



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

**ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES
I Z T A C A L A**



**U.N.A.M. CAMPUS
IZTACALA**

**FRECUENCIA DE AISLAMIENTO DE Escherichia coli PRODUCTORA
DE TOXINA TERMOESTABLE EN PACIENTES CON DIARREA EN
UNA COMUNIDAD RURAL.**

T E S I S

Que para obtener el título de

B I O L O G O

presenta

MARIA DEL PILAR RAMOS CASTILLO

Director de tesis: Q.F.B. SILVIA GONZALEZ ARROYO

Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Edo. de México

1986



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

A MIS PADRES Y HERMANOS

A MI ESPOSO

A MI DIRECTOR DE TESIS

AGRADEZCO SINCERAMENTE A LAS SIGUIENTES PERSONAS
SU ASESORIA EN LA REALIZACION DEL PRESENTE:

Q.F.B. EFRAIN PEÑALOZA AYALA
M. EN C. JAVIER TORRES LOPEZ
DRA. MA. DEL CARMEN MARTINEZ
DR. HECTOR GUISCAFRE GALLARDO

ESTE TRABAJO SE REALIZO EN EL LABORATORIO DE BACTERIOLOGIA DE LA
UNIDAD DE INVESTIGACION CLINICA EN ENFERMEDADES INFECCIOSAS Y PA
RASITARIAS, DEL C.M.N., I.M.S.S. Y FORMO PARTE DEL PROYECTO FI -
NANCIADO POR CONACYT CON LA CLAVE PC SABN - 021550.

C O N T E N I D O



	PAG.
I. RESUMEN.....	1
II. INTRODUCCION.....	2
III. ANTECEDENTES.....	5
- Objetivos.....	7
IV. DESCRIPCION DEL AREA DE ESTUDIO.....	8
V. MATERIAL Y METODOS.....	12
- Material biológico.....	12
- Condiciones de Cultivo y Preparación de la toxina.....	12
- Ensayo de ratón lactante para la detec- ción de la toxina termolábil de <u>E. coli</u>	13
VI. RESULTADOS.....	15
VII. DISCUSION.....	24
VIII. CONCLUSIONES.....	28
IX. APENDICES.....	29
X. BIBLIOGRAFIA.....	33

I. RESUMEN

Escherichia coli productora de toxina termoestable se ha aislado de casos con diarrea en humanos, cerdos y bovinos. Se han desarrollado diferentes técnicas para la detección de la toxina, la primera de ellas fué el ensayo de ratón lactante, el cual fué usado en el presente trabajo para determinar la frecuencia de aislamiento de dicho microorganismo en pacientes con diarrea en la comunidad rural de Cadereyta, Qro., en donde existen las condiciones necesarias que propician el desarrollo de dicha bacteria. Las muestras problema que fueron los sobrenadantes libres de bacterias, las cuales fueron previamente identificadas por pruebas bioquímicas y cultivadas en el medio especial sintético de Asparagina, fueron inoculados en ratones para posteriormente medir la acumulación de fluido intestinal y establecer la relación: peso de los intestinos/peso de los cuerpos. Cuando la relación fué \leq a 0.085 se consideró negativa la actividad de la toxina, cuando el valor fue \geq a 0.085 el resultado fué positivo.

Se obtuvo 19.4% de aislamiento de E. coli TTE+ a partir de 72 individuos con diarrea, al organizar los individuos con aislamiento en \leq y \geq a 5 años de edad se obtuvo una mayor frecuencia en el segundo grupo (21.4%) que en el primero (19.0%). La mayor frecuencia de familias de los individuos con E. coli TTE+ tienen un grado de hacinamiento moderado, baja escolaridad, tipo de abastecimiento de agua intradomiciliaria, practican el fecalismo al aire libre y son pocas las familias que conviven con animales. Las características clínicas de la enfermedad fueron; baja frecuencia en vómitos, fiebre, sangre en heces y aún menor frecuencia de disentería, el período de duración de la enfermedad fué de 7 - 14 días en la mayor parte de los casos.

La prueba de χ^2 revela que las diferencias encontradas en cada una de las características de composición, ambiente familiar y sintomatología, a excepción de la presencia de disentería, no fueron estadísticamente significativas .

II. INTRODUCCION

Existen cuatro clases de Escherichia coli que causan diarrea en humanos: E. coli enteropatógena, E. coli enterotoxigénica, E. coli enteroinvasiva y la más recientemente descubierta E. coli enterohemorrágica (31).

E. coli enterotoxigénica (E.C.E.T.), posee una serie de antígenos de superficie, termolábiles, que le permiten adherirse y colonizar las células epiteliales del intestino de humanos y animales. Estos antígenos de tipo fimbriado, han sido denominados Factores de Colonización (CFA) I y II (11). La producción de CFA está controlado genéticamente (43).

E.C.E.T. puede producir diarrea por la elaboración de una o dos toxinas: una termolábil (TTL) y una termoestable (TTE). Ambas enterotoxinas son codificadas por plásmidos transferibles Ent+, cuyo peso molecular es de 6.0×10^7 daltones si codifica para ambas toxinas; el que codifica para la producción sólo de TTE tiene un peso molecular de 2.1 a 8.0×10^7 daltones dependiendo del origen de la cepa (24).

La toxina termolábil es de alto peso molecular, está relacionada estructural e inmunológicamente con la toxina de Vibrio cholerae (6,19,28). Ejerce sus efectos sobre el intestino delgado "in vivo" y sobre una variedad de células de mamíferos (células adrenales de ratón Y-1, células de ovario de Hamster Chino CHO, y células de carcinoma humano He-La) (20,39). Estimula la enzima adenilato ciclasa, la cual produce un incremento en el AMPc que induce la liberación de líquidos y electrolitos al intestino dando como resultado la producción de diarrea (16).

Se han distinguido dos tipos de toxina termoestable en base a diferencias

de solubilidad en metanol, a su estructura y a la especificidad de la respuesta en los ensayos de asa ligada y ratón lactante: TTE de tipo I ó a y TTE de tipo II ó b (2).

Con respecto a la TTE-II su papel en la diarrea es incierto, se sabe que es una proteína con 23 aminoácidos con peso molecular de 5090 daltones, es insoluble en metanol, presenta actividad en asa ligada de conejo y en cerdo de 7 a 9 semanas, pero no en ratón lactante (4,9,36).

La TTE-I tiene asociación con casos de diarrea en humanos, cerdos y bovinos (1,27,40). Es detectable por la técnica de ratón lactante (7,17), soluble en metanol y estable al calor por 30 min. a 100°C (1,10,29). De naturaleza proteínica con peso molecular de 1972 daltones para cepas de origen humano y 5100 para las de origen porcino (1,42).

La molécula tiene uno o más puentes disulfuro, los cuales tienen que ver con su hidrofobicidad (5); no pierde actividad biológica después del tratamiento con proteasas, tripsina, proteinasa K, nucleasas, Fosfolipasa C y solventes orgánicos como acetona, fenol, cloroformo y metanol; es estable a valores de pH de 1 a 8 (1,10). Incrementa la actividad de la enzima guanilato ciclasa en fracciones membranales de mucosa intestinal de rata y conejo y estimula la secreción de fluido intestinal en ratón lactante por la elevación en los niveles de guanosín -3'-5' monofosfato cíclico (GMPc) que bloquea la absorción de iones cloro y agua por las células de la mucosa (8,13,37,38). El efecto de la toxina sobre la guanilato ciclasa es tejido-específica, ya que no altera la actividad de la guanilato ciclasa en hígado, corazón, pulmón, riñón, o corteza cerebral(10).

Hay evidencia que el receptor en las células intestinales es de naturaleza proteínica o glucoproteínica (14).

III. ANTECEDENTES.

Alrededor de 1800 y más tarde en 1900 en varios trabajos veterinarios, se asoció a E. coli como un agente causal de diarrea. En 1945, en la época de verano, en Inglaterra, se identificó serológicamente a E. coli en un 90% de individuos con diarrea. En 1956, en Calcuta, se demostró que cultivos de E. coli desarrollaron una respuesta de fluido secretorio en el intestino delgado de conejo. Posteriormente en 1967 se describieron cepas de dicho organismo que producían una enterotoxina termoestable, la cual provocó dilatación en asa ligada de intestino de cerdos y terneras (22).

También se relacionó a E. coli enterotoxigénica como causante de diarrea en turistas (21,33).

En 1972 fué desarrollada la técnica de ratón lactante para detectar ECET y más tarde perfeccionada por Giannella como un ensayo específico y confiable para detectar a E. coli productora sólo de TTE (7,17). A partir de entonces fué usada en varios trabajos epidemiológicos realizados con el fin de conocer las posibles causas y frecuencias en determinadas poblaciones de estudio. Para la Ciudad de México se reportó en 1977, que E.C.E.T. fue aislada en 29 de 62 casos de diarrea infantil (46.8%), de los cuales 18 fueron positivos para TTE (29%) (12). En un estudio en el Hospital de Pediatría del CMN, IMSS, se encontró ECET en 17 de 343 muestras diarréicas, de las cuales 6 (1.75%) fueron productoras de TTE (35).

En un estudio de dos años sobre agentes patógenos asociados a diarrea en una área rural de Bangladesh, se encontró mayor frecuencia de E. coli productora de TTE en el grupo de edad de 2 a 9 años, siguiendo el grupo de mayores de 10 años y el de menos frecuencia el de menores de dos años (2).

En 1983, en una villa de Brasil, se realizó un estudio dividiendo a la población en base a diferentes condiciones socioeconómicas. Se encuentra que el promedio de duración de diarrea fué de 4,2, 19.8 y 31.3 días; para el área urbana no pobre, el área urbana pobre y el área rural respectivamente. E. coli productora de TTE fué de las bacterias más frecuentemente aisladas (15.4%), el promedio de duración de la enfermedad para este organismo fué de 9 días, el 38% de los casos tuvieron fiebre y se encontró asociación con una baja de peso del individuo enfermo (23).

En ese mismo año, en un estudio sobre tres epidemias causadas por E. coli productora de TTE, en donde la fuente de infección fué una clase de queso importado, se destaca la necesidad de un inóculo grande de organismos para que ellos puedan causar la enfermedad, por lo que la transmisión de persona a persona es poco común, lo cual más bien ocurre en áreas en donde el saneamiento es pobre. Los síntomas presentes en la enfermedad incluyeron diarrea en 100%, dolor abdominal 80%, jaqueca 38%, náusea 38%, fiebre en 20% y poca frecuencia de pacientes con vómito y presencia de sangre en heces (32).

Más recientemente (1984) se aislaron a partir de 94 muestras diarréicas 14.89% cepas productoras de TTE, en niños menores de cinco años con condición socioeconómico baja (15).

Después del conocimiento sobre la composición y estructura de la toxina, siguió la búsqueda de una técnica que arrojará datos más confiables para la detección de la toxina, lo cual no fué fácil por considerar a la molécula como un antígeno de bajo peso molecular, por lo que fué necesario usar accareadores como la albúmina sérica de bovino. Las técnicas que en los últimos años se han sugerido son: Hibridización de DNA. Radioinmunoanálisis y

ELISA para detectar la TTE de E. coli (3,18,34).

En el presente trabajo, usando la técnica de ratón lactante, que aunque menos confiable que las anteriores, es la más asquible, se plantearon como objetivos, determinar la frecuencia de aislamiento de E. coli productora de toxina termoestable en pacientes con diarrea en una comunidad rural; así como, su importancia como agente causal de diarrea en grupos de diferentes edades; esperando mayor frecuencia de aislamiento que la reportada para el área urbana, debido a que en la comunidad de estudio se encuentran las condiciones que permiten la implantación del microorganismo; además de una elevada frecuencia de aislamiento en niños menores de cinco años, dado que corresponden a un grupo de la población con mayor riesgo de infección.

IV. DESCRIPCION DEL AREA DE ESTUDIO.

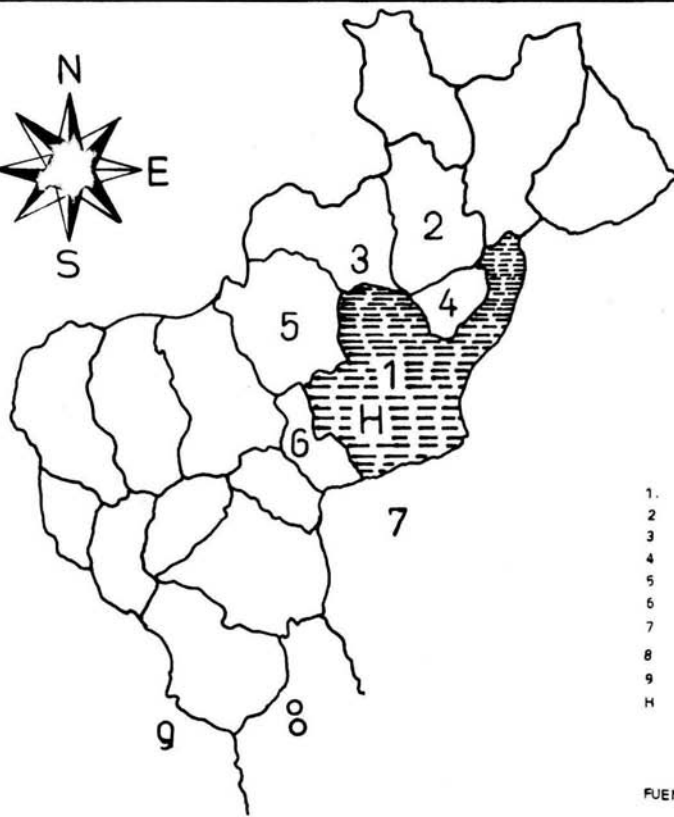
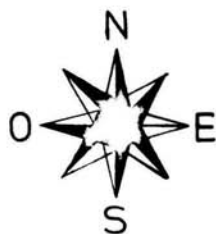
El Municipio de Cadereyta, Qro., se encuentra en la parte central del estado, tiene una extensión de 131 km² (Esquema 1).

El Municipio cuenta con 37542 habitantes, 18702 son mujeres y 18840 son hombres, distribuidos en 142 localidades. La población mayor de 15 años es de 19,445 de los cuales 11,260 son alfabetas y 8,185 analfabetas. Con respecto a las condiciones de vida el hacinamiento es moderado y el porcentaje de fecalismo al aire libre es alto. La mayoría de la población tiene abastecimiento de agua intradomiciliaria. La población económicamente activa es de 12,538, la gran mayoría de ellos se dedican a la agricultura, industrias manufactureras y labores de construcción (25,26,41), (Gráficas 1-4).

ESQUEMA No. 1

LOCALIZACION GEOGRAFICA

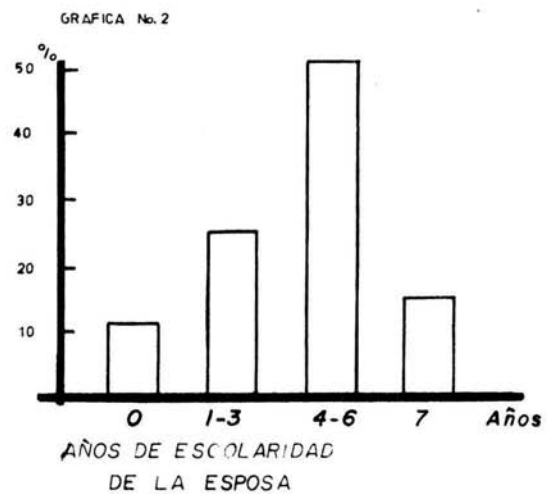
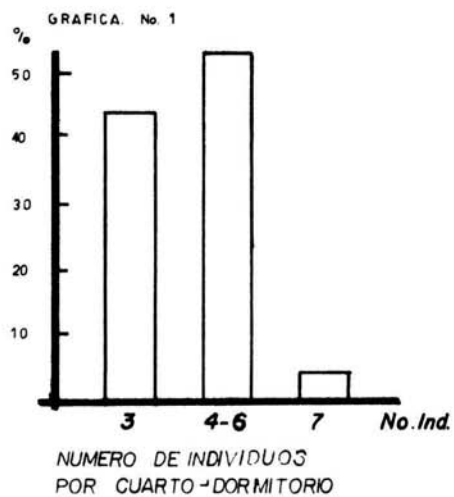
..Estado de Queretaro..



- 1. MUNICIPIO DE CADEREYTA
- 2 " " AMOLES
- 3 " " PEÑAMILLER
- 4 " " SAN JOAQUIN
- 5 " " TOLIMAN
- 6 " " EZEQUIEL MONTES
- 7 ESTADO DE HIDALGO
- 8 ESTADO DE MEXICO
- 9 ESTADO DE MICHOACAN
- H HOSPITAL GENERAL DE ZONA CADEREYTA, QRO.

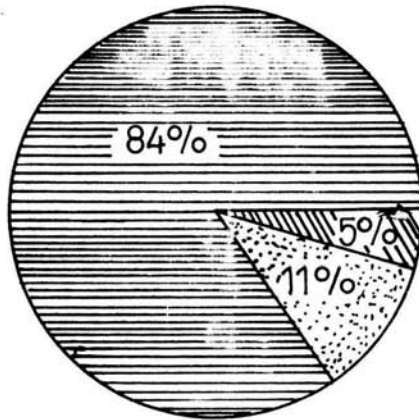
FUENTE: S.P.P. X CENSO NACIONAL DE POBLACION
Y VIVIENDA, 1980. VOL. I y II

COMPOSICION Y AMBIENTE FAMILIAR

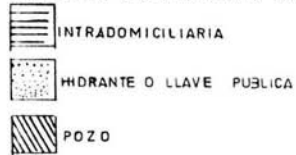


COMPOSICION Y AMBIENTE FAMILIAR

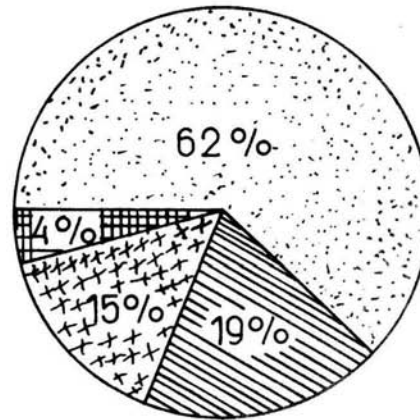
GRAFICA No. 3



FUENTE DE ABASTECIMIENTO DE AGUA



GRAFICA No. 4



TIPO DE ELIMINACION DE EXCRETAS



V. MATERIAL Y METODOS.

Material Biológico:

- Cepa control de Escherichia coli enterotoxigénica H10407, serotipo 078:H11, TTL⁺ y TTE⁺.
- Cepas de Escherichia coli aisladas de muestras diarreicas en Cadereyta, Qro.
- 600 ratones lactantes de la cepa Balb/c de 2 a 3 días de edad.

A los pacientes que el médico del Hospital de Cadereyta, diagnosticó con diarrea aguda, que no hubieran recibido tratamiento con antimicrobianos y que la enfermedad tuviera un tiempo de evolución menor a cinco días, se les solicitó una muestra fecal de aproximadamente 5 grs. la cual fué usada para la búsqueda de virus, parásitos y bacterias; ya que el presente trabajo forma parte de un proyecto global de investigación que se llevó a cabo en la Unidad de Investigación Clínica en Enfermedades Infecciosas y Parasitarias, en el Hospital de Pediatría, del CMN, IMSS.

Condiciones de Cultivo y Preparación de la Toxina;

La muestra destinada para el estudio de E. coli enterotoxigénica se procesó inicialmente en el laboratorio local de Cadereyta, en donde se realizó la primera siembra en medio de Mac Conkey, de donde se seleccionaron cuatro colonias sospechosas de E. coli y se sembraron por separado en medio de gelosa especial para su transporte al laboratorio de Bacteriología de la Unidad.

Una vez en el laboratorio, del medio de gelosa especial las cepas se sembraron en Agar Mac Conkey incubándose a 37°C por 24 horas, para posteriormente realizar pruebas bioquímicas para identificación en los siguientes me -

dios: Agar Hierro de Kligler, Agar Citrato de Simons, Agar Fenilalanina, Medio MIO, Caldo de Lisina, Caldo de Maionato. Las lecturas de las pruebas se observan en el apéndice II, en base a Lennette, 1985 (30).

Una vez identificadas las colonias se sembraron en el Agar de Tripticaseína, que es un medio rico e inerte, para obtener un inóculo fresco que se sembró en un medio especial diseñado para favorecer la producción de la toxina, el resto del cultivo se congeló a -70°C en viales con Infusión Cerebro Corazón y glicerol al 20%.

Para la detección de la toxina termoestable se sembró en medio sintético de Asparagina, las cuatro colonias de cada paciente en un solo matraz (22). Dicho medio contiene Acetato y Asparagina como fuente de Carbono y Nitrógeno que favorecen la producción de la toxina termoestable, además de la presencia de Mn^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{2+} y sulfatos (42). En este medio las bacterias se incubaron a 37°C por 24 horas con agitación constante en un baño metabólico a 70 rpm (Shaking Incubaron, Labline Instruments Inc.), la agitación es importante para favorecer la producción de la toxina (17).

Transcurrido ese tiempo las bacterias se eliminaron por centrifugación a 3500 rpm por 30 min (Centrífuga Sorvall) y el sobrenadante se utilizó para probar su actividad por la técnica de ratón lactante (7,17).

Ensayo de Ratón Lactante para la Detección de Toxina Termoestable:

Se utilizaron cuatro ratones de la cepa Balb/c de 2 a 3 días de edad para cada muestra problema, que es el sobrenadante libre de bacterias. Dicho sobrenadante se inoculó intragástricamente en un volumen de 0.1 ml para cada ratón conteniendo además un gota de colorante azul de Evans al 1%. Una vez

inoculados los ratones, se tuvieron a temperatura ambiente durante tres horas y media en vasos de plástico, para después medir la acumulación de flujo intestinal causado por la actividad de la toxina. Transcurrido ese tiempo los animales se sacrificaron con cloroformo y se extrajeron los intestinos y los cuerpos sin intestino. La actividad de la toxina se midió estableciendo la relación: peso de los intestinos/peso de los cuerpos sin intestino. Se obtuvo un promedio de la relación I/C para los cuatro ratones y se estableció el grado de positividad para la presencia de la toxina para cada sobrenadante problema. Cuando la relación I/C fué menor a 0.085 - se consideró negativo a la presencia de la toxina; cuando la relación fué mayor o igual a 0.085, los ratones presentaron inflamación por actividad de la toxina (17). Los ratones que no presentaron coloración en los intestinos, indicó que no fueron inoculados correctamente y se descartaron del experimento. Como control negativo se usó solamente medio y como positivo la cepa de E. coli H10407.

A cada paciente se le aplicó un cuestionario para investigar datos sobre el ambiente y composición familiar, así como de las características clínicas de la enfermedad de cada caso. Según se observa en los apéndices 3 y 4.

Los datos obtenidos para los casos con E. coli TTE⁺, se contrastaron mediante la prueba de χ^2 , para cada una de las características.

VI. RESULTADOS.

En la tabla I se pueden observar los resultados positivos obtenidos a partir del ensayo de ratón lactante, para la detección de la TTE de E.coli. De acuerdo al estándar referido en la parte de material y métodos, la relación I/C (gr/gr) 0.085 indica positividad. La mayor frecuencia encontrada fué de 35.8% para la relación 0.10, la cual indica moderada inflamación de los intestinos a causa de la acción de la TTE. Esta clasificación de baja, moderada y alta se basa en la observación directa de los intestinos y en todos los casos correspondió a la relación I/C encontrada. Cabe mencionar que se habla de número de sobrenadante y no de número de cepas, debido a que cada sobrenadante contenía las cuatro colonias aisladas para cada paciente y por lo cual no se pudo determinar si se trataba de cepas diferentes.

De los 72 pacientes que fueron estudiados con diarrea aguda (tabla II), se detectó E. coli productora de TTE en 14 de ellos (19.4%), los cuales se distribuyeron por edad de acuerdo a la tabla III, en donde la mayor frecuencia fué para el grupo de 2 a 4 años, (35.7%) y el menor el grupo de mayores de 35 años (7.2%), que específicamente se trató de un paciente de 60 años de edad.

Los casos positivos se organizaron en dos grupos de edad de menores y mayor-igual a cinco años, para obtener la frecuencia de positividad para cada grupo con respecto a los individuos que presentaron diarrea organizados en la misma forma (tabla IV). Se encontró mayor frecuencia en el grupo de mayor-igual de 5 años (21.4%) que en el de menores de 5 años (19.0%), como se puede notar existe poca diferencia en estas frecuencias, y como se observa en la tabla de contingencia 2 x 2 realizada para este fin, no hay significancia estadística.

Las características de Composición y Ambiente Familiar más relevantes de las 12 familias a las que pertenecían los casos con E. coli TTE⁺ y las 44 familias de casos de diarrea por otras causas se muestran en la tabla V. Tanto la frecuencia de individuos por familia, como por dormitorio nos dan idea del grado de hacinamiento presente. La mayor frecuencia encontrada en estas dos características fué para el grupo de 4-6 individuos.

Así mismo se puede ver que la mayoría de las madres tienen baja escolaridad (menos de 3 años); y que la ocupación que predomina en los jefes de familia es labores de campo. En cuanto al tipo de abastecimientos de agua de dichas familias la mayor frecuencia se encontró en el tipo intradomiliaria.

Un factor muy importante que influye en las infecciones gastrointestinales es la práctica del fecalismo al aire libre; nótese que la mayoría de estas familias lleva a cabo esta práctica. Se ha reportado, presencia de E. coli TTE⁺ en cerdos y bovinos, y sabiendo que en el área rural, las familias con viven con animales, se investigó el número de familias que tienen estos animales, como se puede ver la frecuencia fué muy baja.

Todas las diferencias encontradas en las diversas características investigadas fueron analizadas estadísticamente, tomando como testigo al grupo de individuos con diarrea por otras causas, y según se observa, las diferencias no fueron significativas estadísticamente.

La tabla VI nos muestra que la mayor frecuencia de individuos con E. coli productora de TTE tienen un período de duración de la diarrea de 7 a 14 días, no así para el grupo de individuos con diarrea por otras causas en

donde la mayor frecuencia se encontró en menos de 7 días de duración. Las evacuaciones con sangre y vómito son más frecuentes en el grupo de diarrea con E. coli TTE⁺. Los síntomas de disentería y fiebre fueron más frecuentes en el grupo de diarrea por otras causas.

Todas estas diferencias en cada uno de los síntomas fueron analizados mediante χ^2 y sólo en el síntoma de disentería se encontró diferencia significativa a nivel estadístico.

TABLA I. Resultados positivos de la prueba de ratón lactante para la detección de Toxina Termoestable

Relación I/C (gr/gr) +	No. de Sobrenadantes ⁺⁺	Frecuencia (%)
0.09	3	21.4
0.10	5	35.8
0.11	2	14.3
0.12	1	7.1
0.13	2	14.3
0.14	1	7.1
Total	14	100.0

+ El resultado es positivo cuando la relación I/C es ≥ 0.085 .

El resultado es un promedio de los cuatro ratones utilizados para cada sobrenadante.

++ Cada sobrenadante corresponde a las cuatro colonias de E. coli aisladas para cada paciente.



Foto 1. Ratón lactante inoculado con sobrenadante problema negativo a la presencia de la Toxina Termoestable de E.coli.



Foto 2. Ratón lactante con inflamación de intestinos causada por la actividad de la Toxina Termoestable de E.coli.

TABLA II. Frecuencia de Aislamiento de Escherichia coli
productora de toxina termoestable.

Individuos con diarrea		Individuos con diarrea con <u>E. coli</u> TTE ⁺		Individuos con diarrea sin <u>E. coli</u> TTE ⁺	
No.	(%)	No.	(%)	No.	(%)
72	(100)	14	(19.4)	58	(80.6)

TABLA III. Distribución por edad de los individuos con diarrea con E. coli productora de toxina termoestable.

Edad	Individuos con <u>E. coli</u> TTE ⁺	
	No.	(%)
0 - 11 meses	3	21.4
12 - 23 meses	3	21.4
2 - 4 años	5	35.7
5 - 14 años	22	14.3
15 - 24 años	0	0
25 - 34 años	0	0
≥ 35 años	1	7.2
T O T A L	14	100.0

TABLA IV. Distribución de los casos con diarrea por grupos de edad.

Grupos de edad (años)	Individuos con diarrea	Individuos con diarrea y <u>E. coli</u> TTE ⁺	%
< 5	58	11	19.0
≥ 5	14	3	21.4
T o t a l	72	14	19.4

Tabla de Contingencia 2 X 2:

Edad (años)	Individuos con <u>E. coli</u> TTE ⁺		Individuos sin <u>E. coli</u> TTE ⁺		Total
	Observados	Calculados	Observados	Calculados	
< 5	11	11.28	47	46.72	58
≥ 5	3	2.72	11	11.28	14
T o t a l	14		58		72

Valor de $\chi^2 = 0.05$

Valor de χ^2 en tablas: 3.84

$P \geq 0.05$

TABLA V. Composición y ambiente familiar de los 14 casos con diarrea aguda con *E. coli* TTE⁺ y de los 58 casos con diarrea por otras causas

Característica	Familias de individuos con <i>E. coli</i> TTE ⁺ N=12*		Familias de individuos sin <i>E. coli</i> TTE ⁺ N=44		Significancia
	No.	(%)	No.	(%)	
Frecuencia de Ind/Familia					
≤ 3	3	(25.0)	9	(20.5)	N/S
4-6	7	(58.3)	25	(56.8)	N/S
≥ 7	2	(16.7)	10	(22.7)	N/S
Frecuencia de Ind/Dormitorio					
≤ 3	4	(33.4)	19	(43.2)	N/S
4-6	8	(66.6)	22	(50.0)	N/S
≥ 7	0	(0)	3	(6.8)	N/S
Escolaridad de la madre					
≤ 3	7	(58.3)	19	(43.2)	N/S
4-6	5	(31.7)	20	(45.4)	N/S
≥ 7	0	(0)	5	(11.4)	N/S
Ocupación Jefe de Familia					
Labores de campo	7	(58.4)	17	(38.6)	N/S
Comerciante	1	(8.3)	2	(4.6)	N/S
Albañil	1	(8.3)	7	(15.9)	N/S
Empleado	1	(8.3)	7	(15.9)	N/S
Otro**	2	(16.7)	11	(25.0)	N/S
Abastecimiento de agua					
Intradomiliaria	8	(66.7)	31	(70.4)	N/S
Pozo	1	(8.3)	5	(11.4)	N/S
Pipa	2	(16.7)	1	(2.3)	N/S
Otro	1	(8.3)	7	(15.9)	N/S
Eliminación de Escretas					
Drenaje público	3	(25.0)	15	(34.1)	
Letrina	2	(16.7)	4	(9.1)	N/S
Fecalismo	7	(58.3)	25	(56.8)	N/S
Convivencia con animales					
Cerdos	3	(25.0)	15	(34.1)	N/S
Bovinos	1	(8.3)	5	(11.4)	N/S

* Dos familias con dos casos con *E. coli* TTE⁺

** Subempleado que se dedica a diferentes actividades.

TABLA VI. Características Clínicas de la Enfermedad

Síntoma	Individuos con Diarrea con <u>E. coli</u> TTE ⁺		Individuos con Diarrea por otras causas		Significancia
	No.	(%)	No.	(%)	
Duración de la diarrea (días)					
< 7	4	(28.6)	33	(56.9)	N/S
7-14	8	(57.1)	23	(39.7)	N/S
≥ 15	2	(14.3)	2	(3.4)	N/S
Evacuaciones con sangre	5	(37.5)	12	(20.7)	N/S
Disentería	1	(7.1)	20	(34.4)	S
Vómitos	4	(28.6)	16	(27.5)	N/S
Fiebre	3	(21.4)	20	(34.4)	N/S

VII. DISCUSION.

Aunque en la actualidad se cuentan con técnicas altamente sofisticadas como Hibridización de DNA, Radioinmunoanálisis y ELISA, que arrojan resultados más confiables y rápidos, la técnica de ratón lactante se sigue utilizando casi con el mismo grado de confianza en los laboratorios en donde no se dispone de la infraestructura necesaria, para la detección de la toxina termoestable de E. coli. Una de las principales dificultades para poder llevarla a cabo, fué la escasez de ratones, por lo que fué necesario preparar un sobrenadante con las cuatro colonias aisladas de cada paciente con diarrea, por lo tanto, no se pudo determinar si los resultados se debían a que todas las colonias producían TTE o sólo algunas.

La frecuencia total de aislamiento de C. coli TTE⁺ (19.4%) a partir de 72 pacientes con diarrea, fué más alta que la reportada por Muñoz, 1977 (1.75%) y Gallardo, 1984 (14.89%), para el área urbana. Sin embargo, no se puede establecer que esta frecuencia obtenida para el área rural sea más alta que en la urbana, porque no existe algún trabajo que reporte frecuencia de aislamiento para niños y adultos en el área urbana de México. Y dado que la mayoría de los reportes son para niños, fué interesante dividir a la población de estudio en grupos de edad de menores y mayor- igual a 5 años. Recordando la hipótesis se esperaba encontrar mayor frecuencia en el grupo de menores de cinco años, por ser los más susceptibles a la enfermedad, pero como se puede ver en la tabla IV la frecuencia más alta correspondió a los mayores de 5 años. Cabe aclarar que dentro de este último grupo se encontraban dos pacientes que pertenecían a las dos

únicas familias con dos casos de diarrea con E. coli TTE⁺, lo que nos hace suponer que la fuente de infección fué la misma. Estas frecuencias no esperadas podemos atribuir las al hecho de que fueron pocos pacientes estudiados y por lo tanto, no podemos afirmar que así se comporte nuestra población de estudio; o puede ser que el fenómeno sea cierto y, por lo tanto, amerite más investigación.

Se ha destacado la importancia de los medios mal saneados sobre la incidencia de E. coli TTE⁺ (15,35,23,32); de tal forma que en el presente trabajo se investigaron datos sobre la composición y ambiente familiar de los pacientes con E. coli productora de TTE para poder dilucidar los posibles factores que intervinieron en la frecuencia obtenida. El grado de hacinamiento en una familia con algún miembro con alguna enfermedad infecciosa, es importante por el alto riesgo de transmisión de persona a persona y si bien es cierto que las familias de los individuos con E. coli TTE⁺ tienen un hacinamiento moderado (58.3% de las familias con 4-6 ind/fam y 66.6% con 4-6 ind/dormitorio) que se consideraría importante porque pocas familias tienen más de 7 integrantes; estadísticamente no hubo diferencias significativas con respecto a las frecuencias obtenidas para las familias con bajo y elevado hacinamiento. El tipo de ocupación de los padres de familia es reflejo de la escolaridad de estos, en este estudio el 58.4% de los padres se dedican a la agricultura y si a esto se agrega que el 58.3% de las madres tienen menos de 3 años de escolaridad, se puede suponer que estas familias no llevan a cabo las reglas mínimas necesarias de higiene para prevenir enfermedades gastrointestinales.

La fuente de infección más común son las deyecciones fecales; siendo los mecanismos de transmisión el agua, alimentos y bebidas contaminadas con materia fecal o por contacto directo a través de las manos. En la comunidad de estudio la práctica del fecalismo se encuentra en mayor frecuencia (58.3%) con respecto a los otros tipos de eliminación de excretas, lo cual implica que esta característica pueda ser la principal fuente de infección; ya que como se puede ver en la tabla V, la mayoría de las familias con individuos con E. coli TTE⁺, utilizan el tipo de abastecimiento de agua intradomiliaria, lo que nos indicaría que hay poco riesgo de contaminación por este medio. El hospedero y reservorio principal es el hombre, aunque también pueden ser algunos animales domésticos, ya que a partir de éstos se ha aislado E. coli TTE⁺ como es el caso de cerdos y bovinos (1,27,40), pero al encontrar que pocas de estas familias conviven con dichos animales se descarta como factor importante en la adquisición de la enfermedad.

El análisis estadístico refleja que las diferencias encontradas en las características de composición y ambiente familiar no son significativas, aunque para el caso de la ocupación de los jefes de familia y tipo de abastecimiento de agua los datos obtenidos mediante la prueba de χ^2 se acercaron más al límite de significancia que las otras características.

Tal como se ha reportado en otros trabajos (23,32), se encontró que la mayoría de los individuos con E. coli TTE⁺ tienen un período de duración de la enfermedad que oscila entre los 7 y 14 días. El síntoma de disentería se encontró en muy poca frecuencia (7.1%) en los pacientes con E. coli TTE⁺ y dado que el análisis estadístico nos muestra diferencias significativas con respecto a los individuos que no tuvieron ese síntoma, podemos afirmar

que la disentería no se presenta dentro del cuadro clínico de la enfermedad causada por el microorganismo, como ha sido reportado por otros autores (23,32), estos trabajos también encuentran baja frecuencia en evacuaciones con sangre, vómito y fiebre, resultados muy parecidos a los que se observan en la tabla VI. Las diferencias encontradas en las frecuencias de presencia y ausencia de síntomas no fueron significativas a nivel estadístico.

VIII. CONCLUSIONES.

Mediante el ensayo de ratón lactante fué posible aislar E. coli productora de TTE en 14 de 72 individuos con diarrea (19.4%). Al organizar los pacientes en grupos de edad de $<$ y \geq de 5 años se encontró una mayor frecuencia de aislamiento en \geq de 5 años. Las diferencias encontradas entre estos grupos de edad no fueron estadísticamente significativas.

Las características de composición y ambiente familiar revelan que las familias de los individuos con E. coli TTE⁺, tienen grado de hacinamiento moderado, baja escolaridad de las madres y los jefes de familia, los cuales en su gran mayoría laboran en el campo. En cuanto a servicios se refiere el 66.7% de las familias tienen abastecimiento de agua de tipo intradomiliaria, 58.3% practican el fecalismo al aire libre, y son pocas las que conviven con cerdos y bovinos.

Como previamente se ha reportado se encuentra que las características clínicas de la diarrea por E. coli TTE⁺ son: Diarrea 100%, duración de la enfermedad entre 7 y 14 días, poca frecuencia en vómito (28.6%), fiebre(21.4%) y sangre en heces (37.5%) y aún menor frecuencia de disentería (7.1%).

IX. APENDICES.

APENDICE No. 1

IZT.

Composición del medio sintético de Asparagina:

- Cloruro de Sodio	2.52 gr.
- Acetato de Sodio	10.0 gr.
- Fosfato de Potasio Dibásico	11.42 gr.
- L-Asparagina	5.0 gr.
- Sulfato de Sodio	0.14 gr.
- Sulfato de Magnesio	0.05 gr.
Cloruro de Manganaso	0.005 gr.
- Sulfato de Fierro	0.005 gr.
- Agua Destilada	1000.0 ml.



U.N.A.M. CAMPUS
IZTACALA

El Cloruro de Manganeso y Sulfato de fierro fueron adicionados en cantidad de 1 ml/litro de medio de una solución stock 0.5% p/v.

Composición del medio de gelosa especial:

- Base gelosa sangre	20 grs.
- Agar bacteriológico	15 grs.
- Extracto de carne	1.5 grs.
- Agua destilada	1000 ml.
- pH final	7.4

APENDICE No. 2

IDENTIFICACION DE Escherichia coli MEDIANTE REACCIONES
BIOQUIMICAS (30)

REACCION	Porcentaje de Positividad
Producción de gas de D-Glucosa	90
Fermentación de la Lactosa	91
Producción de H ₂ S	0
Utilización de Citrato	0
Desaminación de Fenilalanina	0
Decarboxilación de Lisina	90
Movilidad	80
Decarboxilación de Ornitina	65
Producción de indol	95
Utilización de Malonato	0

APENDICE No. 3

CARACTERISTICAS CLINICAS DE LA ENFERMEDAD

Nombre _____

Edad _____ en _____ 1 = días
2 = meses
3 = años

Característica:

Días de duración de la diarrea _____

No. de evacuaciones últimas 24 horas _____

1 = Si 2 = No

Evacuaciones con sangre _____

Disentería _____

Fiebre _____

Vómito _____

COMPOSICION Y AMBIENTE FAMILIAR

NUMERO DE
FAMILIARES

OCUPACION DEL
JEFE DE FAMILIA

OCUPACION DE
LA ESPOSA

NUMERO DE AÑOS
DE ESCOLARIDAD
DEL JEFE DE FAM,

NUMERO DE AÑOS
DE ESCOLARIDAD
DE LA ESPOSA

NUMERO DE
CUARTOS USADOS
COMO DORMITORIOS

NUMERO DE INDIVIDUOS
POR CUARTO-DORMITORIO

CUARTO.1

CUARTO.2

CUARTO.3

CUARTO.4

FUENTE PRINCIPAL DE
APROVISIONAMIENTO
DE AGUA

- 1- intradomiciliario
- 2- hidrante público
- 3- pípa
- 4- pozo
- 5- río
- 6- cenote
- 7- lago o presa
- 8- aljibe
- 9- otros

METODO PRINCIPAL DE
ELIMINACION DE
EXCRETAS

- 1- drenaje público
- 2- fosa séptica
- 3- letrina
- 4- pozo negro
- 5- fecalismo

TABLA DE OCUPACIONES

- 01 pequeño propietario
- 02 ejidatario
- 03 mediero
- 04 peón
- 05 minero
- 06 pescador
- 07 obrero
- 08 albañil
- 09 comerciante
- 10 empleado
- 11 labores domésticas
- 12 otras

CONVIVENCIA
CON ANIMALES

1= SI
2=NO

AVES

CERDOS

BOVINOS

CAPRINOS

X. BIBLIOGRAFIA

- 1.- Alderete, J.F., Robertson, D.C. Purification and Chemical Characterization of the Heat - Stable Enterotoxin Produced by Porcine Strains of Enterotoxigenic Escherichia coli. Infect. Immun. 1978; 19: 1021-1030.
- 2.- Black, R.E., Merson, M.H., Rahman, A.S.M.M., Yunus, M., Alim, A., Hug, I., Yolken R.H., Curlin, G.T. A two-Year Study of Bacterial, Viral, and Parasitic Agents associated with Diarrhea in Rural Bangladesh. J. Infect. Dis. 1980; 142: 660-664.
- 3.- Brandwein, H., Deutsch, A., Thompson, M., Giannella, R. Production of Neutralizing Monoclonal Antibodies to Escherichia coli Heat-Stable Enterotoxin. Infect. Immun. 1985; 47: 242-246.
- 4.- Burgess, M.N., Hywater, R.J., Cowley, C.M., Mullan, N.A., Newsome, P.M. Biological evaluation of a methanol - soluble, Heat - stable Escherichia coli Enterotoxin in Infant Mice, Pigs, Rabbits, and Calves. Infect. Immun. 1978; 21: 526-531.
- 5.- Chan, S.K., Giannella, R.A. Purification and Characterization of Heat-Stable - Enterotoxin produced by a strain of E. coli pathogenic for man. J. Biol. Chem. 1980; 255: 4716-4721.
- 6.- Clements, J.D., Finkelstein, R.A. Isolation and Characterization of Homogeneous Heat - Labile Enterotoxins with High Specific activity from Escherichia coli cultures. Infect. Immun. 1979; 24: 760-769.
- 7.- Dean, A.G., Ching, Yi-Chuan., Williams, R.G., Harden, L.B. Test of Escherichia coli Enterotoxigen using infant mice: Application in a study of diarrhea in Children in Honolulu. J. Infec. Dis. 1972; 125: 497-411.

- 8.- Dreyfus, L.A., Friedmann, L.J., Robertson, D.C. Characterization of the mechanism of action of Escherichia coli heat-stable enterotoxin. *Infect Immun.* 1984; 44: 493-501.
- 9.- Echeverria, P., Seriwatana, J., Patamaroj, U., Mossley, S., Mc Farland, A., Chityothin, O., Chaicumpa, W. Prevalence of Heat - stable II Enterotoxigenic Escherichia coli in pigs, water, and people at farms in Thailand as Determined by DNA Hybridization. *J. Clin. Microbiol.* 1984; 13: 489-491.
- 10.-Eidels, L., Proia, R.L., Hart, D. Membrane receptors for Bacterial Toxins. *Microbiol. Rev.* 1983; 596-620.
- 11.-Evans, D.G., Evans Jr, D.J., Tjoa, S., DuPont, H.L. Detection and Characterization of Colonization Factor of Enterotoxigenic Escherichia coli isolated from adults with diarrhea. *Infect. Immun.* 1978; 727-736.
- 12.-Evans, D.G., Olarte, J., DuPont, H.L. Enteropathogens associated with pediatric diarrhea in Mexico City. *J. Pediatr.* 1977;
- 13.-Field, M., Lloyd, H.G., Laird, W.J., Smith, P.L. Heat - stable enterotoxin of Escherichia coli: In vitro effects of guanylate cyclase activity, cyclic GMP concentration, and ion transport in small intestine. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1978; 75: 2800-2804.
- 14.-Frantz, J.C., Robertson, D.C. Binding of Escherichia coli heat - stable Enterotoxin to rat intestinal cells and Brush Border Membrans. *Infect. Immun.* 1984; 43: 622 -630.
- 15.-Gallardo, R.G. Aislamiento e identificación de cepas de Escherichia coli enterotoxigénica en muestras diarréicas. 1984; Tesis.Q.F.B.U.N.A.M.

- 16.-Gemmell, C.G. Comparative study of the nature and biological activities of bacterial enterotoxins. *J.Med.Microbiol.* 1984; 17: 217-235.
- 17.-Giannella, R.A. Suckling Mouse Model for detection of Heat - Stable Escherichia coli enterotoxin: Characteristics of the Model. *Infect. Immun.* 1976; 14: 95-99.
- 18.-Giannella, R.A., Drake, K.W., Luttrell, M. Development of a Radioimmunoassay for Escherichia coli Heat - stable enterotoxin: Comparison with the Suckling Mouse Bioassay. *Infect. Immun.* 1981; 33: 186-192.
- 19.-Gill, D.M., Clements, J.D., Robertson, D.C., Finkelstein, R.A. Subunit Number and Arrangement in Escherichia coli Heat - labile Enterotoxin. *Infect. Immun.* 1981; 33: 677-682.
- 20.-Giugliano, L.G., Mann, G.F., Drasar, B.S. Response of Mammalian cell lines to the toxins of Escherichia coli. *J.Med.Microbiol.* 1982; 15: 531-539.
- 21.-Gorbach, S.L., Kaan, B.H., Evans, D.G., Evans, D. J.Jr., Bessudo, D. Travelers' diarrhea and Toxigenic Escherichia coli. *N. Engl. J. Med.* 1975; 292: 933-936.
- 22.-Greenberg, R.N., Guerrant, R.L. E. coli Heat - Stable Enterotoxin. *Pharmac. Ther.* 1981; 13: 507-531.
- 23.-Guerrant, R.L., Kirchhoff, L.V., Shields, D.S., Nations, M.K., Leslie, J., Sousa, M.A., Araujo, J.G., Correia, L.L., Sauer, K.T., MacClelland, K.E., Trowbridge, F.L., Hughes, J.M. Prospective study of diarrheal illnesses in Northeastern Brazil: Patterns of Disease, Nutritional Impact, Etiologies, and Risk Factors. *J.Infect.Dis.* 1983; 148: 986-997.

- 24.-Gyles, C., So, M., Falkow, S. The Enterotoxin Plasmids of Escherichia coli. J. Infect. Dis. 130: 40-49.
- 25.-Hospital Rural IMSS - COPLAMAR. 1983. Diagnosis de la Comunidad de Cadereyta, Querétaro.
- 26.-Hospital rural IMSS-COPLAMAR. 1983. Diagnosis del Hospital de Cadereyta, Qro.
- 27.-Kapitany, R.A., Scott, A., Forsyth, G.W., McKenzie, S.L., Worthington, R.W. Evidence for Two Heat - Stable Enterotoxins produced by Enterotoxigenic Escherichia coli. Infect. Immun. 1979; 14: 965-966.
- 28.-Kunkel, S.V., Robertson, D.C. Purification and Chemical Characterization of Heat - labile Enterotoxin Produced by Enterotoxigenic Escherichia coli. Infect. Immun. 1979; 25: 586-596.
- 29.-Lallier, R., Lariviere, S., Pierre, S. St. Escherichia coli Heat-stable Enterotoxin: Rapid Method of Purification and some Characteristics of the toxin. Infect. Immun. 1980; 28: 469-474.
- 30.-Lennette, E.H., Balows, A., Hausler, W.J., Shadomy, H.J. Manual of Clinical Microbiology. 4a. edición. American Society for Microbiology. 1985. Pp. 263-277.
- 31.-Levine, M.M., Edelman, R. Enteropathogenic Escherichia coli of classic serotypes associated with infant diarrhea: Epidemiology and Pathogenesis. Epidemiol. Rev. 1984; 6: 31-51.

- 32.-MacDonald, K.L., Gidson, M., Strohmeyer, C., Levy, M.E., Wells, J.G., -
Puhr, N.D., Wachsmuth, K., Hargrett, N.T., Cohen, M.L. A multistate -
outbreak of gastrointestinal illness caused by enterotoxigenic Escheri-
chia coli in imported semisoft cheese. J. Infect. Dis. 1985; 151:716-
720.
- 33.-Merson, M.H., Morris, G.K., Sack, D.A., Wells, J.G., Feeley, J.C., Brad-
ley, R., Creech, W.B., Kapikian, A.Z., Gangorosa, E.J. Travelers' dia-
rrhea in Mexico. N. Engl. J. Med. 1976; 294:1299-1305.
- 34.-Moseley, S.L., Huq, I., Alim, A.R.M.A., So, M., Samadpour, M.M., Falkow,
S. Detection of enterotoxigenic Escherichia coli by DNA colony hybridi-
zation. J. Infect. Dis. 1980; 142:892-898.
- 35.-Muñoz, O.H., Coello, P.R., Serafín, F.A., Olarte, J., Pickering, L.K.,
Dupont, H., Gutierrez, G. Gastroenteritis Infecciosa Aguda. Etiología
y su correlación con las manifestaciones clínicas y el moco fecal. -
Arch. Invest. Med. (Méx.). 1979; 10:135-145.
- 36.-Picken, R.N., Mazaitis, A.J., Maas, W.K., Rey, M., Heynaker, H. Nucleo-
tide sequence of the gens for heat-stable enterotoxin II of Escherichia
coli. Infect. Immun. 1983; 42:269-275.
- 37.-Rao, M.C., Guandalini, S., Smith, P.L., Field, M. Mode of action of -
heat-stable Escherichia coli enterotoxin. Tissue and subcellular speci-
ficities and role of cyclic GMP. Biochim. Biophys. Acta. 1980; 632:35-
46.
- 38.-Rao, M.C., Orellana, S.A., Field, M., Robertson, D.C., Giannella, R.A.
Comparison of the biological actions of three purified heat-stable En-



U.N.A.M. CAMPUS
IZTACAL.

38.

- terotoxins: Effects on ion transport and guanylate cyclase activity in rabbit ileum in vitro. *Infect. Immun.* 1981; 33:165-170.
- 39.-Sack, D.A., Sack, R.B. Test for enterotoxigenic Escherichia coli using Y1 adrenal cells in miniculture. *Infect. Immun.* 1975; 11:334-336.
- 40.-Saeed, A.M.K., Magnuson, N.S., Spiranganathan, N., Burger, D., Cosand, W. Molecular homogeneity of heat-stable enterotoxins produced by ovine enterotoxigenic Escherichia coli. *Infect. Immun.* 1984; 45:242-247.
- IZT.
- 41.-Secretaría de Programación y Presupuesto. X Censo Nacional de Población y Vivienda. 1980; Vol. I y II.
- 42.-Staples, S.J., Asher, S.E., Giannella, R.A. Purification and characterization of heat-stable enterotoxin produced by a strain de E. coli pathogenic for man. *J. Biol. Chem.* 1980; 255:4716-4721.
- 43.-Willshaw, G.A., Smith, H.R., Mac Connell, M.M., Barclay, E.A., Krnjulac, J., Rowe, B. Genetic and molecular studies of plasmids coding for colonization factor antigen I and heat-stable enterotoxin in several Escherichia coli serotypes. *Infect. Immun.* 1982; 37:858-868.