEC de adherirse a las células Hep-2 depende de la presencia de un plásmido de 60 Mda llamado plásmido del factor de adherencia (EAF) (Nataro *et al.*, 1998). La identidad de este factor fue elucidado por Girón en 1991, al describir una fimbria de 7nm de diámetro producido por EPEC y que permitía la agregación por formación de lazos, sugiriendo el termino "bundle-forming pilus" (BFP). Esta fimbria se produce solo en determinadas condiciones de cultivo y esta involucrada en la adherencia entre bacterias (Girón *et al.*, 1991; Nataro *et al.*, 1998).

2) Transducción de señal.- La adherencia de EPEC a las células epiteliales induce una gama de vías de transducción de señales en las células eucariotas. Los genes bacterianos responsables para dicha actividad se hallan codificadas en una isla de patogenicidad de 35 Kb denominada locus de borrado del enterocito (LEE), que codifica un sistema de secreción de tipo III, múltiples proteínas y una proteína de adherencia denominada intimina. Estos factores por si solos no pueden

desencadenar el proceso patogénico, requieren de la adherencia de las bacterias a las células epiteliales (Nataro *et al.*, 1998; Reid, 1999).

La adherencia de EPEC a las células epiteliales se da por la fosforilación de los residuos de serina y treonina de varias proteínas de la célula epitelial, la más importante la cadena ligera de miosina. También se ha observado la activación de dos kinasas, la protein-kinasa C (PKC) que induce los cambios rápidos en la secreción de agua y electrolitos y la activación de la kinasa de la cadena ligera de miosina, su fosforilación induce a un incremento de la permeabilidad de las uniones fuertes, sugiriendo un mecanismo adicional a la diarrea causada por EPEC (Nataro *et al.*, 1998 ; Xiangjun *et al.*, 2000).

El blanco principal de la fosforilación de residuos de tirosina, es una proteína denominada Hp 90, insertada en la membrana celular. Estas proteínas son parte de la lesión y su distribución está restringida a un área inmediatamente por debajo de la bacteria en el extremo del pedestal. La proteína Hp 90 sirve como receptor de la adhesina intimina, por lo tanto, la transducción de señal en las células epiteliales activa la unión al receptor, así como los cambios del citoesqueleto. Esta proteína Hp 90 es una proteína bacteriana denominada Tir (receptor translocado de la intimina). La traducción de señal en respuesta a EPEC también incluye la migración de leucocitos polimorfo nucleares (Nataro *et al.*, 1998; Humbert *et al.*, 2000).

#### **1.3.1.4. Proteínas secretadas**

Por lo menos 4 proteínas Esp son secretadas por EPEC y 3 de ellas son necesarias para la lesión de adherencia y esfacelamiento: Esp A (25 Kda), Esp B (38 Kda), Esp D (40 Kda) y aun no se conoce la función de Esp C (110 Kda). Por otra parte, EPEC posee un sistema de secreción de proteínas de tipo III similar al hallado en otros patógenos gram negativos. Es así que EPEC posee un sistema de secreción de proteínas especializada que es necesario para la translocación de proteínas críticas desde el citoplasma bacteriano al medio externo (Mecenas, 1996; Nataro *et al.*, 1998).

### **1.3.1.5. Otros factores de virulencia**

1) Otras fimbrias.- La fimbria BFP no es la única fimbria involucrada en el proceso de adherencia localizada. Varias estructuras similares a fimbrias parecen ligar las bacterias con las células epiteliales, mientras que las estructuras del tipo BFP están involucradas esencialmente en las interacciones bacteria-bacteria (Nataro *et al.*, 1998).

2) EAST 1.- Esta toxina es producida por algunas cepas de EPEC y se desconoce su papel en la patogénesis de esta bacteria.

3) Invasión.- EPEC puede invadir varias líneas de células epiteliales, pero EPEC no puede multiplicarse intracelularmente, ni escapar de la vacuola endocítica. No causa síndromes parecidos a la disentería, así que la importancia de este fenómeno no está claro (Nataro *et al.*, 1998).

### **1.3.1.6. Mecanismo de transmisión de EPEC**

El ingreso de estos microorganismos al nuevo huésped se realiza por vía oral y el desarrollo o no de un cuadro clínico va a depender de los mecanismos de defensa relacionados a la inmunidad del huésped, de la dosis del inóculo y de los factores de patogenicidad de la bacteria (Cravioto, 1992).

Ha sido observado que tanto el personal de salud encargado del cuidado de los niños en cuneros, como los miembros de la familia pueden excretar los serotipos de EPEC, involucrados en los brotes epidémicos sin haber presentado manifestaciones clínicas. En el ambiente hospitalario se considera que es posible la transmisión de los microorganismos por polvo y/o fomites. En virtud de la asociación de sintomatología respiratoria observada en casos de diarrea, cuya etiología se ha relacionado con cepas EPEC, se plantea que esta vía pueda tener un papel importante en la transmisión del microorganismo. Cepas de *E.coli* aisladas de muestras de aire y suelos intra y extradomiciliarios y analizadas por serología mostraron en un total de 113 aislamientos que 32 cepas pertenecían a diferentes serogrupos de EPEC, lo cual confirma la posibilidad de que las corrientes de aire

jueguen un papel importante en la transmisión de este microorganismo (Gravioto, 1992).

#### **1.3.1.7. Epidemiología**

En la actualidad los casos de diarrea por cepas EPEC en cuneros de países industrializados son muy poco frecuentes. Por el contrario, en los países en desarrollo, la prevalencia de diarrea por EPEC sigue siendo muy alta, puede ocasionar brotes o casos aislados de diarrea (Humbert et al., 2000; Torres et al., 2001; Cortes-Ortiz et al., 2002). Esta categoría patogénica afecta principalmente a niños menores a 6 meses y a los de 2 años. También puede aislarse de adultos enfermos y sanos especialmente cuando hay un factor predisponente (Rodríguez et al., 2002).

La época del año probablemente no influye sobre las tasas de incidencia, pues hay reportes contradictorios al respecto, no obstante, se considera que su mayor frecuencia puede ser en verano (Kenneth, 1997).

#### **1.3.1.8. Inmunidad contra EPEC**

La inmunidad natural desempeña un importante papel en la protección contra las infecciones por *E.coli*. Es importante destacar que en las comunidades donde perdura la leche materna como única forma de alimentación infantil, la incidencia de diarrea es baja en comparación con aquellas en las que se ha sustituido ésta por leche artificial, esto está probablemente asociado a los riesgos de contaminación fecal (Lilius *et al.*, 2001).

Al analizar la capacidad protectora del calostro y de la leche materna contra infecciones intestinales producidas por las cepas EPEC, se observó una respuesta específica de Ig A secretora en ambos productos obtenidos de mujeres, contra la adhesina de 94 Kda producida por las cepas de EPEC. Al realizar un ensayo de neutralización en la prueba de adherencia en células Hep-2 empleando la misma Ig A se observó que esta se inhibía. Al analizar las muestras de leche de las mujeres se encontró que contienen pentasacáridos y moléculas de lactosa con dos residuos

de fucosa, los cuales también inhiben la adherencia localizada de cepas EPEC (Cravioto, 1992; Lilius *et al.*, 2001).

#### **1.3.1.9. Vacunas**

Se ha iniciado el desarrollo de vacunas que pueden ser útiles para el control de la diarrea asociada a infecciones por dichos microorganismos. Se han utilizado cepas como O111:H2 y otras a las que se les indujo la mutación en el gen gal E, con lo cual se obtuvieron cepas deficientes en la producción de galactosa uridin 5 difosfato epimerasa. Dichas mutantes conservan la capacidad para adherirse en forma localizada pero no llegan a producir la lesión de adherencia y esfacelamiento en el intestino de conejos (Nataro *et al.*, 1998).

En estudios posteriores se inoculó a voluntarios grandes dosis de dichas mutantes, confirmaron la capacidad de colonizar el intestino de dichos individuos durante un periodo de 10 días, medido esto por la identificación de la bacteria en las heces de los voluntarios durante ese tiempo. Al medir la respuesta inmune de los individuos se encontró que tenían anticuerpos contra el antígeno O de la bacteria con la que fueron desafiados y contra la proteína de 94 Kda (relacionada con la adherencia íntima de la bacteria). La posibilidad de incrementar selectivamente la presencia de anticuerpos específicos en la leche materna contra cepas EPEC o sus adhesinas, por medio de la inoculación oral en mujeres embarazadas con las mutantes del tipo antes descritos, abre una opción más segura para la protección específica contra la diarrea en niños pequeños (Cravioto, 1992).

#### **1.3.2. *Escherichia coli* Enteroinvasiva (EIEC)**

Las cepas de *Escherichia coli* enteroinvasivas fueron una de las primeras cepas mostradas, capaces de causar diarrea en estudios con voluntarios. Es un agente causal de la disentería bacilar (Du Pont *et al.*, 1971). Las cepas de EIEC comparten propiedades bioquímicas, genéticas y están patogenicamente relacionadas con las cepas de *Shigella spp* ya que son decarboxilasa negativas, no móviles y lactosa negativa (Rodríguez *et al.*, 2002). Ambas especies portan un

plásmido de 120 a 140 Mda asociado a la virulencia y cuya expresión es regulada por genes plasmidicos y cromosomales (Casalino *et al.*, 1991).

### **1.3.2.1. Mecanismo de patogenicidad de EIEC**

El mecanismo de patogenicidad de *E.coli* enteroinvasiva es la invasión del epitelio del colon; para ello el primer paso es la adherencia de la bacteria a las vellosidades de la mucosa requiriendo de mucinasa y adhesinas, para después entrar por endocitosis a la célula y la posterior multiplicación de EIEC dentro de la célula y diseminación a células sanas adyacentes alterando el funcionamiento de estas hasta provocar su muerte (Rico-Martinez, 1995; Nataro *et al.*, 1998), permanecen localizadas dentro de las células epiteliales llegando a la lamina propia pero no lo atraviesan, como resultado de ello se produce una fuerte respuesta inflamatoria (Bennish, 1990).

### **1.3.2.2. Patogénesis**

El esquema patogénico preciso de *E.coli* enteroinvasiva aun no ha sido dilucidado, sin embargo, los estudios de la patogénesis de EIEC sugieren que sus características patogénicas son virtualmente idénticas a los de *Shigella spp.* Ambos microorganismos invaden las células epiteliales, un fenotipo mediado por plásmido y loci cromosomal. Además, ambos EIEC y *Shigella* elaboran uno o más enterotoxinas que juegan un rol importantes en la patogénesis de la diarrea (Nataro *et al.*, 1998). La invasión de las células epiteliales y la destrucción de la mucosa, produce fiebre, toxemia, disentería (heces que contienen sangre y moco) (Nataro *et al.*, 1998).

La invasión de las cepas EIEC esta dada por una serie de pasos.

- 1) Penetración a las células epiteliales
- 2) Lisis de las vacuolas endocitadas
- 3) Multiplicación intracelular
- 4) Movimiento direccional a través del citoplasma
- 5) Extensión dentro de las células adyacentes

El gen responsable para la invasión se encuentra en un plásmido de 140 MDa llamado *pInV*, que codifica para proteínas, como por ejemplo las Ipa y otras que están involucradas en el proceso de patogénesis (Halet *et al.*, 1983; Eslava *et al.*, 1994; Sethabutr *et al.*, 2000). El sistema de secreción tipo III es utilizada para la secreción de múltiples proteínas las cuales son necesarias para la completa patogénesis. Las proteínas Ipa (IpaA a IpaD) son proteínas secretadas por este sistema, de las cuales IpaB, IpaC y IpaD son efectores de la invasión fenotípica. Mientras que, Ipa B tiene función de lisis de las vacuolas fagocitadas y en la inducción de apoptosis en macrófagos (Nataro *et al.*, 1998).

La infección por EIEC se caracteriza por un periodo de diarrea acuosa precedida por un set de escasa disentería heces que contienen sangre y mucus. Se ha clonado y secuenciado un plásmido de EIEC (designado *sen*), el cual codifica una nueva proteína con un tamaño predictivo de 63 Kda. Una mutación en el gen *sen* causa una significativa disminución de la actividad enterotoxigenica de las cepas. El rol de la enterotoxina no esta probada, pero su presencia puede explicar la característica de la diarrea acuosa atribuido a EIEC (Nataro *et al.*, 1998).

#### **1.3.2.3. Mecanismo de transmisión de EIEC**

Se observa casos esporádicos de infección por cepas EIEC. El mecanismo de transmisión es a través de alimentos o aguas contaminadas con heces fecales, el contagio de persona a persona ocurre con menor frecuencia. La dosis de infección de EIEC en voluntarios es elevado. La incidencia de EIEC se piensa que es baja pero por la contaminación de alimentos se presentan casos esporádicos, elevando el índice de infección por EIEC (Nataro *et al.*, 1998).

#### **1.3.2.4. Epidemiología**

En muchos estudios epidemiológicos de EIEC se describen brotes. En los casos esporádicos, muchas cepas EIEC son probablemente identificadas erróneamente como *Shigella* o cepas de *E. coli* no patogenicas. Endémicas esporádicas enfermedades ocurren en algunas áreas, generalmente donde *Shigella* spp es también prevalente, pero las características epidemiológicas pueden ser

diferentes a los de *Shigella* spp (Qadri *et al.*, 1988; Nataro *et al.*, 1998). La incidencia de EIEC en países desarrollados se piensa que es baja, pero ocasionalmente brotes por alimentos pueden ocurrir (Nataro *et al.*, 1998).

### 1.3.3. Métodos de Diagnostico

Existen varios métodos para la identificación de las diferentes categorías de *E. coli* patogénicas, entre ellos la serotipificación, ELISA y las técnicas moleculares como el PCR y las Sondas de hibridación.

#### 1.3.3.1. Método Inmunológico (Test de aglutinación)

La clasificación serologica de *E. coli* se basa en tres tipos principales de antígenos: Antígeno O somático, antígeno K capsular, antígeno H flagelar. Los antígeno O específicos existen en todos los géneros, aunque resultan comunes las reacciones cruzadas entre géneros íntimamente relacionados (*Escherichia coli* y *Shigella*). En *E.coli* se conocen 176 variantes de antígenos somáticos, los cuales se detectan mediante aglutinación con antisueros específicos (Rodríguez, 2002).

Los antígenos K capsulares, pueden interferir con la detección de los antígenos O, lo que hace necesario su eliminación mediante ebullición. Los antígenos K son compartidos por diferentes gérmenes, tanto dentro como fuera de la familia Enterobacteriaceae (*E. coli* K1 da reacción cruzada con *Neisseria meningitidis* y *H. Influenzae*), en *E.coli* se conocen 60 antígenos capsulares. Los antígenos H son proteínas flagelares termolabiles y en *E.coli* se conocen 112 antígenos flagelares. La clasificación serologica de los aislados de *Escherichia coli* tiene utilidad para fines epidemiológicos, por lo que ciertos serotipos se asocian a propiedades de virulencia y los serogrupos más comunes se muestran en la tabla 2 (Comba, 1998). La aglutinación es una técnica de inmunología que comprende: aglutinación, floculación y precipitación, esta reacción se puede visualizar mediante microscopio o visualización directa. En este tipo de reacción se presenta con frecuencia el fenómeno de prozona, esto debido a la inhibición de la reacción por exceso de anticuerpos (Boehringer, 1985).

Tabla 2. Serotipos y Serogrupos mas comunes de *Escherichia coli* causantes de diarrea.

ETEC	EIEC	EPEC	EAEC	STEC	STEC
O6:H16	O28ac:H-	O18	O3:H2	O1:H1	O21:H5
O6:H-	O29:H-	O26:H-	O15:H18	O1:H2	O22:H-
O8:H-	O112ac:H-	O26:H11	O44:H18	O1:H20	O22:H1
O11:H27	O124:H-	O55:H-	O77:H18	O1:HNT	O22:H8
O15:H11	O124:H7	O55:H6	O86:H-	O2:H1	O22:H40
O20:H-	O124:H30	O55:H7	O111:H21	O2:H2:K1	O23:H7
O25:H-	O135:H-	O86:H-	O127:H2	O2:H6	O23:H16
O27:H-	O143:H-	O86:H34	ONT:H10	O2:H7	O25:H-
O27:H7	O144:H-	O111:H-		O2:H27	O25:H11
O27:H20	O152:H-	O111alx:H2		O4:H40	O26:H-
O80	O167:H5	O119:H6		O5:H-	O26:H2
O85:H7		O125ac:H21		O5:H16	O26:H8
O114:H21		O126:H-		O6:H-	O26:H11
O126:H9		O126:H2		O6:H1	O26:H21
O128ac:H27		O126:H27		O6:H29	O26:H32
O139		O127:H21		O8:H-	O27:H-
O148:H28		O128alx:H2		O8:H14	O39:H4
O149:H4		O128:H12		O8:H21	O39:H8
O149:H10		O142:H6		O9ab:H-	O45:H-
O153:H45		O158:H23		O11:H49	O45:H2
O159:H				O14:H-	O45:H7
O159:H4				O15:H-	O50:H-
O159:H20				O15:H25	O55:H-
O166:H27				O16:H-	O55:H6
O167:H5				O16:H6	O55:H7
O169:H41				O17:H18	O55:H10
O173:H-				O18:H-	O55:H?
				O18:H?	O60:H-
				O20:H7	O65:H16
					O70:H11
					O73:H34
					O75:H-
					O75:H5
					O76:H19
					O79:H7
					O80:H-
					O82:H8
					O83:H1
					O84:H2
					O85:H10
					O85:H23
					O56:H10
					O88:H-
					O91;H-

### 1.3.3.2. Reacción en Cadena de la polimerasa (PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa es una técnica de amplificación *“in vitro”* de segmentos definidos del DNA. Esta técnica comprende tres pasos: desnaturalización del DNA, hibridación (unión del primers al DNA blanco) y la extensión por la acción de una DNA polimerasa (Figura 1) (Rangel, 2000).

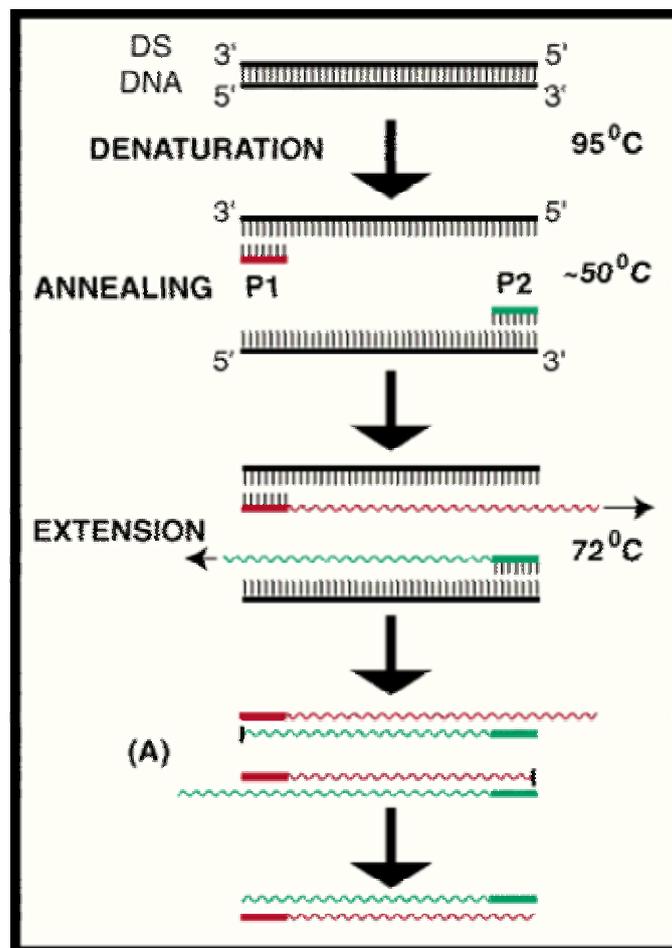


FIGURA 1. Representación esquemática de la técnica de PCR.

Los reactivos que se utilizan para la amplificación por PCR son: Taq Polimerasa, Primers de oligonucleotidos, nucleotidos trifosfato (dNTPs), buffer y cloruro de magnesio (Sean, 1999). La cantidad del producto se duplica con cada ciclo, por lo que se van acumulando de forma exponencial. Al cabo de 30 ciclos, habrán 270 millones de copias (Sean, 1999). La sensibilidad analítica del PCR es superior, solo se requiere una molécula blanco para ser detectada. La sensibilidad que alcanza es del 70% cuando se tiene una molécula blanco y del 99,99% cuando se tiene 10 moléculas blanco. En la actualidad por medio de la amplificación de ácido nucleicos es posible detectar más de 50 bacterias patógenas y numerosos virus (Nataro *et al.*, 1998).

### **1.3.3.3. Ensayo de la fijación del rojo congo**

Un marcador fenotipico facil de ser identificado y que sirve para diferenciar cepas virulentas de avirulentas es la capacidad de fijación del rojo congo. La habilidad de las cepas de *Escherichia coli enteroinvasiva* de fijar el rojo congo, esta asociada con la virulencia determinada por la presencia del plásmido de 140 -120 Mda. (Chihiro *et al.*, 1986). La conversión de un microorganismo virulento en avirulento esta usualmente acompañada por la pérdida o delección de este plásmido (Sasakawa *et al.*, 1986; Stugard *et al.*, 1989). Por otra parte, fue identificada una proteina de 101 kilodaltons como responsable de la fijación de este pigmento por Stugard *et al.*, quienes encontraron que la expresión de la misma esta regulada por la temperatura (Stugard *et al.*, 1989). También se han realizado extensos estudios sobre la envoltura externa de estos patógenos, donde las cepas virulentas son mas hidrofobicas que las cepas avirulentas (kabir *et al.*, 1983; Rozgonyi *et al.*, 1985; Seltmann *et al.*, 1986). La capacidad de fijar el rojo congo y de absorber la hemina a la superficie celular está correlacionada con la virulencia de *Shigella* y EIEC.

El ensayo consiste en sembrar las bacterias sobre medio agar nutritivo conteniendo rojo congo. Las cepas virulentas formaran colonias rojas, mientras que las formas avirulentas aparecerán como colonias blancas (Sankaran *et al.*, 1989).

### **1.3.4. Pruebas Diagnosticas**

Pasos en la planificación de un estudio sobre una prueba de diagnostico.

- Primero: Determinar si existe necesidad de una nueva prueba
- Segundo: Describir la forma de selección de individuos
- Tercero: Disponer de un patrón de referencia, para comparar los resultados de la prueba asegurándose de que la prueba diagnostica como el estándar primario podrán aplicarse a todos los individuos que participen en el estudio.
- Cuarto: Se debe asegurar que la prueba diagnostica y el estándar, otorguen aplicabilidad en todos los individuos de forma estandarizada.
- Quinto: Estimar tamaño de muestra, necesario para obtener limites de confianza del 95% razonablemente precisos.
- Sexto: Se deben encontrar el número de individuos que satisfagan las especificaciones de tamaño de la muestra y los criterios de muestreo.
- Séptimo: Los resultados del estudio se debe comunicar en términos de sensibilidad y especificidad, así notificar los valores positivos y negativos de la prueba respecto a distintas probabilidades previas de la enfermedad (Hulley, 1985).

#### **1.3.4.1 Sensibilidad y especificidad**

Al evaluar una prueba diagnostica pueden darse cuatro situaciones:

- Un resultado verdadero positivo (VP), cuando la prueba es positiva y el paciente tiene la enfermedad.
- Un resultado falsamente positivo (FP), cuando la prueba es positiva pero el paciente no tiene la enfermedad
- Un resultado verdadero negativo (VN), cuando la prueba es negativa y el paciente no tiene la enfermedad.
- Un resultado falsamente negativo (FN), cuando la prueba es negativa pero el paciente no tiene la enfermedad.

### 1.3.4.2 Sensibilidad del diagnostico

La sensibilidad del diagnostico de un método se refiere al porcentaje de resultados positivos producido por un método de laboratorio en individuos que poseen una enfermedad determinada y puede calcularse mediante la siguiente formula:

$$\text{Sensibilidad} = \frac{\text{Verdaderos positivos}}{\text{Verdaderos positivos} + \text{Falsos negativos}} \times 100$$

### 1.3.4.3. Especificidad del diagnostico

La especificidad diagnostica de un método es el porcentaje de resultados negativos producidos por una prueba de laboratorio en individuos en los cuales una enfermedad en particular está ausente, puede calcularse de la siguiente manera :

$$\text{Especificidad} = \frac{\text{Verdaderos negativos}}{\text{Verdaderos negativos} + \text{Falsos positivos}} \times 100$$

### 1.3.4.4. Eficiencia

La eficiencia se define como la capacidad de una prueba para detectar correctamente las muestras positivas y negativas, puede calcularse de la siguiente manera.

$$\text{Eficiencia} = \frac{\text{VP} + \text{VN}}{\text{VP} + \text{FP} + \text{VN} + \text{FN}} \times 100$$

### 1.3.4.5. Valores predictivos.

Los valores predictivos determinan la probabilidad de identificar acertadamente una muestra con una determinada prueba. Existen dos tipos de valor predictivo:

- Valor predictivo positivo (VPP), es la probabilidad que una muestra detectada como positiva sea realmente positiva, es decir que una muestra sea positiva y el paciente tenga realmente la enfermedad.

$$\text{Valor predictivo Positivo} = \frac{\text{Verdadero positivo}}{\text{Verdadero positivo} + \text{Falsos positivos}} \times 100$$

- Valor predictivo negativo (VFN), es la probabilidad que una muestra detectada como negativa sea realmente negativa, es decir que la muestra sea negativa y el paciente no tenga la enfermedad.

$$\text{Valor predictivo Negativo} = \frac{\text{Verdaderos negativos}}{\text{Verdaderos negativos} + \text{Falsos negativos}} \times 100$$

### 1.3.4.6. Pruebas de Concordancia.

Cuando se requiere la evaluación de diferentes métodos frente a un mismo panel de muestras de referencia, se usan estudios de concordancia:

- Índice de Kappa (K), es un test de concordancia que se basa en la comparación de índices de concordancia esperada (Pe) con los índices de concordancia observados (Po).

$$\text{Índice de Kappa (K)} = \frac{\text{Po} - \text{Pe}}{1 - \text{Pe}}$$

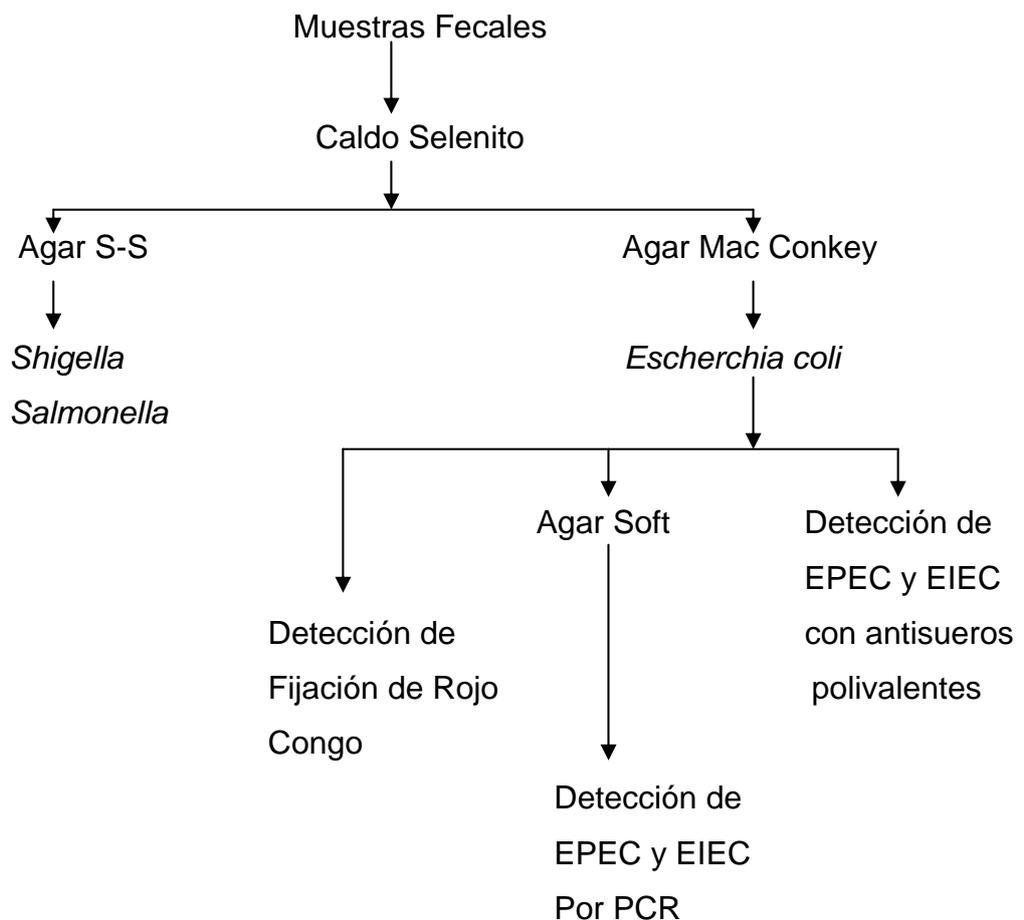
Este índice es el parámetro estadístico empleado con mayor frecuencia para medir la correspondencia entre dos observaciones (Dawson, 1993), se clasifica en 5 grupos distintos (Cura, 1994).

<b>CONCORDANCIA</b>	<b>INDICE DE KAPPA</b>
Deficiente	< a 0,20
Regular	0,21 a 0,40
Moderada	0,41 a 0,60
Buena	0,61 a 0,80
Muy Buena	0,81 a 1,00

## MATERIALES Y METODOS.

### 2.1. Población de estudio

La población en estudio esta constituida por pacientes menores a 15 años de edad. Las muestras fueron procedentes de pacientes internos y externos del hospital del niño, remitidos al laboratorio de Seladis (Instituto de Servicios de Laboratorio de Diagnostico e Investigación en Salud), para el análisis microbiológico, posteriormente se realizo el análisis con métodos moleculares (PCR), en el Laboratorio de Biología Molecular de la carrera de Biología, de acuerdo al siguiente esquema.



Esquema de trabajo del analisis de las muestras fecales de pacientes con diarrea.

## **2.2. Cepas de referencia**

Las características de las cepas de referencia utilizadas en este estudio se muestran en la Tabla 3. Todas estas cepas pertenecen a la Unidad de Biología Molecular (Universidad Mayor de San Andrés, Carrera de Biología).

## **2.3. Recolección de Muestras**

Las muestras de heces diarreicas fueron recolectadas en el periodo de 16-04-01 al 20-09-01. Solo una deposición de muestra fecal fue recolectada de cada niño, sin ningún agente preservante químico, en recipientes estériles y posteriormente las muestras fueron trasladadas inmediatamente al laboratorio donde fueron procesadas para el respectivo análisis microbiológico.

## **2.4. Procesamiento de las muestras**

Las muestras de heces fecales fueron enriquecidas en caldo selenito y posteriormente sembradas en medios selectivos (agar Mc Conkey y agar SS). La identificación microbiológica se realizó en base a las pruebas bioquímicas (fermentación de azúcares, producción de gas, formación de sulfuro de hidrógeno, motilidad, producción de indol a partir de triptofano, utilización de citrato y reducción de nitrato a nitrito).

TABLA 3. Cepas control de referencia utilizadas para la caracterización  
Geno-fenotípica de EPEC y EIEC

Cepa	Marcador	Aplicación
3B	gen <i>eae</i>	control positivo para EPEC
PS 2.5	gen <i>ial</i>	control positivo para EIEC
DAS 100	gen <i>lt</i> y <i>st</i>	control negativo para EPEC y EIEC
E- 47	gen <i>ial</i>	control positivo para EIEC
E- 49	gen <i>ial</i>	control positivo para EIEC

EPEC: *Escherichia coli* enteropatogenica

EIEC: *Escherichia coli* enteroinvasiva

## 2.5. Determinación de serogrupos de EPEC y EIEC con antisueros

Para la realización de esta prueba se hizo una suspensión de las bacterias en solución fisiológica, luego se colocó una gota de esta suspensión sobre un porta objetos, posteriormente se añadió una gota del antisuero polivalente (PROMICRO) específico para EPEC o EIEC (Tabla 4 y 5), después se mezcló cuidadosamente durante un minuto por agitación suave. La reacción se consideró positiva cuando se observó aglutinación con la formación de grumos visibles a simple vista y fue negativa cuando no hubo aglutinación, este procedimiento se realizó con cada uno de los antisueros polivalentes.

El criterio de selección del antisuero fue realizado en base a la edad del paciente, las muestras de niños menores a 2 años fueron analizadas con el kit de antisueros para EPEC, mientras que, las muestras de niños mayores a 2 fueron analizadas con el kit de antisueros para EIEC.

TABLA 4. Antisueros polivalentes (Kit PROMICRO) para la identificación de los serogrupos de EPEC

Antisueros	Serogrupos
Polivalente A	<i>E.coli</i> O26, O55, O111, O119
Polivalente B	<i>E.coli</i> O114, O125, O142
Polivalente C	<i>E.coli</i> O86, O126, O127, O 128

TABLA 5. Antisueros polivalentes (Kit PROMICRO) para la identificación de los serogrupos de EIEC.

Antisueros	Serogrupos
Polivalente A	<i>E.coli</i> O28, O29, O136, O144, O152
Polivalente B	<i>E.coli</i> O112, O124, O143, O164, O167

## 2.6. Fermentación del sorbitol

Para esta prueba se utilizaron placas de agar soya tripticasa con sorbitol, se tomaron 2 a 3 colonias de *E. coli*, que fueron inoculadas en estas placas e incubadas a 37°C por 24 horas, fueron consideradas como sorbitol positivo las colonias que crecieron en este medio y negativos los que no desarrollaron.

## **2.7. Análisis de fijación del rojo congo**

En este caso se prepararon placas de agar soya tripticasa con 0,3 % de rojo congo, luego se inocularon 2 a 3 colonias de *E. coli* e incubadas a 37°C durante 24 horas, terminado el periodo de incubación se realizó el análisis, fueron positivas las colonias que fueron capaces de fijar el rojo congo, presentando una pigmentación de color rojo y fueron negativas las colonias sin pigmentación.

## **2.8. Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR)**

Mediante la técnica de PCR se caracterizaron las cepas de EPEC y EIEC, los genes detectados, primers y las condiciones óptimas de reacción para el PCR, son presentados en la Tabla 6. Para la extracción del DNA se tomó un barrido de las colonias de *E.coli*, que fueron suspendidas en 0,2 ml de agua destilada estéril, luego se realizó una dilución 1/50, esto se llevó a 100°C por 15 min y a -20°C por 10 minutos para la lisis celular, esta suspensión fue utilizada para el PCR.

La mezcla de reacción se preparó para un volumen final de 20  $\mu$ l que contiene los primers a una concentración final de 0,3  $\mu$ M, los cuatro nucleótidos a una concentración final de 0,2 mM de cada uno de ellos, buffer al 1X, 0,02 unidades de tag polimerasa (Promega) y 10  $\mu$ l del DNA extraído de la muestra problema. La amplificación se llevó a cabo en un termociclador (modelo Hibay), el programa de amplificación fue establecido en función a las propiedades de los cebadores y a la longitud de los productos de amplificación, los cuales son mostrados en la Tabla 6.

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 con luz UV.

## **2.9. Evaluación Clínica**

El análisis se realizó mediante la determinación de la sensibilidad y especificidad de la técnica de Serología en base a la aplicación de fórmulas. Para el presente trabajo se empleó la técnica de PCR como prueba estándar.

TABLA 6. Condiciones de reacción para el PCR, genes detectados y primers utilizados.

Gen	Secuencia de primers	Tamaño del Amplicon	Condiciones de reacción (°C)			
EPEC <i>eae</i>	5'CGTTTGAAGAAGTTGCAACAG3' 5'CTAGATGTAACACTACAACACTAC 3'	860 pb	94° 2'30''	94°, 53°, 72° 1' 1'30''	72° 2'	10'
EIEC <i>lal</i>	5'GGAGGCCAACAATTATTTCC 3' 5'CATCTATTAGAATACCTGTG 3'	320 pb	94° 2'30''	94°, 50°, 72° 1' 1'30''	72° 2'	10'

## RESULTADOS

### 3.1.1. Distribución por género de la población analizada

En este estudio, se analizaron un total de 71 muestras de heces de pacientes menores a 15 años, cuyas muestras fueron recolectadas desde abril a septiembre del 2001.

En la Tabla 7, se muestran las principales características de la población analizada, en estos pacientes la relación entre sexo femenino y masculino fue de 1,1. En cuanto a la edad la mayor proporción de los pacientes (59%) comprende a los niños menores a 2 años en comparación al 41% de los niños mayores a 2 años, todos ellos fueron atendidos en el hospital del Niño.

TABLA 7. Distribución de los pacientes menores a 15 años con EDA en relación al sexo y edad. Ciudad de La Paz (2001)

Edad	Nº de pacientes Analizados (%)	sexo	
		Femenino	Masculino
< 2 años	42 (59)	17	25
> 2 años	29 (41)	20	9
Total	71	37	34

### 3.1.2. Análisis microbiológico

Del total de las muestras analizadas, se identificaron mediante el análisis microbiológico 2 cepas (3%) de *Shigella sp*, 50 cepas (70%) fueron identificadas como *Escherichia coli* y el resto de los aislados se los identifico como flora microbiana normal (Tabla 8).

TABLA 8. Enteropatógenos aisladas de muestras de heces fecales de pacientes con procesos diarreicos. Ciudad de La Paz (2001).

Enterobacterias	Nº de aislados (%)
<i>Shigella sp</i>	2 (3)
<i>E. coli</i>	50 (70)
FMN	19 (27)
Total	71(100)

FMN: Flora microbiana normal

### 3.1.3. Identificación de las cepas EPEC y EIEC por Serología

La identificación de EPEC y EIEC fue realizada mediante la técnica de aglutinación con antisueros polivalentes. Del total de las muestras analizadas, en 50 muestras de heces se identificaron *E. coli*, de las cuales solo 30 muestras fueron testadas con antisueros anti-EPEC que correspondía a niños menores a 2 años, de estas muestras el 50% fue positiva para EPEC. En cuanto a la identificación de EIEC, 11 cepas (55%) fueron positivas para este patógeno que fueron analizadas a partir de 20 muestras pertenecientes a niños mayores a 2 años (Tabla 9).

TABLA 9. Identificación de EPEC y EIEC mediante la técnica de aglutinación en muestras diarreicas de pacientes menores a 15 años. Ciudad de La Paz (2001).

Aglutinación	Nº de muestras (%) Identificación de EPEC	Nº de muestras (%) Identificación de EIEC
Positiva	15(50)	11(55)
Negativa	15(50)	9(45)
Total	30	20

### 3.1.4. Identificación de EPEC y EIEC por PCR

La identificación de EPEC y EIEC fue realizada en las 50 cepas de *E. coli* aisladas de las muestras fecales por PCR, mediante la amplificación del gen *eae* (Figura 2) y la amplificación del locus *ial* (Figura 3).

Como se observa en la Tabla 10, fueron positivas para el gen *eae* 7 cepas (14%) y los restantes 43 cepas (86%) fueron negativas para este gen.

También se observa que EPEC afecta mas a niños menores a 2 años, donde el 8% de las muestras positivas corresponden a esta edad y su distribución es menor en el resto de los pacientes alcanzando en conjunto un 6% (Tabla 10).

TABLA 10. Identificación del gen *eae* por PCR de muestras clínicas procedentes de procesos diarreicos de pacientes. Ciudad de La Paz (2001).

Edad	Nº de Muestras	Amplificación del gen <i>eae</i>	
		Positivo	Negativo
0-2 a	30	4	26
3-5 a	8	0	8
6-10 a	3	1	2
11-15 a	9	2	7
Total	50	7(14%)	43(86%)

De las 50 muestras analizadas, 5 cepas (10%) fueron positivas para el locus *ial*, de las cuales 2 cepas corresponden a niños menores a 2 años y otras 2 cepas corresponden a niños de 3 a 5 años de edad, solo 1 cepa fue positiva para el grupo etareo de 11 a 15 años (Tabla 11).

TABLA 11. Identificación del locus *ial* por PCR de muestras clínicas procedentes de procesos diarreicos de pacientes. Ciudad de La Paz (2001).

Edad	Nº de Muestras	Amplificación del locus <i>ial</i>	
		Positivo	Negativo
0-2 a	30	2	28
3-5 a	8	2	6
6-10 a	3	0	3
11-15 a	9	1	8
<b>Total</b>	<b>50</b>	<b>5(10%)</b>	<b>43(90%)</b>

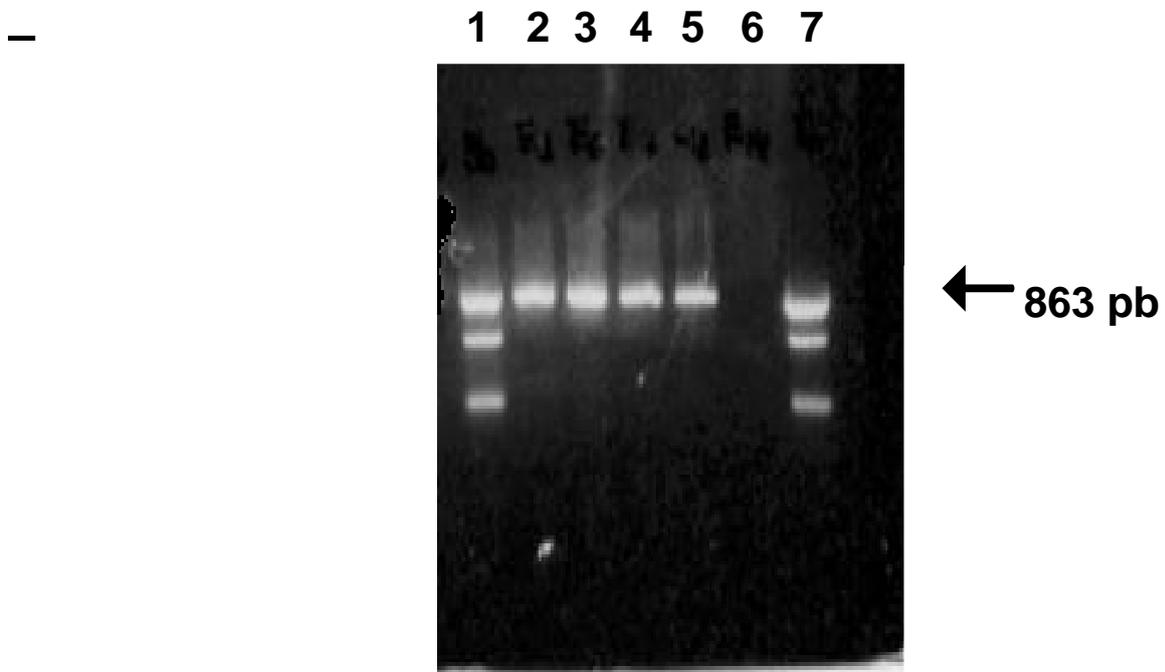


FIGURA 2. Gel de electroforesis en agarosa al 1.5%, con productos de amplificación por PCR del gen *eae* a partir de muestras control y clínicas.

Carril 1. Cepa de referencia *E. coli* 3b control positivo para *eae*

Carril 2. Muestra clínica N° 6 positivo para el gen *eae*

Carril 3. Muestra clínica N° 21 positivo para el gen *eae*

Carril 4. Muestra clínica N° 28 positivo para el gen *eae*

Carril 5. Muestra clínica N° 30 positivo para el gen *eae*

Carril 6. Cepa de referencia *E. coli* Das 100 control negativo

Carril 7. Cepa de referencia *E. coli* 3b control positivo para *eae*

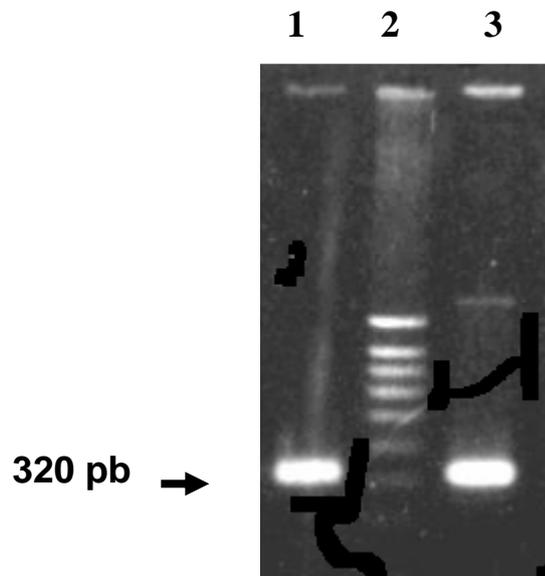


FIGURA 3. Gel de electroforesis en agarosa al 1.5%, con productos de amplificación por PCR del locus *ial* a partir de muestras control y clínicas.

Carril 1. Cepa de referencia PS 2.5 control positivo para *ial*

Carril 2. Marcador de peso molecular Smart –ladder SF

Carril 3. Muestra clínica N° 41 positivo para el locus *ial*

### 3.1.5. Comparación geno-fenotípica de EPEC y EIEC

Como se observa en la Tabla 12, solo 3 muestras (6%) fueron geno-fenotípicamente positivas para EPEC y 12 muestras (24%) fueron negativas por PCR y positivas por Serología, por otra parte, 1 cepa que fue negativa por Serología fue positiva por PCR.

De las muestras no identificadas por Serología, 3 muestras (6%) fueron positivas para EPEC por PCR (Tabla 12).

TABLA 12. Comparación geno-fenotípica de EPEC mediante la técnica de aglutinación y PCR de muestras aisladas de pacientes con procesos diarreicos agudos. Ciudad de La Paz (2001).

	Nº (%) de aislados		
	Identificados por Serología		No identificados por Serología
	+	-	
<i>eae</i> +	3(6)	1(2)	3(6)
<i>eae</i> -	12(24)	14(28)	17(34)
Total	15	15	20

El análisis de correlación entre la técnica de aglutinación y PCR, mostró que solo 2 muestras (14%) fueron geno-fenotípicamente positivas para EIEC y 9 muestras (18%) que fueron positivas por Serología fueron negativas por PCR. También se observa que la muestra que fue negativa por Serología fue positiva por PCR (Tabla 13).

Por otra parte, en las muestras en las cuales no se identifico EIEC por Serología, 2 muestras fueron positivas por PCR para este germen (Tabla 13).

TABLA 13. Comparación geno-fenotípica de EIEC mediante la técnica de aglutinación y PCR de muestras aisladas de pacientes con procesos diarreicos agudos. Ciudad de La Paz (2001).

	Nº (%) de aislados		
	Identificados por Serología		No identificados por Serología
	+	-	
ial +	2(4)	1(2)	2(4)
ial -	9(24)	8(16)	28(56)
Total	11	9	30

### 3.1.6. Fijación de Rojo Congo

La fijación de Rojo Congo fue realizada en las 50 cepas de *E. coli*, como también se realizó la fermentación de Sorbitol, donde todas las cepas fueron positivas para esta prueba (dato no mostrado).

En la Tabla 14, se muestra que de las 6 cepas positivas para fijación del Rojo Congo, 3 cepas fueron positivas para el locus *ial* y las otras 3 cepas fueron negativas para ambos genes.

TABLA 14. Determinación de la fijación de Rojo Congo en las cepas de *E. coli* aisladas de pacientes con procesos diarreicos agudos. Ciudad de La Paz (2001).

	Nº de Aislados	Amplificación del locus <i>ial</i>	
		+	-
Rojo Congo +	6	3	3
Rojo Congo -	44	2	42
Total	50	5	45

### 3.1.7. Determinación de Sensibilidad y Especificidad de la técnica de Serología

Mediante la aplicación de formulas se determino la sensibilidad de la técnica de Serología, obteniéndose una sensibilidad de 50% para la detección de EPEC y una sensibilidad de 40% para la detección de EIEC (Figura 4).

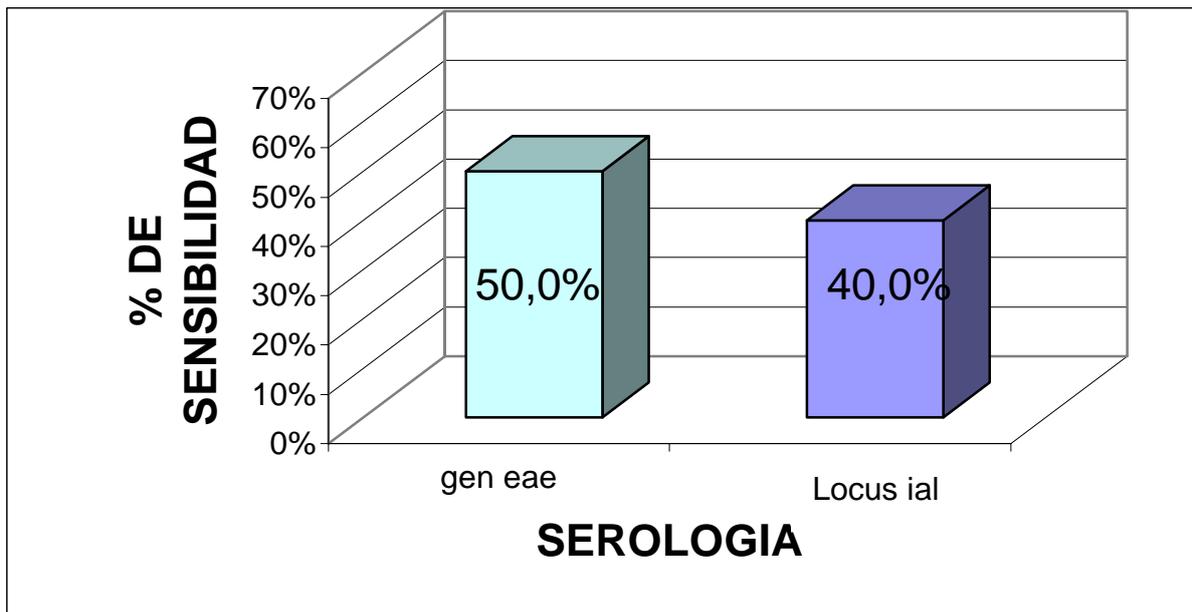


FIGURA 4. Sensibilidad de la técnica de Serología para la identificación de EPEC y EIEC de muestras clínicas aisladas de pacientes. Ciudad de La Paz (2001).

En cuanto a la determinación de la especificidad de la técnica de Serología se obtuvo un 66% para la detección de EPEC y un 70% para la detección de EIEC (Figura 5).

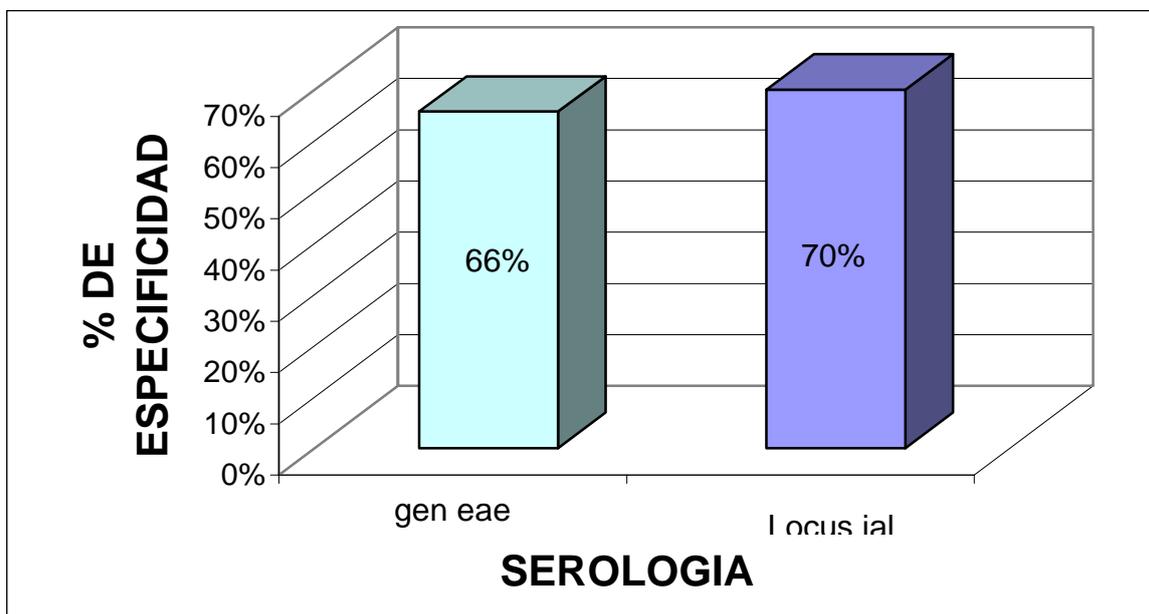


FIGURA 5. Especificidad de la técnica de Serología para la detección de EPEC y EIEC de muestras clínicas aisladas de pacientes. Ciudad de La Paz (2001).

Por otra parte, también se realizó la determinación de la eficiencia de la técnica de Serología, el cual fue de 63% para la detección de EPEC y de 66% para la detección de EIEC (Figura 6).

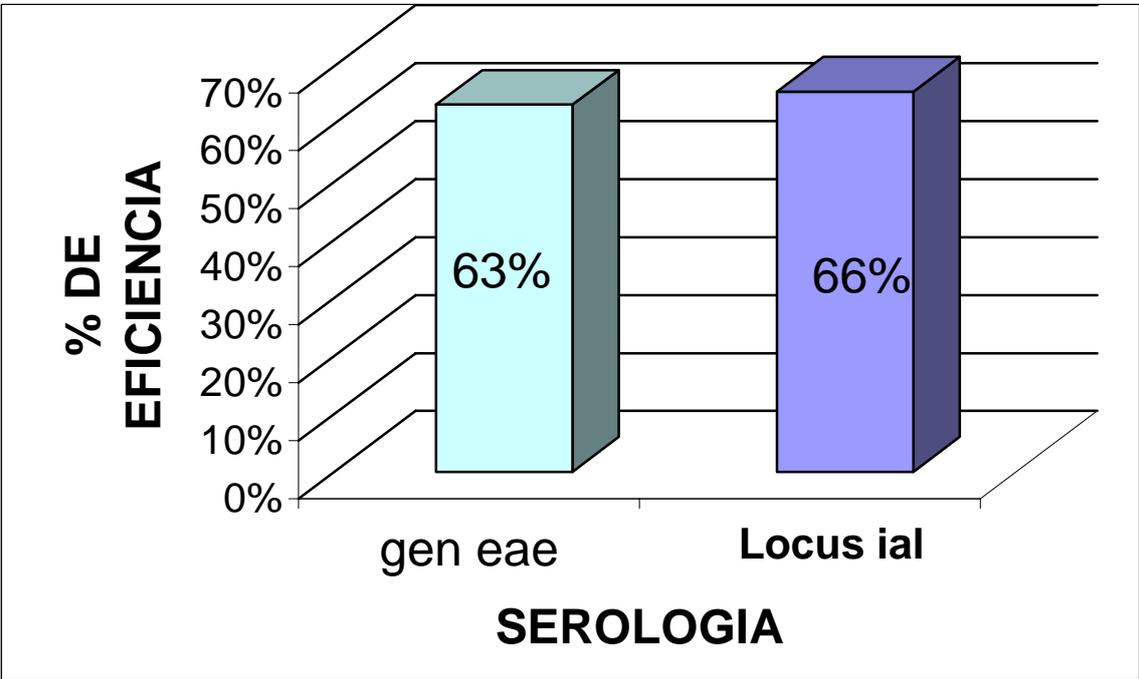


FIGURA 6. Determinación de la eficiencia de la técnica de Serología Para la detección de EPEC y EIEC de muestras clínicas aisladas de pacientes. Ciudad de La Paz (2001).

### 3.1.8. Valores predictivos de la técnica de Serología

En la Tabla 15, se muestran los valores predictivos positivos y negativos de la técnica de Serología para la detección de EPEC que fue de 20% y 80% respectivamente. Para la detección de EIEC se obtuvo un valor predictivo positivo de 18% y un valor predictivo negativo de 89%.

TABLA 15. Valores predictivos obtenidos por la técnica de serología para la detección de EPEC y EIEC de muestras clínicas aisladas de pacientes. Ciudad de La Paz (2001).

Serología	Valor predictivo positivo	Valor predictivo negativo
Detección de EPEC	20%	88%
Detección de EIEC	18%	89%

En la comparación de resultados por el índice de Kappa de la técnica de Serología, se obtuvo una concordancia regular de 0,32 para la identificación de EPEC, por otra parte, la concordancia para la identificación de EIEC fue también regular de 0,28 (Tabla 16).

TABLA 16. Determinación de concordancia según el índice de Kappa de la técnica de serología para la identificación de EPEC y EIEC de muestras clínicas. Ciudad de La Paz (2001).

Concordancia	Índice de Kappa	Detección de EPEC	Detección de EIEC
Deficiente	< a 0,20		
Regular	0,21 a 0,40	0,32	0,28
Moderada	0,41 a 0,60		
Buena	0,61 a 0,80		
Muy Buena	0,81 a 1,00		

## DISCUSIÓN

### 3.2.1. Distribución por género de la población analizada

La diarrea es una enfermedad que ha sido reconocida como una causa de alta mortalidad y morbilidad infantil a nivel mundial. Los niños que viven en los países en desarrollo son particularmente más susceptibles a las infecciones diarreicas, las cuales contribuyen anualmente a la muerte de 4,6 a 6 millones de niños (Torres *et al.*, 2001). En estos países en desarrollo se calcula que se producen aproximadamente entre 2 a 12 episodios de diarrea por niño por año y con mayor frecuencia en los dos primeros años de vida (Klaus *et al.*, 2001).

En Bolivia su importancia es mayor, ya que las enfermedades diarreicas continúan siendo una de las principales causas de morbilidad y mortalidad infantil, especialmente en los niños menores a 5 años, donde aproximadamente el 29% de ellos presentaron enfermedad diarreica aguda, de los cuales solo el 46% recibió atención médica. La mortalidad infantil en niños menores a 5 años fue alrededor de 15.000 muertes anuales (Instituto Nacional de Estadística, 2004).

A pesar de que en los últimos años se ha implementado el programa SUMI que permite el servicio gratuito a los niños menores a 5 años, se observa que tanto la morbilidad como la mortalidad infantil aun es muy alta, esto tal vez se deba a que factores como el nivel socioeconómico de la población, las barreras geográficas y culturales siguen siendo los principales obstáculos para reducir la tasa de mortalidad infantil, es así, que las enfermedades infecciosas alcanzan niveles alarmantes en las zonas pobres, donde el saneamiento es escaso, la higiene insuficiente y no se tiene acceso al agua potable (UNICEF, 2002).

Cuando se presentan las infecciones diarreicas no siempre son tratadas adecuadamente, en la mayoría de los casos los padres llevan a sus hijos al hospital en el último momento cuando la enfermedad se ha agravado. Por otra parte, los médicos no acostumbran solicitar los análisis necesarios para diferenciar si la infección es debido a bacterias, virus o parásitos, por lo tanto una gran mayoría de las muestras fecales no son remitidas al laboratorio para su respectivo análisis, es

así, que durante el periodo de estudio, 1527 niños menores a 14 años que presentaban infección diarreica, fueron atendidos en el Hospital de Niño de los cuales solo algunas muestras fueron remitidas al Laboratorio de Seladis para la realización del análisis microbiológico, como se muestra en los resultados de la Tabla 4. El diagnóstico de la diarrea es fundamentalmente clínico, reservándose el coprocultivo para los casos de mayor gravedad, duración prolongada o brotes epidémicos.

De acuerdo a los resultados, el grupo etareo más afectado y de mayor riesgo por EDA, son los niños menores a 2 años (59%), este resultado concuerda con los datos del Hospital del Niño, ya que durante el periodo de estudio 1439 niños menores a 4 años fueron atendidos, los cuales presentaban enfermedad diarreica aguda.

Como anteriormente se había mencionado existen varios factores que influyen en la propagación de una enfermedad como la diarrea entre ellas están las deficiencias sanitarias especialmente en las zonas periféricas de la Ciudad de La Paz y por otra parte, el nivel socioeconómico que influye en la desnutrición desde temprana edad del niño, esta población es la que acude al hospital de Niño.

### **3.2.2. Análisis microbiológico**

Durante los últimos años, en diferentes países se han realizado numerosos estudios sobre la epidemiología de la diarrea infantil (Wong *et al.*, 2000; Okeke *et al.*, 2000; Klaus *et al.*, 2001; Torres *et al.*, 2001; Keskimaki *et al.*, 2001; Shehabi *et al.*, 2003). En todos estos estudios se ha visto que las cepas de *Escherichia coli* *Diarreogenicas* tienen mucha importancia, ya estas cepas son causantes de enfermedades diarreicas en niños, sobre todo en países en vías de desarrollo (Clarke, 2001; Shehabi *et al.*, 2003). La prevalencia de las diferentes categorías de *E. coli* *Diarreogenicas* varía de un país a otro, esto de acuerdo a la localización, estacionalidad, edad de los pacientes y otros factores (Nataro *et al.*, 1998; Clarke, 2001; Sarantuya *et al.*, 2004).

En nuestro país, pocos estudios se han realizado sobre la epidemiología de la diarrea infantil, se desconoce que patógenos son más prevalentes en nuestro medio y en la mayoría de los casos en los laboratorios se busca con preferencia las cepas de *Shigella* y *Salmonella* como agentes causantes de la diarrea, obviándose las diferentes categorías de *E. coli* Diarreogénicas que también son responsables de una gran mayoría de los casos de diarrea, como lo muestran los estudios realizados por Sánchez y Romesín en la ciudad de La Paz, donde EPEC y EHEC están presentes en un 9,3% y 0,4% respectivamente en niños menores a 5 años con diarrea (Sánchez *et al.*, 2003).

De acuerdo a nuestros resultados, las cepas de *Escherichia coli* (70%) fueron las más frecuentemente aisladas de pacientes con diarrea que las cepas de *Shigella* (3%). Este resultado es parecido a lo reportado en numerosos estudios de epidemiología donde una gran mayoría de las cepas aisladas fueron *E. coli* que a su vez fueron caracterizadas como cepas de *E. coli* Diarreogénicas, de las cuales EPEC fue la más prevalente que las cepas de *Shigella* y *Salmonella* (Torres *et al.*, 2001; Knutton *et al.*, 2001; Nishikawa *et al.*, 2002; Haque *et al.*, 2003).

### **3.2.3. Identificación de EPEC y EIEC por aglutinación**

Durante mucho tiempo hasta la actualidad, en los laboratorios clínicos se sigue utilizando la técnica de Serología para la diferenciación de las diferentes categorías de *E. coli* Diarreogénicas en muestras de heces fecales de pacientes con procesos diarreicos. La técnica se basa en la determinación del antígeno somático mediante la aglutinación con antisueros polivalentes, es así, que en nuestros resultados, de las 30 muestras procesadas para EPEC, el 50% fue positiva y de las 20 muestras procesadas para EIEC, 55% fue positiva. En cuanto a EPEC este resultado es similar a lo reportado por Torres *et al.* en un estudio realizado en Uruguay utilizando la misma técnica (Torres *et al.*, 2001). Por otra parte, en esta técnica existe la posibilidad de que se de reacción cruzada, lo cual pudo haber sucedido con nuestros resultados al obtenerse estos valores elevados tanto para EPEC como EIEC.

En algunos laboratorios solo se identifican algunas categorías de *E. coli* patogénicas de acuerdo a la disposición de los antisueros, como en este estudio donde se identificó solo EPEC y EIEC, por lo cual, una gran mayoría de las muestras fueron negativas y reportadas como flora microbiana normal, este tipo de reportes son erróneas ya que las muestras negativas para algunas categorías patogénicas pueden ser positivas para otras, además, una vez testadas para todas las categorías patogénicas se debe también descartar si la infección es viral o parasitaria, lo cual no se realiza.

Además, de los antisueros polivalentes para la identificación de las diferentes categorías patogénicas, se debe contar con varios Kits de antisueros monovalentes específicos para cada serogrupo o serotipo, lo cual llega a ser costoso, por lo tanto, en la mayoría de los laboratorios solo se llega a identificar el serogrupo con los antisueros polivalentes como en este estudio. También se ha constituido que solamente algunos serotipos dentro de cada serogrupo son patógenos. Estos microorganismos constituyen clonas patógenas dentro de la especie y estas clonas corresponden a un serotipo determinado. Por ello para saber si una cepa de *E. coli* es patógena es necesario realizar el serotipado completo, es decir la determinación de los antígenos O, K y H (Domínguez, 1995).

Otro aspecto importante a analizar en este estudio, es el hecho de que la identificación de EPEC y EIEC fue realizada en base a la edad del paciente, es así que en los pacientes menores a 2 años se realizó solo la identificación de EPEC y en los mayores a 2 años la identificación de EIEC, esta manera de identificar EPEC y EIEC es aplicada en algunos laboratorios, se realiza de esta manera para ahorrar reactivos ya que EPEC es más prevalente en niños menores a 2 años y EIEC es más frecuente en adultos, esto de acuerdo a estudios previos realizados en otros países, porque en nuestro país se desconoce que categorías de *E. coli* patogénicas son más prevalentes y en qué edad son más frecuentes. Es por esta razón, que la identificación de EPEC y EIEC debe realizarse en todos los pacientes y no de acuerdo a la edad como se ha estado realizando hasta ahora. Por otra parte, también se debe realizar la identificación de las otras categorías patogénicas como ETEC y EAEC que también afectan con mayor frecuencia a niños menores a 2 años como lo muestran los estudios realizados en otros países (Viboud *et al.*, 1999;

Quadri *et al.*, 2000; Okeke *et al.*, 2000; Oyofe *et al.*, 2001; Torres *et al.*, 2001; Nishimura *et al.*, 2002; Nishikawa *et al.*, 2002; Shehabi *et al.*, 2003; Subekti *et al.*, 2003; Haque *et al.*, 2003; Sarantuya *et al.*, 2004; Rappelli *et al.*, 2005).

#### **3.2.4. Caracterización de EPEC y EIEC por PCR**

La capacidad del PCR para detectar muy bajas cantidades de un agente infeccioso con alta especificidad y sensibilidad hace que esta técnica sea aplicada para la identificación de las diferentes categorías de *E. coli* patogénicas, como en la mayoría de los estudios realizados en otros países, donde la identificación de estos patógenos fue realizada por PCR (Nishikawa *et al.*, 2002; Shehabi *et al.*, 2003; Sarantuya *et al.*, 2004; Rappelli *et al.*, 2005), además de ser aplicado para el diagnóstico rutinario de laboratorio, que permite una adecuada y rápida identificación del patógeno causante de la diarrea.

De acuerdo a nuestros resultados mediante la técnica de PCR, se obtuvo una frecuencia de 14% para el gen *eae* que codifica para un factor de virulencia de EPEC. Este resultado es casi similar a los reportes de otros países en los cuales los resultados oscilan casi por los mismos valores (Cortes-Ortiz *et al.*, 2002; Shehabi *et al.*, 2003; Dulguer *et al.*, 2003), siendo el patógeno más frecuentemente aislado en niños con diarrea. En relación a los estudios previos realizados por Sánchez y Romesin en nuestro país, este resultado es ligeramente mayor a lo reportado por ellos de 9,4% (Sánchez *et al.*, 2003). En cuanto a EIEC se encontró una frecuencia de 10%, este resultado es mayor en comparación a los reportes de los diferentes estudios realizados en los otros países (Okeke *et al.*, 2000; Torres *et al.*, 2001; Shehabi *et al.*, 2003; Haque *et al.*, 2003; Sarantuya *et al.*, 2004; Rappelli *et al.*, 2005), donde la frecuencia de aislamiento de EIEC es muy baja, sugiriendo que estos patógenos pueden tener un rol menos importante en la diarrea de los niños en los países en vías de desarrollo. En nuestro país no se tiene estudios previos de la frecuencia de este patógeno y la identificación de ambos patógenos fue realizada en las 50 cepas de *E. coli* a diferencia de la identificación mediante la técnica de Serología en la cual se obvió un gran número de muestras al realizarse la identificación en base a la edad.

Por otra parte, los resultados del presente estudio también muestran que EPEC es mas frecuente en los niños menores a 2 años, en relación a los otros grupos etéreos. Este resultado concuerda con los reportes de otros estudios realizados en diferentes países y en el nuestro (Okeke *et al.*, 2000; Torres *et al.*, 2001; Nishikawa *et al.*, 2002; Sánchez *et al.*, 2003). En cuanto a EIEC, también esta presente en niños menores a 2 años, como en niños de 3 a 5 años.

Los niños menores a 1 año son mas susceptibles a la infección, debido a varios factores, una de ellas seria la lactancia materna que juega un rol importante en la protección contra enfermedades diarreicas ya que la leche materna contiene anticuerpos como la inmunoglobulina A, que disminuye el riesgo a que el niño presente diarrea, esto se ha observado en estudios de seguimiento de niños desde el nacimiento hasta los dos años de edad (Cruz *et al.*, 1988; Valentiner-Branth *et al.*, 2003; Steinsland *et al.*, 2003; Rao *et al.*, 2003). Otro factor de protección podría ser la lactoferrina, que es una proteína que esta presente en gran cantidad en la leche materna y que cumple la función de bloquear la adhesión bacteriana (Oliveira *et al.*, 2001).

### **3.2.5. Comparación geno-fenotípica de EPEC y EIEC**

Los resultados obtenidos, muestran las diferencias entre el método de PCR y Serología en la capacidad de la detección de EPEC y EIEC. En el caso de EPEC solo 3 muestras fueron positivas por PCR y Serología, en cuanto a EIEC solo 2 muestras fueron positivas por ambas técnicas. Un aspecto a destacar es el hecho de que las muestras que fueron negativas por Serología fueron positivas por PCR y varias muestras que fueron positivas por Serología, fueron negativas por PCR.

Estas diferencias de resultados entre ambas técnicas muestran que existe mucha variación en cuanto a la técnica de Serología ya esta se basa en la aglutinación del antígeno O con antisueros polivalentes, por ese mismo hecho, existe reacción cruzada entre las diferentes categorías de *E. coli* patogénicas como con las otras enterobacterias, por lo que la técnica de Serología estaría sujeta a mayor variación que la técnica de PCR. Por otra parte, cuando se realiza la serotipificación de las cepas EPEC o EIEC identificadas previamente por PCR una

gran mayoría de estas cepas no corresponden a los serotipos clásicos o alguna de ellas son negativas, tipificándolas como no determinadas, todos estos factores influyen en la distinción de las diferentes categorías de *E. coli* Diarreogénicas mediante la técnica de Serología.

### 3.2.6. Fijación de Rojo Congo

El enlace y la adherencia de los microorganismos enteropatógenicos a las células del tracto gastrointestinal se cree que es un proceso importante en la patogénesis de las enfermedades diarreicas. Por esta razón, se han realizado extensos estudios sobre la envoltura externa de estos patógenos, donde las cepas virulentas son más hidrofóbicas que las cepas avirulentas (Kabir *et al.*, 1983; Rozgonyi *et al.*, 1985; Seltmann *et al.*, 1986). Una de las pruebas utilizadas para el estudio de las propiedades de la superficie bacteriana es la fijación del rojo Congo que está directamente relacionada con la virulencia y patogenicidad de cepas como *E. coli* enteroinvasiva, *Shigella flexneri*, *Yersinia pestis*, *Neisseria meningitidis* y *Vibrio cholerae*. Esta prueba ha sido utilizada para la diferenciación entre cepas virulentas y avirulentas de una variedad de bacterias gram negativas y también como criterio de hidrofobicidad, además de ser barata y rápida para la identificación de cepas virulentas.

De acuerdo a nuestros resultados solo 6 cepas de las 50 cepas de *E. coli* testadas fueron positivas para la fijación del rojo Congo. Para esta prueba se tomó como positivas a las colonias pequeñas con un pigmento rojo oscuro en el centro, pero también se nos presentaron colonias con pigmentación difusa lo cual dificultó la distinción entre cepas rojo Congo positivas y negativas, ya que para realizar esta prueba se debe tener mucho cuidado y controlar las condiciones necesarias que se requieren como utilizar cultivos frescos, el tiempo de incubación y la temperatura que son críticos, para la correcta identificación de estas cepas.

Por otra parte, esta fijación de rojo Congo se cree que es codificada por un plásmido de 140 MDa. que es altamente inestable (Qadri *et al.*, 1988) y en nuestro estudio se realizaron varios subcultivos los cuales pudieron influir en la pérdida de este plásmido y a su vez en la pérdida de la capacidad de la fijación del rojo Congo y

por otro lado, según nuestros resultados no se tiene un patrón característico entre la fijación de rojo congo y EIEC que determine la virulencia de estas cepas.

### **3.2.7. Sensibilidad y Especificidad de la técnica de Serología**

Debido a que en estudios previos se determinó la sensibilidad y especificidad de la técnica de PCR (Nataro *et al.*, 1998), se tomó esta técnica como estándar, además de que en el laboratorio de Biología Molecular ya se había estandarizado la técnica de PCR para la identificación de EPEC y EIEC.

Nuestros resultados muestran que la sensibilidad de la técnica de Serología fue de 50% para la identificación de EPEC y de 40% para la identificación de EIEC. De acuerdo a los reportes de otros estudios, la sensibilidad de la técnica de serología es muy baja en comparación con otras técnicas como ELISA, Sondas de DNA y PCR (Kerr *et al.*, 1999; Huerta *et al.*, 2000; Bettelheim *et al.*, 2002), ya que en la técnica de Serología influyen varios factores como la cantidad de suspensión bacteriana y la cantidad de antisuero utilizado, además influye mucho la procedencia y marca del antisuero. Por otro lado, en esta técnica se observa la aglutinación mediante visualización directa y muchas veces esta visualización de la presencia o ausencia de la aglutinación falla y se dan los falsos positivos y negativos.

Respecto a la especificidad, la técnica de Serología presentó una especificidad de 66% para la detección de EPEC y de 70% para la detección de EIEC. De la misma manera que en la sensibilidad, muchos autores muestran que la técnica de Serología es muy inespecífica (Huerta *et al.*, 2000), esto debido a la reacción cruzada que se da entre las diferentes categorías de *E. coli* Diarreogénicas y por lo tanto, la eficiencia de esta técnica es muy baja para la detección de EPEC y EIEC.

En resumen, en este trabajo se pretende comparar la técnica de Serología con la técnica de PCR las cuales son utilizadas para el diagnóstico de EPEC y EIEC. Considerando el hecho de que las enfermedades diarreicas son una de las principales causas de morbilidad y mortalidad infantil, es necesario contar con métodos de diagnóstico eficientes, que proporcionen el correcto resultado del

germen que esta provocando la diarrea, así de esta manera realizar una pronta intervención. Por otra parte, la rápida identificación y caracterización de estos patógenos permitiría mejorar el control y la prevención de esta enfermedad.

## CONCLUSIONES

El presente trabajo, fue realizado en pacientes menores a 15 años con procesos diarreicos, cuyas muestras fueron remitidas al laboratorio de Seladis para su respectivo análisis microbiológico.

I. Las siguientes características más relevantes fueron encontradas:

- Mediante la técnica de Serología se encontró 50% de muestras positivas para EPEC y 55% de muestras positivas para EIEC, produciéndose numerosos falsos positivos y negativos, tanto para la detección de EPEC como EIEC.
- EPEC y EIEC son una importante causa de diarrea en nuestro medio, ya que mediante la amplificación del gen *eae* se encontró una frecuencia de infección de EPEC de 14% y de 10% para EIEC mediante la amplificación del locus *ial*.
- Se encontró que la infección por EPEC y EIEC esta presente en todas las edades de la población en estudio, pero con mayor frecuencia afecta a niños menores a 2 años, encontrándose 8% para EPEC y 4% para EIEC.
- En cuanto a la comparación de resultados de las dos técnicas, se encontró que solo 3 muestras fueron positivas para EPEC y 2 muestras para EIEC por ambas técnicas y que la mayoría de las muestras positivas por Serología para EPEC y EIEC fueron negativas por PCR, esto debido a la reacción cruzada que se da en la técnica de Serología.
- La técnica de Serología para detectar EPEC y EIEC presento una baja sensibilidad, por lo cual se debería considerar la utilización de otra técnica para la detección de Enteropatogenos.
- Solo el 6% de las cepas EIEC presentaron la capacidad de la fijación del rojo congo relacionadas con la virulencia y patogenicidad.

- La técnica de Serología presento un valor predictivo positivo de 20% y valor predictivo negativo de 88% para la detección de EPEC, en cuanto a EIEC fue de 18% y 89% respectivamente.

## **SUGERENCIAS**

En nuestro país se requieren estudios epidemiológicos a nivel nacional de las enfermedades diarreicas agudas, para determinar la prevalencia de los principales patógenos bacterianos, virales y parasitarios que afectan a nuestra población. Este estudio debe realizarse también en zonas rurales ya que en estos lugares la incidencia de EDA es mayor, especialmente en los niños menores a 5 años.

Considerando que las infecciones diarreicas son muy frecuentes en nuestro medio como país en vías de desarrollo, es necesario la implementación de métodos de diagnóstico de alta sensibilidad y especificidad para elucidar mejor la epidemiología y la vigilancia de la infección por los diferentes patógenos.

Para una mejor identificación de los patógenos potenciales en las muestras de heces proponemos el siguiente flujograma de la metodología que se debería usar (Figura 8).

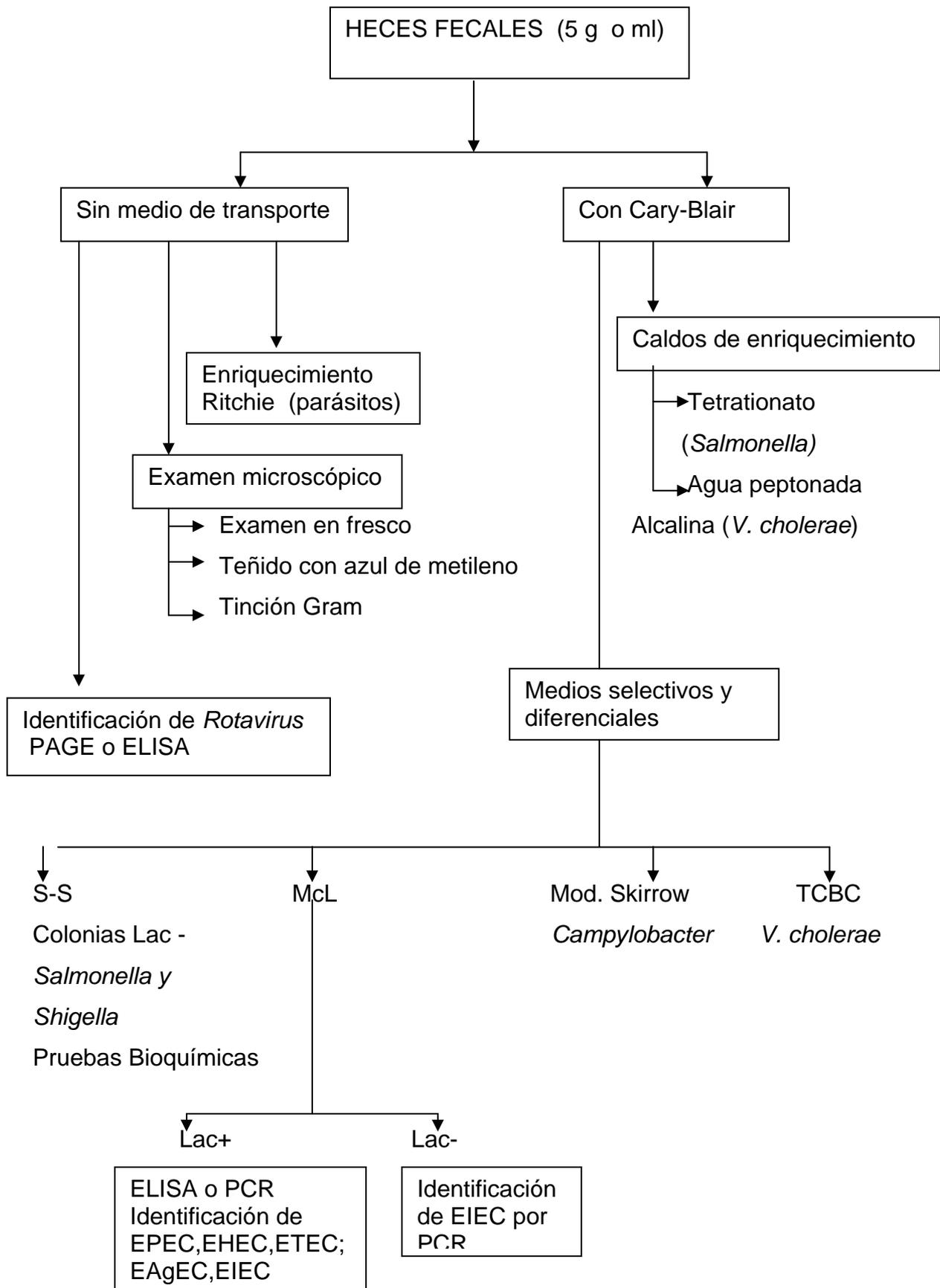


FIGURA 8. Flujograma de la metodología para la identificación de patógenos potenciales en heces.

## BIBLIOGRAFIA

Ahmed, A., Shimamoto, T. (2004). "A plasmid-encoded class 1 integron carrying sat, a putative phosphoserine gene and aad A2 from enterotoxigenic *Escherichia coli* o159 in Japan." FEMS Microbiology **235**: 243-248.

Akiyoshi, E., Benitez, A., Sanzetenea, E., Rodríguez, E., Zamora, J., Hanover, E., Kai, A. (1995). "Mayor Enteropathogenic bacteria isolated from diarrheal patients en Bolivia." Microbiology Immunology **39**: 845-851.

Bettelheim, K., Beutin, L., Gleier, K., Pearce, L., Luke, R., Zimmermann, S. (2003). "Serotypes os *Escherichia coli* isolated from healthy infants in Berlin, Germany and Melbourne; Australia." Comparative Immunology Microbiology Infectious diseases **26**: 55-63.

Bern, C., Martinez, J., Zoysa, I. (1992). "The magnitude of the global problem of diarrhoeal disease: a ten-years update" Bulletin of the world health organization **70**: 705-714.

Blanco, J., Blanco, M., Gonzalez, E., Blanco, JE., Alonso,MP., Garabal, J. (1993). "Serotypes and colonization factors of enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated in various countries." Eur. Journal Epidemiology **9**: 489-496.

Blanco, J., Blanco, M., Blanco, J., Mora, A., Balaguer, L., Juarez, A., Jasen, W. (1996). "Serogrupos biotypes and eae genew in *Escherichia coli* isolated from diarrhea and healthy rabbits. " Microbiologia Clinica **34**: 3101-3107.

Bray, J., (1945). "Isolation of antigenically homozigous starins of bacterium coli Neopolitanum from summer diarrhoea of infants" Journal Bact **57**: 239-247.

Casburn-Jones, A., Farthing, M. (2004). "Review." Journal Gastroenterology and Hepatology: 610-618.

Clarke, S. (2001). "Diarrhoeogenic *Escherichia coli* an emerging problem." Diagnostic Microbiology and Infectious Disease **41**: 93-98.

Comba, E., Fain Binda, J., Padola, N., Etcheverria, A., Sanz, M., Parma, A. (1998). "Factores de Virulencia de *E. coli* aisladas de un caso de enfermedad o de los edemas." VII Congreso Argentino de Microbiología 250.

Cortes\_Ortiz, A., Rodriguez-Angeles, G., Moreno-Escobar, E., Tenorio-Lara, J., Torres-Mazadiego, B., Montiel\_Vazquez E. (2002). "Brote causado por *Escherichia coli* en Chalco México." Salud Publica de Mexico **44**: 297-302.

Cura Estela, (1994). "Manual de procedimientos de Control de Calidad para los laboratorios de serología de los bancos de Sangre" Organización Panamericana de la Salud.

Cravioto, A., Trujillo, F., Hernandez, J., Eslava, C. (1992). "Infecciones por *Escherichia coli* Mexico DF" 1-5.

Dawson Saunders, Beth (1993). "Bioestadística Médica" Mexico D.F. Ed. El manual moderno, 275-283.

Davidson, G., Barnes, G., Bass, D., Cohen, M., Fasano, A., Fontaine, O., Guandaline, S. (2002). "Infectious diarrhea in children: Working group report of the first world congress of pediatric gastroenterology, Hepatology and Nutrition." Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition **35**: 5143-5151.

Dulguer, M., Fabricotti, S., Bando, S., Moreira-Filho, C., Fagundes Neto, U. (2003). "Atypical Enteropathogenic *Escherichia coli* strains: Phenotypic and genetic profiling reveals a strong association between Enteroaggregative *E. coli* Heat-Stable enterotoxin and diarrhea." Journal Infection Diseases **188**: 1685-1694.

Donnenberg, M., Whittam, T., (2001). "Pathogenesis and evolution of virulence in enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*." Journal Clinical Investigation **107**: 539-547.

Dupont, HL., Haynes, GA., Pickering, LK.; Tjoa, W., Sullivan, P., Olarte, J. (1977). "Diarrhea of travelers to Mexico. Relative susceptibility of United States and Latin American students attending a Mexican University." Journal Epidemiology: 37-41.

Esa-Matti Lilius, P. M. (2001). "The role of colostral antibodies in prevention of microbial infections." Current Infection disease **14**: 295-300.

Farmer, I. (1995). "Enterobacteriaceae:Introduction and identification." Manual of Clinical Microbiology: 440.

Field, M. (2003). "Intestinal ion transport and the pathophysiology of diarrhea." Journal of clinical Investigation **111**: 931-943.

Firdausi, Q., Shaikh, A., Ciznar, I., Haider, H., Ljungh, A., Wadstrom, T. (1988). "Congo red bending and salt aggregation as indicator of virulence in *Shigella sp*" Journal of clinical microbiology 1343-1348.

Fukushima, H., Hoshina, K., Gomyoda, M. (2000). "Selective isolation of eae-positive strains of shiga toxin-producing *Escherichia coli*." Journal of Clinical Microbiology 1684-1687.

Gutierrez, G., Tapia-Conyer, R., Guicafre, H., Reyes, H. Martinez, H. Kumare, J. (1996). "Impact of oral rehydration and selected public health interventions on reduction of mortality from childhood diarrhoeal diseases in Mexico." Bulletin of the world health organization **74**: 189-197.

Giron, J., Schoolnik, G. (1991). "An inducible bundleforming pilus of enteropathogenic *Escherichia coli*." Science **254**: 710-713.

Giron, J., Viboud, G., Sperandio, V., Gomez-Duarte, O., Maneval, D., Levine, M., Kaper, J. (1995). "Prevalence and association of the longus pilus structural gene (IngA) with colonization factor antigens." Infection and Immunity **63**: 4195-4198.

Halet, T., Sansonetti, P., Schad, P., Formal, SB. (1983). "Characterization of virulence plasmids and plasmid associated outer membrane proteins in *Shigella flexneri*, *Shigella sonnei* and *Escherichia coli*." Infection Immunity **40**: 340-350.

Haque, R., Kirkpatrick, B., Akther, S., Farr, B., Sack, B., Petri, W. (2003). "Epidemiologic and clinical characteristics of acute diarrhea with emphasis on *Entamoeba histolytica* infections in preschool children in an urban slum of Dhaka, Bangladesh." Tropical Medicine and Hygiene **69**: 398-405.

Huerta, M., Grotto, I., Gdalevich, M., Mimouni, D., Gavrieli, B., Yavzori, M., Cohen, D., Shpilberg, O. (2000). "A waterborne outbreak of gastroenteritis in the Golan Heights due to Enterotoxigenic *Escherichia coli*." Clinical and Epidemiological studies **28**: 267-271.

Humbert, J., Jouve, M., Lebouguenec, C., Gounon, P. (2000). "Electron microscopic improvement in the study of Diarrheagenic *Escherichia coli*." Microscopy Research and Technique **49**: 389-393.

Humbrad, A., Harrinson, D., Moyes, C. (1998). "Direct detection of eae positive bacteria in human and veterinary colorectal specimens by PCR." Journal of Clinical Microbiology 2326-2330.

Iruka, O., Adebayo, L., Hartmut, S., James, K. (2000). "Characterization of *E. coli* strains from cases of childhood diarrhea in provincial Southwestern Nigeria." Journal of Clinical Microbiology 7-12.

Jiang, Z., Mathewson, J., Ericsson, C., Svennerholm, A-M., Pulido, C., DuPont, H. (2000). "Characterization of enterotoxigenic *Escherichia coli* strains in patients with travelers diarrhea acquired in Guadalajara, Mexico." Journal Infection Diseases **181**: 779-782.

Jiménez, S., Camps, RT., Monton, AJ. (1998). "Tratamiento de la diarrea aguda infantil en atención primaria." INSALUD **22**: 109-116.

Joveleviths, D., Prolla, J., Hernández, E., Missel, J., Coelho, D., (2004). "Clinical Course of Diarrhea in Pediatric Primary Health Care." Internacional Pediatrics **19**: 90-94.

Karmall, M., Petric, M., Bielaszewska, M. (1999). "Evaluation of microplate latex agglutination method (Verotox-F assay) for detecting and characterizing Verotoxins (Shiga toxin) in *E. coli*." Journal of Clinical Microbiology 396-399.

Kabir, S., Ali S. (1983). "Characterization of surface properties of *Vibrio cholerae*." Infection Immunity **39**: 1048-1058.

Kerr, P., Ball, H., China, B., Mainil, J., Finlay, D., Pollock, D., Mackie, D. (1999). "Use of a monoclonal antibody against an *Escherichia coli* O26 surface protein for detection of Enteropathogenic and Enterohemorrhagic strains." Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology: 610-614.

Keskimaki Markku, Mattila Leena, Peltola Heikki, Siitonen Anja, (2000). "Prevalence of Diarrheagenic *Escherichia coli* in Finns with or without Diarrhea during a Round – the-World Trip." Journal of Clinical Microbiology **12**: 1-17.

Knutton, S., Shaw, R., Philips, A., Smith, H., Willshaw, A., Watson, P., Price, E. (2001). "Phenotypic and genetic analysis of diarrhea-associated *Escherichia coli* isolated from children in the United Kingdom." Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition **33**: 32-40.

Koneman Elmer W. (1998). "Diagnostico Microbiologico" Tercera edición, Editorial Medica Panamericana, Madrid-España, 119-153.

Leverstein-Van, M., Blok, H., Donders, R., Fluit, A., Verhoef, J. (2003). "Multidrug resistance among Enterobacteriaceae is strongly associated with the presence of integrons and is independent of species or isolate origin." Journal of Infectious Diseases **187**: 251-258.

Lilius, E., Marnila, P. (2001). "The rol of calostrat antibodies in prevention of microbial infections." Infectious Disease **14**: 295-300.

Mecsas, J., Strauss, E. (1996). "Molecular mechanism of bacterial virulence: Type III secretion and pathogenecity island." Emerging Infectious Disease **2**: 1-6.

Monkemuller, Klaus; Mel Wilcox, C., (2001). "Gastrointestinal infections in children." Current Opinion in Gastroenterology **17**: 35-39.

Murray Patrick R. (1999). "Microbiologia Medica" Segunda edición, Editorial Harcourt Brace, Madrid- España. 6-37.

Nataro JP., K. J. (1998). "Diarrheagenic Escherichia coli." Clinical Microbiology Reviews **11**: 142-201.

Nishikawa, Y., Zhou, Z., Hasc, A., Ogasawara, J., Kitase, T., Abe, N., Nakamura, H., Wada, T., Ishii, E. (2002). "Diarrheagenic Escherichia coli isolated from stools of sporadic cases of diarrheal illness in Osaka city, Japan between 1997 and 2000." Infection Disease **55**: 183-190.

Okeke, I., Lamikanra, A., Steinruck, H., Kaper, J. (2000). "Characterization of Escherichia coli strains from cases of childhood diarrhea in provincial Southwestern Nigeria." Juornal of Clinical Microbiology **38**: 7-12.

Oliveira, I., Araujo, A., Bao, S., Jimenes, L. (2001). "Binding of lactoferrin and free secretory component to enterotoxigenic Escherichia coli." FEMS Microbiology **203**: 29-33.

Oyofo, B., Subekti, D., Svenerholm, A-M., Machpud, N., Komalarini, T., Setiawam, B., Cambell, J., Corwin, A., Lesmana, M. (2001). "Toxin and colonization factors antigen of enterotoxigenic Escherichia coli among residents of Jakarta, Indonesia." Journal Trop Med Hyg **65**: 120-124.

Pichel, M., Binsztein, N., Qadri, F., Giron, J., (2002). "Type IV Longus Pilus of Enterotoxigenic *Escherichia coli* : Occurrence and Association with Toxin Types and Colonization Factors among Strains Isolated in Argentina." Journal of Clinical Microbiology **40**: 694-697.

Presterl, E., Zwick, R., Reichman, S., Winkler, S., Kremsner, P., Graninger, W. (2003). "Frequency and virulence properties of diarrheagenic *Escherichia coli* in children with diarrhea in Gabon." Tropical Medicine and Hygiene **69**: 406-410.

Quadri, F., Kumar, S., Faraque, A., Fuchs, G., Albert, M., Bradley, R., Svenerholm, A-M. (2000). "Prevalence of toxin types and colonization factors in enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated during a 2 years period from diarrheal patients in Bangladesh." Journal of Clinical Microbiology **38**: 27-31.

Quadri, F., Shaikh Abu Hossain., Ciznar Ivan., Haider Khaleda., Ljungh Asa., Wadstrom Torkel., Sack David (1988). "Congo red binding and salt aggregation as indicators of virulence in *Shigella* species." Journal of Clinical Microbiology **26**: 1343-1347.

Rappelli, P., Folgosa, E., Solinas, M., DaCosta, J., Pisano, C., Sidat, M., Melo, J., Cappuccinelli, P. (2005). "Pathogenic enteric *Escherichia coli* in children with and without diarrhea in Maputo, Mozambique." FEMS Microbiology and Medical Microbiology **43**: 67-72.

Reid, S. D., Herbelin, C.J., Bunbaugh, AC., Selander, RK., Whittam, TS., (2000). "Parallel evolution of virulence in pathogenic *Escherichia coli* " Nature **406**: 64-67.

Rico-Martinez, M. (1995). "Biología Molecular en la patogenia de *Shigella* sp y *Escherichia coli* enteroinvasiva." Rev. Latinoamericana Microbiología **37**: 367-385.

Riverón Corteguera, R. (1999). "Fisiopatología de la diarrea aguda." Rev Cubana Pediatría **71**: 86-115.

Rodriguez, G. (2002). "Principales características y diagnóstico de los grupos patogénicos de *Escherichia coli*." Salud Pública de México **44**: 464-475.

Romecin Duran, P. (2003). Caracterización genética de la intimina en cepas de *E. coli* enteropatógenicas (EPEC) y *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) presentes en la ciudad de La Paz, Universidad Mayor de San Andrés: 42-47.

Rozgonyi, F., Szitha, A., Ljungh, S., Baloda, S., Hjerten, S., Wadstrom (1985). "Standardization of salt aggregation test for reproducible determination of cell surface hydrophobicity with special reference to *Staphylococcus* species." Appl. Bacteriology **59**: 451-457.

Rudin, A. (1996). Colonization factors of enterotoxigenic *Escherichia coli*: Cross-reactive and protective epitopes. Department of Medical Microbiology and Immunology. Sweden, Goteborg.

Sanchez, S. A. (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, Universidad Mayor de San Andrés: 44-50.

Sankaran, K., Ramachandran, V. (1989). "Congo red-mediated regulation of levels of *Shigella flexneri* 2a membrane proteins." Infect. Immunology **34**: 75-83.

Sarantuya, S., Nishi, J., Wakimoto, N., Nataro, J., Sheikh, J., Iwashita, M., Manago, K. (2004). "Typical Enteroaggregative *Escherichia coli* is the most prevalent pathotype among *E. coli* strains causing diarrhea in Mongolian children." Journal of Clinical Microbiology **42**: 133-139.

Sasakawa, Ch. Kamata, K. (1986). "Molecular alteration of the 140-Megadaltons plasmid associated with loss of virulence and congo red binding activity in *Shigella flexneri*." Infect. Immunology **51**: 470-475.

Schoolnik, Gary. (2000). "PRC Detection of Shigella species and Enteroinvasive *Escherichia coli*. 277-279.

Seltmann, G., Pal, T., Tschape, H. (1986). "Surface hydrophobicity of plasmid-carrying virulent *Shigella flexneri* and their avirulent variants." Basic Microbiology **26**: 238-287.

Shehabi, A., Bulos, N., Hajjaj, K. (2003). "Characterization of Diarrhoeagenic *Escherichia coli* isolates in Jordanian Children." Scand Journal Infection Disease **35**: 368-371.

Sierra, Pedro. (1998) "Actualización del control de la enfermedad diarreica aguda en pediatría. Prevención, Diagnostico y tratamiento." Pediatría Organo Oficial de la Sociedad Colombiana 1-5.

Steinsland, H., Valentiner-Branth, P., Gjessing, H., Aby, K., Sommerfelt, H. (2003). "Protection from natural infections with enterotoxigenic *Escherichia coli* longitudinal study." The Lancet **362**: 286-291.

Subekti, D., Lesmana, M., Tianiadi, P., Machpud, N., Sriwati, N., Alexander, W., Cambell, J., Corwin, L., James Beecham, H., Simanjuntak, C., Oyofo, B. (2003). "Prevalence of enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) in hospitalised acute diarrhea patients in Denpasar; Bali, Indonesia." Diagnostic Microbiology and Infections Disease **47**: 399-405.

Stugard, C., Daskaleros, P., Payne S. (1989). "A 101-Kilodaltons heme-binding protein associated with congo red binding and virulence of *Shigella flexneri* and enteroinvasive *Escherichia coli* strains. " Infect. Immunology **57**: 3534-3539.

Thielman, N., Guerandt, R. (2004). "Acute Infectious Diarrhea." The New England Journal of Medicine: 38-47.

Torres, M., Pirez, M., Schelotto, F., Varela, G., Parodi, V., Allende, F., Falconi, E., Gaione, P., Mendez, M., Ferrari, A., Montaña, A., Zaneta, E. (2001). "Etiology of

children's diarrhea in Montevideo, Uruguay: Associated pathogens and unusual isolates." Journal of Clinical Microbiology **39**: 2134-2139.

Tornieporth, N., Joylene, J., Salgado, K. (1997). "Differentiation of pathogenic *Escherichia coli* strain in Brazilian children by PCR." Journal of Clinical Microbiology 1371-1374.

Valentiner\_Branth, P., Steinsland, H., Ficher, T., Perch, M., Scheuts, D., Aaby, P., Molbak, K., Sommerfelt, H. (2003). "Cohort study of Guinean children: Incidence, pathogenicity, conferet protection and attributable risk for Enteropathogens during the first 2 years of life." Journal of Clinical Microbiology **9**: 4238-4245.

Viboud, G., Jouve, M., Binsztein, N., Vergara, M., Rivas, M., Quiroga, M., Svenerholm, A-M. (1999). "Prostective cohort study of enterotoxigenic *Escherichia coli* infections in Argentinean children." Journal of Clinical Microbiology **37**: 829-833.

Victoria, Cesar G., Bryce, J., Fontaine, O., Monasch, R., (2001) "Reducción de la mortalidad por diarrea mediante la terapia de rehidratación oral" Boletin de la Organización Mundial de la Salud **4** : 111-112.

Wolf, M. (1997). "Occurrence distribution and associations of O and H serogrups colonization factor anteigens and toxins of enterotoxigenic *Escherichia coli*." Clinical Microbiology **10**: 569-584.

Wong, CS., Jelacic, S., Habeeb, RL. (2000). "The risk of the hemolyticus uremic syndrome after antibiotic treatment of *Escherichia coli* O157:H7 infections" Journal Medical **342**: 1930-1936.

Xiangjun Zhou, N., Toivola, D., Bishr Omary, M. (2000). "The cytoskeleton of digestive epithelial in health and disease." Journal Physiology **40**: 1108-1137.

## ANEXO 1

Correlación de los resultados obtenidos por las técnicas de Serología y PCR en la detección de EPEC.

Numero de muestras	Serología EPEC	Amplificación del gen eae	Amplificación del locus ial	Correlación entre serotipificación y gen eae
1	+	-	-	NC
2	+	-	+	NC
3	+	-	-	NC
4	+	-	-	NC
5	+	-	-	NC
6	-	+	-	NC
7	-	-	-	C
8	-	-	-	C
9	-	-	-	C
10	-	-	-	C
11	-	-	-	C
12	+	-	-	NC
13	-	-	-	C
14	-	-	-	C
15	+	-	-	NC
16	+	-	-	NC
17	-	-	-	C
18	+	-	-	NC
19	+	-	+	NC
20	-	-	-	C
21	+	+	-	C
22	+	-	-	NC
23	-	-	-	C
24	-	-	-	C
25	+	-	-	NC
26	-	-	-	C
27	-	-	-	C
28	+	+	-	C
29	-	-	-	C
30	+	+	-	C

EPEC: Escherichia coli enteropatogenica

NC: No Concuerta

C: Concuerta

## ANEXO 2

Correlación de los resultados obtenidos por las técnicas de serología y PCR en la detección de EIEC.

Numero de Muestra	Serología de EIEC	Amplificación del locus ial	Amplificación del gen eae	Correlación entre serotipificación y locus ial
31	+	-	+	NC
32	+	-	+	NC
33	+	-	-	NC
34	-	-	-	C
35	-	-	-	C
36	+	-	-	NC
37	-	-	-	C
38	-	-	-	C
39	+	-	-	NC
40	+	-	-	NC
41	+	+	-	C
42	-	-	-	C
43	-	-	-	C
44	-	-	-	C
45	+	-	-	NC
46	+	-	-	NC
47	-	-	+	C
48	+	-	-	NC
49	-	+	-	NC
50	+	+	-	C

EIEC: Escherichia coli enteroinvasiva

NC: No concuerda

C: Concuerda