

1126114
19

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO



DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO
FACULTAD DE MEDICINA

ETIOPATOGENIA DEL SINDROME DIARREI-
CO AGUDO EN UNA POBLACION
PEDIATRICA DEL HOSPITAL
REGIONAL 20 DE NOVIEMBRE,
ISSSTE

T E S I S
PARA OBTENER EL TITULO DE:
ESPECIALISTA EN:
CIENCIAS BIOMEDICAS
(BACTERIOLOGIA)

P R E S E N T A :
Q. F. ANA DOLORES DEL ROCIO SARMIENTO ARCE





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 está 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.

INDICE

1. INTRODUCCION	1
2. GENERALIDADES	4
<i>Escherichia coli</i>	7
<i>Campylobacter</i>	12
<i>Shigella</i>	15
<i>Salmonella</i>	17
<i>Yersinia enterocolitica</i>	19
<i>Clostridium difficile</i>	20
Rotavirus	22
<i>Cryptosporidium</i>	25
Citología de moco fecal	29
3. HIPOTESIS	31
4. OBJETIVOS	32
5. MATERIAL Y METODOS	33
Figura 1. Esquema de trabajo (A). Coprocultivo (B).....	44
Figura 2. Aislamiento e identificación de <i>Campylobacter</i>	45
Figura 3. Búsqueda de Enterobacterias	46
Figura 4. Aislamiento e identificación de <i>Y. enterocolitica</i>	47
Figura 5. Aislamiento e identificación de <i>C. difficile</i>	48
6. RESULTADOS	49
7. DISCUSION	58
8. CONCLUSIONES	61
9. APENDICES	63
Apéndice 1. Medios de cultivos	63
Apéndice 2. Reactivos	65
Apéndice 3. Antisueros	71
10. REFERENCIAS	74

INTRODUCCION

El síndrome diarreico es una manifestación clínica de patologías diversas, y se define como el incremento en la frecuencia de evacuaciones líquidas o semilíquidas en relación al patrón usual de cada individuo. Este problema se encuentra asociado en la mayor parte de los casos, con agentes bacterianos, parasitarios, virales y micóticos, como etiología única o múltiple (1,2).

El control de este problema de salud se ha basado fundamentalmente en la mejoría del medio ambiente donde vive el niño y en el tratamiento oportuno y adecuado del proceso agudo para impedir las complicaciones causadas por la enfermedad que pudieran provocar al niño la muerte (3).

Un estudio realizado por la OMS en 1988 indica que 1.3 mil millones de episodios de diarrea ocurren cada año en niños menores de cinco años de edad en Asia (excluyendo China), Africa y América Latina de los cuales 4 millones de niños en este grupo de edad mueren anualmente de diarrea; y que 80% de estas muertes ocurren en los dos primeros años de vida (4).

Es importante destacar que en muchos casos las complicaciones por gastroenteritis ocurren no sólo en los pacientes que carecen de atención médica oportuna, sino también en aquellos que reciben tratamientos inadecuados, uso indiscriminado de antibióticos, los cuales en ocasiones no solo no mejoran el proceso sino que pueden agravarlo al prolongar el estado de portador (1).

En la Ciudad de México muchos niños presentan de 3 a 5 cuadros de diarrea al año con un promedio de 2.7 por niño (5). En poblaciones

rurales, el 98% de los menores de un año presentan 3 cuadros en promedio en el curso de su primer año de vida y otros 3 en el curso del segundo (3).

Hasta la década de los 60's la etiología de los casos de diarrea fue oscura, excepto para epidemias (6). En México, los problemas gastrointestinales causados por bacterias son de primera importancia y las enterobacterias, tales como *Salmonella*, *Shigella* o serotipos enteropatógenos de *E. coli* son la causa principal de este tipo de gastroenteritis en niños y adultos. Un gran número de casos fueron considerados tradicionalmente de etiología viral o desconocida por carecer de metodología adecuada, sin embargo esta situación ha cambiado actualmente, en particular por la identificación de Rotavirus, otros patógenos bacterianos, así como de otros protozoarios implicados.

De los cuadros enterales diagnosticados clínicamente, sólo en la mitad de ellos es posible identificar un germen causal, ya sea por coprocultivo o por estudio coproparasitológico. Por este motivo cerca del 40% de pacientes quedan sin diagnóstico etiológico. Esto se puede deber, en cierta medida, a que no se lleva a cabo una búsqueda de todos los posibles agentes causales (7,8,9,10).

Cravioto y cols., investigando este problema en una población rural, refieren haber aislado al menos un posible agente causal en el 74 al 84% de pacientes menores de un año que cursaron con diarrea los dos primeros años de vida (3).

Pickering y cols. en 1978, realizaron un estudio comparativo entre niños que asistieron a centros hospitalarios de México y Houston, encontrando que los gérmenes aislados más frecuentemente

fueron *Shigella*, *Salmonella* y Rotavirus, también encontraron títulos elevados de anticuerpos en suero contra toxina termolábil de *E. coli* (9).

En 1980 Morales-Castillo y cols., en un estudio de 256 niños de población urbana aislaron con mayor frecuencia Rotavirus y *E. coli* enteropatógena asociados a diarrea (11).

Cravioto y cols. durante 1982, estudiaron la etiología de gastroenteritis en una población rural mexicana, refiriendo que los agentes causales encontrados con mayor frecuencia fueron: en menores de un año, *E. coli* enteropatógena y enterotoxigénica; mientras que en niños de 12 a 18 meses, *E. coli* enterotoxigénica y Rotavirus (3).

Calva y cols. en un estudio realizado en 1983, en una población suburbana de la Ciudad de México, buscaron únicamente *Campylobacter* sp., sin investigar otros agentes etiológicos capaces de producir diarrea, encontrando que el 60% de los niños estudiados eran portadores de este germen (5).

Mertens y cols., en un estudio de 371 niños con diarrea y 121 controles realizado en Sri Lanka, publicado en 1990 encontraron que Rotavirus fue el germen más frecuentemente aislado, siguiendo *Shigella* y luego *Salmonella*. Los casos con diarrea tuvieron un aislamiento de 53.7% y los controles solamente 19.6% (12).

La importancia que revisten las enfermedades diarreicas en nuestro medio, sobre todo en la población pediátrica asistencial al Servicio de Urgencias-Pediatría del "Hospital Regional 20 de Noviembre" ISSSTE, fueron las causas que motivaron el presente estudio, cuyo desarrollo servirá para establecer las nuevas técnicas de identificación microbiana utilizadas en este estudio.

GENERALIDADES

Los agentes etiológicos más frecuentes de la diarrea infecciosa son los virus, las bacterias y los parásitos; sólo en raras ocasiones están implicados los hongos, los cuales causan problemas infecciosos en individuos inmunocomprometidos. El proceso patológico propiamente dicho consta de tres fases (13):

1) La ingestión del microorganismo en cantidad suficiente que resista las defensas naturales del huésped presentes en el aparato digestivo, como son la acidez gástrica, la capa de moco que cubre la mucosa, el peristaltismo, la competencia bacteriana y la inmunidad intestinal, posiblemente asociadas con coproanticuerpos, así como factores inespecíficos de resistencia y los epitopes intestinales o sitios receptores para la fijación de los microorganismos o fracciones tóxicas.

El tamaño de la dosis infecciosa mínima varía con los distintos agentes.

2) En una segunda etapa el germen tendrá que colonizar el intestino y multiplicarse en cantidades importantes antes de ejercer su acción patógena.

3) Finalmente, en la tercera fase entrará en acción uno o varios de los tres mecanismos de virulencia básicos que poseen los microorganismos enteropatógenos:

- a) producción de enterotoxinas
- b) invasividad
- c) capacidad de adherencia

Los microorganismos enteropatógenos poseen diversos factores de virulencia, que participan en el proceso infeccioso, como se describe en el cuadro 1.

Cuadro 1. Factores de virulencia presentes en enteropatógenos.

FACTOR	MICROORGANISMO
Factores de colonización	CFA/I CFA/II CFA/III CFA/IV (antes E-8775) <i>E. coli</i> (ETEC)
Toxinas	Enterotoxinas: CT LT STa STb ST-A ST-B <i>V. cholerae</i> <i>E. coli</i> (ETEC) <i>E. coli</i> (ETEC) <i>E. coli</i> (ETEC) <i>Shigella</i> <i>Shigella</i>
	Citotoxinas: LT ST LT <i>C. difficile</i> <i>Y. enterocolitica</i> <i>Campylobacter</i>
	Neurotoxinas: <i>E. coli</i> (serotipos de EPEC) EHEC-O157 <i>S. dysenteriae</i> 1 y otras <i>Shigella</i> , <i>C. difficile</i> -toxina B
	Endotoxinas: <i>C. botulinium</i> <i>S. aureus</i> <i>B. cereus</i>
	<i>Salmonella</i>
Invasividad	<i>Shigella</i> , <i>Salmonella</i> <i>Campylobacter</i> , EIEC <i>Y. enterocolitica</i>
Adherencia	ETEC, EPEC, EAEC

a) Las toxinas se clasifican en dos grupos: exotoxinas constituidas por proteínas de síntesis bacteriana y endotoxinas que son elementos

constitutivos de la pared celular formados por fosfolípidos y polisacáridos (14,15). Las exotoxinas se clasifican a su vez en tres grupos:

1) Neurotoxinas: algunas de estas toxinas son elaboradas por bacterias como *Clostridium botulinum*, *Staphylococcus aureus*, o *Bacillus cereus*.

2) Enterotoxinas: se ha denominado así porque su actividad tóxica tiene efecto en la porción entérica. La primera enterotoxina descrita fue la de *V. cholerae* que produce un aumento en los niveles de AMPc intracelular en células intestinales, incrementando la secreción de líquido extraintestinal. Algunas cepas de *E. coli* enterotoxigénica producen una enterotoxina muy similar a la descrita

en *V. cholerae*. En algunas especies de *Salmonella*, así como de *Klebsiella*, *Clostridium perfringens*, *Shigella dysenteriae* y *B. cereus* se han descrito también la producción de enterotoxinas.

3) Citotoxinas: se ha observado que estas son capaces de destruir las células de mamíferos; son producidas por varias especies de *Shigella*, *Clostridium perfringens*, *Vibrio parahaemolyticus*, *S. aureus*, *Clostridium difficile* y por algunos serogrupos de *E. coli*.

b) Invasividad: Ciertas bacterias como *Shigella*, *Salmonella*, *Yersinia enterocolitica*, *Campylobacter* y *E. coli* enteroinvasiva (EIEC) poseen habilidad, no solo de colonizar el intestino si no de penetrar la mucosa intestinal y multiplicarse en el tejido epitelial dando origen a lesiones inflamatorias locales. Aparentemente este mecanismo invasivo constituye el factor de virulencia esencial en la patogenia de estas infecciones. Además

del poder invasivo, algunos de estos gérmenes elaboran diferentes tipos de toxinas, cuyo papel en el proceso patológico no es claro (16,17,18).

- c) **Capacidad de adherencia:** Se ha encontrado que algunas cepas de *E. coli* son capaces de adherirse a la mucosa intestinal, alterando la función de las vellosidades intestinales. El fenómeno de adhesión puede demostrarse "in vitro" en células adenocarcinoma de ratón (HEp-2) en cultivo (19).

Escherichia coli

Se encuentra habitualmente en el tubo digestivo del hombre y de los animales, predominando en el colon. Es un bacilo gram negativo, no produce esporas. *E. coli* se ha agrupado en cinco grupos de acuerdo a su mecanismo patogénico (20).

- A) *E. coli* enteropatógena (EPEC)
- B) *E. coli* enterotoxigénica (ETEC)
- C) *E. coli* enteroinvasiva (EIEC)
- D) *E. coli* enterohemorrágica (EHEC)
- E) *E. coli* enteroadherente (EAEC)

A) *E. coli* enteropatógena (EPEC)

La identificación de estas cepas se realiza por medio de la tipificación de los antígenos somáticos (O), flagelares (H) y capsulares (K) de la bacteria según el esquema descrito por Kauffman en 1947 (21).

Se han descrito dos tipos de mecanismos por los cuales las EPEC

pueden producir daño:

1) la capacidad de adhesión a la mucosa intestinal, 2) la producción de citotoxinas.

La capacidad para adherirse al tejido epitelial ha sido uno de los atributos de patogenicidad importantes descritos en las bacterias ya que permite la colonización del tejido en donde causan daño.

En 1979 Cravioto y cols., describieron que el 80% de las EPEC aisladas de epidemias de cuneros tenían la capacidad casi exclusiva de adherirse "in vitro" a células HEp-2 en cultivo. La capacidad de estas cepas de adherirse a los receptores de las células epiteliales se confirmó en biopsias intestinales de niños con diarrea severas y prolongadas que presentaban microcolonias bacterianas adheridas focalmente al epitelio intestinal (19).

Levine en un artículo publicado en 1985, encontró que existe una relación directa entre adhesividad de EPEC a células HEp-2 y la presencia de diarrea en voluntarios humanos inoculados oralmente con estas cepas (23).

El control genético de esta capacidad adhesiva reside en plásmidos, los cuales codifican para la producción de una adhesina no fimbriada que se encuentra en la parte exterior de la membrana celular de esta bacteria, por medio de la cual se adhiere a receptores específicos de la célula intestinal (23).

En cuanto a la producción de toxinas, estudios realizados en cepas de *E. coli* han demostrado su presencia y sus efectos en diferentes tejidos animales.

Konowalchuk y cols. en 1977, encontraron que los filtrados de los cultivos de algunos serotipos de *E. coli* eran capaces de destruir las

células de riñón de mono verde africano (Vero) y que este efecto era diferente al producido por las cepas enterotoxigénicas de *E. coli* que sólo cambiaban la forma de las células (efecto citotónico) sin destruirlas. Esta toxina VT es similar a la citotoxina neurotóxica producida por *Shigella dysenteriae* 1; la relación que tiene la toxina VT con diarrea producida por EPEC sigue siendo oscura ya que no todas las cepas pertenecientes a estos serotipos la producen (24,25).

Actualmente se llevan a cabo estudios para investigar si la presencia de VT y la adhesividad a células HEP-2 se encuentran asociados a EPEC y si ambas son necesarias para producir diarrea en humanos.

B) *E. coli* enterotoxigénica (ETEC).

Estas cepas son capaces de producir dos tipos de enterotoxinas, una lábil (LT) y otra estable al calentamiento (ST). Una misma bacteria puede producir una o ambas enterotoxinas. La producción de enterotoxinas no es suficiente para que una cepa ETEC produzca diarrea (26).

El microorganismo debe ser capaz de adherirse y colonizar áreas de flujo rápido en el intestino y competir con una gran cantidad de gérmenes de la microbiota local. Para colonizar estas áreas del intestino las cepas ETEC han desarrollado apéndices proteicos superficiales denominados fimbrias que les permiten adherirse a receptores específicos en la célula intestinal. Estos factores son específicos para cada factor de colonización y probablemente determinan la patogenicidad (26,27).

A estas estructuras fimbriadas se les ha denominado factores

antigénicos de colonización (CFA) (37,38), que por su carácter proteico son capaces de producir una respuesta inmune local y sistémica en el hospedero. Esta misma propiedad permite la elaboración de antisueros específicos contra estos factores en conejos, lo que permite su detección e identificación serológica en el laboratorio (26).

También puede demostrarse la presencia de estos factores por microscopía electrónica o por hemaglutinación manosa-resistente (HAMR) (26,27,28).

La información genética para la producción de estas fimbrias se localiza en plásmidos y puede ser transferida de una bacteria a otra por el proceso de conjugación bacteriana (26).

En las cepas de origen humano, las estructuras fimbriadas o fibrilares llamados CFA, se dividen en CFA/I, CFA/II, CFA/III y CFA/IV (antes llamado E-8775). Los CFA descritos son lo que se conoce como antígenos de superficie.

Las ETEC de origen animal presentan estructuras semejantes llamados antígenos, de los cuales el primer factor descrito fue el K88, el cual se ha involucrado en la producción de enteritis en cerdos (28); otros factores adhesivos relacionados con producción de diarrea en animales son el K99, F41 y 987P (29,30,31).

C) *E. coli* enteroinvasiva (EIEC).

DuPont y cols. en 1971 describieron ciertas cepas de *E. coli* que causan formas de diarrea invasiva y disenterica con serotipos distintos de ETEC y EPEC (17). Se parecen a *Shigella* ya que no tienen flagelos (por lo tanto son inmóviles) no fermentan la lactosa

y presentan reacción cruzada con los antígenos O.

En conejos y cobayos inoculados experimentalmente con cepas de EIEC se ha demostrado que la ulceración del intestino se debe a invasión y reproducción de estas cepas dentro del citoplasma celular (21,32).

Las EIEC actúan penetrando la mucosa intestinal, multiplicándose en el tejido y produciendo reacción inflamatoria y lesiones ulcerosas con el consiguiente efecto de salida del líquido y electrólitos, así como la presencia de sangre y moco en las heces.

El ataque de los microorganismos es en la base de las microvellosidades donde penetra a las células epiteliales.

La capacidad invasiva del epitelio por cepas EIEC está determinada por la información genética que reside tanto en plásmidos como en el cromosoma de estas bacterias (33,34).

Al parecer esta capacidad es un proceso complicado de interacción entre el microorganismo y receptores específicos en la célula epitelial del intestino grueso, cuyo mecanismo aún se está estudiando.

D) *E. coli* enterohemorrágica (EHEC).

En este grupo de cepas de *E. coli*, la capacidad patogénica se ha asociado con la presencia de colitis hemorrágica en humanos.

Estas cepas no tienen capacidad de producir ST ni LT, no pertenece a los serogrupos EPEC clásicos ni tiene capacidad invasiva. La única característica patogénica que se ha descrito es la producción de grandes cantidades de VT en cultivos de células (35). Estudios posteriores han demostrado que esta citotoxina es idéntica a la toxina producida por *Shigella dysenteriae* 1 (48).

En la búsqueda de cepas similares en brotes de colitis hemorrágica se ha demostrado que cepas de *E. coli* del serotipo O145:H- productoras de citotoxinas se pueden asociar también con esta enfermedad. Cepas O145 y O157 productoras de Vero toxinas (VT) se han aislado así mismo de algunos niños con síndrome urémico-hemolítico (36). La participación de VT en la fisiopatología de estas enfermedades aún no se conoce.

E) *E. coli* enteroadherente (EAEC).

Este grupo es el más recientemente descrito y su patogenicidad se basa en su capacidad para adherirse a células HEP-2. Hasta el momento se han descrito tres tipos de adherencia (37,38).

- 1o. Adherencia difusa.
- 2o. Adherencia localizada.
- 3o. Adherencia agregativa (EA-AggEC).

Actualmente se sabe que la adherencia está mediada por uno o varios factores de adherencia las cuales están codificados por plásmidos y que esta propiedad está aparentemente relacionada con la enteropatogenicidad de estas cepas.

Diversos reportes apoyan fuertemente que la adherencia a células HEP-2 puede ser un factor de virulencia en las cepas de *E. coli* independientemente del serogrupo y que las cepas de EAEC representan otro grupo de *E. coli* productoras de diarrea (39).

Campylobacter

El género *Campylobacter* consiste en un grupo de bacilos finos gram negativos, curvados en espiral, de 0.2 a 0.5 μ m de ancho y 0.5 a

5 um de largo. Estos microorganismos pueden tener forma de coma, de "S", de ala de gaviota. No forman esporas. Tienen movilidad activa con un característico movimiento como de sacacorchos, presentan un sólo flagelo polar en uno o ambos extremos de la célula y esto puede ser 2 a 3 veces el largo de la célula, en ocasiones hay cepas inmóviles (40,41,42).

Las especies implicadas en patología entérica humana son: *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli* y *Campylobacter laridis* (43). La movilidad de *Campylobacter* aparentemente es un determinante de patogenicidad, ya que esta le permite colonizar la mucosa del revestimiento gastrointestinal, donde se fijan para producir la enfermedad, el flagelo es uno de los antígenos más importantes de la composición celular de *Campylobacter* (53).

Poco es lo que se sabe sobre el mecanismo de patogenicidad de *C. jejuni*, *C. coli* y *C. laridis*. La presencia de sangre y leucocitos en las heces de personas infectadas indica que el *C. jejuni* puede ser invasor; sin embargo, también se produce una forma secretora de diarrea, especialmente en niños, lo cual sugiere la intervención de una enterotoxina. Varios investigadores han informado sobre la producción de una enterotoxina de tipo colérico semejante a enterotoxina termolábil de *E. coli* (41). Sin embargo Olsvik y cols., en sus estudios genéticos no detectaron genes para la producción de toxina colérica, ni para la enterotoxina termolábil (44). Observaciones clínicas han sugerido que la patogénesis de *C. coli* y *C. laridis* es semejante a la del *C. jejuni*.

C. jejuni es sensible a la acidez gástrica, se considera que la dosis infecciosa mínima puede ir de 500 a 1'000.000 de células

bacterianas (45). Una vez vencida la barrera gástrica, *C. jejuni* necesita penetrar la capa de moco que recubre la mucosa intestinal y lograr su multiplicación y acción deletérea. Sin embargo, esta bacteria no posee fimbrias o "pili" que faciliten esta tarea, desconociéndose por el momento los factores específicos de adherencia que le permiten la colonización del intestino (45).

Al igual que en las enterobacterias, *Campylobacter* también posee el lipopolisacárido en su membrana externa que confieren al germen especificidad antigénica. Algunos trabajos mencionan la participación de este antígeno en el proceso infeccioso, así como en la respuesta inmunológica del huésped (45,46). Los flagelos de *C. jejuni* están constituidos por proteínas antigénicas tipo específicas; y aparentemente representan un factor importante en la penetración del moco intestinal y su multiplicación en el mismo (45,47).

Para la diferenciación de las especies de *C. jejuni*, *C. coli* y *C. laridis* y su biotipificación Skirrow y Benjamin (48), Hebert y cols. (49), proponen esquemas basados en la hidrólisis del hipurato, la prueba rápida de H_2S y la hidrólisis del DNA, las cuales permiten su diferenciación, señaladas en el cuadro 2.

Cuadro 2.
Esquema de Biotipificación para *C. jejuni*, *C. coli* y *C. lariidis*.

	<i>C. jejuni</i>				<i>C. coli</i>		<i>C. lariidis</i>	
BIOTIPO	I	II	III	IV	I	II	I	II
PRUEBA:								
Hidrólisis del Hipurato	+	+	+	+	-	-	-	-
Prueba rápida de H2S	-	-	+	+	-	-	+	+
Hidrólisis del DNA	-	+	-	+	-	+	-	+

Tomado de National Reference Service for *Campylobacter*, División of Enteric Bacteriology, Laboratory Center for Disease Control, Ottawa, Ontario, Canada.

Shigella

Shigella, es un bacilo delgado, no esporulado, inmóvil, gram negativo, aerobio que libera mediante autólisis un antígeno somático tóxico que posiblemente explique la intensa irritación ocasionada en la pared intestinal (41).

La totalidad de las especies incluidas en el género *Shigella* resultan patógenas para el hombre, y desde el punto de vista antigénico se clasifican en cuatro especies que a su vez comprenden varios tipos:

ESPECIE	GRUPO Y TIPO
<i>S. dysenteriae</i>	A (1-10)
<i>S. flexneri</i>	B (1- 6)
<i>S. boydii</i>	C (1-15)
<i>S. sonnei</i>	D (1)

Esta clasificación se basa en las características bioquímicas y antigénicas. Su especificidad serológica depende del polisacárido (50).

Se ha demostrado que los 4 grupos de *Shigella* contienen plásmidos de 120 a 140 megadaltons, que son requeridos por el microorganismo para invadir las células epiteliales (51,52).

Las infecciones por *Shigella* se limitan casi siempre al tubo gastrointestinal; es muy rara la invasión de la sangre, la dosis infecciosa es menor de 10^3 microorganismos.

El proceso patológico esencial consiste en invasión del epitelio mucoso; la formación de microabscesos en la pared del intestino grueso y el ileon terminal produce necrosis de la mucosa, ulceración superficial de la misma, hemorragia y formación de una "seudomembrana" en la zona ulcerada (67).

Dos mecanismos han sido puestos a consideración para explicar las manifestaciones clínicas: la producción de enterotoxinas y la capacidad de invasión del microorganismo.

En los últimos años la toxina de *Shigella* ha sido altamente purificada y producida en cantidad suficiente para su estudio (68).

Shigella dysenteriae tipo 1 (bacilo de Shiga) elabora una toxina, la cual posee las siguientes características (69). Causa parálisis letal, citotoxicidad y actividad enterotóxica. Se encuentra entre los agentes biológicos más tóxicos conocidos. Está compuesto por dos péptidos diferentes, los monómeros subunidad 1 A (PM=32.000) y subunidad 5 B (PM=7691 daltones) (68,69).

La estructura de la subunidad A de la toxina de Shiga es semejante a la de la toxina del cólera y la toxina termolábil de *E.*

coli, pero no hay cruce antigénico entre ambas. Se conoce por su capacidad de inhibir la síntesis de proteínas de mamíferos, actuando directamente sobre la unidad ribosomal 60S de la célula blanco (70,71).

La subunidad B es diferente a la de la toxina del cólera y a la toxina termolábil de *E. coli* (68,69,72), y es responsable del enlace de la toxina al receptor de las células blanco por medio de la interacción de un azúcar específico parecido a la lectina presente en esta subunidad con el receptor de la toxina en la superficie de la célula (70,73).

Se ha demostrado que los sueros de los pacientes con infecciones por *Shigella flexneri* o *Shigella sonnei* desarrollan una antitoxina que neutraliza los efectos citotóxicos de la toxina Shiga en células HeLa (74). La actividad toxica es distinta a la propiedad invasora de las *Shigella* en caso de disentería.

La respuesta de anticuerpos a la toxina de Shiga en el suero de humanos infectados está limitada a la cadena pesada de la IgM (75,76).

Se han visto que hay 2 tipos de variantes antigénicas entre la familia de toxinas Shiga y tipo Shiga (77): 1o. las toxinas que no cruzan por neutralización con un solo antisuero de referencia, y 2o. las toxinas que parcialmente cruzan por neutralización, pero no son antigénicamente idénticas.

Salmonella

La *Salmonella* es un bacilo móvil gram negativo que fermenta de manera característica la glucosa y la manosa, pero no fermenta la lactosa ni la sacarosa, la mayor parte de las cepas de *Salmonella*

producen H_2S , produce ácido y/o gas a partir de glucosa (54,64).

La gastroenteritis causada por *Salmonella* tiene especial predominio en la edad pediátrica afectando principalmente a los lactantes, la transmisión ocurre a través de la ingestión de alimentos contaminados y por medio del contacto con portadores humanos y animales domésticos. Esta bacteria se considera dentro de los patógenos de más amplia distribución en la naturaleza. El habitat acostumbrado del género es el tracto gastrointestinal de humanos y animales; algunas cepas de *Salmonella* viven en los tejidos (78)

Estos microorganismos invaden epitelio intestinal, adhiriéndose a las vellosidades y provocando degeneración parcial de las mismas. Una vez que han penetrado, el daño causado a las vellosidades se repara rápidamente, los microorganismos se multiplican y se diseminan por el epitelio intestinal, penetrando la lámina propia lo que provoca una reacción inflamatoria aguda con infiltración de PMN. La capacidad invasiva no lleva consigo la capacidad de producir diarrea (78,79).

Sin embargo las lesiones principales se producen a nivel de colon donde se presentan alteraciones en la capacidad de absorción de fluidos y electrolitos, hay movilidad anormal del intestino (79).

Aunque *Salmonella* se identifica inicialmente por sus características bioquímicas, los grupos y las especies se identifican mediante análisis antigénico. Al igual que otras enterobacterias, *Salmonella* posee diversos antígenos O y diferentes antígenos H en una o ambas fases (67). Otras especies de *Salmonella* cuentan con antígenos capsulares (K) como el de *S. typhi* conocido como antígeno Vi que puede interferir con la aglutinación con los antisueros O y que se relaciona con invasividad. Las pruebas de aglutinación con antisueros absorbidos

de diferentes antígenos O y H constituyen la base para la clasificación serológica de las *Salmonella* (67).

Los microorganismos pueden perder los antígenos H y convertirse en no móviles. La pérdida del antígeno se acompaña de un cambio de la forma de las colonias, de lisas a rugosas. El antígeno Vi se puede perder en parte o por completo. También puede adquirirse (o perderse) los antígenos en el proceso de transducción (64).

Las manifestaciones clínicas de la salmonelosis se han dividido en:

- 1.- Gastroenteritis.
- 2.- Bacteriemia o septicemia con o sin lesiones focales (extraintestinales).
- 3.- Fiebre entérica (fiebre tifoidea).
- 4.- El estado de portador

Yersinia enterocolitica

Estos microorganismos son bacilos gram negativos cortos y pleomórficos que no fermentan la lactosa, no forman esporas y son positivos a la ureasa y negativos a la oxidasa. Crecen mejor a 25°C y son móviles a esta misma temperatura, pero no lo son a 37 C. Se encuentran en el tubo intestinal de diversos animales, a los que producen enfermedad, y son transmisibles al hombre, en el cual producen diversos síntomas clínicos (53,66).

Y. enterocolitica se ha clasificado en más de 50 serotipos; la mayor parte de los aislamientos clínicos en humanos pertenecen a los serotipos O3, O8 y O9 (50).

Y. enterocolitica se ha aislado de roedores y animales domésticos (como ovejas, bovinos, perros, gatos) y de las aguas contaminadas por

estos animales. La transmisión al hombre ocurre probablemente por contaminación de los alimentos, las bebidas o los fomites. La dosis infectiva es 10^8 a 10^9 microorganismo por vía oral para producir infección.

Esta bacteria produce diarrea grave de tipo disentérico por mecanismos combinados, por un lado produce una enterotoxina termoestable de bajo peso molecular, que estimula la adenilciclase de los enterocitos y por otro, es capaz de producir daño al epitelio e invasión de la mucosa (67,68,69).

Durante el periodo de incubación *Yersinia enterocolitica* se multiplica en la mucosa del intestino, en particular el ileon terminal, el colon y el apéndice cecal; sin embargo todo el tracto intestinal está habitualmente afectado. A veces el dolor es intenso y localizado en el cuadrante inferior derecho del abdomen, y sugiere apendicitis (50,70).

Clostridium difficile

Son bacilos gram positivos, anaerobios estrictos, que forman esporas subterminales, por lo general mayores que el diámetro de los bacilos que las forman, son móviles; presentan actividad bioquímica fermentando los carbohidratos con producción de ácido y gas, se diferencia de las otras especies de *Clostridium* por tener un perfil único de cromatografía de gases (41).

El habitat natural incluye suelo, agua y el contenido intestinal de varios animales y el hombre. Carecen de citocromo y de citocromooxidasas y son incapaces de destruir el peróxido de Hidrógeno por que carecen de catalasa y peroxidasa. Por ello el H_2O_2 tiende a

acumularse hasta alcanzar concentraciones tóxicas (50,71).

Las esporas de los clostridios no solamente son resistentes al calor y los desinfectantes, sino que sobreviven durante largos periodos a la exposición al aire; solamente germinan en condiciones fuertemente reductoras (71).

Clostridium difficile elabora dos toxinas: una enterotoxina (toxina A) y una citotoxina (toxina B). Las dos toxinas presentan diferencias antigénicas, bioquímicas y, principalmente biológicas (72,73).

C. difficile es virtualmente la causa de todos los casos de colitis pseudomembranosa (CPM) y un 20-30% de diarrea asociada a antibióticos.

Staphylococcus aureus fue el primer microorganismo al cual se atribuyó la enteritis causada por antibióticos, no obstante los cultivos anaerobios demostraron que la enfermedad, inducida por la mayor parte de antibióticos está relacionada con *C. difficile*. Además, la enterotoxina específica de dicho germen es detectable a menudo con los filtrados de heces diarreicas (71).

Evidencias reportadas por Borriello y cols. describen que *Clostridium perfringens* enterotoxigénico es otro posible agente causante de diarrea asociada a antibióticos en algunos pacientes (74).

La colitis asociada a antibióticos ocurre después de la administración prolongada de Clindamicina y de otros medicamentos. Esta colitis se ha atribuido a *C. difficile* resistente a medicamentos, el cual prolifera en el colon y produce una toxina necrosante. La patogenicidad se atribuye por lo menos a la presencia de las dos toxinas, han sido descritos otros posibles factores de virulencia como

fimbrias, habilidad de adherirse con el mucus de la célula intestinal, producción de una cápsula, secreción de enzimas hidrolíticas y producción de otras toxinas. (75).

La identificación confirmante de *C. difficile* puede hacerse utilizando pruebas bioquímicas y/o cromatografía de gases. Actualmente resulta más sensible el método de cromatografía gas-líquido, pero tiene la desventaja de ser un sistema con el que cuentan pocos laboratorios. La identificación por pruebas bioquímicas involucra más tiempo y material de laboratorio (41).

El porcentaje de reconocimiento de la presencia de *C. difficile* es mejor si se busca la presencia de la toxina además del cultivo para recuperar el microorganismo (72).

La contraímmunoelectroforesis (CIE) es otra técnica que se ha empleado para detectar la presencia de citotoxina en muestras de heces de pacientes con CPM, pero su utilidad está restringida por que carece de especificidad (76).

Lyrelly y cols. y Laughon y cols., han descrito el procedimiento del ensayo inmunoenzimático (ELISA) para identificar las toxinas A y B de heces y filtrados de cultivos, este tipo de pruebas están basados en detección de las toxinas con anticuerpos específicos anti-A o anti-B (77).

Otra técnica prometedora que ha sido descrita es el procedimiento de aglutinación de látex para detectar enterotoxina (75).

Rotavirus

En 1973 Bishop y cols., al examinar al microscopio electrónico biopsias duodenales de niños hospitalizados que padecían

gastroenteritis aguda no bacteriana, encontraron y describieron partículas virales similares a orbivirus (78).

En 1974 Flewett y cols., propusieron el nombre de Rotavirus, del latín "rota" que significa rueda, este nuevo grupo de virus contiene RNA de doble cadena, formado por una doble cápside una interna y otra externa (79).

Con el microscopio electrónico se pueden distinguir dos tipos de partículas redondas: viriones "lisos o completos", de doble cápside y de 70 nm de diámetro y partículas "rugosas o incompletas" de cápside simple y de aproximadamente 60 nm de diámetro.

En todas las especies de Rotavirus la infectividad viral parece depender de la presencia de la cápside externa, la cual se pierde cuando las partículas son tratadas con agentes quelantes de calcio, como el EDTA y EGTA (80).

El genoma de los Rotavirus está compuesto por 11 segmentos de RNA de doble cadena, cuyos tamaños van desde 660 hasta 3700 pares de bases (pb). Estos segmentos pueden ser separados electroforéticamente en un gel de poliacrilamida, dando un patrón electroforético característico, conocido como "electroferotipo" (80).

En algunas cepas de Rotavirus humano, los segmentos 10 y 11 migran ligeramente menos que lo usual, dando lugar a cepas con "electroferotipo corto" y "electroferotipo largo" (81,82).

Actualmente se conoce con más detalle el asignamiento génico de proteínas tanto estructurales como no estructurales. Cuando se analizan por electroforesis en geles de poliacrilamida se pueden observar extractos de células infectadas cuando menos once diferentes proteínas que no se observan en células no infectadas (81,82,83).

Seis de ellas, denominadas VP1, VP2, VP* y VP6 conforman la cápside interna del virus, mientras que VP3 y VP7 conforman la cápside externa (83,84).

Experimentos utilizando anticuerpos monoclonales contra VP6 demuestran que es la portadora de epitopes comunes entre Rotavirus. Por análisis serológico se ha demostrado que han intercambiado genes de una cepa a otra (rearrreglo genómico), que cuando menos existe un epítopo no común en el polipéptido VP6, lo que ha hecho clasificar a los Rotavirus en dos subgrupos I y II (82,85).

La proteína VP7, además de ser el mayor antígeno de neutralización, es responsable de dar la especificidad de serotipo a los Rotavirus, se han clasificado en 7 diferentes serotipos: Los serotipos 1, 2, 3 y 4 están representados por Rotavirus humanos; los serotipos 5, 6 y 7 por Rotavirus de origen animal (80,86).

Recientemente, se han descrito tres diferentes cepas de Rotavirus, denominadas 69H y W161 (humanos) y B223 (bovino) las cuales poseen características serológicas distintas a las que presentan los serotipos del 1 al 7, por lo que se han propuesto como posibles serotipos 8, 9 y 10 respectivamente (80).

Las cepas de Rotavirus humanos clasificados como subgrupo I corresponden a cepas con electroferotipo "corto" y de serotipo 2; mientras que las de subgrupo II corresponden a cepas con un electroferotipo "largo" y serotipo 1, 3 o 4. No existe una explicación clara entre la posible correlación, subgrupo-electroferotipo-serotipo y la virulencia (82).

Con relación a las proteínas de cápside externa VP3 y VP7, se sabe que en ellas se encuentran determinantes antigénicos que inducen

en el hospedero la producción de anticuerpos neutralizantes capaces de inhibir la infección viral "in vivo" (87).

VP3, además de ser la hemaglutinina viral, es responsable de provocar un aumento de la infectividad del virus cuando éste es tratado con tripsina. Se ha demostrado que al incubar partículas completas de Rotavirus SA11 en presencia de tripsina, VP3 sufre un corte proteolítico que genera dos péptidos denominados VP5 y VP8.

La infección por Rotavirus al parecer está limitada a la capa de células epiteliales del intestino delgado, hay acortamiento y edema de las vellosidades, infiltración mononuclear en la lámina propia, observándose partículas virales fácilmente reconocibles en las cisternas distendidas del retículo endoplásmico rugoso (82).

La diarrea resulta de la infección de la célula, la atrofia de las vellosidades y la disminución evidente de la capacidad de absorción de los enterocitos. Puede demostrarse experimentalmente alteración en la absorción de glucosa y D-xilosa, disminución de la concentración de disacaridasas y alteración de la actividad de timidina-cinasa, sin modificación de AMPc y adenilato ciclasa (82). La absorción y la ingestión no son gravemente afectadas, al grado que permite la rehidratación oral exitosa.

Cryptosporidium

Los protozoarios intestinales patógenos para el hombre pueden clasificarse taxonómicamente en tres phylum: *Sarcomastigophora*, *Ciliophora* y *Apicomplexa* en donde encontramos el orden *Eucoccidiida*, del cual forma parte la familia *Cryptosporidiidae*. *Cryptosporidium* pertenece a esta familia y es el único género, su ciclo de vida es

monoxeno, es decir, sólo necesita un huésped para desarrollar todo su ciclo (88,89).

Cryptosporidium es un nuevo agente patógeno humano, asociado con enteritis severa y quizás colecistitis en pacientes inmunocomprometidos, particularmente aquellos con Síndrome de Inmuno Deficiencia Adquirida (SIDA), y diarrea autolimitada en el huésped inmunocompetente. Aunque la prevalencia de la enfermedad en el humano no es conocida (90,91).

La infección por *Cryptosporidium* es transmitida por la ingestión de ooquistes maduros, los cuales son infectantes inmediatamente después de ser eliminados en las heces (92). La pared del ooquiste es digerida en el tractogastrointestinal del nuevo huésped, quedando libre el esporozoito; estos infectan células epiteliales del intestino delgado para transformarse en trofozoitos, que al igual que el resto de las etapas se lleva a cabo sobre el borde de las microvellosidades de las células epiteliales. El desarrollo generalmente ocurre en el epitelio gastrointestinal; sin embargo, ocasionalmente otras superficies epiteliales han sido infectadas, particularmente vesícula biliar, conductos pancreáticos y biliares. El trofozoito forma una zona de unión electrodensa en su interfase con la célula huésped, y su citoplasma está rodeado por 4 membranas distintas, se ha sugerido que las dos externas son originadas por el huésped; si esto es así, la localización del parásito es intracelular, pero extracitoplásmico (89,93,94).

El trofozoito sufre 3 divisiones nucleares formando 8 merozoitos (esquizonte de la generación); los merozoitos son liberados del esquizonte reinfectando otras células epiteliales. Después de

adherirse los merozoitos se redondean y sufren 2 divisiones nucleares, convirtiéndose en esquizontes de 2a. generación, conteniendo merozoitos de 2a. generación (89,93).

A continuación se presenta el ciclo sexual formando los microgametocitos y los macrogametocitos que dan origen a los gametos; un microgameto se une con un macrogameto para formar el cigoto y éste se desarrolla hasta formar un ooquiste y así completar el ciclo de vida (89,94).

La principal forma de transmisión de *Cryptosporidium* es la diseminación fecal-oral, ya que los ooquistes han sido encontrados casi exclusivamente en las heces, y este modo de transmisión ha sido demostrado experimentalmente en muchas especies animales (92).

La transmisión directa puede llevarse a cabo durante las prácticas sexuales que implican contacto oral-anal; la transmisión indirecta puede ocurrir por exposición a objetos, agua o alimentos contaminados.

En humanos la enfermedad se caracteriza por diarrea acuosa profusa sin sangre, en individuos normales con duración de una a 3 semanas, anorexia, dolor abdominal, fiebre y vómito; mientras que en individuos con daño inmunitario se presenta síndrome coleriforme con gran pérdida de líquido, 3 litros o más al día, y la diarrea puede durar desde 17 días hasta años. La fisiopatología de esta gran pérdida de líquidos no ha sido descrita bien.

Existen pocos estudios de prevalencia de este microorganismo, Tzipori en Australia encontró que el 7% (26 de 369) de los pacientes hospitalizados con gastroenteritis, en verano (febrero-marzo) se excretaron ooquistes en heces y de estos sólo 4 mostraron evidencias

de infección por otros enteropatógenos. En el resto del año el 2% (10 de 515) excretaron ooquistes y de 320 pacientes sin gastroenteritis ninguno expulsó ooquistes. De acuerdo con este estudio, Tzipori asegura que no es común encontrar portadores asintomáticos en la población en general, pero hay posibilidad de encontrarlos en homosexuales o pacientes con SIDA (92).

Los ooquistes son muy pequeños, de 3 a 6 micras de diámetro, se excretan en forma intermitentes y en cantidades pequeñas. El diagnóstico de esta enfermedad puede realizarse por estudio parasitológico, mediante la observación de ooquistes en heces.

La infección es iniciada por el organismo formando una unión estable con la superficie de la mucosa intestinal. A diferencia de muchos enteropatógenos bacterianos, este proceso probablemente no es mediado por organelos extracelulares (factores de colonización) pero puede proceder mediante el reconocimiento de célula a célula en la superficie de la membrana. La fase de unión es seguida por penetración dentro de la célula epitelial. Esta relación inicial huésped-parásito probablemente influya mucho en el cambio de apariencia de las vellosidades. La infección grave con *Cryptosporidium* produce depresiones o cráteres dentro de la superficie mucosa. Varios investigadores describen cambios gruesos en la arquitectura de las vellosidades afectadas por parásitos; falta de desarrollo y fusión de las vellosidades fueron comunmente reportados, junto con daño y degeneración de enterocitos. Esto, junto con la localización predominante de *Cryptosporidium* en el intestino delgado posterior, comprenden probablemente los factores enteropatógenos más importantes.

El organismo no destruye a la célula huésped. Los cambios

morfológicos que ocurren (pérdida o degeneración de las microvellosidades en la zona de unión) se considera que causa una mala digestión, malabsorción y diarrea (95).

CITOLOGIA DE MOCO FECAL

La diarrea aguda es una enfermedad común que puede ser de curación espontánea o tener una evolución complicada progresiva. Para el tratamiento adecuado del paciente el médico se enfrenta con el problema de determinar la causa específica. El coprocultivo y examen para leucocitos fecales ayudan al médico a limitar las posibilidades diagnósticas (96).

En el tratamiento de la diarrea se ha generalizado mantener una conducta expectante estableciendo una estrecha vigilancia del enfermo hasta obtener información del agente causal de la enfermedad. El hallazgo microbiológico y la evolución clínica del paciente, norman finalmente la decisión terapéutica (97).

En instituciones en donde se carece de facilidades técnicas para estudios microbiológicos, y aun medios hospitalarios en los que existen condiciones favorables para efectuar este tipo de estudios, sería pues de gran valor contar con un indicador que en un corto lapso pudiera anticipar si la diarrea se asocia o no con gérmenes enteropatógenos (97).

El examen microscópico para leucocitos fecales ofrece una información diagnóstica rápida y de un costo benéfico positivo.

La presencia de leucocitos fecales indica un proceso inflamatorio con invasión de la mucosa colónica y señalaría un proceso bacteriano invasor. Su ausencia sugiere un proceso no invasor causado por

microorganismos patógenos enterotoxigénicos o una causa no infecciosa (96).

La localización anatómica de los microorganismos patógenos puede también deducirse con base en la presencia o ausencia de leucocitos fecales

Los microorganismos patógenos invasores suelen infectar el intestino grueso, los patógenos diarreicos mediados por toxinas se localizan, en general, en intestino delgado y se caracterizan por la ausencia de leucocitos fecales (96).

El cuadro diarreico depende de la patogénesis y patofisiología de la infección en general, podríamos decir que una diarrea voluminosa líquida que no contiene sangre o leucocitos y está asociada con signos de deshidratación sugiere colonización del intestino delgado con un microorganismo enterotoxigénico no invasivo o bien con la ingestión de una enterotoxina producida fuera del organismo. Las diarreas con poca cantidad de materia fecal que contienen moco, sangre, sugiere infección del intestino grueso por un microorganismo invasivo.

El diagnóstico de la diarrea bacteriana por datos clínicos es muy difícil, este estudio del moco fecal es sencillo, rápido, no es traumático para el paciente, aunque debe recordarse que también puede ser motivo de confusión si no se interpreta de acuerdo con datos clínicos, ya que la sola presencia de leucocitos en el moco fecal no necesariamente es indicativa de una etiología bacteriana, o por el contrario puede no haber respuesta celular, aunque también un frotis negativo con coprocultivo positivo pueden indicar que el paciente es un portador (98).

HIPOTESIS

La etiología infecciosa bacteriana o viral es la causa más frecuente de gastroenteritis en edad pediátrica en una población asistencial a la consulta externa y al Servicio de Urgencias de un Hospital de tercer nivel de atención a la salud de la Ciudad de México.

OBJETIVOS

- 1o. Determinar los agentes etiológicos responsables del síndrome diarreico agudo en los pacientes que acuden al Servicio de Urgencias-Pediatria del "H. R. 20 de Noviembre" ISSSTE.
- 2o. Establecer la incidencia por grupos de edad.
- 3o. Determinar si existen asociaciones de diferentes microorganismos en un mismo paciente.
- 4o. Valorar la utilidad del estudio citológico del moco fecal.

MATERIAL Y METODOS

Se realizó un estudio prospectivo, observacional y descriptivo en 121 muestras de heces diarreicas en una población infantil formada por 121 niños cuyas edades comprendían entre los 19 días a los 13 años de edad y que presentaban diarrea aguda al solicitar atención al Servicio de Urgencias del "H. R. 20 de Noviembre" durante el periodo comprendido entre los meses de diciembre de 1989 a julio de 1990.

A cada paciente con diarrea aguda se le practicó citología de moco fecal, coprocultivo, Rotaforesis y tinción de Kinyou para la búsqueda de *Cryptosporidium*, de acuerdo al esquema de trabajo (figura 1-A).

A) COPRO CULTIVO

Para el coprocultivo (ver figura 1-B), la muestra se obtuvo por hisopado rectal utilizando hisopos estériles: un hisopo en caldo infusión cerebro-corazón (BHI), 2 hisopos en medio de transporte Stuart-carbón y 2 hisopos en Solución Buffer Fosfatos (PBS) (ver apéndice 2) (41,100,101).

El examen de la muestra se realizó durante las dos primeras horas siguientes, el hisopo en BHI se sembró en placas con medio de cultivo Skirrow (ver apéndice 1), los hisopos de Stuart-carbón en agar McConkey, agar Tergitol 7 y agar X.L.D. y los de PBS en agar McConkey y en el medio de Cycloserine Cefoxitine Fructuosa Agar (CCFA) (ver apéndice 1), realizando en cada placa aislamiento por estría cruzada.

Los hisopos en medio de transporte Stuart-carbón se introdujeron en tubos de 18x160 mm con 5 ml de caldo selenito y caldo tetrionato

agregándole a este último 3 gotas de solución de yodo yodurado (ver apéndice 2).

Ambos tubos y las placas provenientes del mismo medio de transporte se incubaron de 18 a 24 horas a 37 C.

Del tubo de solución de PBS se tomaron 2,5 ml de la suspensión y se agregaron a un tubo de 18x160 mm con 5 ml de caldo selenito y se incubaron junto con la placa de McConkey a 22 C durante 48 horas y el tubo de la suspensión de PBS a 4 C por 10 días (102).

A.I AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DE *Campylobacter* (figura 2)

Las placas con medio de cultivo Skirrow, una vez inoculadas y sembradas por estria cruzada, se colocaron en jarras Brewer con un sobre de Anaerocult C, previamente humedecido con 6 ml de agua, para producir una atmósfera reducida en oxígeno y enriquecida en CO₂. Se cerró herméticamente la jarra de Brewer y se colocó en la incubadora a 42 C durante 48 horas.

Posteriormente se observó la morfología colonial y a las colonias sospechosas de *Campylobacter* se les practicó un frotis con la técnica de Gram modificada con fucsina al 0.3% en lugar de safranina (ver apéndice 2) (41,100).

El frotis teñido se observó al microscopio con objetivo de inmersión para búsqueda de bacilos gram negativos, delgados, pequeños y curvos, en forma de "S" o ala de gaviota.

Una vez observada dicha morfología, se procedió a purificar el microorganismo en condiciones de microaerofilia en jarras de Brewer a 42 C durante 48 horas.

Al microorganismo ya purificado se le realizaron las pruebas de

Oxidasa y Catalasa (ver apéndice 2).

Si ambas pruebas fueron positivas se procedió a realizar las siguientes pruebas bioquímicas:

A.II Hidrólisis del Hipurato

Se inoculó una asada de un cultivo de *Campylobacter* de 24 horas de crecimiento en tubos de 10x75 mm con hipurato de sodio (ver apéndice 2). Se mezcló bien y se incubó en baño maría a 37 C durante 2 horas. Posteriormente se agregó lentamente por la pared del tubo 0.2 ml de ninhidrina (ver apéndice 2) y se reincubó en baño maría a 37 C durante 10 minutos.

Si se observó un color púrpura (parecido al del cristal violeta) la prueba se consideró positiva y un color débil o ausencia de color, nos indicó una prueba negativa.

A.III Producción de H₂S

Se inoculó una asada de un cultivo de *Campylobacter* de 24 horas de crecimiento en caldo Brucela, se mezcló bien y se colocó en el borde del tubo, una tira de papel filtro previamente impregnada de acetato de plomo (ver apéndice 2), sin que éstas toquen el medio de cultivo. Se colocó la tapa al tubo sin apretarla y se incubó en jarras de Brewer con un sobre de Anaerocult C, durante 48 horas a 42 C.

El vire de la tira de papel filtro impregnada en acetato de plomo a un color negro, nos indicó una reacción positiva a la formación de ácido sulfídrico.

Si no se observó ningún vire de color en la tira de papel filtro, la prueba se consideró negativa.

A.IV Hidrólisis de DNAsa

Se inoculó una asada de un cultivo de *Campylobacter* de 24 horas de crecimiento sobre una placa de agar DNAsa en una superficie de 1 cm² colocando el inóculo en forma de botón, esta placa se colocó en una jarra de Brewer con un sobre de Anaerocult C y se incubó 48 horas a 42 C.

La formación de un halo incoloro alrededor de la zona de crecimiento, se consideró una reacción positiva. Si no se formó dicho halo, la prueba se consideró negativa.

A.II IDENTIFICACION DE ENTEROBACTERIAS (figura 3)

A.II.I Después de incubar 24 horas las placas inoculadas de agar XLD, Tergitol 7 y McConkey, se seleccionaron colonias aisladas para sembrarlas en pruebas bioquímicas específicas de enterobacterias.

Se dió especial interés a las colonias lactosas negativas, ya que podría tratarse de los patógenos *Salmonella* o *Shigella*. Las colonias sospechosas se inocularon en los medios: Kliger, MIO y Urea de Christensen y se incubaron de 18 a 24 horas a 37 C (139,141).

Posteriormente se leyeron las pruebas bioquímicas añadiendo al medio MIO, 4 gotas del reactivo de Kovac's (ver apéndice 2) para la producción de indol. El vire a un color rojo nos indica una reacción positiva. Si no se observa ningún cambio, la prueba se considera negativa.

Posteriormente se procedió a la identificación de los microorganismos mediante la utilización de tablas.

Si el microorganismo se identificó como *Salmonella* o *Shigella*, se

procedió a la tipificación serológica con antisueros polivalentes y luego con los antisueros monovalentes en existencia (ver apéndice 3).

Debido a que *E. coli* es un organismo que fermenta la lactosa, las colonias que mostraron tal propiedad, fueron inoculadas en agar nutritivo sembrando una superficie de 1 cm² de cada colonia diferente observada, incubándose de 18 a 24 horas a 37 C.

Posteriormente las colonias de *E. coli* se probaron por medio de aglutinación en portaobjeto con una solución de acriflavina 1:500 (ver apéndice 2).

Si la aglutinación fue negativa, se sometieron a pruebas de aglutinación con antisueros polivalentes de *E. coli* enteropatógena y en caso de ser positivas, se procedió a la identificación de los serogrupos mediante los antisueros monovalentes específicos (ver apéndice 3).

Enriquecimiento.- Después de haber sido incubados los hisopos en los caldos de enriquecimiento, cada uno de ellos fue inoculado en placas con agar McConkey, S.S., X.L.D. y Verde Brillante, y se incubó de 18 a 24 horas a 37 C, luego se procedió de la forma antes descrita, para la identificación de los microorganismos de nuestro interés (101).

A.II.II AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DE *Yersinia enterocolitica*

(figura 4).

Una vez inoculada la muestra problema en medio para aislamiento (agar McConkey) y enriquecimiento (PBS y caldo selenito).

Se incubó el McConkey y el selenito a 22 C por 48 horas y el PBS a 4 C durante 10 días (preenriquecimiento en frío), los dos últimos se

resembraron en McConkey incubándose de la forma descrita (102).

Después de 48 horas de incubación de la placa con el medio McConkey se observó la morfología colonial y las colonias sospechosas de *Yersinia enterocolitica* (translúcidas pequeñas de 1-2 mm de diámetro), se inocularon en medios: LIA, TSI y MIO, y se incubaron 48 horas a 22 C. Posteriormente se leyeron las pruebas bioquímicas añadiendo al medio MIO, 4 gotas del reactivo Kovac's para la producción de indol. El vire a un color rojo nos indica una reacción positiva. Si no se observa ningún cambio, la prueba se considera negativa (ver cuadro 3).

Cuadro 3.

	LIA	TSI	MIO			
			SH ₂	Indol	Mov.	Orn.
<i>Yersinia enterocolitica</i>	A/A o K/A	A/A	-	+/-	+	-

A.II.III AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DE *Clostridium difficile*

(figura 5).

Las placas con medio de cultivo C.C.F.A., una vez inoculadas por estria cruzada, se colocaron en jarras de Brewer con un sobre de Anaerocult A, previamente humedecido con 35 ml de agua, para producir una atmósfera de anaerobiosis, se cerró herméticamente y se colocó en la incubadora a 37 C durante 48 horas (41).

Posteriormente se observó la morfología colonial y a las colonias

sospechosas se les practicó un frotis por la tinción de Gram. El frotis teñido se observó al microscopio con el objetivo de inmersión para la búsqueda de bacilos gram positivos esporulados.

Una vez observada dicha morfología, las colonias sospechosas se sembraron en: gelosa sangre a 37 C, durante 48 horas y en medio de C.C.F.A. en atmósfera de anaerobiosis a 37 C durante 48 horas. Luego se procedió a purificar el microorganismo en las mismas condiciones y a identificar la especie por pruebas bioquímicas (ver cuadro 4).

Cuadro 4.

	Esp	Lec	Gel	ALe	Ind	HES	Glu	Mal	Lac	Sac	Man
<i>C. difficile</i>	OS	-	V	-	-	+	+	-	-	-	+

Esp = Esporas

Lec = Lecitinasasa

Gel = Gelatinasa

ALe = Acción en la leche

Ind = Indol

HES = Hidrólisis de la esculina

Glu = Glucosa

Mal = Maltosa

Lac = Lactosa

Sac = Sacarosa

Man = Manitol

OS = Ovaes Subterminal

B) ROTAPORESIS

La técnica de Rotaforesis se efectuó obteniendo la muestra por hisopado rectal, el cual se colocó en solución de PBS. El examen de la muestra se realizó de la siguiente manera (142):

A. Preparación de la muestra

A.1 Se colocó en tubos numerados de 1 a 9, 0.4 ml de solución A (ver apéndice 2) (diluir 0.8 ml de solución A 5x en 3.6 ml de agua

destilada). Se agregó al tubo No.10 0.2 ml de solución A.

A.2 Se agregó a estos tubos 1 gota (0.05ml) de las muestras de heces y al décimo tubo 0.2ml del testigo positivo (ver apéndice 2).

A.3 Luego se agregó 0.2 ml de solución B (ver apéndice 2) (cuidado con esta solución pues contiene fenol y es cáustica).

A.4 Se agitó vigorosamente en un vortex, cuidando que el fenol y la fase acuosa constituyan una fina emulsión.

A.5 Luego se agregó 0.2 ml de cloroformo.

A.6 Se agitó como en A.4.

A.7 Posteriormente se centrifugó a 1500 rpm, por 10 minutos. Después de la centrifugación se obtuvieron 2 fases (la fase superior clara).

A.8 Se tomó 0.15 ml (3 gotas) de la fase acuosa (superior) y se colocó en otro tubo.

B. Electroforesis

B.1 Se puso a fundir la solución C (ver apéndice 2) a 100 C.

B.2 Los tubos obtenidos en A.8 se colocaron en baño maría a 60 C.

B.3 Luego se adicionó 0.05 ml (1 gota) de solución C a cada uno de los tubos en 60 C.

B.4 Se preparó el gel en la cámara de electroforesis.

B.5 Con una pipeta Pasteur se colocó las muestras en cada uno de los pozos del gel.

B.6 Una vez solidificadas las muestras, se colocó el gel en la cámara de electroforesis.

B.7 Se agregó 50 ml de solución D (ver apéndice 2) a la cámara (diluyendo 5 ml de solución D 10x en 45 ml de agua destilada) y se eliminaron las pequeñas burbujas.

B.8 El corrimiento electroforético se realizó a 100 volts. A este voltaje la intensidad de la corriente era aproximadamente de 10 a 30 mA. Se continuó la electroforesis hasta que todo el colorante salió del gel.

C. Tinción.

Se usó guantes limpios para manipular el gel, ya que la tinción utilizada es muy sensible.

C.1 Una vez terminada la electroforesis, se levantó uno de los vidrios con una espátula, se cortó los dientes que formaban los pozos y una esquina del gel para saber cual era la muestra 1, se puso el gel en un recipiente de vidrio de fondo plano y se lavó por 30 minutos con solución E (ver apéndice 2) (diluir 5 ml de solución E 10x en 45 ml de agua destilada).

C.2 Después de retirar completamente la solución E, se lavó el gel por 30 minutos con 50 ml de solución F (ver apéndice 2) (diluir 0.5 ml de solución F 100x en 50 ml de agua destilada).

C.3 Luego se enjuagó 3 veces el gel con agua destilada.

C.4 Posteriormente se agregó 50 ml de solución G (ver apéndice 2) (diluyendo 0.4 ml de solución G 125x en 50 ml de NaOH al 3%) y se agitó ocasionalmente. Una vez que aparecieron las bandas en el testigo positivo se retiró la solución G.

C.5 Se detuvo la reacción con ácido acético al 1% (0.5 ml de ácido acético en 49.5 ml de agua destilada).

C.6 Por último se procedió a identificar las bandas de RNA en el gel

C) BUSQUEDA DE *Cryptosporidium*.

La muestra se obtuvo por hisopado rectal, utilizando un hisopo

estéril, el cual se introdujo en el recto del paciente y se hizo girar varias veces con el objeto de recoger de la mucosa la mayor cantidad de muestra.

La muestra se colocó sobre un portaobjeto, realizando un movimiento rotatorio del hisopo, para luego ser teñido con la técnica de Kinyoun (apéndice 2) de acuerdo a los siguientes pasos (99):

- 1.- Dejar secar el frotis al medio ambiente
- 2.- fijar al calor brevemente
- 3.- fijar con metanol absoluto y dejar secar
- 4.- teñir con carbol-fucsina (ver apéndice 2) durante 5 minutos, colocando papel filtro sobre cada una de las preparaciones
- 5.- lavar con agua corriente
- 6.- decolorar con alcohol-ácido, hasta que el color rojo se desvanezca por completo
- 7.- lavar con agua corriente
- 8.- contrastar con azul de metileno (ver apéndice 2) durante 2 a 3 minutos
- 9.- se lava y se deja secar
- 10.- se observa al microscopio con objetivo de inmersión.

El parásito se observa como un cuerpo esférico teñido de rojo o rosa con granulaciones más oscuras al centro, los desechos y levaduras aparecen teñidos de color azul verdoso.

D) CITOLOGIA DE MOCO FECAL

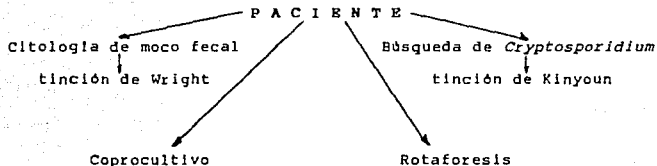
El análisis de citología de moco fecal se efectuó obteniendo la muestra por hisopado rectal utilizando un hisopo estéril, el cual se introdujo en el recto del paciente, y se hizo girar varias veces con

el objeto de recoger de la mucosa la mayor cantidad de muestra.

La muestra se colocó sobre un portaobjeto, moviendo rotatoriamente el hisopo. Este frotis se tiñó cubriéndolo con el reactivo de Wright (ver apéndice 2) durante 5 minutos, después se lavó con buffer y se dejó secar al aire.

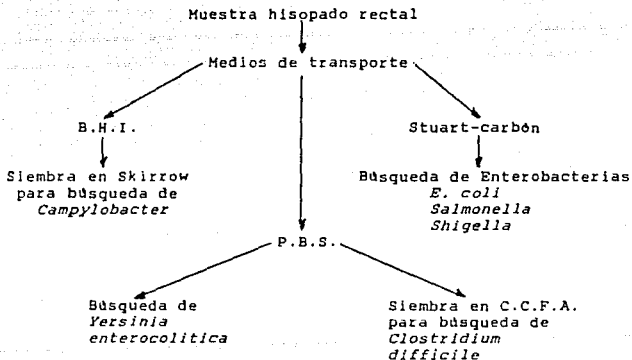
Posteriormente se observó al microscopio con el objetivo de inmersión, para el recuento diferencial de células claramente identificadas como polimorfonucleares o mononucleares (97,99).

ESQUEMA DE TRABAJO



A)

COPROCULTIVO



B)

FIGURA #1

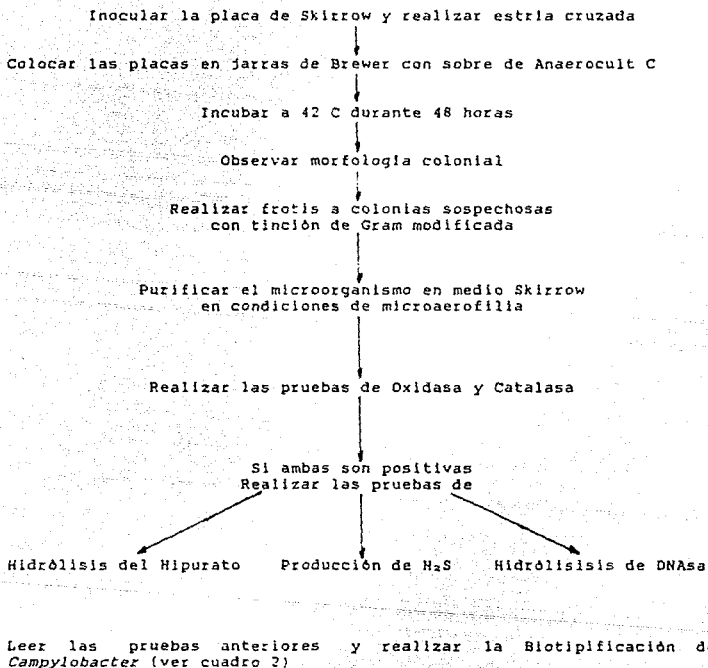
AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DE *Campylobacter*

FIGURA #2

DIAGRAMA PARA LA BUSQUEDA DE ENTEROBACTERIAS

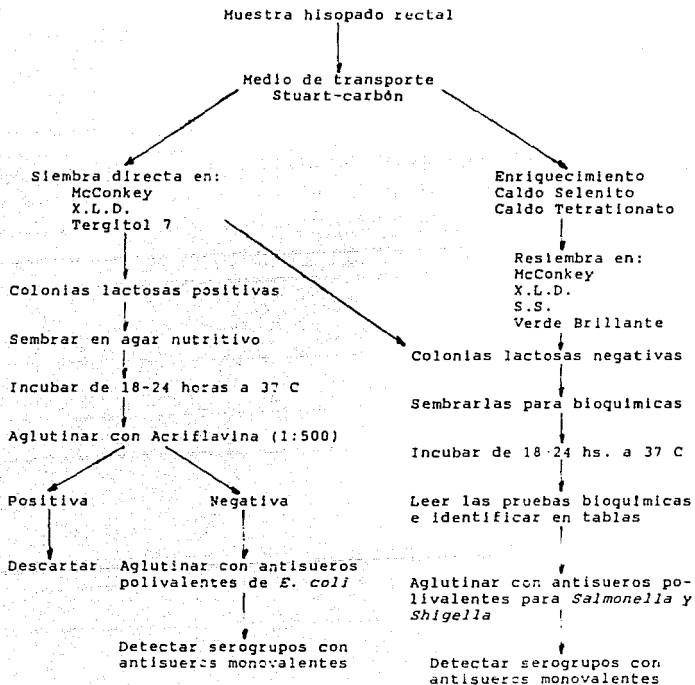


FIGURA #3

DIAGRAMA PARA EL AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DE
Yersinia enterocolitica

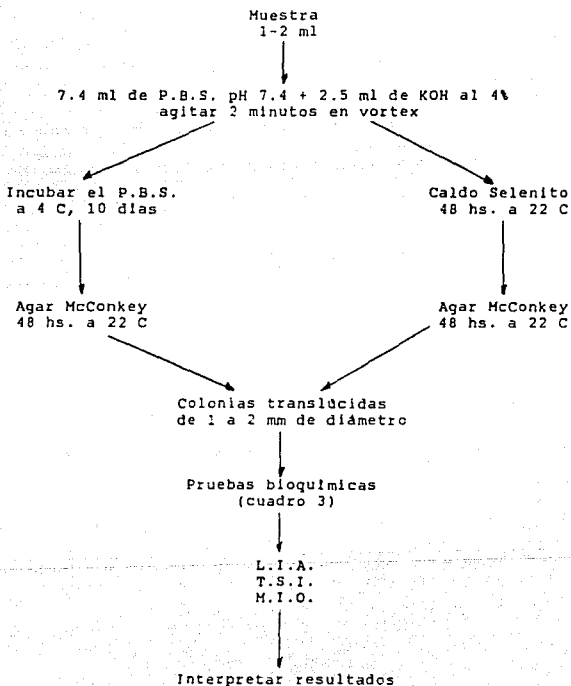


FIGURA #4

AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DE
Clostridium difficile

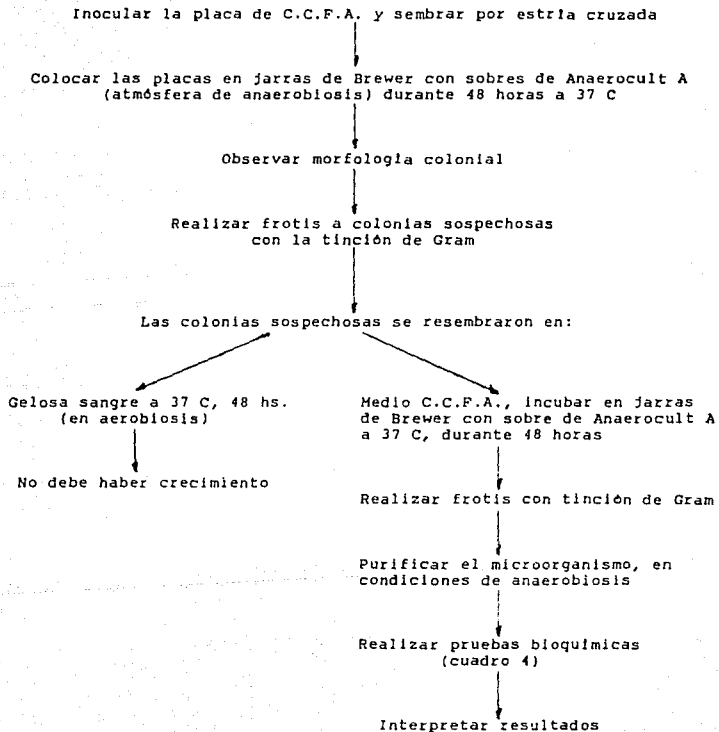


FIGURA # 5

RESULTADOS

Del total de 121 pacientes con síndrome diarreico agudo, en edad pediátrica, los cuales acudieron al Servicio de Urgencias-Pediatría del "H. R. 20 de Noviembre", durante el periodo comprendido entre diciembre de 1989 a julio de 1990, fue de 81 microorganismos es decir 66.94% dentro de los cuales encontramos 8 grupos quedando por orden de frecuencia de la siguiente manera (tabla 1).

Rotavirus	28 de 81 (34.57%)
E.P.E.C.	20 de 81 (24.69%)
<i>Salmonella</i>	12 de 81 (14.8%)
<i>Campylobacter</i>	11 de 81 (13.58%)
<i>Shigella</i>	8 de 81 (9.88%)
<i>C. difficile</i>	1 de 81 (1.23%)
<i>Cryptosporidium</i>	1 de 81 (1.23%)
<i>Y. enterocolitica</i>	0 de 81 (0%)

De los 121 pacientes estudiados sólo 64 presentaron alguno de estos microorganismos patógenos, pudiéndose encontrar como etiología única o múltiple. Los pacientes en estudio variaron su edad desde 1 día a 14 años por lo que se les distribuyó en 6 grupos: en el grupo I (0-3 meses) se encontraron 16 niños, 35 para el grupo II (4-7 meses), 37 para el grupo III (8-12 meses), 17 para el grupo IV (13-24 meses), 8 para el grupo V (2-6 años) y 8 para el grupo VI (6-14 años) (tabla 2).

La relación de patógenos aislados por grupo de edad muestra que en los grupos II y III se encontraron un mayor número de agentes etiológicos responsables del síndrome diarreico, 13 en el grupo II y 14 en el grupo III (tabla 3).

En cuanto al número de aislamientos obtenidos por mes, se pudo observar que durante mayo y junio se presenta el mayor número de aislamientos, obteniéndose 18 y 21 microorganismos respectivamente. En cuanto al agente etiológico, Rotavirus fue más frecuente en diciembre y enero, y el resto de los agentes aislados fueron más frecuentes en los meses de mayo y junio (tabla 4).

Al analizar los porcentajes de aislamientos de patógenos obtenidos en los diferentes grupos de edad se observó que en 5 grupos, el 62% de los pacientes presentó alguno de los patógenos estudiados excepto en el grupo IV que abarca los niños de 1 a 2 años, donde se encontró que en el 100% de los casos analizados se aisló el agente etiológico. Pudiéndose también observar, que en el grupo V el único agente patógeno aislado fue Rotavirus (tabla 5).

De los 121 casos estudiados se observó que 16 de estos presentaron infecciones mixtas (13.2% del total), distribuidos de la siguiente manera: 1 caso para el grupo I, 5 para el grupo II, 3 para el grupo III, 5 para el grupo IV, 1 para el grupo V y 1 para el grupo VI. Entre estas asociaciones dos fueron las más frecuentes: entre *E. coli* y Rotavirus (5 casos) y entre *E. coli* y *Campylobacter* (3 casos) (tabla 6).

La citología de moco fecal realizada en el total de muestras señala que los pacientes a los que se les aisló *Shigella* presentaron el mayor número de polimorfonucleares por campo (PMN/c) dando un total de 25 a 30 células. Sin embargo a los pacientes que se les aisló E.P.E.C., *Campylobacter* y *Salmonella* el número de PMN/c fue de 5 a 20 células, y aquellos patógenos considerados como no invasivos entre ellos Rotavirus, *Cryptosporidium*, *C. difficile*, no presentaron PMN en

el frotis de moco fecal. Es necesario mencionar que de los 121 casos estudiados 57 no presentaron aislamientos de patógenos, sin embargo 28 no tuvieron células y 29 si en el frotis fecal (Tabla 7)

TABLA # 1

	TOTAL DE PATOGENOS (81)
E.P.E.C.	20/81 (24.69%)
<i>Campylobacter</i>	11/81 (13.58%)
<i>Salmonella</i>	12/81 (14.81%)
<i>Shigella</i>	8/81 (9.88%)
<i>Clostridium difficile</i>	1/81 (1.23%)
<i>Yersinia enterocolitica</i>	0/81 (0%)
<i>Cryptosporidium</i>	1/81 (1.23%)
Rotavirus	28/81 (34.57%)
T O T A L	81/81 (100 %)

TABLA # 2

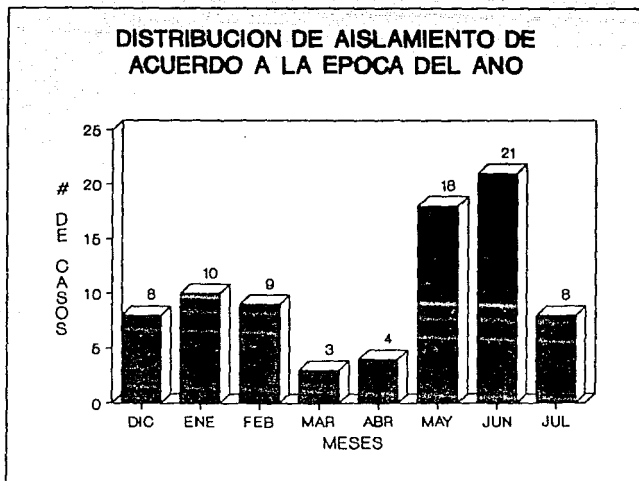
DISTRIBUCION DE PACIENTES DE ACUERDO AL GRUPO DE EDAD			
GRUPO	EDAD	No. DE PACIENTES	% DEL TOTAL
I	1 día-3 meses	16	13.22
II	4-7 meses	35	28.92
III	8-12 meses	37	30.57
IV	13-24 meses	17	14.04
V	2-6 años	8	6.61
VI	6-14 años	8	6.61
TOTAL		121	100

RELACION DE PATOGENOS AISLADOS POR GRUPOS DE EDAD					
GRUPO I	GRUPO II	GRUPO III	GRUPO IV	GRUPO V	GRUPO VI
ESTUDIADOS 16 POSITIVOS 11	ESTUDIADOS 35 POSITIVOS 22	ESTUDIADOS 37 POSITIVOS 21	ESTUDIADOS 17 POSITIVOS 17	ESTUDIAD. 8 POSITIVOS 5	ESTUDIADOS 8 POSITIVOS 5
E.P.E.C. (3) 0119 0128 078 <i>Campylobacter</i> sp. Penner 46 <i>Salmonella enterica</i> B <i>Campylobacter jejuni</i> B IV <i>Cryptosporidium</i> Rotavirus (4)	E.P.E.C. (4) 0119 0128 086 078 <i>Campylobacter jejuni</i> B II (2) <i>Campylobacter jejuni</i> B I (2) <i>Salmonella enterica</i> B (2) <i>Salmonella enterica</i> C 2 <i>Salmonella enterica</i> C (2) <i>Shigella sonnei</i> <i>Shigella boydii</i> <i>Clostridium diff.</i> Rotavirus (5)	E.P.E.C. (7) 0127 0119 (2) 086 0126 0128 0125 <i>Campylobacter sp.</i> Penner 5 y 5 <i>Campylobacter coli</i> B I <i>Campylobacter lariidis</i> B II <i>Campylobacter sp.</i> <i>Salmonella enterica</i> B (3) <i>Salmonella enterica</i> C <i>Shigella sonnei</i>	E.P.E.C. (6) 0129 026 0126 (3) 086 <i>Campylobacter coli</i> B II <i>Salmonella enterica</i> B <i>Shigella flexneri</i> Rotavirus (8)	Rotavirus (5)	<i>Shigella sonnei</i> 2 <i>Shigella flexneri</i> <i>Salmonella enterica</i> C 2 Rotavirus (1)
		Rotavirus (5)			

TABLA # 3

TABLA # 4

DISTRIBUCION DE AISLAMIENTO DE ACUERDO A LA EPOCA DEL AÑO								
AGENTES CAUSALES	DIC.	ENE.	FEB.	MAR.	ABR.	MAY.	JUN.	JUL.
E.P.E.C.	-	-	3	1	2	8	2	4
<i>Campylobacter</i>	2	-	1	-	-	1	5	2
<i>Salmonella</i>	-	1	2	-	-	1	8	-
<i>Shigella</i>	-	1	-	-	-	4	3	-
<i>C. difficile</i>	-	-	-	-	-	1	-	-
<i>Y. enterocolitica</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Cryptosporidium</i>	1	-	-	-	-	-	-	-
Rotavirus	5	8	3	2	2	3	3	2
TOTAL	8	10	9	3	4	18	21	8



PORCENTAJES DE AISLAMIENTOS DE PATOGENOS ENTERICOS CON RELACION
A LOS PACIENTES ESTUDIADOS POR GRUPO DE EDAD

	GRUPO I 16/11	GRUPO II 35/22	GRUPO III 37/21	GRUPO IV 17/17	GRUPO V 8/5	GRUPO VI 8/5	TOTAL 121 PACIENTES
E.P.E.C.	3	4	7	6	0	0	20
<i>Campylobacter</i>	2	4	4	1	0	0	11
<i>Salmonella</i>	1	5	4	1	0	1	12
<i>Shigella</i>	0	3	1	1	0	3	8
<i>C. Difficile</i>	0	1	0	0	0	0	1
<i>Y. Enterocolítica</i>	0	0	0	0	0	0	0
<i>Cryptosporidium</i>	1	0	0	0	0	0	1
Rotavirus	4	5	5	8	5	1	28
TOTAL	11 (68.75%)	22 (62.85%)	21 (56.75%)	17 (100%)	5 (62.5%)	5 (62.5%)	121/81 (66.94%)

TABLA # 5

TABLA # 6

CASOS DE INFECCIONES MIXTAS POR GRUPO DE EDAD	
GRUPO	MICROORGANISMOS ASOCIADOS
I	<i>Campylobacter</i> sp. Penner 46, <i>Cryptosporidium</i> y Rotavirus
II	<i>Campylobacter jejuni</i> B.II y <i>E. coli</i> O128 <i>Shigella sonnei</i> y <i>Clostridium difficile</i> <i>Salmonella</i> entérica B y <i>E. coli</i> O86 <i>Salmonella</i> entérica C2 y <i>Shigella sonnei</i> <i>E. coli</i> O119 y Rotavirus
III	<i>Campylobacter coli</i> B.I y <i>E. coli</i> O127 <i>Campylobacter</i> sp. y <i>E. coli</i> O125 <i>E. coli</i> O128 y Rotavirus
IV	<i>E. coli</i> O129 y <i>E. coli</i> O26 <i>E. coli</i> O86 y Rotavirus <i>Shigella flexneri</i> y Rotavirus <i>Campylobacter coli</i> B.II y Rotavirus <i>E. coli</i> O126 y Rotavirus
V	<i>E. coli</i> O126 y Rotavirus
VI	<i>Salmonella</i> entérica B y Rotavirus

TABLA # 7

AISLAMIENTO EN PACIENTES		OBSERVACION EN MOCO FECAL
E.P.E.C. (20)	9 no asociadas	(5) 5-10 PMN/c (4) No Leucocitos
	11 asociadas	(1) 15-25 PMN/c (<i>Campylobacter</i>) (1) 5-10 PMN/c (<i>Salmonella</i>) (1) 3-5 PMN/c (Rotavirus) (2) 8-12 PMN/c (<i>Campylobacter</i>) (5) No Leucocitos (<i>E. coli</i> , Rotavirus) (1) 1-2 PMN/c (Rotavirus)
<i>Campylobacter</i> (11)	6 no asociadas	5-25 PMN/c
	5 asociadas	(1) No Leucocitos (<i>Cryptosporidium</i> , Rotavirus) (1) 15-25 PMN/c (<i>E. coli</i>) (2) 8-12 PMN/c (<i>E. coli</i>) (1) 15-25 PMN/c (Rotavirus)
<i>Salmonella</i> (12)	9 no asociadas	5-20 PMN/c
	3 asociadas	(1) 5-10 PMN/c (<i>E. coli</i>) (1) 28-30 PMN/c (<i>Shigella</i>) (1) 4-10 PMN/c (Rotavirus)
<i>Shigella</i> (8)	5 no asociadas	25-35 PMN/c
	3 asociadas	25-35 PMN/c (<i>Salmonella</i> , <i>C. difficile</i> , Rotavirus)
<i>C. difficile</i> (1)	1 asociado	25-35 PMN/c (<i>Shigella</i>)
<i>Cryptosporidium</i> (1)	1 asociado	No Leucocitos (<i>Campylobacter</i> , Rotavirus)
Rotavirus (28)	19 no asociados	No Leucocitos
	9 asociados	(4) No Leucocitos (<i>Campylobacter</i> , <i>Cryptosporidium</i> , <i>E. coli</i>) (2) 3-5 PMN/c (<i>E. coli</i>) (1) 28-32 PMN/c (<i>Shigella</i>) (1) 15-20 PMN/c (<i>Campylobacter</i>) (1) 4-10 PMN/c (<i>Salmonella</i>)
No Aislamientos (57)		(28) No Leucocitos (49.1%) (20) 10-30 PMN/c (35.08%) (9) 1-10 PMN/c (15.7%)

DISCUSION

La prevención de la diarrea debe estar enfocada al mejoramiento de las condiciones de saneamiento y vida de diferentes comunidades en riesgo. En México la situación económica y demográfica ha dañado las condiciones de vida de sus habitantes y por tanto la gastroenteritis sigue y seguirá siendo frecuente en su presentación y sus complicaciones.

El conocimiento de los agentes etiológicos involucrados en la producción de cuadros enterales en población que asiste a una institución hospitalaria brinda datos epidemiológicos y características clínicas de los padecimientos ocasionados por cada germen. Permite además valorar la importancia de asociaciones de agentes con la producción de cuadros severos de gastroenteritis.

Loening y cols. en 1989, realizaron un estudio en un grupo de niños con síndrome diarreico para detectar el organismo responsable de la diarrea, sus resultados señalan que Rotavirus se encuentra en el 15% de los casos, E.P.E.C. en 9%, *Shigella* 4%, *Campylobacter jejuni* 4%, *Salmonella* 2%, *Cryptosporidium* 3% (105); mientras que en el presente estudio se encontraron porcentajes mayores a diferencia de *Cryptosporidium* que fue de 1.23% (ver tabla 1).

Los resultados obtenidos en este trabajo se puede observar que los grupos II y III fueron los que presentaron un mayor número de casos (tabla 2).

Cabe señalar que en los grupos II y III se encontró una gran variedad de agentes etiológicos responsables del síndrome diarreico, encontrándose en ambos grupos las siguientes especies: *E. coli* O119,

O128, O86, *Salmonella* entérica B, *Salmonella* entérica C, *Shigella sonnei* y en ambos grupos igual número de Rotavirus, también es interesante destacar que en ambos grupos se aisló igual número de *Campylobacter* en sus diferentes especies y biotipos (ver tabla 3).

Se observó que hubo un aumento en la frecuencia de presentación del síndrome diarreico en los meses de mayo y junio, esto puede deberse al aumento de la temperatura ambiental que favorece la pululación de los microorganismos (ver tabla 4).

En el presente estudio la recuperación de microorganismos enteropatógenos encontrados asciende a 66.9%; aún cuando la metodología empleada resulta normalmente satisfactoria, dicho porcentaje podría aumentar si se buscaran otros agentes patógenos como *E. coli* enterotoxigénica y parásitos animales o micóticos.

A pesar de que los grupos II y III presentaron el mayor número de casos con problemas diarreicos, es decir aquellos niños entre 4 a 12 meses de edad, el porcentaje más alto de aislamientos de enteropatógenos se presentó en el grupo IV formado por niños entre 1 a 2 años de edad, en donde el 100% de los pacientes presentó etiología patógena (tabla 5). Este fenómeno, aunque no es fácil de explicar, puede deberse a que en los grupos II y III (4-12 meses) los agentes patógenos más comunes son precisamente los no buscados como *E. coli* enterotoxigénica, parásitos, agentes micóticos.

Reportes previos concuerdan con los resultados obtenidos en este estudio en relación a la frecuencia con que Rotavirus se presenta. Merteus y cols. publicaron en 1990 un estudio donde reportan que Rotavirus fue el germen más frecuente (11).

En este estudio la gastroenteritis viral fue la principal causa

de diarrea en lactantes y menores hasta cinco años, empezando a declinar y hacerse menos frecuente en mayores de cinco años, esto concuerda con los estudios realizados por Arango y cols. en 1985, quienes encontraron que el 35.5% de 124 niños con cuadro de diarrea aguda se les aisló Rotavirus (106). De igual manera Gutierrez y cols. en 1989 detectaron que Rotavirus fue el patógeno con mayor frecuencia, aislándose en el 57.8% de los casos estudiados (107).

Dentro del cuadro clínico la asociación de microorganismos es muy importante encontrándose en este estudio 16 pacientes con infecciones mixtas, 19.7% de los 81 microorganismos aislados, la asociación más frecuente fue entre *E. coli* y Rotavirus y entre *E. coli* y *Campylobacter* (tabla 6).

En Kuwait Sethi y cols. (1989), realizaron un estudio en 343 niños con síndrome diarreico y encontraron casos que presentaban uno o más patógenos y 44 de estos pacientes tuvieron infecciones mixtas, es decir el 12.9% (108), lo cual concuerda con los resultados obtenidos en este trabajo.

El examen de heces para leucocitos fecales es una forma sencilla de establecer un diagnóstico probable de diarrea aguda. La presencia de leucocitos fecales relacionada con características clínicas ayuda a limitar el diagnóstico diferencial y es útil como pronóstico de los resultados del coprocultivo (96).

De los 121 niños estudiados 57 no tuvieron aislamiento de patógenos, de los cuales el 49.1% (28) no presentaron leucocitos en sus heces. Sin embargo el 35.08% (20) presentaron de 10-30 PMN/c y el 15.7% (9) presentó de 1-10 PMN. Esto quizás correlaciona con el hecho de que otros agentes patógenos como *E. coli* enterotoxigénica,

Entamoeba histolytica, *Giardia lamblia*, etc. no fueron buscados en este estudio (tabla 7).

Los resultados presentados apoyan la importancia de gérmenes buscados habitualmente y apoyan la necesidad de nuevas técnicas para la búsqueda de otros microorganismos y la necesidad de adquirir métodos más rápidos para el diagnóstico rutinario a nivel de hospital, en donde la solución de los problemas debe ser inmediato para disminuir la morbilidad relacionada con este padecimiento.

CONCLUSIONES

La frecuencia de aislamientos del grupo de 121 niños que acudieron al Servicio de Urgencias-Pediatría del "H. R. 20 de Noviembre ISSSTE" con síndrome diarreico agudo fue de 66.9%, aislándose 81 microorganismos. Al analizar los datos obtenidos en este estudio se obtiene que:

- 1o. Rotavirus fue el patógeno más frecuente.
- 2o. En las EPEC aisladas se encontró mayor frecuencia de los serogrupos pertenecientes del llamado grupo II de Levin, en donde están los responsables de diarreas esporádicas.
- 3o. Que la especie de *Campylobacter* más frecuente fue *jejuni*.
- 4o. Los grupos de *Salmonella* entérica frecuentes fueron de los grupos B (en donde se encuentra el serotipo *Typhimurium*) y C.
- 5o. Dentro del grupo de *Shigella* lo más frecuente fue *flexneri* y *sonnei*.

- 6o. La proporción de aislamiento para *Clostridium difficile* y *Cryptosporidium* fue muy bajo.
- 7o. No se encontró *Yersinia enterocolitica*.
- 8o. El estudio citológico del moco fecal concuerda con los datos publicados en la bibliografía. Esto da un apoyo para el diagnóstico clínico de la enfermedad ya que correlaciona el número de células con la presencia del agente infeccioso, aunque no es de ninguna manera patognomónico.

De los resultados obtenidos podemos concluir que los grupos de mayor afectación son aquellos comprendidos entre los 4 a 12 meses de edad. La asociación entre *E. coli* y Rotavirus y entre *E. coli* y *Campylobacter* es un fenómeno de infecciones mixtas que se describe frecuentemente en los estudios en México.

La presencia o ausencia de leucocitos en las heces de una persona con diarrea es una forma sencilla de establecer un diagnóstico probable de diarrea aguda. Por lo que todos estos resultados se correlacionan con lo ya publicado y se puede concluir que el frotis de moco fecal es útil para orientar hacia un posible agente causante de la enfermedad.

La observación de mayor incidencia en los meses de mayo y junio nos indica la facilitación que las condiciones climatológicas establece en la presencia y mayor desarrollo de organismos enteropatógenos con el aumento de la temperatura ambiental.

APENDICE 1

MEDIOS DE CULTIVO

Medio Skirrow:

Agar selectivo para *Campylobacter* Base

Peptona mezcla de proteínas	21.0
Electrolitos	5.0
Almidón soluble	1.0
Agar-agar	13.0
pH final +/-	7.3

Preparación:

Esterilizar la base a 15 libras durante 15 minutos. Posteriormente agregar a la base 2 viales de antibióticos (suplemento selectivo para *Campylobacter*) que contiene una mezcla de Polimixina, Vancomicina y Trimetoprim. Finalmente se le agregan 20.0 ml de sangre de carnero estéril. Se mezcla en forma homogénea y se sirve en cajas Petri.

Medio C.C.F.A.

Agar Selectivo para *Clostridium difficile*

Proteosa peptona.....	40 g
Na ₂ HPO ₄	1 g
MgSO ₄ anhidro	0.1 g
Fructosa	6 g
NaCl	2 g
Rojo neutro al 1%	3 ml
Cycloserine	250 mg
Cefoxitine	10 mg
Agar bacteriológico	20 g
Agua destilada	1000 ml

Preparación:

Mezclar la proteosa peptona, Na₂HPO₄, MgSO₄, NaCl y el agar bacteriológico, calentarlo para que se disuelva bien, agregar el indicador y luego llevarlo hasta 1000 ml con agua destilada, esterilizarlo a 15 libras por 15 minutos. Posteriormente agregar los antibióticos, y el azúcar previamente esterilizado, se mezcla en forma homogénea, y se sirve en cajas Petri.

APENDICE 2

REACTIVOS

Reactivo de Wright

Colorante de Wright..... 4 g

Metanol..... 1 Lt.

Preparación:

Mezclar el colorante con el metanol y agitar , se deja reposar por un mes, y luego se filtra.

Solución Buffer Fosfato (P.B.S.)

Fosfato disódico

Fosfato monopotásico

Cloruro de Sodio

Solución Yodo-Yodurada para caldo Tetracionato

Yodo 6 g

Yoduro de Potasio 5 g

Agua destilada20 ml

Preparación:

El yodo se tritura en un mortero y se le adiciona el yoduro de potasio, ya disuelto se le agrega el agua. Se conserva en un gotero en frasco ámbar.

FUCSINA

Solución A

Fucsina básica 0.3 g

Etanol 10.0 ml

Solución B

Fenol fundido 5 ml

Agua destilada 95 ml

Preparación:

Mezcle perfectamente la solución A y la solución B y guarde en frasco ámbar. Se utiliza para la tinción de Gram modificada para *Campylobacter*, en lugar de safranina.

REACTIVO PARA OXIDASA

Dimetilparafenilendiamina..... 1.0 g

Agua destilada 100.0 ml

Preparación

Secar la cantidad necesaria e impregnar tiras de papel filtro. Dejar secar las tiras y guardarlas en frasco ámbar a 4 C (estas tiras pueden usarse confiablemente de 15 a 20 días). Se usa para la prueba de oxidasa.

REACTIVO PARA CATALASA

Peróxido de Hidrógeno 3.7 ml

Agua destilada 97.0 ml

Se utiliza para la prueba de catalasa, agregar a una asada de colonia colocada sobre un portaobjetos una gota de peróxido de Hidrógeno. Reacción positiva, formación de burbujas.

HIPURATO DE SODIO

Acido hipúrico 0.1 g
 Agua destilada 10.0 ml

Preparación:

Mezcle perfectamente y coloque 0.4 ml de la solución en tubos de 10x75mm. Se utiliza para la determinación de hidrólisis de hipurato. Reacción positiva, vire a un color púrpura.

NINHIDRINA

Ninhidrina 0.175 g
 Butanol 2.5 ml
 Acetona 2.5 ml

Preparación:

A la ninhidrina se le agrega el butanol y la acetona y se mezcla perfectamente, y se le añade 0.2 ml a los tubos que contienen el hipurato de sodio. Reacción positiva vire a un color púrpura parecido al del cristal violeta. Reacción negativa a un color débil o incoloro después de agregar la ninhidrina y de incubar a 37 C por 10 minutos.

ACETATO DE PLOMO

Acetato de plomo 10.0 g
 Agua destilada 50.0 ml

Preparación:

Disolver el acetato de plomo en el agua destilada, humedecer tiras de

papel filtro, dejarías secar y guardarlas en frasco ámbar en refrigeración.

REACTIVO DE KOVAC'S

Alcohol amílico o isoamílico 150.0 ml
 p-Dimetil aminobenzaldehido 10.0 g
 HCL (concentrado) 50.0 ml

Preparación:

Disolver el aldehido en el alcohol y agregar lentamente el ácido. El reactivo debe ser de color amarillo; si el color es café, no deberá usarse. Se utiliza para la detección de Indol.

ACRIFLAVINA

Acriflavina 1.0 g
 Agua destilada 550.0 ml

Preparación:

Mezclar perfectamente la solución y guardarlas en frasco ámbar en refrigeración. Se utiliza para la aglutinación de las colonias de E. coli.

REACTIVO DE KINYOUN

Solución 1	Solución 2
Fucsina básica 4 g	Fenol concentrado ... 8 ml
Alcohol etílico al 95 % ... 20 ml	Agua destilada 100 ml

Disolver la fucsina y posteriormente agregar la Solución 2

Solución 3

Solución A		Solución B	
Azul de metileno	0.3 g	KOH	0.01 g
Alcohol etílico al 95% ...	30 ml	Agua destilada ...	100 ml

SOLUCION A5x

Tris Base	1.6 g
EDTA	1.4 g
SDS	0.65 g
Mercapto etanol	0.65 ml
NaCL	2.0 g
H ₂ O	50.0 ml

CONTROL POSITIVO (para Rotavirus)

Lisado SAll	12 ml
Mertiolate	0.5 ml

SOLUCION B1x

Fenol	120 g
TE	100 ml

Preparación:

Mezclar el fenol con el TE, agitar bien por 5 minutos, luego separar el fenol.

SOLUCION C1x

Agarosa 0.5 g
Agua 33 ml
Xilene Cianol 0.2 ml

SOLUCION D10x

Tris base 7.2 g
Glicina 34.6 g
llevar a 300 ml

SOLUCION E10x

Etanol 287 ml
Acido acético 3 ml

SOLUCION F 100x

AgNO₃ 5.5 g
Agua 30 ml

SOLUCION G125x

Formaldehido al 38%

APENDICE 3

A N T I S U E R O S

Antisueros para *E. coli* (Bigaux)

Antisuero E-1: Antisuero polivalente de *E. coli* grupo A (serogrupos O111:K58, O55:K59,)26:K60, O127:K63).

Antisuero E-2: Antisuero polivalente de *E. coli* grupo B (Serogrupos O86:K61, O112:K66, O128:K67,)119:K69, O125:K70, O126:K71 y O124:K72).

Antisuero E-3: Antisuero polivalente de *E. coli* grupo C (Serogrupos O18:K77, O20:K61, O20:K84, O28:K73 y O44:K74).

Antisueros para *Shigella* (Bigaux)

Antisuero Sh-1:

Antisuero polivalente de *Shigella dysenteriae* (grupo A).

Antisuero Sh-2:

Antisuero polivalente de *Shigella flexneri* (grupo B).

Antisuero Sh-3:

Antisuero polivalente de *Shigella boydii* (grupo C).

Antisuero Sh-4:

Antisuero polivalente de *Shigella sonnei* (grupo D).

Antisueros para *Salmonella* (Bigaux)**Antisuero S-1:****Antisuero polivalente de *Salmonella* de los grupos A hasta el I más VI.****Antisuero S-2:****Antisuero polivalente de *Salmonella* de los grupos A hasta el E más VI.****Antisuero S-3:****Antisuero de *Salmonella* grupo A.****Antisuero S-4:****Antisuero de *Salmonella* grupo B.****Antisuero S-5:****Antisuero de *Salmonella* grupo C₁.****Antisuero S-6:****Antisuero de *Salmonella* grupo C₂.****Antisuero S-7:****Antisuero de *Salmonella* grupo D.****Antisuero S-8:****Antisuero de *Salmonella* grupo E.****Antisuero S-9:****Antisuero de *Salmonella* grupo F.**

Antisuero S-10:

Antisuero de *Salmonella* grupo G.

Antisuero S-11:

Antisuero de *Salmonella* grupo H.

Antisuero S-12:

Antisuero de *Salmonella* grupo I.

La serotipificación de las cepas de *Campylobacter* se realizó en el Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencias Epidemiológicas (I.N.D.R.E.) de la Ciudad de México, D.F. por la M. en S.P. Celia Gonzalez.

REFERENCIAS

- 1.- Gómez, B.D., González, S.N., y Pérez, E.J. Gastroenteritis. En: *Infectología Clínica Pediátrica*. ed. N. González, A. Torales y D. Gómez. 4ª ed. 1988. Trillas. México. pp.147-153.
- 2.- Enfermedades diarreicas en el niño, Ediciones Médicas del Hospital Infantil de México Federico Gomez, 9a. Edición, 1988, México.
- 3.- Cravioto A., Reyes R.E., Ortega R., Fernandez G., Hernandez R., López D. Incidencia y etiología de diarrea aguda durante los dos primeros años de vida de una cohorte de niños rurales. *Bol. Med. Inf. Mex.* 1987;44:316-321.
- 4.- Programme for the Control of Diarrhoeal Diseases. A manual for treatment of diarrhoea. WHO/CDD/SER/80.2 Rev .2 1990.
- 5.- Calva J.J., Ruiz-Palacios G.M., López-Vidal A.B., Ramos A., Bojalil R. Cohort study of intestinal infection with *Campylobacter* in Mexican children. *Lancet* 1988;i:503-505,
- 6.- Bruce D., Zoehowski W., Ferguson I.R. *Campylobacter* enteritis. *Br. Med. J.* 1977;2:1219
- 7.- DuPont H.L. Diarrheal Diseases. *Am. J. Med.* (Suppl. 6B) 1985;28:63-64.
- 8.- Donta S.T., Wallace R.B., Whipp S.C., Olarte J. Enterotoxigenic *E. coli* and diarrheal disease in Mexican children. *J. Infect. Dis.* 1977;135:482-485.
- 9.- Pickering L.K., Evans D.J., Muñoz O., DuPont H.L., Coello-Ramirez P., Vollet J.J., Conklin R.H., Olarte J., Kohl S. Prospective study of enteropathogens in children with diarrhea in Houston and México. *J. Pediatr.* 1978;93:363-388.
- 10.- Síndrome Diarreico, Editorial La Prensa Médica Mexicana S.A., Primera Edición, 1987, México D.F., México.
- 11.- Morales-Castillo M.E., García-Pérez M., Pedroza J.L., D'Amico A., Palacios-Treviño J., Muñoz O. Frecuencia de *Campylobacter fetus*, *C. jejuni* y *Yersinia enterocolitica* en niños con diarrea aguda. *Bol. Hosp. Inf. Mex.* 1984;41:86-89.
- 12.- Mertens T.E., Wijenayake R., Pinto M.R., Peiris J.S., Wijesundera M.D., Eriyagama N.B. Karunaratne K.G., Ranaweera L.R. Microbiological agents associated with childhood diarrhoea in the dry zone of Sri Lanka. *Trop. Med. Parasitol.* 1990;41(1):115-120.
- 13.- Sack R.B. Acute diarrheal diseases in humans caused by bacteria. En: Tyrrei, D.A.J., Kapikian A. Z., eds: *Virus infections of the Gastrointestinal Trac*, Nueva York: Marcel Decker 1982:239-290.

- 14.- Mims C.A. The pathogenesis of infectious disease. Academic Press, INC; third edition, 1986, London-England.
- 15.- Stephen J., Putrowski R.A. Bacterial Toxins. American Society, for Microbiology. Second edition, 1986, Washington, D.C. USA.
- 16.- Levine M.M., Kaper J.B., Black R.E., Clements M.L. New Knowledge on pathogenesis of bacterial enteric infections as applied to vaccine development. Microbiol. Rev. 1983;47:510-550.
- 17.- DuPont H.L., Formal S.B., Hornick R.B., Snyder M.J., Libonati J.P., Sheahan D.C., La Brec E.H., Balas J.P. Pathogenesis of de *E. coli* diarrhea. N. Engl. Med. 1971;285:1-9.
- 18.- O'Brien A.D., Gentry M.K., Thompson M.R., Doctor P., Gemski P., Formal S.B. *Shigellosis* and *E. coli* diarrhea; Relative importance of invasive and toxigenic mechanisms. Am. J. Clin. Nutr. 1979;32:229-233.
- 19.- Cravioto A., Cross J.R., Scotland S.M., Rowe B. An adhesive factor found in strains of *E. coli* belonging to the traditional infantile enteropathogenic serotypes. Curr. Microbiol. 1979;3:95-99.
- 20.- Levine M.M. *Escherichia coli* that Cause Diarrhea: Enterotoxigenic, Enteropathogenic, Enteroinvasive, Enterohemorrhagic, and Enteroadherent. J. Infect. Dis. 1987;155:377-386.
- 21.- Rowe B. The role of *Escherichia coli* in gastroenteritis. Clin. Gastroenterol. 1979;8:625.
- 23.- Levine M.M., Nataro J.P., Karch H., Baldini M.M., Kaper J.B., Black R.E., Clement M.L., O'Brien A.D. The diarrheal response of man to some classical enteropathogenic *E. coli* is dependent on a plasmid encoding an enteroadhesive factor. J. Infect. Dis. 1985;152:550.
- 24.- Konowalchuk J., Spiers J.J., Stavric S. Vero response to a cytotoxin of *E. coli*. Infect. Immun. 1977;18:775.
- 25.- Scotland S.M., Day N.P., Rowe B. Production of a cytotoxin affectin Vero cells by strains of *E. coli* belonging to the traditional enteropathogenic serogroups. FEMS. Microbiol. Lett. 1980;7:15.
- 26.- Cravioto A. Prospectos para la elaboración de una vacuna antiadhesiva contra cepas de *E. coli* causantes de diarrea en humanos. Bol. Med. Hosp. Infant. Mex. 1984;41:122,188,253.
- 27.- Greenberg R.H., Guerrant R.L. *E. coli* heat-stable enterotoxin pharmac. Ther. 1981;13:507-531.

- 28.- Cravioto A., Scotland S.M., Rowe B. Hemagglutination activity and colonization factor antigens I y II in enterotoxigenic and non-enterotoxigenic strain of *E. coli* isolated from humans. *Infect. Immun.* 1982;136:189-197.
- 29.- Gaastra W., Graaf F.K. Host specific fimbrial adhesins of non-invasive enterotoxigenic *E. coli* strains. *Microbiol. Rev.* 1982;46:129-161.
- 30.- McConnell M.M., Thomas L.V., Willshaw G.A., Smith H.R., and Rowe B. Genetic Control and Properties of Coli Surface Antigens of Colonization Factor Antigen IV (PCF8775) of Enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 1988;56;1974-1980.
- 31.- Knutton S., McConnell M.M., Rowe B., and McNeish A.S. Adhesion and Ultrastructural Properties of Human Enterotoxigenic *Escherichia coli* Producing Colonization Factor Antigens III and IV. *Infect. Immun.* 1989; 57:3364-3371.
- 32.- Gross R.J. *Escherichia coli* diarrhoea. *J. Infect.* 1983;7:177.
- 33.- Boilleau C.R., D'Hantville H.M., Sansonetti P.J. DNA hybridization technique to detect *Shigella* species and enteroinvasive *E. coli*. *J. Clin. Microbiol.* 1984;20:959.
- 34.- Silva R.M., Toledo M.R.F., Trabulsi L.R. Invasiveness in enteroinvasive *E. coli* strains in plasmid correlated. *J. Infect. Dis.* 1982;146:706.
- 35.- O'Brien A.D., Nataro J.P. New concepts in the pathogenesis of enteropathogenic *E. coli* diarrhea. En: Schlessinger D. ed: *Microbiology 1985*. Washington: American Society for Microbiology, 1985:78-82.
- 36.- Karmali M.A., Petric M., Lim C., Fleming P.C., Arbus G.S., Lior H. The association between idiopathic hemolytic uremic syndrome and infection by verotoxin-producing *E. coli*. *J. Infect. Dis.* 1985;151:775.
- 37.- Pablo A. Vial, Roy Robins-Browne, Hermy Lior, Valeria Prado, James B. Kaper, James P. Nataro, David Maneval, Alaa-el-deen Elsayed, and Myron M. Levine. Characterization of Enteroadherent-Aggregative *Escherichia coli*, a Putative Agent of Diarrheal Disease. *J. Infect. Dis.* 1988;158:70-79.
- 38.- Mathewson J.J., and Cravioto A. HEp-2 Cell Adherence as an Assay for Virulence Among Diarrheagenic. *J. Infect. Dis.* 1989;159:1057-1059.
- 39.- Mathewson, John J., Johnson P.C., DuPont H.L. A newly recognized cause of traveler's diarrhea. Enteroadherence *E. coli*. *J. Infect. Dis.* 1985;151:471-475.
- 40.- Lori A., Harris, Logan S.M., Guerry P. Antigenic variation of

- Campylobacter flagella*. J. 1987;169:5066-5071.
- 41.- Lennette E.H., Hausler W.J., Shadomy H.J. In Manual of clinical Microbiology. American Society for Microbiology. Fourth edition, 1985, Washington D.C. USA.
 - 42.- Butzler J.P. *Campylobacter* infection in man and animals, CRC Press, INC, Third edition, 1985, USA.
 - 43.- Blaser M.J., Perez P.G. Extraintestinal *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* infections host factors and strain characteristic. J. Infect. dis. 1986;153:552-557.
 - 44.- Olsvik O.K., Wachsmuth, Morris G. and Feeley J.C. Genetic probing of *Campylobacter jejuni* for cholera toxin and *E. coli* heat-labile enterotoxin. Lancet. i:449.
 - 45.- Walker R.I., Caldwell M.B., Lee E. C., Guerry P., Trust T.J., Ruiz-Palacios G.M. Pathophysiology of *Campylobacter* enteritis. Microbiol. Rev. 1986;50:81.
 - 46.- Perez-Perez G.I., Blaser M.J. Lipopolysaccharide characteristic of pathogenic *Campylobacter*. Infect. Immun. 1985;47:353.
 - 47.- Newell D. C., McBride H., Pearson A.D. The identification of outer membrane proteins and flagella of *Campylobacter jejuni*. J. Gen. Microbiol. 1984;130:1201.
 - 48.- Skirrow M.B. and Benjamin J. Differentiation of enteropathogenic *Campylobacter*. J. Clin. Pathol. 1980;33:1122.
 - 49.- Hebert G.A., Hollis D.G., Weaver R.E., Lambert M.A., Blaser M.J. and C. Wayne Moss. 30 years of *Campylobacters*: Biochemical characterization and a biotyping proposal for *Campylobacter jejuni*. J. Clin. Microbiol. 1975;11:114-115.
 - 50.- Jawatz E., Joseph L.M., Adalberg E.A. Microbiologia Médica; Editorial El Manual moderno; 17a. edición, 1987, México D.F., México.
 - 51.- Sansonetti P.J.H., D'Hanteville, Ecobichon C., and Pourcel. Molecular comparison of virulence plasmid in *Shigella* and enteroinvasive *E. coli*. Ann Microbiol (Ins. Pasteur) 1980;1-4.
 - 52.- Sansonetti P.J.H., Kopeccko and Formal S.B. Involvement of a plasmid in the invasive ability of *Shigella flexneri*. Infect. Immun. 1982;35:952-960.
 - 53.- Ewing W.H. Identification of Enterobacteriaceae; Elsevier Science Publishers B.V., fourth edition, 1986, N.Y.- E.U.A.
 - 54.- Donohue-Rolfe A., Keusch G.T., Edson C., Thorley-Lawson D., Jacewicz M. Pathogenesis of *Shigella* diarrhea. IX. Simplified high yield purification of *Shigella* toxin and characterization of

- subunit composition and function by the use of subunit-specific monoclonal and polyclonal antibodies. *J. exp. Med.* 1984;160:1767.
- 55.- Seldah N.G., Donohue-Rolfe A., Lazure C., Anclair F., Keusch G.T., Chretien M. complete amino acid sequence of *Shigella* toxin B chain A novel polipeptide containing 69 amino acids and one disulfide bridge. *J. Biol. Chem.* 1986;261:13928.
 - 56.- Keusch G.T., Donohue-Rolfe A., Jacewicz M. *Shigella* toxin and the pathogenesis of shigelosis. En: Evered D., Whelan J., ed: Microbial toxins and diarrhoeal disease. London: Pittman. 1985;195-205.
 - 57.- Jackson M.P.W., Newland R.R., Holmes and O'Brien A.D. Nucleotide sequence analysis of structural gene for Shiga-like toxin 1 by bacteriophage 933J from *E. coli*. *Microbiol. Patho.* 1987;2:147-153.
 - 58.- O'Brien A.D., Laveck G.D., Griffin D.E. and Thompson M.R. Characterization of *Shigella dysenteriae* tipo 1 (Shiga) toxin purified by anti-shiga toxin affinity chromatography. *Infect. Immun.* 1980;30:170-179.
 - 59.- Mobassaleh M., Donohue-Rolfe A., Jacewicz M., Grand R.J., Keusch G.T. Pathogenesis of *Shigella* diarrhea. XIII. Evidence for a developmentally regulated glycolipid receptor for *Shigella* toxin involved in the fluid secretory response of rabbit small intestine. *J. Exp. Med.* 1987 (En prensa).
 - 60.- Keusch G.T. and Jacewicz M. Serum enterotoxin neutralizing antibody in human *Shigellosis*. *Nature, New, Biol.* 1973;241:31-32.
 - 61.- Keusch G.T., Jacewicz M., Levinne M.M., Hornick R.B. and Kochwa S. Pathogenesis of *Shigella* diarrhea. serum anticytotoxin antibody response produced by toxigenic and non-toxicogenic *Shigella dysenteriae* tipo 1. *J. Clin. Invest.* 1976;57:194-202.
 - 62.- O'Brien A.D., Homes R.K. Shiga y Shiga-like toxins. *Microbiol. Rev.* 1978;51:206-220.
 - 63.- Prado D.T.G., Clearly L.K., Pickering C.D., Ericson A.V. Barlet III, DuPont H.L. and Johnson P.C. The relations hip between cytotoxin production and clinical features in *shigellosis*. *J. Infect. Dis.* 1986;154:149-155.
 - 64.- Finlay B.B., and Falkow S. *Salmonella* as an intracellular parasite. *Molecular Microbiology*, 1989;3(12):1833-1841.
 - 65.- Gianella F.A., Gost R.E., Chaney A.N. Pathogenesis of *Salmonella* mediated intestinal fluid secretions. *Gastr.* 1975;69:1238-1245.
 - 66.- Bottone E.J., and Robin T. *Yersinia enterocolitica*: Recovery and Characterization of Two Unusual Isolates from a Case of Acute Enteritis. *J. Clinical Microb.* 1977;5:341-345.

- 67.- Gryboski J., Walker W.A. Diarrheas Acute and Chronic. En: Gastrointestinal problems in the infant. Philadelphia: Saunders, 1983:541-585.
- 68.- Arredondo J.L. Diarrea en el recién nacido. Bol. Med. Hosp. Infant. Mex. 1987;44:360.
- 69.- Von Lichtenberg F. Infectious diseases. En: Robbins S.L., Cotran R.M. Kumar V., ed; Pathologic basis of disease. 3a. ed. Philadelphia: Saunders, 1984:273-350.
- 70.- Vantrappen G., Agg H.O., Ponette E., Geboes K., Bertland P.H. *Yersinia* enteritis and enterocolitis: Gastroenterological aspects. Gastroenterology 1977;72:220.
- 71.- Davis B.D., Dulbecco R.; Tratado de Microbiología; Editorial Salvat, 3a. edición, 1985, Barcelona-España.
- 72.- Laugho B.E., Viscidi R.P., Gdovin S.L., Yolken R.H., and Bartlett J.G. Enzyme immunoassays for detection of *Clostridium difficile* toxins A and B in fecal specimens. J. Infect. Dis. 1984;149:781-788.
- 73.- Bartlett J.G. *Clostridium difficile*: clinical considerations. Rev. Infect. Dis. 1990;12:243-251.
- 74.- Borriello S.P., Larson H.E., Welch A.R., Barclay F., Stringer H.F., and Bartholomew B.A. Enterotoxigenic *Clostridium perfringens* a possible cause of antibiotic-associated diarrhea. Lancet. 1984;1:305-307.
- 75.- Borriello S.P., Davies H.A., Kamiya S., Reed P.J., Seddon S. Virulence factors of *Clostridium difficile*. Rev. Infect. Dis. 1990;12 Suppl 2:185-191.
- 76.- West S.E.H., and Wilkins T.D. Problems associated with counterimmunoelectrophoresis assays for detecting *Clostridium difficile* toxin, J. Clin. Microbiol. 1982;15:347-349.
- 77.- Lyrelly D.M., Sullivan N.M., and Wilkins T.D.: Enzyme-linked immunosorbent assay for *Clostridium difficile* toxin A, J. Clin. Microbiol. 1983;17:72-78.
- 78.- Bishop R.F., Davidson G.P., Holmes I.H., Ruck B.J. Virus particles in epithelial cells of duodenal mucosa from children with viral gastroenteritis. Lancet 1973;2:1281-1283.
- 79.- Flewett T.H., Bryden A.S., Davies H., Woode G.N., Bridger J.C., Derrick J.M. Relationship between virus from acute gastroenteritis of children and newborn calves. Lancet 1974;2:61-63.
- 80.- Ruiz-Morales A. Caracterización antigénica y molecular de un

- Rotavirus porcino YM, un posible nuevo serotipo de Rotavirus. U.N.A.M. FES Cuautitlan, 1988, Tesis para obtener el titulo de Maestro en Microbiologia.
- 81.- Holmes I.H. Rotaviruses. In: Joklik WK, ed. The Reoviridae. New York: plenum Press. 1983:359-423.
 - 82.- Kapikian A.Z., Chanock R.M. Rotaviruses. En: Fields B.N., ed: Virology. New York: Raven Press, 1990:1353-14048.
 - 83.- Estes M.K., Palmer E.L., Obijeski J.F. Rotaviruses: a review. Curr Top. Microbiol. Immunol. 1983;105:123-184.
 - 84.- Matsui S.M., Mackow E.R., Greenberg H.B. The molecular determinant of rotavirus neutralization and protection. Adv. Virus res. 1989;36:181-214.
 - 85.- Bachmann P.A., Bishop R.F., Flewett T.H., Kapikian A.Z., Mathan M.M., Zissis G. Nomenclature of human rotaviruses: designation of subgroups and serotypes. Bull WHO 1984;62:501-503.
 - 86.- Taniguchi K., Urasawa T., Morita Y., Greenberg H.B., Urasawa S. Direct serotyping of human rotavirus in stools using serotype 1, 2, 3 and 4 specific monoclonal antibodies VP7. J. Infect. Dis. 1987;155:1159-1166.
 - 87.- Hoshino Y., Saif L.J., Sereno M.M., Chanock R.M., Kapikian A.Z. Infection immunity of piglets to either VP3 or VP7 outer capsid protein confers resistance to challenge with a virulent rotavirus bearing the corresponding antigen. J. Virol. 1988;62:744-748.
 - 88.- Levine N.D., Corliss J.O., Cor F.E.G., Deroux G., Grain J., Honigberg B.M., Leedale G.F., Loeblich A.R. III, Lom J., Lynn D., Merinfeld G.E.G., Page I.C., Poljansky G., Sprague V., Vavra J., Wallage I.G. A newly revised classification of the Protozoa. J. Protozool. 1980;27:37.
 - 89.- Navin T.R., Juranek D.D. *Cryptosporidiosis*: clinical, epidemiologic and parasitologic review. Rev. Infect. Dis. 1984;6(3):313-327.
 - 90.- Brady E.H., Margolis M.L., Korzenlowsky O.M. Pulmonary *Cryptosporidiosis* in acquired immune deficiency syndrome. JAMA 1984;252:89-90.
 - 91.- Casemore D.P., Sand R.H. *Cryptosporidium* species a new human pathogen. J. Clin. Pathol. 1985;38:1321-1336.
 - 92.- Tzipori S., Angus K.W., Cambell I., Gray E.W. *Cryptosporidium*: Evidence for a single-species genus. Infect. Immun. 1980;30:884.
 - 93.- Bird R.G., Smith M.D. *Cryptosporidiosis* in man: Parasite life cycle and fine structural pathology. J. Pathol. 1980;132:217.

- 94.- Bird R.G., Smith M.D. *Cryptosporidiosis* in man, parasite life cycle and fine structural pathology. *J. Pathol.* 1980;132:217-233.
- 95.- Garza D. Diarrhea caused by a coccidian parasite, *Cryptosporidium*. *Lab. Med.* 1983;14(5):283-286.
- 96.- Calubiran O.V., Domenico P., Klein N.C., Cunhas B.A. Importancia de Leucocitos fecales en enfermedad infecciosa. *Infectología.* 1990;9:547-550.
- 97.- Vega-Franco L., Berrout J.C., Joachin A., Alanís J. Predicción etiológica de la diarrea mediante la identificación de leucocitos en las heces. *Bol. Med. Hosp. Inf.* 1974;XXXI(5):879-885.
- 98.- Muñoz O., Coello R.P., Setafin A.F. y cols. Gastroenteritis infecciosa aguda. Etiología y su correlación con las manifestaciones clínicas y moco fecal. *Arch. Invest. Med. Mex.* 1979;10:135.
- 99.- Vazela A. *Cryptosporidiosis* en pacientes adultos con Síndrome de Inmuno Deficiencia Adquirida. Universidad Feminina de México A.C., 1990 Tesis para obtener el título de Q.B.P.
- 100.- Ramírez M.T. Recuperación de *Campylobacter sp.* en relación con otros microorganismos clásicos causantes de diarrea en niños menores de 2 años en la zona Oriente de la Ciudad de México. Universidad Autónoma de Guerrero, 1989. Tesis para obtener el título de Q.B.P.
- 101.- Koneman E.W., Allen S.D., Dowell V.R., Sommers H.M.; Diagnóstico microbiológico; Editorial médica Panamericana, 1983, Buenos Aires-Argentina.
- 102.- Manual de Bacteriología Médica. Editado por: Academia de profesores del Laboratorio de Bacteriología Médica. Departamento de Microbiología. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. 4a. ed. 1983
- 103.- McFaddin J.F.; Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica; Editorial médica Panamericana; 1984; México D.F., México.
- 104.- Dra. Susana López. Centro de Investigación sobre Ingeniería Genética y Biotecnología. U.N.A.M. Departamento de Biología Molecular. Comunicación Personal. Cuernavaca-Morelos.
- 105.- Loening W.E., Coovadia Y.M., Van den Ende J. Aetiological factors of infantile diarrhoea: a community-based study. *Ann Trop Paediatr.* 1982;9: 248-255.
- 106.- Arango A.E., Aguirre C., Aristizábal L., Hanssen H. Frecuencia de Rotavirus en niños menores de cinco años con diarrea aguda. *Salud univorte.* 1985; 2;129-138.
- 107.- Gutiérrez B.J., Soriano E.H., O'Ruan G.M., Avendaño U.P.,

D'Ottone M.K., Soriano P.H. Agentes patógenos en el síndrome
diarreico agudo no enterocolítico. Rev. chil. pediatr.
1989;60:28-33.

- 108.- Sethi S.K., Khuffash F. Bacterial and viral causes of acute
diarrhoea in children in Kuwait. J. Diarrhoeal Dis. Res.
1989;7:85-88.