



# Universidad Nacional Autónoma de México

ESCUELA DE ESTUDIOS PROFESIONALES  
ENEP ZARAGOZA

## Frecuencia de Aislamiento e Identificación de Agentes Causales de Diarrea con Sangre en Pacientes menores de 15 años

### T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

**Químico Farmacéutico Biólogo**

P R E S E N T A:

**Ma. Angélica Cárcamo Calderón**

ASESOR ACADEMICO  
**Q. B. P. Martha A. Perez Reyes**

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

México, D. F.

1 9 9 3.



## **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.

## I N D I C E

RESUMEN . . . . .	1
INTRODUCCION. . . . .	3
ANTECEDENTES. . . . .	17
FUNDAMENTOS . . . . .	19
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA. . . . .	24
OBJETIVOS. . . . .	25
HIPOTESIS . . . . .	26
MATERIAL Y METODO . . . . .	27
RESULTADOS. . . . .	40
DISCUSION . . . . .	50
CONCLUSIONES. . . . .	53
BIBLIOGRAFIA. . . . .	54

## RESUMEN

La presente investigación tuvo como objetivos. 1) Determinar la frecuencia y distribución de los diferentes enteropatógenos asociados a la diarrea con sangre y disentería en pacientes menores de 15 años; 2) Correlacionar la presencia de leucocitos P.M.N. con el agente etiológico aislado; 3) Comparar el porcentaje de aislamiento de Campylobacter sp en los medios S.S.M. y Campy-BAP.

De marzo de 1990 a marzo de 1991, fueron captados 140 pacientes en 18 Unidades de Atención Médica de Primer Nivel del I.M.S.S.S. y Centros de Salud.

A las muestras se les realizó: coprocultivo, búsqueda de leucocitos fecales y amiba en fresco.

Para el aislamiento de Shigella sp, Salmonella sp y Escherichia coli; se emplearon medios selectivos y/o diferenciales, agar Mac ConKey, agar Mac ConKey-Telurito, agar SS, agar Verde Brillante y agar XLD, en forma directa y con previo enriquecimiento en caldo Selenito de sodio. El aislamiento de Aeromonas hydrophila, se efectuó utilizando agar TSA. Campylobacter sp se aisló con los medios S.S.M. y Campy-BAP en forma directa e indirecta, utilizando caldo tioglicolato al 0.4% de agar. Para el aislamiento de Yersinia enterocolitica se empleó agar Yersinia con y sin previo enriquecimiento en caldo Yersinia. La observación del moco fecal se realizó empleando la tinción de Giemsa. En la investigación de Entamoeba histolytica, sólo fueron considerados los trofozoitos, los cuales se buscaron con la técnica de Tricromo de Gomori modificado por Wheatley.

La frecuencia de enteropatógenos aislados en los pacientes fueron: Shigella sp 21%; Campylobacter sp 20%; Salmonella sp 18%, E.coli citotóxica 8%; Aeromonas hydrophila 2%, y Entamoeba histolytica 2%. No se aisló Yersinia enterocolitica. De los enteropatógenos estudiados Shigella sp, Salmonella sp y Campylobacter sp, presen-

tan una incidencia mayor en niños pequeños, encontrándose la primera de éstas, con mayor frecuencia en el grupo de pacientes de uno a cinco años y las otras dos en pacientes menores de un año. Las infecciones mixtas representaron el 9%. En el estudio de moco fecal Shigella sp, presenta más de 50 leucocitos PMN en aproximadamente el 40% de sus aislamientos y en los pacientes a los que se les aisló Salmonella sp, Campylobacter sp y E. coli citotóxica el número de PMN fue desde 2 hasta 50 células. Con respecto al aislamiento de Campylobacter sp, el porcentaje obtenido en los medios SSM, Campy-BAP, SSM-tioglicolato y Campy-BAP-tioglicolato fueron respectivamente: Campylobacter jejuni (11,43,25 y 61%), y Campylobacter coli (14,14,14 y 18%).

## INTRODUCCION

La enfermedad diarreica es la principal causa de morbilidad y mortalidad infantil en los países en desarrollo y la causa de mayor desnutrición (12,24,66). Según estadísticas reportadas por la Organización Mundial de la Salud, más de 1.3 mil millones de episodios diarreicos ocurren cada año en niños menores de cinco años de edad en: Africa, América Latina y Asia (incluyendo China); en este grupo, 4 millones de niños mueren anualmente de diarrea ocurriendo el 80% de estas muertes en los primeros dos años de vida. (12,66).

México está caracterizado por altos índices de morbimortalidad, en los que predominan los padecimientos infecciosos y la desnutrición. Dentro de los primeros, la diarrea infecciosa aguda ha dejado de ocupar el primer lugar como causa de muerte desde hace varios años, pero sigue siendo uno de los principales motivos de consulta y de hospitalización en todo el territorio nacional, lo que constituye la segunda causa de morbilidad. (32, 37, 42, 58).

En el Distrito Federal muchos niños presentan de 3 a 5 cuadros de diarrea al año con un promedio de 2.7 por niño, mientras que 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 (12, 17, 26).

Estudios socioeconómicos confirman que los factores contribuyentes a la alta incidencia de diarrea incluyen, hacinamiento, niveles de saneamiento bajo, agua contaminada e higiene inadecuada en la preparación de alimentos, (13,36,39,58) y que precisamente el descenso en la mortalidad se debe a mejoramientos de estos factores, y la aplicación de campañas de hidratación oral. Por otra parte, existe una acción sinérgica entre las enfermedades infec-

ciosas y la mal nutrición , esta última sea como causa básica o asociada de muerte (36).

En investigaciones realizadas en nuestro país, se ha observado que la mayoría de las defunciones por diarrea infecciosa aguda son consecuencia de la deshidratación, el manejo dietético y el tratamiento inadecuado (20,30,31,32).

La etiología de la diarrea infecciosa aguda puede ser de origen viral, bacteriano o parasitario. Encontrándose en diferentes estudios epidemiológicos tendientes a determinar la etiología de la diarrea infecciosa aguda, que los agentes patógenos más comúnmente asociados son Rotavirus, Campylobacter jejuni, E. coli enterotoxigénica, Shigella sp, Salmonella sp, y Giardia lamblia, observándose diferencias en la frecuencia de aislamiento según el grupo de edad estudiado (26,42,58).

La diarrea infecciosa aguda sin sangre es un tipo de diarrea que requiere únicamente manejo nutricional, prevención o tratamiento de la deshidratación para evitar la desnutrición y complicaciones secundarias a la pérdida de líquidos y electrolitos, siendo en este caso innecesario el uso de antibióticos. Sin embargo, en estudios realizados en 1987, se encontró que aproximadamente el 12.6% de casos de diarrea aguda demostraron trazas de sangre, de los cuales el 50% de los casos son causados por Shigella sp y el 10% por Entamoeba histolytica, éstas requieren de tratamientos específicos con antimicrobianos que acortan la duración de las manifestaciones clínicas, reducen el periodo de contagiosidad y previenen complicaciones que puedan causar la muerte (43); el 40% restante de casos de diarrea con sangre son causados por otros enteropatógenos (Campylobacter sp, Salmonella sp, Vibrio parahemolyticus, Yersinia enterocolitica) (28,64). Por otro lado, no hay un acuerdo sobre el antibiótico correcto que deba ser administrado en cada caso, siendo necesario que exista un conocimiento actualizado de la etiología y del patrón de resis-

tencia de los agentes causales para el diseño de un esquema de tratamiento.

En el presente siglo se han logrado avances sustanciales en la identificación de nuevos agentes causales, sus mecanismos de patogenicidad y los trastornos fisiopatológicos que caracterizan al síndrome diarreico. Aproximadamente hace 15 años, el agente etiológico podía ser determinado en sólo 15-20% de los casos: en la actualidad es posible establecer el diagnóstico etiológico en un 50-70%, lo cual facilita el tratamiento oportuno y contribuye al reconocimiento temprano de epidemias y permite la evaluación y aplicación de medidas de intervención específicas (12,47,65).

#### GENERALIDADES

El presente trabajo incluye la determinación: Shigella sp, Salmonella sp, Campylobacter sp, E. coli citotóxica, Aeromonas hydrophila, Yersinia enterocolítica y Entamoeba histolytica.

#### Shigella sp

##### Identificación

Bacilos gram negativos inmóviles, que miden de 0.4 a 0.6 por 1.0 a 3.0  $\mu\text{m}$ , anaerobios facultativos, lactosa negativa, catalasa positivos (a excepción de una especie), oxidasa negativos, quimioorganotróficos. Fermentan los azúcares sin producción de gas, no licúan la gelatina ni producen  $\text{H}_2\text{S}$ , no emplean citrato o malonato como única fuente de carbono y no desarrollan en KCN (19,38,40,45).

##### Patogénesis

La bacteria induce a la célula para que la ingiera por endocitosis, en el proceso, Shigella es internalizada en inclusiones



membranales de la célula huésped y una vez dentro, la vacuola que contiene a la bacteria se lisa, al parecer por la acción de hemolisinas de Shigella y el organismo es liberado en el citoplasma. Shigella se multiplica dentro de las células epiteliales del colon y rara vez penetra más allá de la lámina propia. La bacteria puede producir una toxina, denominada toxina Shiga que detiene la síntesis de proteínas del enterocito y junto con el proceso invasivo, provoca la destrucción de la mucosa e induce una respuesta inflamatoria; estos mecanismos de daño se manifiestan por la presencia de sangre y de leucocitos en heces (4,14,24,27,53).

#### Características epidemiológicas

La shigelosis es mundial. Es principalmente una enfermedad pediátrica con más aislamientos en niños de 1 a 4 años de edad. La infección se transmite por vía oral-fecal; principalmente por vía de manos contaminadas, y con menos frecuencia por alimento o agua. Se han encontrado en estudios hechos anteriormente que 10<sup>6</sup> bacilos pueden provocar la enfermedad, la shigelosis se transmite con rapidez en comunidades donde los estándares sanitarios y niveles de higiene personal son bajos (13,14,24,26,39,51).

#### Características clínicas

Las infecciones por especies de Shigella incluyen: infecciones asintomáticas, diarrea y disentería severa. Los síntomas de la shigelosis aparecen de 1 a 3 días después de que se ingirieron los bacilos, presentando un inicio repentino que comprende fiebre de intensidad y duración variable, toxemia y dolor abdominal, marcada deshidratación y ocasionalmente vómito. Por lo general, la diarrea es inicialmente líquida y abundante, pero luego puede disminuir, mostrando abundantes neutrófilos, eritrocitos y moco en las evacuaciones, entonces el cuadro clínico se transforma en una verdadera disentería. La infección por lo general, se autolimita, aunque se recomienda tratamiento antibiótico para reducir el riesgo de conta

gio secundario. Las infecciones por Shigella en general se limitan al sistema digestivo, las posibles complicaciones incluyen: vaginitis, síndrome urémico-hemolítico, etc. (24, 51, 54).

### Salmonella sp

#### Identificación

Bacilos gram negativos que no forman esporas, de 0.5 a 0.7 por 1.0 a 3.0  $\mu\text{m}$ , se mueven por flagelos peritricos, aunque son anaerobios facultativos, se desarrollan bien en los medios de cultivos ordinarios en presencia de oxígeno. Casi siempre dan reacciones para movilidad, fermentación de manitol y sorbitol, reducen los nitratos a nitritos, en la mayoría de los casos producen gas a partir de glucosa y generalmente negativos para DNAasa, indol, fenilalanina desaminasa, ureasa, Voges-Proskauer, desarrollo en KCN, ONPG y fermentación de lactosa, adonitol, sacarosa, rafinosa y salicina, no utiliza malonato y en la mayoría de los aislamientos son ácido sulfhídrico positivo (38, 40, 45).

#### Patogénesis

Se reconocen por lo general dos patrones de patogenicidad para Salmonella uno se asocia con la infección generalizada del sistema mononuclear fagocítico (SRE) bacteremia y pírexia prolongada causada típicamente por S. typhi o S. paratyphi A y B y el otro es la enteritis en la cual Salmonella invade la pared intestinal del colon y del ileon, preferentemente a células epiteliales y especializadas M en el ileon terminal. La bacteria se adhiere al enterocito y penetra por un mecanismo de pinocitosis donde la membrana de la célula rodea al microorganismo hasta internalizarlo en una vacuola; cada vacuola contiene sólo una bacteria y varias de estas se fusionan para formar una sola con varias bacterias. Esta vacuola viaja hasta la otra cara de la célula y se fusiona con la membrana basal para liberar las salmonellas en la lámina propia (transcitosis). Una vez aquí,

la bacteria se multiplica e induce una fuerte respuesta inflamatoria, cuyos mediadores aumentan el daño a la pared intestinal y algunos de ellos, como las prostaglandinas pueden provocar hipersecreción, contribuyendo a la pérdida de líquidos (24,51,53,42).

#### Características epidemiológicas

Salmonella es cosmopolita e infecta al hombre y varias especies de animales. La fuente de la mayoría de las infecciones es la ingestión de agua contaminada o de productos alimenticios o propagación directa oral-fecal en los niños. La máxima incidencia de enfermedad es en niños pequeños, infectados durante los meses calientes del año. La dosis mínima infectante para el hombre es de  $10^6-10^7$ , siendo las aves de corral, huevos y productos diarios las fuentes más comunes de infección (24,38,51). S. typhi está restringida al huésped humano.

#### Características clínicas

Las infecciones de Salmonella aparecen en cuatro formas: gastroenteritis, bacteremia, fiebre entérica y colonización asintomática. La gastroenteritis es la forma más común, los síntomas por lo general aparecen de 6 a 48 horas, después del consumo de la comida o del agua contaminada, con la presentación inicial de náusea, molestias abdominales, cefalea, fiebre, deshidratación y malestar general. Ocasionalmente, puede haber vómito y escalofríos. Las evacuaciones diarreicas a veces presentan sangre, moco y leucocitos, siendo en ocasiones de tipo francamente desinteriforme. Los síntomas pueden persistir de dos días a una semana antes de una resolución espontánea (21,24,51,54).

#### Campylobacter sp

##### Identificación

Son bacilos finos gram-negativos, curvados en espiral, de 0.2 a

0.5  $\mu\text{m}$  de ancho y 0.5 a 5.0  $\mu\text{m}$  de largo, tienen apariencia de S o forma de ala de gaviota, no forman esporas, en cultivos viejos las células pueden volverse esféricas o cocoides, poseen un flagelo polar en uno o en ambos extremos y muestran movilidad lineal rápida o en sacacorchos, son micro-aerófilos ya que tienen un mejor crecimiento en atmósferas de tensión reducida de oxígeno, puede cultivarse en una atmósfera de 5% de  $\text{O}_2$ , 10% de  $\text{CO}_2$  y 85% de  $\text{N}_2$ . No fermentan ni oxidan los carbohidratos, oxidasa y catalasa positivos, los medios selectivos en los que se cultiva Campylobacter sp deben incubarse a 42-43°C de 48 a 72 horas (4,48,50).

#### Patogénesis

La enfermedad se caracteriza por la destrucción de las superficies mucosas del yeyuno, íleon y colon, debido a que el microorganismo atraviesa la mucosa intestinal causando poco daño al epitelio, multiplicándose en la lámina propia y en nódulos linfáticos mesentéricos, induciendo una fuerte respuesta inflamatoria con producción de un infiltrado con neutrófilos, células mononucleares y eosinófilos. Campylobacter produce una enterotoxina semejante a la termolábil de E. coli y a la colérica de V. cholerae y se sugiere que participa en la hipersecreción. También se ha observado la producción de citotoxinas pero se desconoce si éstas participan en la pared intestinal (24,48,50).

#### Características epidemiológicas

Campylobacter es a nivel mundial uno de los agentes que más comúnmente producen diarrea. La campylobacteriosis es considerada una zoonosis, numerosas especies animales presentan a Campylobacter en su flora intestinal. Las infecciones humanas resultan del consumo de alimento contaminado, leche o agua y por contacto directo con animales contaminados. Puede haber transmisión fecal-oral de persona a persona, pero no es común. La dosis infectiva está estimada en 500 microorganismos, con un periodo de incubación variable de 1 a 7 días (24,48,50,61).

### Características clínicas

Las infecciones de C. jejuni, se ven más comúnmente como enteritis aguda, con diarrea, malestar, fiebre y dolor abdominal. Por lo general, la enfermedad es autolimitante, aunque los síntomas pueden durar una semana o más. Existen dos días de síntomas prodrómicos caracterizados por deposiciones líquidas, frecuentes y generalmente con presencia de sangre, moco y leucocitos polimorfonucleares (24,48,50).

### Yersinia enterocolitica

#### Identificación

Todos los miembros del género son ovalados o cocoides, de 0.5 a 1.0  $\mu\text{m}$  de ancho y 2.0 a 3.0  $\mu\text{m}$  de largo, gram negativo, anaerobio facultativo, móvil por flagelos peritricos cuando se cultiva a menos de 30°C, su temperatura óptima de crecimiento es de 30 a 37°C, con un índice de crecimiento menor a esta temperatura que otros patógenos entéricos, un rasgo importante de Yersinia es su capacidad de reproducción a temperaturas bajas ( $\pm 5^\circ\text{C}$ ). Fermenta arbutina, celobiosa, galactosa, sorbitol y sorbosa sin producción de gas, produce ureasa, beta galactosidasa y ornitina descarboxilasa, ocasionalmente produce indol (48).

#### Patogénesis

A pesar de que el microorganismo puede producir una enterotoxina que recuerda estrechamente a la toxina termoestable (ST) de E. coli, Yersinia enterocolitica se considera principalmente como un patógeno no invasivo que se asocia comúnmente a nódulos linfáticos intestinales. La enfermedad incluye el íleon terminal con alargamiento de los nódulos linfáticos mesentéricos pudiendo semejar una apendicitis aguda (24,38,51).

### Características epidemiológicas

Yersinia enterocolitica, es una causa común de enterocolitis en Escandinavia y en otros países europeos, así como, en los lugares más fríos del Norte de América. Se presenta principalmente en niños menores de siete años de edad. Cepas de Yersinia enterocolitica se han aislado de humanos, animales y fuentes del medio ambiente. Las fuentes potenciales de transmisión son leche, agua y alimentos contaminados con heces de perro, cerdo o rata. El periodo de incubación es de 12 a 72 horas (24,51).

### Características clínicas

Aproximadamente dos terceras partes de todas las infecciones de Yersinia enterocolitica son enterocolitis. La gastroenteritis se caracteriza por diarrea de corta duración sin presencia de sangre, fiebre y dolor abdominal que en el 95% de los casos, dura de 1 a 2 semanas aunque se puede desarrollar una forma crónica y persistir durante meses (24,38,51).

### Aeromonas hydrophila

#### Identificación

Bacilos rectos, gram-negativos con extremos redondeados o cocoides, de 0.3 a 1.0  $\mu\text{m}$  de diámetro y 1.0 a 3.5  $\mu\text{m}$  de largo, se les encuentra aislados, en pares o formando cadenas cortas, móviles por un sólo flagelo polar, anaerobios facultativos. Nutrición quimioorgánica, producen oxidasa y catalasa, fermentan la glucosa con producción de ácido y gas, reducen nitratos a nitritos, su rango de temperatura de desarrollo oscila entre 10 y 41°C, algunas cepas son bioquímicamente más activas a 22°C que a 37°C, crecen en caldo nutritivo con NaCl al 3.5% pero no al 6.5%, presenta una beta hemólisis en agar sangre (1,25).

### Patogénesis

Los posibles mecanismos patogénicos por los cuales este organismo causa enteritis, incluyen los siguientes factores de virulencia: adherencia a células bucoepiteliales, hemaglutinación, producción de exotoxinas (incluyendo hemolisinas) y actividad enterotoxigénica. Se ha encontrado que las cepas de Aeromonas sp asociadas con enfermedad diarreica producen una enterotoxina termolábil que se neutraliza con la antitoxina del cólera (1,25,26).

### Características epidemiológicas

Las Aeromonas tienen una distribución cosmopolita. Tanto humanos como animales pueden ser portadores. Las bacterias se encuentran en agua fresca y salada particularmente en verano. Las infecciones humanas surgen de la exposición a aguas no tratadas, pero la enfermedad no se asocia al consumo de mariscos o pescado fresco (24,25,50).

### Características clínicas

Aeromonas hydrophila es la especie de este grupo más comúnmente hallada en la práctica clínica. Está asociado a una amplia variedad de infecciones humanas como son: 1) gastroenteritis aguda en niños y adultos; 2) heridas infectadas con agua o tierra contaminada y complicadas con celulitis; 3) septicemia en huéspedes inmunocomprometidos; 4) otras infecciones menos frecuentes del tracto urinario, miositis, conjuntivitis, meningitis. La infección entérica está caracterizada por diarrea generalmente de corta duración, con presencia de sangre y moco, dolor abdominal, fiebre y vómito en pacientes pediátricos (1,24,25,51).

### Escherichia coli

#### Identificación

Son bacilos gram negativos, que miden entre 0.5 a 1.0  $\mu\text{m}$  de ancho

y 2.0 a 3.0  $\mu\text{m}$  de largo, anaerobios facultativos. E. coli es típicamente positiva para producción de gas a partir de glucosa, Indol, lisina, arabinosa, manitol, ONPG, trehalosa y xilosa, los aislamientos son también generalmente negativos DNA asa,  $\text{H}_2\text{S}$ , fenilalanina desaminasa, ureasa, Voges-Proskaver, inositol y KCN (38).

#### Patogénesis y Características clínicas

Escherichia coli está reconocido como patógeno asociado a una amplia variedad de infecciones humanas, entre las que se encuentran: 1) Septicemia, siendo el foco de infección por lo regular una infección del sistema urinario o diseminación de organismos del sistema gastrointestinal; 2) infecciones del sistema urinario, siendo E. coli la responsable del 80% de los casos; 3) Meningitis; 4) Gastroenteritis. Cepas de E. coli que causan gastroenteritis, están subdivididas en, por lo menos, cuatro grupos de acuerdo a su mecanismo patogénico: enterotoxigénica (ETEC), enteroinvasiva (EIEC), enteropatogénica (EPEC) y enterohemorrágica (EHEC) (4,15,38,51). La gastroenteritis producida por ETEC se media con exotoxinas termolábiles y termoestables. La acción de la toxina termolábil (LT) es similar a la bien caracterizada toxina de Vibrio cholerae, con activación de adenil ciclasa y subsecuente hipersecreción de  $\text{H}_2\text{O}$  y electrólitos en el intestino delgado. La toxina termoestable activa a la guanil ciclasa y estimula la secreción de fluidos (15,38, 51).

E. coli enteroinvasiva (EIEC) actúa 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 (19,24).

EPEC son agentes importantes de diarrea infantil, con particularidad en países pobres. Se han descrito dos tipos de mecanismos por los cuales EPEC pueden producir daño: 1) la capacidad de adhesión



a la mucosa intestinal, esta habilidad del organismo para adherirse a la membrana del enterocito y causar la destrucción de las microvellosidades adyacentes 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, 2) la producción de citotoxinas y su efecto se ha demostrado en diferentes tejidos animales, encontrando que filtrados de los cultivos de algunos serotipos de E. coli eran capaces de destruir las células de Vero y que este efecto era diferente al producido por las cepas ETEC que sólo cambiaban la forma de las células (efecto citotónico) sin destruirlas; la relación que tiene la toxina con la diarrea producida por EPEC sigue siendo oscura ya que no todas las cepas pertenecientes a estos serotipos la producen (15,24,41, 44,52,57).

E. coli enterohemorrágica (EHEC), produce una citotoxina llamada verotoxina, llamada así por el efecto citopático en la línea de las células Vero. EHEC, característicamente, es responsable de colitis hemorrágica con un dolor abdominal severo, diarrea con sangre y en ocasiones poca fiebre (16,24,38,51).

#### Características epidemiológicas

E. coli durante muchos años fue la única especie del género *Escherichia*, pero ahora se reconocen otras 3 especies. Estas especies, E. fergusonii, E. hermanii, y E. vulneris, han sido aisladas de fuentes humanas potencialmente significativas pero hasta el presente no han demostrado ser patógenos humanos. E. coli es la que se aísla con más frecuencia, estando presente en el sistema gastrointestinal en grandes cantidades y es el Enterobacteriaceae con frecuencia, más asociado con septicemia, meningitis neonatal, con infecciones del sistema urinario y con gastroenteritis en los viajeros. La mayoría de las infecciones son endógenas (4,38,51).

## Entamoeba histolytica

### Formas de vida

La infección por Entamoeba histolytica se conoce como amibiasis; ésta puede encontrarse en las heces en tres formas: trofozoito, prequiste y quiste. El trofozoito es la forma vegetativa activa; se le ha comparado al leucocito, dado que tiene algunas acciones similares (locomoción, quimiotaxis, fagocitosis), pero Entamoeba histolytica es más grande y frecuentemente presenta en su citoplasma glóbulos rojos fagocitados. Los prequistes son células redondas, incoloras, más pequeñas que el trofozoito y la formación de pseudópodos es lenta. La forma quística es redonda, con 4 núcleos en su interior y es la forma esencial para la transmisión, ya que el quiste maduro tiene capacidad infectante (33,46, 56).

### Patogénesis

Este parásito se ubica a lo largo del intestino grueso, en cuya pared puede producir úlceras microabscesos en "botón de camisa". Pero también puede producir invasión tisular por vía linfática o hematológica y así se puede localizar en hígado, pulmón y cerebro. E. histolytica puede causar enfermedad invasiva por: 1) adherencia a la capa mucosa del colon, resultando en colonización intestinal; 2) rompimiento de las barreras intestinales por secreción de enzimas proteolíticas o toxinas; 3) lisis de las células epiteliales del intestino e inflamación celular, provocando ulceración del colon; 4) resistencia hacia los mecanismos de defensa inmune (11,33,56).

### Características epidemiológicas

E. histolytica infecta aproximadamente un 10% de la población mundial con incidencia del 30% en regiones tropicales y subtropicales. En México la amibiasis es endémica, encontrándose una incidencia

del 27%. Estudios serológicos en la Ciudad de México indican que por arriba del 5% de los residentes experimentan alguna forma de amibiasis invasiva cada dos años. La fuente de contagio siempre es el humano enfermo o portador. El mecanismo de transmisión se establece por la ingestión de alimentos o agua contaminada, o bien por contacto directo vía fecal-oral (33,56).

#### Características clínicas

La amibiasis en el niño puede dar cuadros clínicos muy variados y esto parece depender de varios factores entre los cuales se mencionan la virulencia de la cepa, intensidad de la infestación, antigüedad de la misma, flora bacteriana fecal asociada, estado inmunitario, edad; por lo tanto los síndromes clínicos pueden incluir infección intestinal asintomática, colitis invasiva crónica o aguda, absceso hepático, amibiasis mucocutánea y amibiasis cerebral. La enfermedad colónica invasiva normalmente se presenta con diarrea mucosanguinolenta, dolor abdominal tipo cólico, pujo, tenesmo y ocasionalmente fiebre. Puede existir ulceraciones no específicas de la mucosa, las clásicas ulceraciones en forma de botón que se extienden dentro de la submucosa. Puede formar lesiones crónicas localizadas (denominadas amebomas) (33,46,56).

### ANTECEDENTES

Estudios epidemiológicos tendientes a determinar la etiología de la diarrea aguda con sangre en nuestro país y otros países en desarrollo, revelan que Shigella sp es el agente etiológico que más frecuentemente se asocia a cuadros de diarrea con sangre o disentería en un 35 a 50%, (10,13,18,61) encontrando su mayor incidencia en niños preescolares; Salmonella sp se aísla aproximadamente en un 10% con mayor frecuencia en niños menores de un año (19,24,26,59,63). Campylobacter sp en aproximadamente el 16%, presentándose en niños entre 1 a 4 años (24,26,63). En nuestro país E. coli enteroinvasiva y E. coli citotóxica se asocian a diarrea aguda con sangre en porcentajes menores de 0.5% (24,26).

En 1984 Taylor, D.N. y col. al examinar 200 casos con diarrea sanguinolenta en Tailandia encontró que Shigella sp se aislaba en un 44%; el siguiente año se estudiaron 410 niños determinando a Shigella sp en un 23%. Otros estudios realizados en países en desarrollo encontraron que este patógeno entérico se aislaba en un 12% de pacientes vistos en Bangladesh, y en 12% de pacientes en Malasia. Tasas similares de aislamiento se encontraron en Brasil (61).

Asimismo en Bangkok, Shigella sp se asoció con diarrea sanguinolenta en 37% de los casos donde sólo un patógeno se detectó, mientras Campylobacter sp y Salmonella sp se asociaron con heces sanguinolentas en 14% y 26% respectivamente (61).

Guiscafré y col. durante 1987, estudiaron la etiología de la diarrea aguda en una población urbana mexicana, refiriendo que los agentes causales en los pacientes con diarrea con sangre fueron con mayor frecuencia Shigella sp en un 42.5% y Entamoeba histolytica en un 8.5% (28). Por otra parte en el mismo año en Bangkok, Shigella sp se aisló en un 52% en niños de 3 a 5 años de edad con diarrea sanguinolenta (19,60).

Fitzroy, J.H. realizó un estudio en niños de 6 a 35 meses en Bangladesh durante 1987-1988, demostrando que cada niño tenía un ataque de diarrea con sangre por periodo de 2 años, identificando a E. coli con una frecuencia de 14.6%, Shigella sp 9.4%, Plesiomonas sp 1.6%, Aeromonas sp 6.3% (35).

En los trabajos anteriormente citados, se ha logrado identificar al agente causal de la diarrea aguda con sangre en un 60-70% de los casos y han establecido la importancia relativa de los diversos agentes etiológicos (12,45,61).

### FUNDAMENTOS

Recientes avances en el conocimiento acerca de las diarreas infecciosas causadas por bacterias, permiten ahora clasificar a los patógenos entéricos por sus mecanismos de patogenicidad.

El amplio rango de enteropatógenos y su virulencia puede ser reconocida en cuatro mecanismos diferentes, que corresponden cada uno de ellos a una lesión anatomopatológica distinta: 1) invasión de la mucosa con inflamación y ulceración; 2) elaboración de citotoxinas que causan lesión de las células inflamatorias y secreción, lo que puede deberse a la inhibición de la síntesis de proteínas o la participación de las sustancias mediadoras de la inflamación; 3) elaboración de enterotoxinas que alteran el balance de agua y sales intestinales sin afectar las formas morfológicas de la mucosa; 4) colonización y adherencia a la superficie del intestino, resultando en una destrucción de las microvellosidades y daños a las células. Algunos patógenos muestran más de un mecanismo simultáneo (Figuras 1 y 2) (4,24,26,48,58).

La diarrea infecciosa ocurre cuando un número crítico de microorganismos (o en algunas ocasiones toxinas microbianas preformadas) es ingerido, sobrevive al paso a través de la acidez gástrica y llega al tracto gastrointestinal; una vez ahí, los microorganismos deben adherirse al moco o directamente a las células de la pared intestinal. La interacción entre esos factores y los mecanismos de virulencia propios del microbio determinan el curso clínico y la severidad de la enfermedad, dando como consecuencia la producción de diarrea secretora e invasiva. La primera ocurre generalmente en la parte alta del intestino delgado, donde una enterotoxina microbiana (ejem.: toxina termolábil y termoestable producidas por E. coli, V. cholerae) o el microorganismo mismo (ejem.: Rotavirus o Giardia lamblia) provocan hipersecreción que se manifiesta como diarrea acuosa. En el caso de la diarrea invasiva el microorganismo o sus citotoxinas (ejem.: Shigella sp, Campylobacter jejuni o Salmonella sp) causan un proceso invasivo, normalmente en el colon,

que se manifiesta como disentería, provocando efectos inflamatorios como característica de la infección, incluyendo la pérdida de la integridad de la capa epitelial de las células, destrucción del tejido y la eliminación de células inflamatorias (PMN) en el tejido y las heces, con evacuaciones con sangre, moco o pus. Entamoeba histolytica causa una colitis invasiva, pero a diferencia de los otros microorganismos, ésta lisa a los polimorfonucleares, que en heces se observan picnóticos o ausentes (3,4,26,39).

Los datos clínicos observados en la diarrea infecciosa aguda pueden agruparse en cuatro síndromes o grupos: Síndrome diarreico, síndrome disentérico, síndrome infeccioso y complicaciones. El síndrome diarreico se manifiesta como un aumento brusco en el número de evacuaciones y en el contenido líquido de los mismos, puede haber sangre y moco en ellas y están compuestas fundamentalmente de materia fecal líquida; también puede haber cólicos. El síndrome disentérico se caracteriza por la presencia de evacuaciones numerosas, compuestas principalmente por moco y sangre, con escasa materia fecal, casi siempre se acompaña de cólicos, pujo o tenesmo. El síndrome infeccioso se caracteriza por fiebre, anorexia, vómito y ataque al estado general (42,58).

Estos síndromes pueden presentarse en forma simultánea o sucesiva en un mismo paciente o corresponder a uno sólo. La frecuencia e intensidad de los síntomas y el tipo de síndrome, varía de acuerdo con el agente patógeno (42,58).

En estudios previos realizados en México, se ha encontrado que aproximadamente el 12.6% de los casos de diarrea aguda se presentan con sangre (28,64). La presencia de sangre y leucocitos PMN en heces es una indicación de enfermedad diarreica con invasión y/o daño a la mucosa; este síndrome puede ser causado por microorganismos invasivos como: Shigella sp, Campylobacter sp, Salmonella sp, Plesiomonas shigelloides, Vibrio parahemoliticus, E. coli enteroinvasiva (EIEC), E. coli enterohemorrágica (EHEC), Entamoeba histolytica (13,19,24,34,61).

Observándose que en países subdesarrollados mucha gente muere de shigelosis más que de diarrea aguda, siendo responsable del 25% de todas las muertes relacionadas a diarrea. El uso de signos clínicos y síntomas es muy importante para identificar pacientes con shigelosis y la diarrea con sangre es un indicador de la infección en la mayoría de los casos.

La infección causada por este microorganismo es la más común y potencialmente la más severa, como causa de disentería, seguida por Campylobacter jejuni, y Salmonella sp, son las causas más comunes de disentería, pero estas últimas generalmente producen una enfermedad autolimitada que es raramente tan seria o tan difícil de tratar como la shigelosis. La Entamoeba histolytica es responsable de la disentería amebiana, es una causa rara de disentería en niños, siendo menos del 5% de todos los episodios (13,39).



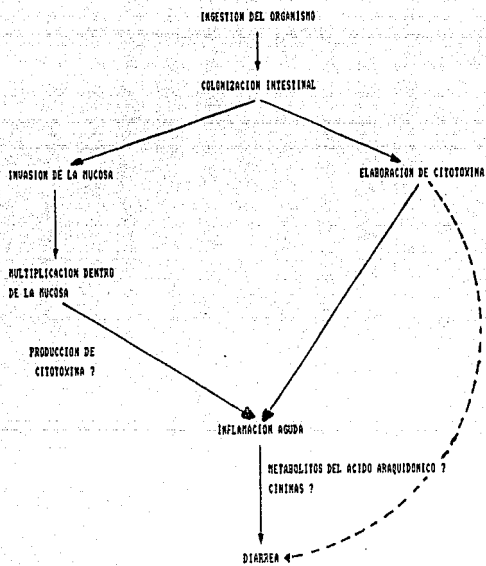


FIGURA 1. PATOGENESIS DE LA DIARREA BACTERIANA INVASIVA Y CITOTOXICA

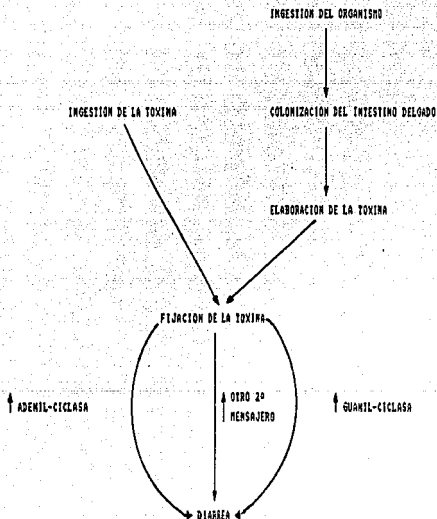


FIGURA 2. PATOGENESIS DE LA DIARREA TOXIGENICA BACTERIANA

### PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La diarrea aguda persiste como una de las principales causas de morbilidad y de consulta en los países en desarrollo, principalmente entre la población infantil. En México constituye la segunda causa de morbilidad en toda la población (32,37).

Se conoce que el 12.6% de los casos de diarrea aguda son diarreas con sangre, los patógenos Shigella sp y Entamoeba histolytica son responsables de un alto porcentaje de los casos, (28,64) sin embargo, en nuestro país no existen estudios encaminados a conocer la etiología de la diarrea con sangre, que permitan aplicar un esquema terapéutico para esta enfermedad.

La O.M.S., ha reportado que el estudio de moco fecal, es orientador de la etiología de diarrea con sangre, lo que permite un diagnóstico rápido (65).

En México no existen estudios que nos indiquen la relación entre leucocitos de moco fecal y el agente etiológico, la facilidad de este estudio y su rapidez permitirían al médico iniciar el tratamiento en forma inmediata por lo que es necesario, montar esta técnica y comparar el número de leucocitos (PMN) por campo y el agente etiológico, aislado de la muestra de diarrea.

Otro agente etiológico importante de diarrea con sangre es Campylobacter sp y en el laboratorio clínico es difícil reconocer sus colonias en medios sólidos, algunos estudios han reportado que el medio semisólido es mejor, por lo que es necesario probar y comparar estos medios para posteriormente recomendar el uso de uno de estos para el trabajo de rutina en los laboratorios de bacteriología (23).

**OBJETIVOS**

- 1.- Conocer la frecuencia y distribución de los diferentes enteropatógenos asociados a Diarrea Aguda con Sangre y Disentería.
- 2.- Correlacionar la presencia de leucocitos PMN, en el examen microscópico directo de moco fecal con el agente etiológico aislado.
- 3.- Comparar el porcentaje de aislamiento de Campylobacter sp en los medios S.S.M. y Campy-BAP sembrados directamente de heces y a partir del medio de transporte (Tioglicolato al 0.4% de agar).

### HIPOTESIS

- 1.- Que en los casos de diarrea aguda con sangre alendidos en los centros de salud, el patógeno más frecuentemente aislado será Shigella sp, menos casos estarán relacionados a E. histolytica y en los casos restantes se aislarán otros enteropatógenos.
- 2.- Que la presencia de 50 ó más leucocitos PMN por campo en el moco fecal se relaciona con el aislamiento de Shigella sp en un alto porcentaje de los casos, mientras que menos de 50 leucocitos PMN por campo nos indicará que el agente etiológico será otro enteropatógeno.
- 3.- El porcentaje de aislamiento para Campylobacter sp es mayor con el Medio Semisólido de movilidad selectiva libre de sangre (SSM) que el obtenido con el medio Campy-BAP.

## MATERIAL Y METODO

### **Población estudiada:**

Los casos fueron colectados en 18 unidades de atención médica de primer nivel del I.M.S.S. y Centros de Salud, localizados en la Delegación de Coyoacán en la Ciudad de México y el procesamiento de las muestras se realizó en la Unidad de Investigación Clínica en Enfermedades Infecciosas y Parasitarias del I.M.S.S.

### **Diseño:**

Se realizó un estudio prolectivo, observacional y transversal de 140 muestras de heces diarreicas con sangre.

### **Criterios de inclusión:**

Pacientes menores de 15 años de edad, con diarrea aguda con sangre o disentería sin importar sexo, en niños que presentaron menos de 7 días de evolución y sin previo tratamiento antimicrobiano durante los últimos 15 días. Todos los datos personales y de laboratorio fueron recabados en un cuestionario especialmente diseñado para ello (Figura 3.)

### **1.- Material para el coprocultivo:**

#### **a) Medios de Transporte:**

Stuart (Merck) y Tioglicolato al 0.4% de agar (Merck, USA).

#### **b) Caldos de enriquecimiento:**

Caldo base de Yersinia enriquecido (Merck USA).

Caldo Selenito de Sodio (Bioxon, USA).

#### **c) Medios de Aislamiento:**

Agar: Soya tripticaseína (TSA, Bioxon, USA), Mac conkey (Difco, USA), Mac Conkey-Telurito (Difco) (55), Base de

yersinia (Merck, USA), Salmonella-Shigella (SS, Bioxon - USA), Verde Brillante (Bioxon, USA), Campy-Bap (Bioxon) (48) y S.S.M. (medio semisólido de movilidad selectiva - libre de sangre, Bioxon) (23).

d) Bioquímicas:

Agar de Hierro Kliger (KIA, Bioxon, USA), Agar Citrato de Simmons (Merck, USA), Agar Fenilalanina (Bioxon), Medio MIO (Bioxon), Caldo Lisina descarboxilasa (Difco, USA), Caldo Urea (Difco), Caldo Malonato (Difco), Caldo MR-VP (Bioxon), Medio basal OF (de Hugh y Leifson, Difco), Agar Esculina modificado (Difco), Caldo BHI con NaCl al 6% y 10% (Merck).

e) Reactivos: (45)

Kovacs, Cloruro Férrico acidificado, Rojo de Metilo, Monoclorhidrato de N,N-dimetil-p-fenilen-diamino, Peroxido de hidrógeno.

f) Equipo:

Jarra Gas-Pak, Estufa bacteriológica, Microscopio de contraste de fases.

2.- Serotipificación de Shigella sp y Salmonella sp

a) Antisueros para Shigella (BACTO)

Antisero polivalente de *Shigella dysenteriae* (grupo A)  
 Antisero polivalente de *Shigella flexneri* (grupo B)  
 Antisero polivalente de *Shigella boydii* (grupo C)  
 Antisero polivalente de *Shigella sonnei* (grupo D)

Antisero de *Shigella dysenteriae* del serotipo 1 al 7

Antisuero de *Shigella flexneri* del serotipo 1 al 6.

Antisuero de *Shigella boydii* del serotipo 1 al 15.

b) Antisueros para Salmonella (BACTO)

Antisuero polivalente de Salmonella O de los grupos A hasta la E.

Antisuero polivalente de Salmonella H de los grupos A a la E.

3.- Material para detectar E. coli citotóxica

Cepas Controles:

Escherichia coli K12 (control negativo)

E. coli 933J (positivo para Shiga-like 1)

E. coli 933W (positivo para Shiga-like 2)

E. coli 0157: H7 (positivo para Shiga-like)

Toxinas Controles:

Toxina de cólera purificada (obtenida comercialmente de los laboratorios List, California, USA).

Toxina B de Clostridium difficile (obtenida por la técnica del Dr. Torres) (62).

Líneas celulares en cultivo de tejidos:

Células CHO (Células de ovario de hamster chino).

Células Vero (Células de riñón de mono verde africano).

Células HT-29 (Células de carcinoma de colon humano).

4.- Tinción de Tricromo de Gomori modificado por Wheatley para determinación de parásitos. (2).



- a) Conservación de la muestra:  
Fijador de alcohol polivinílico (PVA).
- b) Soluciones para la tinción:  
Colorante de Tricromo, alcohol acidificado, solución de yodo D'Antoni.
- c) Equipo:  
Microscopio Óptico.

5.- Leucocitos Fecales: (65)

- a) Tinción:  
Metanol, colorante de Giemsa.
- b) Equipo:  
Microscopio Óptico.

Metodología:

- 1.- Durante la consulta externa los casos fueron detectados por una enfermera especialista a través de un cuestionario para conocer la historia de la diarrea con sangre, confirmándose su inclusión por observación directa de las características de las heces.

A la semana se le aplicó otro cuestionario al hacerle seguimiento de vivienda para registrar la evolución de la enfermedad.

- 2.- Se le tomó una muestra de heces recién emitida, que fue procesada en forma inicial colocando un hisopo de algodón con muestra en los medios de transporte (Stuart y Tioglicolato al 0.4% de agar), así como la inoculación en el medio de premoistamiento Mac Conkey Telurito (55).

Por otra parte se tomó una muestra de heces de cada paciente, con cucharilla de vidrio colocándola en un vial con alcohol polivinílico PVA para la preservación de los trofozoitos de Entamoeba histolytica (un volumen de heces x tres volúmenes de PVA). Otra fracción de la muestra fue extendida en un portaobjetos en ese momento para la detección de leucocitos en el moco fecal.

Posteriormente fue trasladado al mismo día al laboratorio, en el cual se procedió a realizar el coprocultivo, como se indica a continuación (Ver figura 4).

### 3.- Coprocultivo:

#### a) Salmonella sp y Shigella sp

**Aislamiento:** Se sembró la muestra proveniente del medio de Stuart en los medios de primoincubación agar Mac Conkey y agar tripticaseína soya (TSA). Las placas se estiraron para su aislamiento junto con la Placa de Mac Conkey telurito anteriormente inoculada, incubándose a 37°C durante 24 horas, y seleccionándose las colonias lactosa negativa (40,65).

**Enriquecimiento y subcultivo:** Partiendo del hisopo proveniente del medio de Stuart se pasó la muestra a caldo selenito de sodio, incubándose a 37°C por un período de 18 a 24 horas, realizándose subcultivo posterior en agar Salmonella-Shigella (SS), y agar Verde Brillante (VB).

**Identificación bioquímica:** Las colonias lactosa negativas se inocularon en una batería de pruebas bioquímicas conformadas por: KIA, agar citrato de Simmons, agar fenilalanina, caldo lisina descarboxilasa, medio MIO, caldo MR-VP, caldo urea y caldo malonato. Estos medios ya inoculados se incubaron a 37°C, realizándose la lectura a las 24 horas (38,45), los resultados fueron comparados con el comportamiento bioquí

mico de Salmonella sp y Shigella sp presentado en tablas (40).

Identificación serológica: La identificación final de cepas de Salmonella sp y Shigella sp se realizó mediante tipificación serológica, con el uso de antisueros específicos (40, 45).

#### b) Aeromonas hydrophila

Aislamiento: Se llevó a cabo mediante el hisopo del medio de Stuart sembrado en placas de TSA, incubándolas a 37°C durante 24 horas. La selección de las colonias sospechosas - fue mediante el siguiente criterio: a partir del medio de TSA las colonias que resultaron positivas para la prueba de citocromo oxidasa se les procedió a realizar identificación bioquímica.

Identificación bioquímica: A las colonias citocromo oxidasa positiva, se les inoculó en los siguientes medios diferenciales: agar KIA, agar citrato de Simmons, agar fenilalanina, caldo lisina descarboxilasa, MIO, caldo MR-VP, caldo urea, - caldo malonato, caldo BHI con NaCl al 6% y 10%, medio OF con glucosa al 1%, agar esculina modificado; asimismo, se sembró en los medios TSA, Mac Conkey, SS a 4, 37 y 42°C. Estos medios ya inoculados se incubaron a 37°C, realizándose la lectura a las 24 horas, los resultados fueron comparados con el comportamiento reportado en tablas para Aeromonas sp (25).

#### c) Yersinia enterocolitica

Aislamiento: La muestra fue inoculada en el momento que fue captado el paciente, en tubos con caldo Yersinia enriquecido, el cultivo se dejó para su enriquecimiento a 4°C durante 7 días, subcultivándose en placas de agar Yersinia, SS y Mac Conkey. Las placas se incubaron a 25°C durante 5 días, selec

cionando las colonias puntiformes lactosa negativa (65).

#### Identificación bioquímica:

Se utilizó la bacteria de pruebas bioquímicas descrita para especies de Salmonella y Shigella. El medio MIO, caldo urea y caldo MR-VP se inocularon por duplicado, los medios se incubaron a 37°C durante 24 horas, los duplicados se incubaron a 25°C durante 24 horas (40, 65).

#### d) Campylobacter sp

**Aislamiento:** Se sembró tanto de manera directa como del medio de Tioglicolato en los medios de Campy BAP y SSM, las placas se incubaron a 42°C, durante 48 horas colocándose en jarras Gas-Pak en una atmósfera de microaerofilia, la cual se alcanzó al encender una vela blanca pequeña (consiguiéndose una atmósfera de 17 a 19% de O<sub>2</sub> y 2 a 3% de CO<sub>2</sub>). La selección de las colonias sospechosas se realizó en base a su morfología: colonias planas extendidas, de apariencia acuosa y de bordes irregulares o bien, colonias redondas, convexas y con bordes enteros.

**Identificación:** Las colonias consideradas como sospechosas, se observaron al microscopio de contraste de fases, mediante la realización de una preparación en fresco, para la observación de la morfología bacteriana y el movimiento característico en forma de saca corchos o lineal rápido con la utilización de microscopio. En caso de duda se realizó una segunda preparación la cual se tiñó con solución acuosa de fucsina - básica al 1%, observándose al microscopio con el objetivo de inmersión en busca de bacterias con morfología semejante a las de gaviota, S, o de varilla curvada. Posteriormente, se les realizó la prueba de citocromo oxidasa, catalasa y capacidad de hidrólisis de hipurato (48,65).

e) Escherichia coli

Aislamiento: De la muestra sembrada en los medios de primario aislamiento Mac Conkey y Mac Conkey telurito para el aislamiento Shigella sp y Salmonella sp, se seleccionaron 5 colonias lactosa positivas de acuerdo a las características morfológicas de Escherichia coli: (38) forman colonias de un rojo intenso con difusión del pigmento en el agar circundante.

Identificación: Se inocularon en una bacteria de pruebas bioquímicas como las descritas para Salmonella y Shigella, incubándose a 37°C por 24 horas, los resultados se compararon con el comportamiento bioquímico presentado en tablas (38).

4.- Producción de Citotoxinas por cepas E. coli

Cinco cepas de E. coli se seleccionaron por muestra, se sembraron en 3ml de caldo soya tripticaseína (TSB), incubándose 4 horas, con a gitación a 37°C. De este cultivo se tomó 0.1 ml para inocular un segundo tubo con 3ml del mismo caldo, - dejándose 18 horas, con agitación a 37°C. Después de este tiempo se obtuvo el sobrenadante libre de células centrifugando a 10,000 revoluciones por minuto a 4°C durante 30 minutos, el sobrenadante se filtró a través de una membrana de 0.45 um de diámetro, del sobrenadante obtenido se inoculó 20 ul por pozo en microplacas de 96 pozos en donde habían crecido las células en cultivo, una con células CHO y otra con células VERO. Se empleó como control negativo una cepa de E. coli K12 y como controles positivos las cepas E. coli 933J - ( productora de citotoxina tipo Shiga 1 ), E. coli 933W (productora de citotoxina Tipo Shiga 2) y una cepa de E. coli 0157:H7 (productora de citotoxinas tipo Shiga 1 y 2). Se usó además, toxina de Vibrio cholerae purificada para control de elongación de células CHO y toxina B de Clostridium difficile

para control de redondamiento de células CHO y VERO. Las microplicatas se incubaron en una atmósfera de  $\text{CO}_2$  al 5% a  $37^\circ\text{C}$ , observándose el efecto citotóxico a las 24 y 48 horas, buscando alteraciones morfológicas como: redondamiento, elongación o lisis. Se consideró como efecto citotóxico positivo cuando se observó alteración morfológica en más del 50% de la población celular, comparado con un control negativo sin sobrenadante.

#### 5.- Tinción de Tricromo Gomori modificado por Wheatley (2).

Para determinación de parásitos (*Entamoeba histolytica*). Para la observación de frotos al microscopio para la detección de parásitos, se realizó la siguiente técnica de tinción. La técnica que se realizó para la observación de frotos al microscopio fue la siguiente: los frotos se realizaron con la suspensión de materia fecal de PVA, dejándolos secar por 24 horas.

Después se colocaron en la solución de trabajo D'Antoni por 3-5 minutos, posteriormente se les dió dos cambios de alcohol al 70% por 2-5 minutos por cambio, al terminar este paso se guardaron los frotos toda la noche antes de continuar.

Se colocaron los frotos en el colorante de tricromo de 8 a 10 minutos, eliminando el exceso de colorante con papel absorbente e introduciendo los frotos en alcohol acidificado de 2 a 3 segundos.

Luego se pasaron los frotos por alcohol al 95%, absorbiendo el líquido colorido en papel.

Posteriormente, se sumergieron los frotos en dos cambios de etanol al 100%. Eliminando el líquido, y colocando los frotos en dos cambios de etanol al 100%, de 2 a 5 minutos por cambio.

Finalmente, los frotos se les dió dos cambios de Xilol de 2 a 5 minutos por cambio, fijándolos con resina y cubreobjetos.

#### 6.- Leucocitos fecales: Tinción Giemsa (61)

El frote hecho se dejó secar, fijándolo con alcohol metílico por 1 minuto.

Dejar secar. Para la tinción se cubrió la preparación con Giemsa diluido 1.5. Dejando actuar el colorante por 30 minutos. Se lavó en agua y se dejó secar. La preparación se observó con objetivo 10x, ubicando las zonas que presentaron leucocitos, posteriormente se cambió al objetivo 40x y se registraron las células claramente identificadas como mononucleares o polimorfonucleares.

De 20 - 50 campos se leyeron, lo suficiente para obtener una lectura representativa de la cantidad de leucocitos en el frote.

Los rangos encontrados se compararon en las distintas infecciones:

Shigelosis > 50 leucocitos PMN/campo objetivo seco fuerte, grupos de leucocitos macrófagos y eritrocitos.

Salmonelosis < 20 leucocitos PMN/campo objetivo seco y fiebre fuerte.  
tifoidea.

Cólera

Diarrea viral 2 - 5 leucocitos

E. coli entero  
toxigénica.

En E. coli Leucocitos degenerados  
 Invasiva y  
 disinteria  
 ambiana.

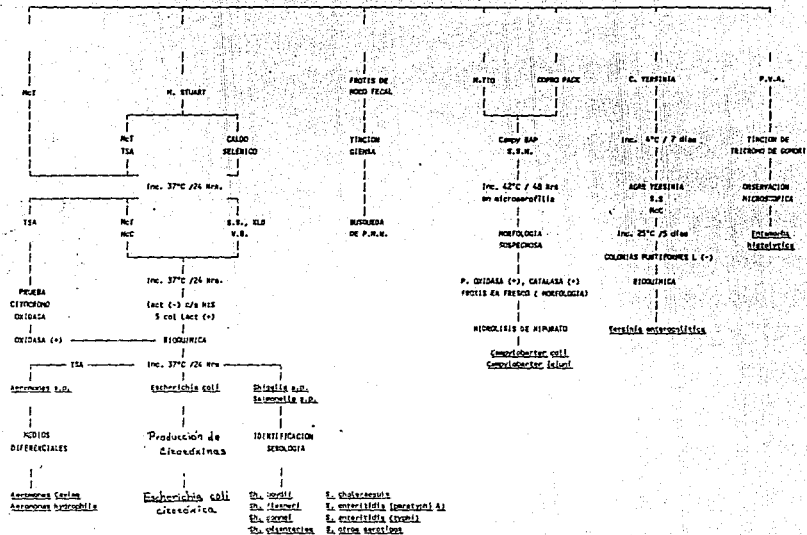
Para simplificar el registro de resultados se utilizó la siguiente escala.

$\geq$	50	leucocitos / campo objetivo 40 x			+++
10	< 50	"	"	"	++
2	- 9	"	"	"	+
0	- 1	"	"	"	-



DATOS PERSONALES																																																																																																																																																																																																																																																
NOMBRE _____								[ ] [ ] [ ] [ ] [ ] [ ]																																																																																																																																																																																																																																								
SEXO <input type="checkbox"/> M <input type="checkbox"/> F		EDAD [ ] [ ] A		FECHA DE MUESTREO [ ] [ ] [ ] [ ] [ ] [ ]																																																																																																																																																																																																																																												
ESTUDIO BACTERIOLOGICO					MUESTRA EN LABORATORIO																																																																																																																																																																																																																																											
<b>Escherichia coli</b>					RECIBIO _____																																																																																																																																																																																																																																											
<table border="1"> <thead> <tr> <th>GRUPO</th> <th>AGLUTINACION</th> <th>INDOL</th> <th>TRYPH</th> <th>TRYPH</th> <th>TRYPH</th> <th>TRYPH</th> <th>TRYPH</th> <th>TRYPH</th> <th>TRYPH</th> <th>TRYPH</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>1</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> </tr> <tr> <td>2</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> </tr> <tr> <td>3</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> </tr> <tr> <td>4</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> </tr> <tr> <td>5</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> </tr> <tr> <td>6</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> </tr> <tr> <td>7</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> </tr> <tr> <td>8</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> </tr> <tr> <td>9</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> </tr> <tr> <td>10</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> </tr> </tbody> </table>					GRUPO	AGLUTINACION	INDOL	TRYPH	TRYPH	TRYPH	TRYPH	TRYPH	TRYPH	TRYPH	TRYPH	1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	7	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	8	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	9	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	10	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	<input type="checkbox"/> LIQUIDA <input type="checkbox"/> SEMILIQUIDA <input type="checkbox"/> MOJO <input type="checkbox"/> SANGRE																																																																																																																		
GRUPO	AGLUTINACION	INDOL	TRYPH	TRYPH	TRYPH	TRYPH	TRYPH	TRYPH	TRYPH	TRYPH																																																																																																																																																																																																																																						
1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+																																																																																																																																																																																																																																						
2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+																																																																																																																																																																																																																																						
3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+																																																																																																																																																																																																																																						
4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+																																																																																																																																																																																																																																						
5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+																																																																																																																																																																																																																																						
6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+																																																																																																																																																																																																																																						
7	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+																																																																																																																																																																																																																																						
8	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+																																																																																																																																																																																																																																						
9	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+																																																																																																																																																																																																																																						
10	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+																																																																																																																																																																																																																																						
<table border="1"> <thead> <tr> <th>GRUPO</th> <th>AGLUTINACION</th> <th>INDOL</th> <th>TRYPH</th> <th>TRYPH</th> <th>TRYPH</th> <th>TRYPH</th> <th>TRYPH</th> <th>TRYPH</th> <th>TRYPH</th> <th>TRYPH</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>11</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> </tr> <tr> <td>12</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> </tr> <tr> <td>13</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> </tr> <tr> <td>14</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> </tr> <tr> <td>15</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> </tr> <tr> <td>16</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> </tr> <tr> <td>17</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> </tr> <tr> <td>18</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> </tr> <tr> <td>19</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> </tr> <tr> <td>20</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> </tr> </tbody> </table>					GRUPO	AGLUTINACION	INDOL	TRYPH	TRYPH	TRYPH	TRYPH	TRYPH	TRYPH	TRYPH	TRYPH	11	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	12	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	13	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	14	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	15	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	16	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	17	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	18	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	19	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	20	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	FECHA DE RECEPCION [ ] [ ] [ ] [ ] [ ] [ ]																																																																																																																		
GRUPO	AGLUTINACION	INDOL	TRYPH	TRYPH	TRYPH	TRYPH	TRYPH	TRYPH	TRYPH	TRYPH																																																																																																																																																																																																																																						
11	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+																																																																																																																																																																																																																																						
12	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+																																																																																																																																																																																																																																						
13	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+																																																																																																																																																																																																																																						
14	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+																																																																																																																																																																																																																																						
15	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+																																																																																																																																																																																																																																						
16	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+																																																																																																																																																																																																																																						
17	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+																																																																																																																																																																																																																																						
18	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+																																																																																																																																																																																																																																						
19	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+																																																																																																																																																																																																																																						
20	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+																																																																																																																																																																																																																																						
<b>Patógenos fermentadores lactosa(-)</b>					<b>PATOGENOS ENCONTRADOS</b>																																																																																																																																																																																																																																											
<table border="1"> <thead> <tr> <th>GRUPO</th> <th>AGLUTINACION</th> <th>INDOL</th> <th>TRYPH</th> <th>TRYPH</th> <th>TRYPH</th> <th>TRYPH</th> <th>TRYPH</th> <th>TRYPH</th> <th>TRYPH</th> <th>TRYPH</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>1</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> </tr> <tr> <td>2</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> </tr> <tr> <td>3</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> </tr> <tr> <td>4</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> </tr> <tr> <td>5</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> </tr> <tr> <td>6</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> </tr> <tr> <td>7</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> </tr> <tr> <td>8</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> </tr> <tr> <td>9</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> </tr> <tr> <td>10</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> </tr> <tr> <td>11</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> </tr> <tr> <td>12</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> </tr> <tr> <td>13</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> </tr> <tr> <td>14</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> </tr> <tr> <td>15</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> </tr> <tr> <td>16</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> </tr> <tr> <td>17</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> </tr> <tr> <td>18</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> </tr> <tr> <td>19</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> </tr> <tr> <td>20</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> </tr> </tbody> </table>					GRUPO	AGLUTINACION	INDOL	TRYPH	TRYPH	TRYPH	TRYPH	TRYPH	TRYPH	TRYPH	TRYPH	1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	7	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	8	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	9	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	10	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	11	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	12	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	13	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	14	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	15	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	16	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	17	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	18	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	19	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	20	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	<input type="checkbox"/> ETEC LT+ 1 2 3 4 5 <input type="checkbox"/> ETEC LT+ 1 2 3 4 5 <input type="checkbox"/> Salmonella _____ <input type="checkbox"/> Shigella _____ <input type="checkbox"/> Yersinia _____ <input type="checkbox"/> Campylobacter _____ <input type="checkbox"/> Aeromonias _____ <input type="checkbox"/> Adenovirus _____ <input type="checkbox"/> Rotavirus _____				
GRUPO	AGLUTINACION	INDOL	TRYPH	TRYPH	TRYPH	TRYPH	TRYPH	TRYPH	TRYPH	TRYPH																																																																																																																																																																																																																																						
1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+																																																																																																																																																																																																																																						
2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+																																																																																																																																																																																																																																						
3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+																																																																																																																																																																																																																																						
4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+																																																																																																																																																																																																																																						
5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+																																																																																																																																																																																																																																						
6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+																																																																																																																																																																																																																																						
7	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+																																																																																																																																																																																																																																						
8	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+																																																																																																																																																																																																																																						
9	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+																																																																																																																																																																																																																																						
10	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+																																																																																																																																																																																																																																						
11	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+																																																																																																																																																																																																																																						
12	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+																																																																																																																																																																																																																																						
13	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+																																																																																																																																																																																																																																						
14	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+																																																																																																																																																																																																																																						
15	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+																																																																																																																																																																																																																																						
16	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+																																																																																																																																																																																																																																						
17	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+																																																																																																																																																																																																																																						
18	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+																																																																																																																																																																																																																																						
19	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+																																																																																																																																																																																																																																						
20	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+																																																																																																																																																																																																																																						
<b>Patógenos oxidasa(+)</b>					<table border="1"> <thead> <tr> <th>GRUPO</th> <th>AGLUTINACION</th> <th>INDOL</th> <th>TRYPH</th> <th>TRYPH</th> <th>TRYPH</th> <th>TRYPH</th> <th>TRYPH</th> <th>TRYPH</th> <th>TRYPH</th> <th>TRYPH</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>1</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> </tr> <tr> <td>2</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> </tr> <tr> <td>3</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> </tr> <tr> <td>4</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> </tr> <tr> <td>5</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> </tr> <tr> <td>6</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> </tr> <tr> <td>7</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> </tr> <tr> <td>8</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> </tr> <tr> <td>9</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> </tr> <tr> <td>10</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> </tr> <tr> <td>11</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> </tr> <tr> <td>12</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> </tr> <tr> <td>13</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> </tr> <tr> <td>14</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> </tr> <tr> <td>15</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> </tr> <tr> <td>16</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> </tr> <tr> <td>17</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> </tr> <tr> <td>18</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> </tr> <tr> <td>19</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> </tr> <tr> <td>20</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> </tr> </tbody> </table>					GRUPO	AGLUTINACION	INDOL	TRYPH	TRYPH	TRYPH	TRYPH	TRYPH	TRYPH	TRYPH	TRYPH	1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	7	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	8	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	9	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	10	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	11	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	12	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	13	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	14	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	15	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	16	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	17	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	18	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	19	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	20	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
GRUPO	AGLUTINACION	INDOL	TRYPH	TRYPH	TRYPH	TRYPH	TRYPH	TRYPH	TRYPH	TRYPH																																																																																																																																																																																																																																						
1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+																																																																																																																																																																																																																																						
2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+																																																																																																																																																																																																																																						
3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+																																																																																																																																																																																																																																						
4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+																																																																																																																																																																																																																																						
5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+																																																																																																																																																																																																																																						
6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+																																																																																																																																																																																																																																						
7	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+																																																																																																																																																																																																																																						
8	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+																																																																																																																																																																																																																																						
9	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+																																																																																																																																																																																																																																						
10	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+																																																																																																																																																																																																																																						
11	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+																																																																																																																																																																																																																																						
12	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+																																																																																																																																																																																																																																						
13	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+																																																																																																																																																																																																																																						
14	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+																																																																																																																																																																																																																																						
15	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+																																																																																																																																																																																																																																						
16	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+																																																																																																																																																																																																																																						
17	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+																																																																																																																																																																																																																																						
18	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+																																																																																																																																																																																																																																						
19	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+																																																																																																																																																																																																																																						
20	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+																																																																																																																																																																																																																																						

UNIDAD MEDICA  
TOMA DE MUESTRA



### RESULTADOS

El estudio comprendió el análisis de 140 muestras de pacientes con diarrea con sangre captados en el transcurso de un año (marzo de 1990 a marzo de 1991), todos ellos, pacientes ambulatorios de consulta externa.

La distribución por edad de los pacientes fue: 52% en niños menores de un año, 36% entre 1 y 5 años y 12% mayores de 5 y menores de 15 años (Ver figura 5).

El total de enteropatógenos determinados fueron 113, lográndose identificar el agente etiológico en un 62% de los casos.

El porcentaje de identificación de los microorganismos investigados se muestran en la Tabla 1. En 29 (21%) de los pacientes, Shigella sp fue el patógeno aislado; Salmonella sp se aisló en 25 (18%) pacientes; Campylobacter sp se identificó en 28 (20%); Escherichia coli citotóxica se encontró en 12 (8%); siendo Aeromonas hydrophila identificada en sólo 3 (2%) de los pacientes; Yersinia enterocolitica no fue aislada en ningún caso.

De los 87 pacientes en los que se identificó algún enteropatógeno, se encontró infección mixta en 13 (9%) de ellos con asociación hasta de 3 microorganismos, siendo las más frecuentes Shigella sp/ Campylobacter sp y Salmonella sp/Campylobacter sp y Salmonella sp/ E. coli citotóxica (Datos no mostrados).

Trofozoítos de E. histolytica fueron detectados en 3 (2%) de los pacientes, dos de ellos presentaron infección mixta con asociación entre Salmonella sp/E. histolytica y Shigella/E. histolytica.

Considerando el número total de microorganismos identificados, se observó que no hay un predominio de alguno de los géneros, ya que se encontró frecuencias de aislamiento muy semejantes entre

Shigella sp (21%), Salmonella sp (18%) y Campylobacter sp (20%).

En cuanto a Shigella sp, en la Figura 6 se puede observar que la que se aisló con mayor frecuencia es Sh. flexneri (55%), encontrándose en mayor porcentaje el serotipo 2; seguida por Sh. sonnei (24%) y Sh. boydii (16%), siendo en esta última el serotipo más frecuente el 2.

La distribución de los gérmenes identificados con respecto a los diferentes grupos de edad, se muestra en la Figura 7. En pacientes entre uno y cinco años, el agente que se identificó con mayor frecuencia fue Shigella sp (14%), en los menores de un año -- Campylobacter sp (16%) fue el germen más frecuentemente aislado, seguido por Salmonella sp (12%).

Los microorganismos restantes no mostraron un predominio por algún grupo etáreo, aunque el número de cepas identificadas de varios de los géneros es muy escaso para poder hacer interpretaciones confiables (Datos no mostrados).

La distribución de enteropatógenos en las estaciones del año, durante el tiempo de estudio se muestra en la Figura 8, observándose que Shigella se aisló mayormente en primavera y verano, mientras que Campylobacter presentó un pico en otoño, por otra parte para Salmonella, se tuvieron porcentajes muy semejantes en las estaciones calurosas y lluviosas.

La citología de moco fecal realizada en el total de muestras, mostró que a la mayor parte de los pacientes a los que se aisló Shigella sp presentaron el mayor número de Polimorfonucleares por campo, encontrándose más de 50 células. Sin embargo, a los pacientes a los que se les aisló Salmonella sp, Campylobacter sp, E. coli citotóxica el número de PMN/campo fue desde 2 hasta 50 células (tabla 2).

Los resultados del estudio comparativo de medios de aislamiento - Campy-BAP y S.S.M., sembrados directamente y de medio de transporte Tioglicolato, para el aislamiento de Campylobacter sp se observan en la Tabla 3. Campylobacter sp, se aisló en un total de 28 (20%) pacientes, correspondiendo 21 de estos casos a Campylobacter jejuni el cual se aisló con mayor frecuencia en el medio Campy-BAP que en el medio SSM, observándose mayor número de aislamientos a partir del medio de transporte tioglicolato en ambos medios de aislamiento. Con respecto a Campylobacter coli, este presentó una frecuencia de aislamiento muy semejante en las diferentes condiciones de siembra (tabla 3).

TABLA 1. FRECUENCIA DE ENTEROPATOGENOS AISLADOS DE 140  
PACIENTES CON DIARREA CON SANGRE.

MICROORGANISMOS	NO. DE AISLAMIENTOS	( % )
<u>Shigella sp</u>	29	( 21 )
<u>Salmonella sp</u>	25	( 18 )
<u>Campylobacter sp</u>	28	( 20 )
<u>E. coli</u> citotóxica *	12	( 8 )
<u>Entamoeba histolytica</u>	3	( 2 )
<u>Aeromonas hydrophila</u>	3	( 2 )
Infecciones Mixtas**	13	( 9 )
Germen no Identificado	53	( 38 )

\* NO FUERON SEROTIPIFICADAS

\*\* ASOCIACION HASTA DE 3 MICROORGANISMOS

TABLA 2. RELACION DE LEUCOCITOS POLIMORFONUCLEARES EN  
HECES CON EL AGENTE ETIOLOGICO AISLADO.

MICROORGANISMOS	NO ( % ) AISLADOS		
	+++	++	+
<u>Shigella sp</u>	12 (9)	6 (4)	5 (4)
<u>Salmonella sp</u>	2 (1)	4 (3)	7 (5)
<u>Campylobacter sp</u>	5 (4)	6 (4)	3 (2)
<u>E. coli</u> citotóxica	3 (2)	1 (<1)	3 (2)
Germen no identificado	4 (3)	7 (5)	17 (12)

+++  $\geq$  50 PMN/campo

++ 10 < 50 PMN/Campo

+ 2 - 9 PMN/Campo

TABLA 3. FRECUENCIA DE AISLAMIENTO DE Campylobacter jejuni  
 Y Campylobacter coli EN LOS MEDIOS SSM Y Campy-BAP.

MEDIOS	NO. (%) AISLADOS	
	<u>Campylobacter jejuni</u>	<u>Campylobacter coli</u>
Campy - BAP	12 (43)	4 (14)
Campy - BAP/Tioglicolato	17 (61)	5 (18)
S.S.M.	3 (11)	4 (14)
S.S.M./Tioglicolato	7 (25)	4 (14)

28 Cepas de Campylobacter sp.



## DISTRIBUCION DE PACIENTES POR GRUPO DE EDAD

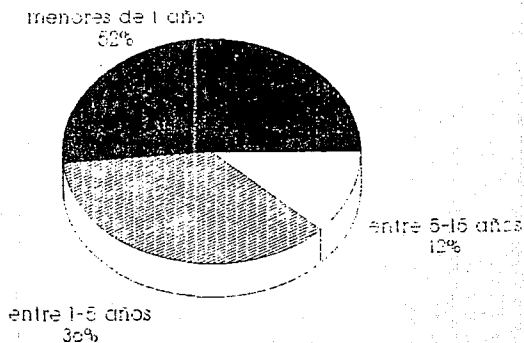


FIGURA 5

140 CASOS DE DIARREA CON SANGRE

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## SEROTIPOS DE *Shigella* sp AISLADOS DE PACIENTES CON DIARREA CON SANGRE.

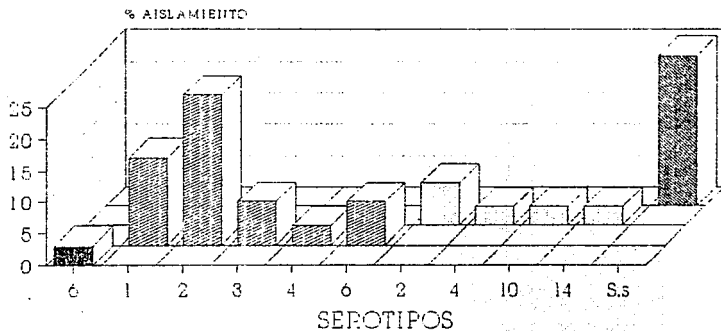






FIGURA 6

 *Shigella dysenteriae*

 *Shigella flexneri*

 *Shigella boydii*

 *Shigella sonnei*

29 CEPAS DE *Shigella* sp

## FRECUENCIA DE ENTEROPATOGENOS DE ACUERDO A LA EDAD

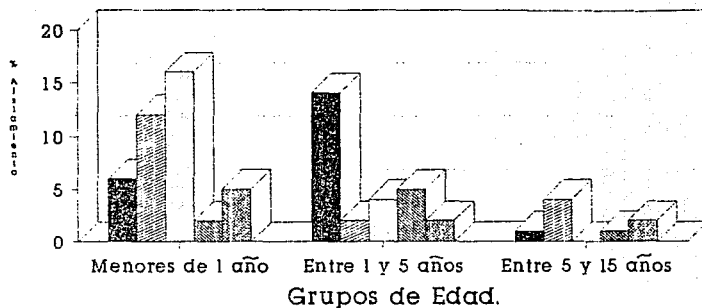


Figura 7

*Shigella* sp.
  *Salmonella* sp.
  *Campylobacter* sp.

*E. coli* citotoxica.
  Infeccion Mixta.

MUESTRA DE 140 PACIENTES

## DISTRIBUCION DE ENTEROPATOGENOS DE ACUERDO A LA EPOCA DEL AÑO.

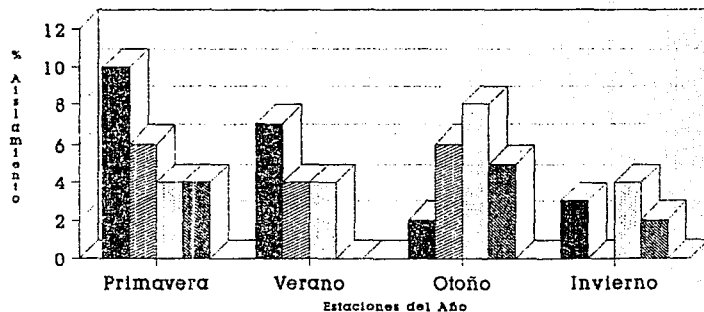


FIGURA 8

*Shigella* sp.  
 *Salmonella* sp.  
 *Campylobacter* sp.  
 *E. coli* citotóxica

113 PACIENTES DE DIARREA CON SANGRE

### DISCUSION

El grupo de 140 niños estudiados, corresponde a pacientes que asisten a una clínica y la información epidemiológica que proporcionan estos estudios es necesaria para integrar el panorama de la etiología de la diarrea aguda con sangre o disentería en nuestra población infantil.

A diferencia de otras publicaciones que han descrito que Shigella sp., se encuentra con más frecuencia (40-50%) que ningún otro patógeno invasivo que produzca estos cuadros, en nuestro estudio no hay un predominio de uno de ellos, ya que se encuentran tasas de aislamiento semejante para Shigella sp (21%), Campylobacter sp (20%) y Salmonella sp (18%) (13,19,28,35,39,60,61). Lo anterior, posiblemente se deba: 1) A la diferencia en capacidad y métodos de los laboratorios involucrados, ya que como mínimo se requiere el uso de definiciones estandarizadas y métodos de laboratorios comparables (35); 2) Por otra parte, la utilización del medio Mac Conkey - Telurito que aunque está diseñado para incrementar el aislamiento de Sh. dysenteriae y Sh. flexneri, en nuestro estudio al igual que en Africa y Bangladesh, es probable que las cepas de Shigella sean más sensibles al telurito provocando su inhibición, causando con esto una disminución en el porcentaje total de aislamiento (5,19,52); 3) Asimismo, aunque Shigella es endémica en nuestro país al igual que muchos países en desarrollo (10,13,39), es probable que el nivel de prevalencia de la disentería sea menor y la prevalencia de otros organismos enteroinvasivos sea superior, pudiendo esto ser la causa de que Campylobacter sp., presente un mayor porcentaje de aislamiento comparado con otros estudios en donde se encuentra con una frecuencia entre el 10 y 15% (13,47,61, 63,64), o posiblemente se deba a que en el esquema de aislamiento esté incluido el medio de transporte Tioglicolato, el cual conserva a Campylobacter por más tiempo, favoreciendo su aislamiento (50,65).

Con respecto a la E. coli citotóxica aunque la mayoría de casos encontrados fue en niños menores de 5 años (Figura 7) no se pueden clasificar como enteropatégenica ni como enterohemorrágica, ya que no se realizó una serotipificación ni tampoco se llevó a cabo la neutralización con anticuerpos específicos contra toxina Shiga producida por Shigella dysenteriae 1, asimismo, no se puede decir que estuvieran asociadas a la diarrea debido a que más de la mitad identificadas se encontraron mezcladas con otros microorganismos. Del resto de los microorganismos, la frecuencia de identificación fue baja, la anterior limita posibles interpretaciones, sin embargo, la información que proporciona es necesaria para integrar el panorama de la etiología. Con respecto Y. enterocolitica, fue el único germen que no se aisló en ningún caso, esto coincide con lo reportado en otros trabajos (24).

En cuanto a la baja frecuencia de identificación de Entamoeba histolytica, este hallazgo se ha repetido en otros estudios (28), ya que este parásito es una causa rara de disentería en niños siendo menor del 5% de todos los episodios (13,33).

Por otro lado con respecto a Shigella, se observó que al igual que en otros países en desarrollo Sh. flexneri es la que se aísla en mayor porcentaje (13,10,19), siendo su serotipo más frecuente el 2, esto es de importancia, ya que la mayoría de los laboratorios aíslan solamente serogrupos, esto es desafortunado y de gran importancia, ya que el futuro de las vacunas de Shigella sea probablemente específicas de serotipos.

Con respecto a la edad, los aislamientos de Shigella incrementaron con la edad, presentando un pico en niños de 1 a 5 años, en comparación con Salmonella y Campylobacter, los cuales se encontraron principalmente dentro del primer año de vida, estos resultados vienen a confirmar lo ya reportado en otros estudios (18,19,24,26).

El examen de heces para eucocitos fecales es una forma sencilla de

establecer una identificación probable del agente etiológico de la diarrea aguda infecciosa con sangre. La presencia de leucocitos PMN, relacionada con características clínicas ayuda a limitar el diagnóstico diferencial y es útil como pronóstico de los resultados del coprocultivo (7,13,19,34). Los resultados presentados apoyan esto debido a que Shigella presentó más de 50 leucocitos PMN en aproximadamente el 40% de sus aislamientos; encontrándose que la presencia de más de 50 células por campo es estadísticamente significativo para Shigella, con un valor de  $P < 0.05$ , así como, también, la presencia PMN se correlacionan con el agente etiológico aislado.

Otros autores citan (13) que la observación de heces al microscopio no es necesaria cuando la sangre es visible, sin embargo, en nuestro estudio donde sólo se captaron pacientes con diarrea con sangre, se puede observar que otros enteropatógenos presentan 50 leucocitos PMN por campo, aunque en un porcentaje muy bajo, por esta situación en algunos trabajos reportan que este examen no es específico para tener valor práctico (13,19), por lo que se recomienda que este examen sea completado con las características clínicas que presenta el paciente para poder hacer un diagnóstico presuntivo de Shigelosis.

Con respecto a Campylobacter sp, se presentó un mayor porcentaje de aislamiento en el medio Campy-BAP, tanto de heces directas como del medio de transporte Tioglicolato, en comparación con lo reportado por Goossens, en donde él encontró hasta un 95% de aislamiento en el medio S.S.M. (21,23). Sin embargo, al trabajar los datos estadísticamente no hay evidencia que indique que hay diferencias entre los medios de cultivo usados para el desarrollo de Campylobacter por lo tanto se recomienda continuar el estudio para recabar mayor información y poder entonces discriminar entre alguno de ellos.

No se realizó identificación de enteropatógenos en un grupo control, debido a que nuestro grupo ha realizado otros estudios en la misma zona, encontrándose una frecuencia del 20.4% (28).

### CONCLUSIONES

La frecuencia de identificación para Shigella sp como para Campylobacter sp y Salmonella sp, fue muy semejante destacando un aumento en la participación en la producción de diarreas con sangre o disentería por parte de Campylobacter. Para los microorganismos restantes, las diferencias no fueron significativas.

La información epidemiológica obtenida puede ser extendida o aplicable a poblaciones con características semejantes a la estudiada, ya que la prevalencia de los enteropatógenos varía de lugar a lugar. Permitiendo a los médicos familiares, tener información sobre el tipo de paciente que maneja.

El estudio citológico del moco fecal concuerda con lo publicado, encontrando que la presencia de más de 50 leucocitos PMN por campo nos indica que el agente etiológico causante del cuadro sea Shigella sp en la mayoría de los casos. Teniéndose que apoyar también en el cuadro clínico para realizar un buen diagnóstico presuntivo.

Numéricamente puede decirse que el aislamiento de Campylobacter sp, fue mejor en el medio Campy-BAP tanto de la siembra directa de heces como a partir del medio de transporte (ioglicolato). Sin embargo, estadísticamente se deben de tener más datos que los obtenidos para poder discriminar entre alguno de ellos.



## BIBLIOGRAFIA

1. Agger W.A., McCormick J.D., Gurwith M.J.: Clinical and Microbiological Features of Aeromonas hydrophila - Associated Diarrhea. J. Clin. Microbiol., 1985, 21 (6): 909-13.
2. Ash L.R., y Orihel T.C. Parasites: A guide to laboratory procedures and identification. American Society Clinical Pathologists. 1987.
3. Banwell J.G.: Pathophysiology of Diarrheal Disorders. Reviews of Infectious Diseases 1990, 12 (Suppl 1): 530-35.
4. Baron E.J., Tenover F.C.: Diagnostic Microbiology. Bailey Scott's, 8a. ed., Toronto 1990.
5. Bogaerts J., Lemmens P., Vandepitte J.: Media for Isolating Shigella. Lancet 1987, March 1:560.
6. Burke V., Gracey M., Robinson J., Peck D., Beaman J., Bundell C.: The Microbiology of Childhood Gastroenteritis: Aeromonas Species and other Infective Agents. J. Infec. Dis., 1983, 148 (68).
7. Calubiran O.V., Domenico P., Klein N.C., Cunhas B.A. Importancia de Leucocitos fecales en enfermedad infecciosa. Infecología 1990, 9:547-50.
8. Calva J.J., Ruiz-Palacios G.M., López-Vidal A.B., Ramos A. Bojalil.: Cohort study of intestinal infection with Campylobacter in México children. Lancet 1988, 1:503-06.
9. Calva J.J.: Campylobacter jejuni: reflexiones sobre la infección entérica en los niños mexicanos. Bol. Med. Hosp. Infant. Mex. 1991, 48(7):455-57.

10. Carine R., Bennish M.L., Wierzba T.: Diagnosis and Management of Dysentery by Community Health Workers. *Lancet* 1988, September 3:552-55.
11. Carrada B.T.: La amibiasis invasora como problema de salud pública. *Bol. Med. Hosp. Infant. Mex.* 1989, 46(2):139-48.
12. Claeson M., Merson M.H.: Global progress in the control of diarrheal diseases. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 1990, 9:345-55.
13. Clinical UPDATE: Shigellosis. ISSUE. 1991. March. 44.
14. Conde G.C.: Shigelosis: patogenia e inmunidad. *Revista - Infectología* 1983, 3(12):591-95.
15. Cravioto A.: Nuevos enfoques en la prevención de diarrea causada por Escherichia coli. *Bol. Med. Hosp. Infant. Mex.* 1989, 46(11):736-41.
16. Cravioto A., Vázquez V., Soria A., Navarro A., Ortíz M.: Producción de citotoxina tipo Shiga (SLT)I en ceras de Escherichia coli aisladas de niños con diarrea en una comunidad rural. *Bol. Med. Hosp. Infant. Mex.* 1988, 45(4):206-10.
17. Cravioto A., Reyes R.E., et. al.: Prospective study of diarrhoeal disease in a cohort of rural Mexican children: incidence and isolated pathogens during the first two years of life. *Epidem. Inf.* 1988, 101:123-34.
18. Daoud A.S., Zaki M., Al-Mutairi G., West P.W., Saleh Q.: Childhood shigellosis: clinical and bacteriological study. *Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 1990, 93:275-79.
19. Echeverría P., Orntipa S., Pitarangsi Ch.: Microbiology and Diagnosis of Infections with Shigella and Enteroinvasive Escherichia coli. *Reviews of Infectious Diseases* 1991, 13 (Suppl 4):S220-25.

20. Encuesta sobre morbilidad, mortalidad y tratamiento de la diarrea. Noviembre-Diciembre de 1989. Dirección General de Epidemiología Secretaría de Salud: México.
21. Endtz H.P., Ruijs G.J., et. al.: Comparison of Six Media, Including a Semisolid Agar, for the Isolation of Various Campylobacter Species from Stool Specimens. Journal of Clinical Microbiology 1991, 29(5):1007-10.
22. Evans D.G., Olarte J., DuPont H.L., et. al.: Enteropathogens associated with pediatric diarrhea in México City. The Journal Of Pediatrics 1977, 91(1):65-68.
23. Goossens H., Vlaes L., Galand I., Venden-Borre C., Butzler J.P.: Semisolid blood-free selective-motility medium. For the isolation of Campylobacters from stool specimens. J. Clin. Microbiol. 1989, 27:1077.
24. Gracey M.: Bacterial Causes of Acute and Chronic Diarrhea in Infants and Children. En Lehenthal E. (ed). Textbook of Gastroenterology and Nutrition in Infancy. 1989, Raven Press, New York pp. 1121-33.
25. Graevenitz A.V.: Aeromonas and Plesiomonas En: Lennette E. H., Belows A., Hausler Jr., W.J., Shadomy H.J., (Eds.) Manuel of Clinical Microbiology, 4a ed., Washington, D.C., E.U.A. American Society for Microbiology. 1985, pp. 278-81.
26. Guerrant R.L., Luhr J.A., Williams E.K.: Acute infectious diarrhea. I. Epidemiology, etiology and pathogenesis. Pediatric Infect. Dis. 1986, 5(3):353-59.
27. Guerrant R.L.: Microbial toxins and diarrhoeal diseases: introduction and overview. E: Evered and Whelan (eds). Microbial toxins and diarrhoeal disease. 1985, Pitman, London (Ciba Foundation Symposium 112) pp. 1-13.

28. Guiscafré H., González S., Parra R., Lemus H., Alvarez T., Guiscafré J., Muñoz O. III. Etiology and clinical picture of the cases studied. Arch. Invest. Med. (Méx.) 1988, 19:361.
29. Guiscafré H., Muñoz O., Padilla G.: Estrategias para mejorar los patrones terapéuticos utilizados en diarrea aguda, en unidades de atención médica primaria. VI. Evaluación de una estrategia dirigida a los médicos familiares para incrementar el uso de hidratación oral y disminuir el de antimicrobianos y dietas restrictivas. Arch. Invest. Med. (Méx.) 1988, 19:395.
30. Guiscafré H., Muñoz O., Gutiérrez G.: Normas para el tratamiento de la diarrea infecciosa aguda. Bol. Med. Hosp. Infant. (Méx.) 1986, 43:702.
31. Gutiérrez G., Martínez M.C.: Encuesta sobre el uso de antimicrobianos y de hidratación oral, en la diarrea infecciosa aguda en el medio rural mexicano. Boletín Mensual de Epidemiología. Sector Salud. 1986, pp. 66-71.
32. Gutiérrez G., Guiscafré H., Bronfmar M., Martínez C., Padilla G., Muñoz Onofre: Estrategias para mejorar los patrones terapéuticos utilizados en diarrea aguda en unidades de atención médica primaria. I. metodología y características de las unidades médicas y de la población estudiada.
33. Gutiérrez G.J.: Parasitosis más frecuentes I. Ambiasis. Introducción a la Pediatría, 4a. ed., México 1990, pp 320-29.
34. Harris J.C., Dupont H.L., Hornick R.B.: Fecal leukocytes in diarrheal illness. Ann. Intern. Med. 1972, 76:697-703.

35. Henry F.J.: Epidemiologic importance of Dysentery in Communities. *Reviews of Infectious Diseases* 1991, 13 (Suppl 4): S238-44.
36. Horwitz A.: Ingeniería sanitaria y ambiental, importancia de la planificación en relación con las necesidades de salud. *Bol. OP. Sanit. Panam.*, 1986, 101:193.
37. Instituto Mexicano del Seguro Social: Informe estadístico Anual 1986, Departamento de Medicina Preventiva. México 1987.
38. Kelly M.T., Brenner D.J., Farmer III J.J.: Enterobacteriaceae. En: Bennette E.H., Balow A., Hausler Jr., W.J., Shadomy H.J. (Eds.). *Manual of Clinical Microbiology*. 4a. ed., Washington, D.C., E.U.A. American Society for Microbiology. 1985, pp. 263-77.
39. Keusch G.T., Bennish M.U.: Shigellosis: recent progress, persisting problems and research issues. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 1989, S713-19.
40. Koneman E., Allen S., Dowell V., Sommers H. *Diagnóstico Microbiológico*. Panamericana. Buenos Aires, Argentina. 1985, pp. 152-256.
41. Konowalchuk J., Spiers J.J., Stavric S. Vero response to a cytotoxin of E. coli. *Infect. Immun.* 1977;18:775.
42. Kumate J., Gutiérrez G., Muñoz O., Santos J.I. *Manual de Infectología*, 12a. ed., Francisco Múndez Cervantes. México 1990.
43. Levine M.M.: Antimicrobial therapy for infectious diarrhoea. *Rev. Infect. Dis.* 1986, 8(Suppl 2):S207.

44. Levine Myron M.: Escherichia coli that Cause Diarrhea: Enterotoxigenic, Enteropathogenic, Enteroinvasive, Enterohemorrhagic, and Enteroadherent. Journal of Infectious Diseases. March 1987:377-389.
45. Mac Faddin J.F.: Pruebas bioquímicas para la identificación de Bacterias e Importancia Médica. Panamericana. Buenos Aires, Argentina.
46. Melvin DM., Healy G.R.: Intestinal and Urogenital Protozoa. En: Lennette E.H., Ballows A., Hausler Jr. W.J., Shadomy H.J. (Eds.). Manual of Clinical Microbiology. 4a. ed., Washington, D.C., E.U.A. American Society for Microbiology. 1985, pp. 631-50.
47. Morales C.M., García P.M., Pedroza J.L., D'Amico A., Palacios T.J., Muñoz O.: Frecuencia de Campylobacter fetus ss jejuni y Yersinia enterocolitica en niños con diarrea aguda. Bol. Méd. Hosp. Infant. Méx. 1984, 41(2):86-89.
48. Morris G.K., Patton C.M.: Campylobacter. En: Lennette E.H. Balows A., Hausler Jr., W.J., Shadomy H.J. (Eds.). Manual of Clinical Microbiology, 4a. ed., Washington, D.C., E.U.A. American Society for Microbiology. 1985, pp. 383-91.
49. Muñoz O., Cuello P., Seraffín F., et. al.: Gastroenteritis infecciosa aguda. Etiología y su correlación con las manifestaciones clínicas y el moco fecal. Arch. Invest. Méd. (Méx.). 1979, 10:135.
50. Murray P.R., Drew W.L., et. al.: Vibrionaceae and Campylobacter. The C.V. Mosby Company, Toronto 1990, 11:127-36.
51. Murray P.R., Drew W.L., et. al.: Enterobacteriaceae. The C.V. Mosby Company, Toronto 1990, 9:103-14.

ESTA TESIS DE DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

52. O'Brien AD, La Veck G.D, Thompson MR, Formal SB. Production of *Shigella dysenteriae* type 1-like cytotoxin by *Escherichia coli*. *J. Infect. Dis.* 1982; 146:763-769.
53. O'Brien A.D., Holmes R.K.: Shiga and Shiga-Like Toxins. *Microbiol. Rev.* 1987, 51(2):206-20.
54. Olarte J.: Etiopatogenia de las diarreas infecciosas. *Bol. Med. Hosp. Infant. (Méx.)*, 1985, 42(1):66-72.
55. Raham M.M., Murshed M.G., Sultanul K.M., y Mushi M.M.H.: Improved medium for isolating *Shigella*. *Lancet*. 1986, Feb. 1:271-72.
56. Raudín J.I.: *Entamoeba histolytica*: From Adherence to Enteropathy. *J. Infect. Dis.*, 1989, 159(3):420-29.
57. 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.
58. Síndrome Diarético, Editorial La Prensa Médica Mexicana, S. A., Primera Edición, 1987, México D.F., México.
59. Skirrow B.M.: A demographic survey of *Campylobacter*, *Salmonella* and *Shigella* infections in England. *Epidem. Inf.* 1987, 99:647-57.
60. Taylor D.N., Echeverría P., Sethabutr O., Piterangsi C., Leksonboon U., Blacklow N.R., Rowe B., Gross R., Cross J.: Clinical and microbiologic features of *Shigella* and enteroinvasive *Escherichia coli* infections detected by DNA hybridization. *J. Clin. Microbiol.* 1988, 26:3262-66.

61. Taylor D.N., Boghidetta L., and Echeverría P.: Epidemiologic Aspects of Shigellosis and other causes of Dysentery in Thailand. *Reviews of Infectious Diseases* 1991, 13 (Suppl 4):S226-30.
62. Torres J., Jennische E., Lange S., Ivannröth I.: Enterotoxins from Clostridium difficile, diarrhoeogenic potency and morphological effects in the rat intestine. *Gut*. 1990, 31: 781-85.
63. Varavithya W., Vathanophas K., Bodhidatta L.: Importance of Salmonellae and Campylobacter jejuni in the Etiology of Diarrheal Disease among Children Less Than 5 years of Age in Community in Bangkok, Thailand. *Journal of Clinical Microbiology* 1990, 28:11:2507-10.
64. Villafan H., Ordóñez R., Tello A., Hernández J.M., Villacaña R., Cravicto A.: Infección por Campylobacter jejuni en niños de una comunidad rural. *Bol. Med. Hosp. Infant. Méx.* 1991, 48(7):458-62.
65. World Health Organization publication. Manual for laboratory investigations of acute enteric infections. Geneva, Switzerland: No. WHO/CDD/83,3 Rev. 1, 1987.
66. World Health Organization publication. A Manual for the treatment of acute diarrhoea: for use by physicians and other senior health workers. Geneva. Switzerland: No. WHO/CDO/SER/80.2 Rev. 2 1990.