

80
205.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA



EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUIMICA

ESTUDIO DE PREVALENCIA DE AGENTES PATOGENOS
CAUSANTES DE DIARREA, CON ESPECIAL ATENCION EN
CAMPYLOBACTER sp. EN POBLACION INFANTIL DE LA ZONA
ORIENTE DE LA CIUDAD DE MEXICO

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICA FARMACEUTICA . BIOLOGA
P R E S E N T A :
MARIA DEL CARMEN LOPEZ SOLIS

MEXICO, D. F.,

1993

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

INDICE

	PAGINA
INTRODUCCION	1
OBJETIVOS	3
GENERALIDADES	4
<i>E.coli</i>	4
<i>E.coli</i> enterotoxigénica	7
<i>E.coli</i> enteroinvasiva	10
<i>E. coli</i> enterohemorrágica	11
<i>E. coli</i> enteroadherente	12
<i>Campylobacter</i>	12
<i>Salmonella</i>	17
<i>Shigella</i>	19
<i>Aeromonas</i>	21
<i>Plesiomonas</i>	23
<i>Giardia lamblia</i>	23
<i>Entamoeba histolytica</i>	25
Rotavirus	26
Citología de moco fecal	29
PARTE EXPERIMENTAL	
Materiales y métodos	31
Coprocultivo	31
Aislamiento y identificación de <i>Campylobacter</i>	32
Prueba de oxidasa	33
Prueba de catalasa	33
Hidrólisis de hipurato	34
Producción de Acido sulfhídrico	34
Hidrólisis de ADN	34
Identificación de Enterobacterias	35
Examen Coproparasitoscópico	37
Rotaforesis	38
RESULTADOS	41
DISCUSION	44
CONCLUSIONES	49
APENDICE 1 MEDIOS DE CULTIVO	51
APENDICE 2 REACTIVOS	64
APENDICE 3 SUEROS PARA TIPIFICACION	73
BIBLIOGRAFIA	76

INDICE DE TABLA Y FIGURAS

TABLA 1	TIPOS DE DIARREA INFECCIOSA AGUDA	4a
TABLA 2	ESQUEMA DE BIOTIFICACION PARA <i>CAMPYLOBACTER</i>	16a
TABLA 3	DATOS DE LOS NIÑOS ESTUDIADOS	31a
FIGURA 1	ESQUEMA DE TRABAJO	31b
FIGURA 2	COPROCULTIVO	31c
FIGURA 3	IDENTIFICACION DE <i>CAMPYLOBACTER</i>	32a
FIGURA 4A	IDENTIFICACION DE ENTEROBACTERIAS	37a
FIGURA 4B	IDENTIFICACION DE ENTEROBACTERIAS	37b
TABLA 4	MICROORGANISMOS AISLADOS EN PACIENTES Y CONTROLES	41a
GRAFICA 1	RECUPERACION DE MICROORGANISMOS CONSIDERADOS CAUSANTES DE DIARREA EN LOS GRUPOS DE PACIENTES Y CONTROLES	41b
TABLA 5	INFECCIONES MIXTAS	43a

INTRODUCCION

La diarrea infantil en sí, constituye un problema muy serio para los países en desarrollo por su elevada morbi-mortalidad.

Las tasas de mortalidad son de más de 200 defunciones por mil nacidos vivos registrados (1).

Se estiman 12,600 muertes cada día en niños de Asia, Africa y América Latina por enfermedades diarreicas, las cuales son causadas por virus , bacterias y parásitos (2), muchos de los cuales se han identificado en las últimas 2 décadas. Así se tiene que *Escherichia coli* enterotoxigénica y Rotavirus predominan en países en desarrollo, mientras que en países desarrollados hay mayor incidencia de *Campylobacter jejuni* , Virus Norwalk y *Clostridium difficile* .

Shigella sp , *Salmonella sp*, *Criptosporidium* y *Giardia lamblia* parecen afectar por igual a individuos de todo el mundo (2).

En la Ciudad de México, durante el año de 1990, se registraron 804 defunciones por enfermedades infecciosas intestinales (3). Estos elevados parámetros se ven favorecidos por los altos niveles de desnutrición, las prácticas de fecalismo al aire libre, el manejo inadecuado de los alimentos y la falta de servicios asistenciales (4).

En México, los problemas gastrointestinales causados por bacterias son de primera importancia y las enterobacterias, tales como *Salmonella*, *Shigella* y *E. coli* enterotoxigénica, representan la más importante causa de gastroenteritis en niños y adultos (5).

Hasta la fecha, todos los esfuerzos para el control de la diarrea

infecciosa aguda se han basado fundamentalmente en mejorar el medio ambiente donde vive el niño y en el tratamiento oportuno y adecuado del proceso clínico, para impedir que la deshidratación causada por la enfermedad lleve al niño a la muerte. Ambos enfoques requieren de una infraestructura en servicios y en personal que deberá ser necesariamente creada o mejorada en la mayoría de los países en vías de desarrollo (6).

En el otoño de 1988 se realizó un estudio de prevalencia de agentes causantes de diarrea en la zona oriente de la Ciudad de México con especial énfasis en *Campylobacter sp.*, encontrándose un porcentaje muy elevado (16.15%) . Dicho porcentaje es superior al que reportaron otros autores en estudios previos realizados en la Ciudad de México en la misma época del año (7)

Con esta inquietud se planteó analizar la prevalencia de *Campylobacter* en relación a otros microorganismos patógenos causantes de diarrea en esta misma zona oriente de la Ciudad de México, pero ahora en los meses de marzo a junio (primavera), y trabajando simultáneamente con un grupo control de niños sanos, a fin de determinar el nivel de acarreamiento de estos agentes causales.

OBJETIVOS

Analizar la prevalencia del género *Campylobacter* en relación a otros microorganismos patógenos causantes de diarrea en la zona oriente de la Cd. de México durante los meses de primavera de 1990.

Relacionar estos datos con los encontrados en el otoño de 1988 y tratar de establecer si esta zona es endémica para este microorganismo.

Comparar el porcentaje de incidencia de este microorganismo en pacientes, con la incidencia de portadores, para tratar de esclarecer el papel patógeno de *Campylobacter* en esta población.

Determinar si existen asociaciones de diferentes microorganismos en un mismo paciente.

Establecer la incidencia de cada uno de los agentes enteropatógenos en los grupos de pacientes y controles, según la edad de los niños.

Valorar la eficacia de la citología de moco fecal como una herramienta útil para el establecimiento de terapia antimicrobiana mas selectiva, al inicio del cuadro clínico.

GENERALIDADES

Los términos de enfermedad diarreica, diarrea y gastroenteritis suelen utilizarse como sinónimos, aunque para algunos la denominación de gastroenteritis da una idea más completa de cuadros de origen distinto pero que se acompañan de una sintomatología semejante. Según la O.M.S, diarrea se define como la aparición de 3 o más evacuaciones líquidas en un período de 24 horas (8), pero no es satisfactoria para recién nacidos que se alimentan exclusivamente de leche materna, y generalmente es mejor basarse en lo que la madre considera diarrea.

La diarrea infecciosa aguda puede ser de tipo inflamatorio y no inflamatorio de acuerdo a las características de la **tabla 1**.

CARACTERÍSTICAS MAS IMPORTANTES DE LOS PRINCIPALES AGENTES PATOGENOS CAUSANTES DE DIARREA.

Escherichia coli

E. coli es un miembro de la familia *Enterobacteriaceae*, Gram negativo, móvil o inmóvil, facultativo. La mayoría de las cepas son comensales que habitan o no el tracto gastrointestinal, pero algunas cepas expresan factores de virulencia que aumentan la capacidad del microorganismo para causar una gran variedad de infecciones intestinales y síndromes diarreicos entre animales de granja neonatos y humanos (9,10).

La identificación de ciertos factores de virulencia ha ayudado a

TABLA 1

TIPOS DE DIARREA INFECCIOSA AGUDA		
	I NO INFLAMATORIA	II INFLAMATORIA
MECANISMO	ENTEROTOXINAS SUPERFICIE DE ABSORCION REDUCIDA	INVASION DE LA MUCOSA CITOTOXINAS
SITIO	INTESTINO DELGADO	COLON
TIPO	ACUOSO	DISENTERICO
DIAGNOSTICO RAPIDO	NO HAY LEUCOCITOS EN MOCO FECAL	LEUCOCITOS ABUNDANTES EN MOCO FECAL.
EJEMPLOS	<i>V. cholerae</i> , Rotavirus . ECET, <i>G. lamblia</i> <i>Cryptosporidium</i>	<i>Shigella sp.</i> , <i>Campylobacter sp.</i> <i>Salmonella enterica</i> , <i>C. difficile</i> <i>E. histolytica</i> *

* *E. histolytica* lisa los polimorfonucleares por lo cual es frecuente no encontrarlos.

Tomado de: Guerrant, R.L. 1985 Microbial toxins and diarrhoeal diseases. Introduction and overview. In microbial toxins and diarrhoeal disease Ciba Foundation Symposium 112 Pitman, London .

definir mecanismos por los cuales varias cepas causan los diferentes síndromes diarreicos. Levine (11) ha descrito *E. coli* diarreagénicas y ha definido 5 grupos de acuerdo a los mecanismos de patogenicidad:

- a) *E. coli* enteropatógena (ECEP)
- b) *E. coli* enterotoxigénica (ECET)
- c) *E. coli* enteroinvasiva (ECEI)
- d) *E. coli* enterohemorrágica (ECEH)
- e) *E. coli* enteroadherente (ECEA)

La observación de que el suero de niños enfermos no aglutinaba con cepas de *E. coli* obtenidas de niños sanos y sí lo hacía con cepas aisladas del contenido duodenal de niños que habían muerto de gastroenteritis no diagnosticada (12), dieron la clave para el estudio del primer grupo de cepas que actualmente se conocen como enteropatógenas clásicas o ECEP y apoyaron el trabajo de Kauffmann, quien perfeccionó un esquema serológico para la identificación de *E. coli*, basado en la presencia de un mosaico antigénico dado por los antígenos O, H y K, del cual existen más de 64 serogrupos reconocidos para O, 60 para H y 103 para K (13). Después se determinaron otros antígenos de naturaleza proteica relacionados con la adherencia, que se denominaron K y CFA asociados a la presencia de fimbrias.

En la actualidad no se conoce con precisión el mecanismo de patogenicidad de estas cepas, aunque se han asociado a ECEP :

- a) La capacidad de adhesión a la mucosa intestinal
- b) La producción de citotoxinas.

La capacidad para adherirse al tejido epitelial ha sido uno de los

atributos de resistencia más importantes descrito en las bacterias, ya que permite la colonización del tejido en donde causa daño.

Esta adherencia a la mucosa intestinal con destrucción local de microvellosidades y formación de pedestales ha sido descrita como adhesión característica en pacientes con diarrea causada por los serotipos tradicionales de ECEP.

En 1979, Cravioto y cols describieron que el 80% de las ECEP aisladas de epidemias de cuneros, tenían la capacidad casi exclusiva de adherirse *in vitro* a células en cultivo de tejido del tipo Hep-2 (14).

Levine, en un artículo publicado en 1985, demostró que existe una relación directa entre adhesividad de ECEP a células HEp-2 y la presencia de diarrea en voluntarios humanos inoculados oralmente con estas cepas (15).

El control genético de esta capacidad adhesiva reside en los genes presentes en fragmentos extracromosómicos de ácido desoxirribonucleico denominados plásmidos, los cuales codifican para la producción de una adhesina no fimbreada que se encuentra en la parte exterior de la membrana celular de esta bacteria, por medio de la cual se adhiere a receptores específicos de la célula intestinal (15).

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

Konowalchuk y cols en 1977, encontraron que los filtrados de los cultivos de algunos serotipos de *E. coli* eran capaces de destruir las células en cultivo de riñón de mono verde africano (Vero), y que este efecto era diferente al producido por las cepas enterotoxigénicas de *E. coli* que sólo cambiaban la forma de las células (efecto citotónico) sin

destruirlas. Esta toxina denominada Vero Toxina (VT) es similar a la citotoxina neurotóxica producida por *Shigella dysenteriae* 1.

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

***E. coli* enterotoxigénica (ECET)**

En la década de los 50 se abrió una nueva línea en relación a la patogénesis de la diarrea, al descubrirse por primera vez la producción de una toxina colérica termolábil (LT) producida por cepas de *E. coli* y se empezó a hablar de *E. coli* enterotoxigénicas o ECET.

Este descubrimiento fué apoyado por De y cols en 1957 (16), quienes observaron la acumulación de fluidos en el modelo del asa ligada de conejo, practicado en igual forma que con la toxina colérica. La toxina termoestable (ST), fué descrita hasta 1970 por Smith y cols (17) en cepas aisladas de animales. Durante mucho tiempo se enmascaró la presencia de esta toxina, pues se encontraba en cultivos de *E. coli* que a su vez producían toxina LT. Las cepas aisladas de humanos productoras de ST se reconocieron hasta 1973 y se requirió de estudios cuidadosos, ya que la expresión LT+/ST+ es más común, que LT+/ST- y que LT-/ST+. Estas cepas ST pueden ocasionar brotes, el primero de los cuales fué observado por Ryder y cols en 1976 (18).

Por lo tanto, las cepas toxigénicas de *E. coli* son capaces de producir dos tipos de enterotoxinas, una termolábil (LT) y otra estable al calentamiento (ST). Una misma bacteria puede producir una o ambas enterotoxinas. La producción de enterotoxinas no es suficiente para que

una cepa ECET produzca diarrea (19), es necesaria la presencia de los factores de colonización (CFA).

Enterotoxina LT (termolábil)

La toxina LT es una proteína con un peso molecular de aproximadamente 90,000 daltones, es destruida a 60° C , su molécula comprende dos subunidades, A y B, unidas en forma covalente (20).

La subunidad A representa la parte biológicamente activa de la molécula, está formada por A1 y A2, mientras que la subunidad B es la responsable de la fijación a las células del hospedero. Una vez excretada por la bacteria, la toxina LT se fija al gangliósido GM1 de las células del epitelio intestinal por medio de la subunidad B. Esta rompe el puente disulfuro que mantiene unidas a A1 de peso molecular 22,000 daltones y A2 de peso molecular 5,500 daltones y A2 toma destino desconocido dentro de la célula, en tanto que A1, por medio de su acción enzimática ADP ribosilante, activa a la adenilciclase localizada en la superficie interna de la membrana celular. La activación de la adenilciclase da como resultado grandes cantidades de AMP cíclico; éste, en concentraciones elevadas dentro de la célula epitelial ocasiona alteraciones graves en el sistema de transporte de electrolitos y como consecuencia, en las células hay una secreción aumentada de sodio y, por lo tanto, de agua y cloro; a nivel de las criptas celulares hay un bloqueo de absorción de cloro y sodio por el enterocito maduro, lo que ocasiona que salga agua por ósmosis (20).

Fué demostrado recientemente que la enterotoxina colérica es fijada selectivamente a sitios del gangliósido GM1 de la mucosa intestinal de cobayos, la enterotoxina LT es fijada tanto a ese gangliósido como a

receptores de una glicoproteína para la cual la enterotoxina colérica no tiene afinidad (21). Sin embargo, la fijación de la toxina LT es reversible lo cual explica que la enfermedad sea menos grave.

Enterotoxina ST (termoestable)

Es un péptido de bajo peso molecular 2,000 daltones, es estable al calor moderado (60° C y se inactiva en 30 minutos a 100° C), no es antigénica y es diferente a la LT tanto en su estructura como en sus funciones (22).

La ST se fija a receptores aparentemente diferentes a los de la LT, e induce la secreción por la activación de guanidil ciclase, que aumenta el acúmulo intracelular de GMP cíclico, el cual altera las funciones de membrana del enterocito ocasionando una secreción neta (23,24).

Hasta el momento se han descrito 2 clases de toxina ST antigénicamente distintas (25).

- a) ST1, soluble en metanol y se detecta por la acumulación de fluidos en intestino de ratón lactante.
- b) ST2, insoluble en metanol y cuya actividad se ensaya en asa ligada de yeyuno de cerdo de 7 a 9 meses.

Solamente ST1 se ha encontrado en cepas ECET aisladas de casos de diarrea en humanos (24), ST2 se ha encontrado en cerdos.

Los factores de colonización (CFA) son básicamente los responsables de la patogenicidad de ECET (26,27), por su carácter proteico son capaces de producir una respuesta inmune local y sistémica en el hospedero. Esta misma propiedad permite la elaboración de sueros específicos contra estos factores, lo que permite su detección e identificación serológica en el laboratorio (19). También puede ser

demostrada la presencia de estos factores por microscopía electrónica o hemaglutinación manosa-resistente (HAMR) (19,28).

La información genética para la producción de estas fimbrias se localiza en plásmidos y puede ser transferida de una bacteria a otra por el proceso de conjugación bacteriana (19).

En las cepas de origen humano, las estructuras fimbriadas llamadas CFA, se dividen en CFA/I, CFA/II, CFA/III y CFA/IV (antes llamada E-8775) (26).

***E. coli* enteroinvasiva (ECEI)**

Las cepas *E. coli* enteroinvasivas (ECEI) se empezaron a describir cuando se aplicó el modelo de inoculación en la conjuntiva de cobayo, observándose una queratoconjuntivitis desarrollada por la penetración de la bacteria a las células. Esta prueba fué empleada antes para *Shigella* y se conoce como prueba de Sereny desde 1957 (29). La capacidad invasiva de ECEI y de *Shigella* está codificada por un plásmido de 140 Megadaltones, que también codifica para la producción de diversas proteínas de membrana externa involucradas en la invasividad, estas proteínas están muy relacionadas antigénicamente en ECEI y *Shigella*, sus antígenos O también presentan reacción cruzada (12).

La interacción entre microorganismos y receptores específicos en la célula epitelial del intestino grueso está en estudio.

Las cepas de ECEI no tienen flagelos, actúan penetrando la mucosa intestinal, multiplicándose en el tejido y produciendo reacción inflamatoria. Provocan ulceraciones en la mucosa con el consiguiente efecto de salida de líquido y electrolitos (30).

El ataque de los microorganismos es en la base de las

microvellosidades donde penetran a las células epiteliales intestinales. La penetración se efectúa por englobamiento formándose un fagosoma, así *E. coli* es fagocitada por neutrófilos y monocitos de la lámina propia.

***E. coli* enterohemorrágica (ECEH)**

En 1982, Riley y col (31) descubrieron una cepa de *E. coli* del serotipo O157:H7 asociada a un cuadro diarreico hemorrágico. O'Brien y cols (1982) trabajaron con extractos bacterianos de esta cepa obtenidos de células lisadas por sonicación, y observaron que éstos presentaban actividad enterotóxica en asa ligada de conejo y eran neurotóxicos para ratón; además, en cultivo de células HeLa, se producía inhibición de la síntesis de proteínas, de igual forma que con la toxina de *Shigella dysenteriae*, por lo que se llamó a esta citotoxina semejante a Shiga (Shiga like) (32,22).

La toxina semejante a Shiga o SL, se produce en medio Syncase al cual se le elimina el hierro mediante tratamiento con una resina de intercambio iónico (Chelex 100); ésta toxina no se produce en los sobrenadantes, ni en cultivo en caldo soya tripticasa, (33). Al medir la producción de citotoxina SL en diferentes cepas, se observó que ésta se producía en concentraciones variables, determinándose los títulos por neutralización con anticuerpos antitoxina de *Shigella dysenteriae* tipo 1 cepa 60R, la cepa *E. coli* O26:H11 conocida como H30, dió uno de los títulos más altos (22).

ECEH como agente causal de la colitis hemorrágica quedó perfectamente establecido en 1982, en que se informó de dos brotes, adquiridos por consumo de alimentos, principalmente carne mal cocida de restaurantes, uno en Oregon y otro en Michigan, U.S.A.; los cuadros se

caracterizaron por cólicos, diarrea abundante acompañada por leucocitos, moco y sangre; brotes similares ya habían sido descritos en Japón y Canadá (34,35). En el estudio realizado por Johnson y cols de 1978 a 1982, se demostró que 54 de 78 cepas de ECEH identificadas pertenecían al serotipo O26:H11 de *E. coli* el resto al serotipo O157:H7. Todas fueron productoras de toxina SL (34,36).

***E. coli* enteroadherente (ECEA)**

Este grupo es el más recientemente descrito y su patogenicidad se ha relacionado a su capacidad para adherirse a células del epitelio intestinal. Ensayos en células Hep-2 han permitido clasificar los diferentes tipos de adherencia en:

- a) Adherencia difusa
- b) Adherencia localizada
- c) Adherencia agregativa.

Actualmente se sabe que la adherencia está mediada por uno o varios factores de adherencia los cuales están codificados por plásmidos (11).

Campylobacter

El género *Campylobacter* ha surgido como uno de los principales patógenos entéricos humanos. Se aisló por primera vez en 1909 y se asoció con abortos en ovejas y ganado vacuno. No fue sino hasta 1947 cuando se obtuvo un cultivo *in vitro* en un medio con sangre humana (37). En 1957 Elizabeth King lo asoció con enfermedad entérica (38).

Este microorganismo se clasificó anteriormente dentro de la familia *Vibrionaceae* por su morfología, pero por su diferente composición en la

relación Guanina-Citocina y por su incapacidad de fermentar y oxidar azúcares, se ha decidido que no pertenece a esta familia. En 1973, Veron y Chatelain publicaron la primera clasificación completa de la taxonomía de este género (38).

Actualmente la clasificación del género *Campylobacter* y *Helicobacter* que se enlista en la tabla 1, está basada en la homología de la secuencia de RNAr de 16sr publicado por Thompson y colaboradores (39).

Género *Campylobacter*

1.-Campylobacterias verdaderas.

1A.- Especies termofílicas enteropatógenas.

C. jejuni subespecie *jejuni*.

C. jejuni subespecie *doylei*.

C. coli

C. upsaliensis.

C. laridis. Variante Ureasa negativa.

Variante Ureasa positiva.

1B.- Otras Campylobacterias verdaderas.

C. fetus subespecie *fetus*.

C. fetus subespecie *venerealis*.

C. hyointestinalis.

C. sputorum biovar *sputorum*.

biovar *bubulus*.

biovar *fecalis*.

C. mucosales.

C. concisus.

2.-Especies Psicrófilicas.

C. nitrofigilis.

C. cryerophila.

Género *Helicobacter* y *Campylobacterias* relacionadas

H. pylori.

H. mustelae.

C. cinaedi.

C. fennelliae.

El grupo 1 subgrupo 1A, incluye las especies de enteropatógenos termofílicos los cuales tienen la capacidad de crecer a 42° C y causar enteritis en humanos. El subgrupo 1B incluye comensales y patógenos de animales que raramente causan infecciones en humanos.

En el grupo 2 se encuentran las especies criófilicas, estos microorganismos crecen a temperaturas bajas, (temperatura óptima menor de 37° C) (40).

En el género *Campylobacter* se agrupan bacilos finos, Gram negativos curvados en espiral, de 0.2 a 0.5 μm de ancho y 0.5 a 5 μm de largo. Estos microorganismos pueden tener forma de coma, de "S", o de

ala de gaviota.

Las células pueden volverse esféricas o cocoides en especial en cultivos envejecidos. Las células son no esporuladas, móviles mediante un solo flagelo polar en uno o dos extremos y en ocasiones hay cepas inmóviles (41). Estos microorganismos son generalmente microaerofílicos y para crecer requieren una concentración de 5-10 % de O₂ y 3-10% de CO₂. Todos son oxidasa positiva.

Para su identificación se emplea la prueba de catalasa, la producción de H₂S, la reducción de nitratos, la hidrólisis del hipurato y la susceptibilidad al ácido nalidixico y a la cefalotina.

Las especies implicadas en patología entérica humana son:

Campylobacter jejuni, *Campylobacter coli* y *Campylobacter laridis*.

Las colonias son grises o incoloras, no hemolíticas, pueden ser planas, con bordes irregulares, redondas y cóncavas con bordes enteros y pueden ser puntiformes o extenderse en la caja.

Poco es lo que se sabe sobre el mecanismo de patogenicidad de *C. coli*, *C. jejuni* y *C. laridis*, varios investigadores han informado sobre la producción de una enterotoxina (42). Sin embargo, Olsvik y cols en sus estudios genéticos, no detectaron genes para la producción de toxina colérica, ni para la toxina termolábil (43).

Otro de los mecanismos de patogenicidad que se ha sugerido es la invasión epitelial donde parece que se involucra el íleo terminal y el colon, las lesiones consisten en infiltraciones inflamatorias de la lámina propia y abscesos en la cripta, lo que puede provocar presencia de sangre y leucocitos en las heces. Observaciones clínicas han mostrado que la patogénesis de *C. coli* y *C. laridis*, es semejante a la de *C. jejuni*.

La enfermedad debida a *C. jejuni* es más comúnmente

gastrointestinal, sin embargo se han reportado infecciones extraintestinales como meningitis, colesistitis o infecciones en el tracto urinario. Las complicaciones que se han asociado con la enteritis por *C. jejuni* incluye el Síndrome de Reite, artritis reactiva y el Síndrome de Guillian -Barré (44,45).

El período de incubación es variable (1 a 7 días) la diarrea es usualmente autolimitante, permaneciendo de 2 a 7 días. La excreción del microorganismo varía de dos semanas a tres meses en hospederos no tratados con antibióticos.

Se considera que la dosis infecciosa mínima de *C. jejuni* puede ir de unas 500 células bacterianas a 1,000,000 (46). Una vez vencida la barrera gástrica, *C. jejuni* necesita penetrar la capa de moco que recubre la mucosa intestinal y multiplicarse (47). Sin embargo, esta bacteria no posee fimbrias o pili que faciliten esta tarea, desconociéndose por el momento los factores específicos de adherencia que le permiten la colonización del intestino (46).

Los flagelos de *Campylobacter jejuni* están constituidos por proteínas antigénicas específicas; aparentemente representan un factor importante en la penetración y su multiplicación en el mismo (46,48).

Para la diferenciación de las especies *C. coli*, *C. laridis* y *C. jejuni* y para su biotipificación, Skirrow y Benjamín, Hert y cols (49), proponen esquemas basados en la hidrólisis del hipurato, la prueba de H₂S y la hidrólisis del ADN (tabla 2).

TABLA 2

ESQUEMA DE BIOTIFICACION PARA CAMPYLOBACTER									
biotipos	<i>Campylobacter jejuni</i>				<i>Campylobacter coli</i>		<i>Campylobacter landis</i>		
	I	II	III	IV	I	II	I	II	
PRUEBAS									
HIDROLISIS DE HIPURATO	+	+	+	+	-	-	-	-	
ACIDO SULFHIDRICO	-	-	+	+	-	-	+	+	
HIDROLISIS DEL DNA	-	+	-	+	-	+	-	+	

Salmonella

El género *Salmonella* comprende una gran variedad de especies patógenas para el hombre y/o los animales.

La gastroenteritis causada por *Salmonella* tiene especial predominio en la edad pediátrica afectando principalmente a los lactantes. La transmisión ocurre a través de la ingestión de alimentos contaminados y por medio del contacto con portadores humanos y animales domésticos.

Esta bacteria se considera dentro de los patógenos de más amplia distribución en la naturaleza. El habitat normal del género es el tracto gastrointestinal de humanos y animales pero algunas cepas de *Salmonella* viven en los tejidos (50).

Los microorganismos del género *Salmonella* son bacilos Gram negativos, facultativos, no esporulados, pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae*. Temperatura óptima de crecimiento 37° C. La dosis infectante es de 10^4 - 10^9 microorganismos viables ingeridos.

Respecto al mecanismo de penetración, se sabe que *Salmonella* invade el epitelio intestinal, adhiriéndose a las vellosidades y provocando degeneración parcial de las mismas.

Una vez que ha penetrado, el daño causado a las vellosidades se repara rápidamente, los microorganismos se multiplican y se diseminan por el epitelio intestinal, penetrando la lámina propia, lo que provoca una reacción inflamatoria aguda con infiltración de polimorfonucleares. La capacidad invasiva no lleva consigo la capacidad de producir diarrea (50,51).

En la fiebre tifoidea las lesiones características son a nivel de colon donde se presentan alteraciones en la capacidad de absorción de fluidos y electrolitos y efectos osmóticos causados por grandes cantidades de

sustancias no absorbidas. También se observa movilidad anormal del intestino (51).

Estudios realizados por Gianella demostraron que la respuesta inflamatoria que se presenta en la salmonelosis libera una cantidad considerable de prostaglandinas las cuales son capaces de activar la adenil ciclasa para que ésta, a su vez, forme AMP-cíclico que se acumula intracelularmente causando trastornos en la secreción y absorción de líquidos y electrolitos.

En el hombre se dan tres formas de salmonelosis clínicamente diferentes :

- 1.-Fiebres entéricas (Fiebres tifoidea y paratifoidea)
- 2.-Septicemia o bacteremia con o sin lesiones focales extraintestinales
- 3.-Gastroenteritis.

Los serotipos de *Salmonella* están definidos en base a su estructura antigénica y se han descrito más de 2,000 (52).

Salmonella posee diversos antígenos O y diferentes antígenos H (53), algunas especies de *Salmonella* cuentan con antígenos de envoltura (K) como el de *Salmonella typhi* conocido como antígeno Vi que se relaciona con la virulencia.

Aunque *Salmonella* se identifica inicialmente por sus características bioquímicas, las pruebas de aglutinación con sueros absorbidos de diferentes antígenos O y H constituyen la base para la clasificación serológica (53).

La fiebre entérica que por su patología resulta la más importante, es provocada por *Salmonella typhi* que por razones desconocidas produce una respuesta inflamatoria con monocitos, a diferencia del resto de las Salmonelas, los microorganismos de esta especie son transportados

a la circulación dando como resultado fiebre elevada y una reacción sistémica.

La gastroenteritis queda confinada fundamentalmente al tubo digestivo, y los síntomas empiezan tras una incubación de sólo 8 a 48 horas.

Después de padecer salmonelosis, el individuo puede convertirse en portador. En el caso de fiebre tifoidea, alrededor de un 3% de los pacientes se convierten en portadores, y continúan excretando de forma indefinida hasta 10^6 a 10^9 microorganismos por gramo de heces.

Shigella

Las especies de *Shigella* causan en el hombre disentería bacilar caracterizada por dolor abdominal, fiebre y diarrea con moco y sangre, su emisión va acompañada por espasmos rectales (tenesmo) (54). Las Shigelas son bacilos Gram negativos, facultativos inmóviles, pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae*, su temperatura óptima de crecimiento es 37°C . Diez microorganismos virulentos de *S. dysenteriae* ingeridos oralmente pueden causar disentería clásica.

Todas las especies incluidas en el género *Shigella* resultan patógenas para el hombre.

Desde el punto de vista antigénico se clasifican en cuatro especies que a su vez comprenden varios tipos (40).

Se ha demostrado que los 4 grupos de *Shigella* contienen plásmidos de 120 a 140 Megadaltones, que codifican la invasión de las células epiteliales (55,56).

La penetración a las células epiteliales e invasión de los tejidos es el principal mecanismo de patogenicidad.

Las características del lipopolisacárido de la pared del microorganismo confiere capacidad de adherencia a las células del epitelio intestinal donde se multiplican y dan lugar a lesiones ulcerativas con la consiguiente salida de líquidos, electrolitos e infiltración de polimorfonucleares y eritrocitos (diarrea mucosa sanguinolenta). No se ha observado nunca que el intestino delgado participe de la etiología patógena de *Shigella*, es a nivel de colon donde se producen todos los cambios (57,58).

Otro de los mecanismos de patogenicidad de algunas especies es la producción de enterotoxina.

En los últimos años, la toxina de *Shigella dysenteriae* se ha purificado y producido en cantidades suficientes para estudio (59).

Ahora se sabe que esta toxina se compone de dos subunidades peptídicas: A y B. La estructura de la subunidad A es semejante a la de la toxina del cólera y la toxina termolábil de *E. coli* pero no hay cruce antigénico entre ambas. Se ha demostrado que tiene capacidad de inhibir la síntesis de proteínas de células de mamíferos, actuando directamente sobre la unidad ribosomal 60s de la célula blanco. La subunidad B es responsable de la interacción de la toxina con el receptor de células por medio de un azúcar específico parecido a la lectina que hace contacto con el receptor de la toxina en la superficie de la célula (57, 60)

La toxina tipo I de *S. dysenteriae* posee también las siguientes características

- A).-Causa parálisis letal; citotoxicidad y actividad enterotóxica en animales de experimentación.
- B).-Se encuentra entre los agentes biológicos más conocidos.
- C).-Su peso molecular está entre 58,000 y 70,000 daltones.

Se ha visto que hay dos tipos de variantes antigénicas entre la familia de toxinas Shiga y tipo Shiga (61).

1.- Las toxinas que no cruzan por neutralización con un solo suero de referencia.

2.- Las toxinas que parcialmente cruzan por neutralización pero no son antigénicamente idénticas.

Aeromonas:

Se trata de microorganismos que se asocian a problemas intestinales en humanos. Son bacilos Gram negativos, facultativos, oxidasa y catalasa positiva, fermentan la glucosa.

El manual de Bergey clasifica el género *Aeromonas* en cuatro especies a (62).

A. hydrophila

A. caviae

A. sobria

A. salmonicida

Existen tres subespecies de *A. salmonicida*

sub sp. salmonicida

sub sp. achromogenes

sub sp. masoucida.

Recientemente se encontró una nueva especie acuática *A. media* no móvil, parecida a *A. salmonicida* y que no se ha encontrado en humanos.

Las infecciones con *Aeromonas spp* ocurren predominantemente durante el período de mayo a noviembre (63,64), y se pueden describir

cuatro categorías:

1.- Celulitis por exposición al agua y al sol.

2.- Diarrea aguda de corta duración que afecta primordialmente a niños menores de cinco años pero que también puede causar problemas en adultos.

3.- Septicemia.

4.- Raros casos de infecciones del tracto urinario, meningitis, peritonitis, otitis y endocarditis.

Todas las especies pueden aislarse de estas patologías (63,65).

Aeromonas generalmente son móviles por un flagelo polar y los cultivos jóvenes en medios sólidos pueden formar flagelos peritricos. *A. salmonicida* y *A. media* son especies no móviles.

La frecuencia de aislamiento de *A. hydrophila* en población sin evidencia de enfermedad gastrointestinal es de 0.2 - 3.2 % mientras que en individuos con diarrea se aísla con una frecuencia mayor al 10% (66,67,68).

El género *Aeromonas* presenta varios factores que participan como mecanismos de patogenicidad en la virulencia, como son las hemolisinas alfa y beta, citotoxinas (en cultivos celulares), enterotoxinas (probadas en asa ligada de conejo), factores de adherencia (pilis) e invasividad, demostradas en células Hela y células HEP-2, respectivamente (69,70).

Si las cepas son Voges-Proskauer positivas se puede recurrir al ensayo de las hemolisinas, ya que se sabe que en aproximadamente el 97% de estas cepas, la beta hemólisis coincide con la producción de la enterotoxina. En el caso de las cepas arabinosa negativas, pueden relacionarse con la producción de enterotoxinas en un 90 % (71,72).

Plesiomonas:

La única especie del género *Plesiomonas* hasta hoy conocida es *P. shigelloides*, que es un bacilo facultativo, que se asocia comúnmente a episodios esporádicos y epidemias raras de diarreas en humanos (73,74).

Son muy raros los casos de infecciones extraintestinales (meningitis, septicemia) por *P. shigelloides* (75,76,77)

P. shigelloides la aislaron primeramente Ferguson y Henderson (78). Este microorganismo fue descrito como una bacteria móvil, que presentaba un antígeno somático como el de *S. sonnei* en fase lisa y fue nombrado paracolón C27 (78,79).

P. shigelloides es un bacilo no esporulado, móvil, catalasa y oxidasa positiva, se encuentra en agua y en muchos animales como perros, gatos, etc (75,80).

Las cepas pueden aislarse de pacientes con diarrea en áreas tropicales y subtropicales (75,81).

El mecanismo de patogenicidad es muy parecido al de *Aeromonas* ya que los factores asociados a la virulencia que se reportan son la actividad de una toxina parecida a la de *V. cholerae* (74), una enterotoxina termoestable (78) y un plásmido (>120 MDa) el cual puede facilitar la invasión en el tracto gastrointestinal (78).

Giardia lamblia

La giardiasis causada por *G. lamblia* se reconoce como una enfermedad que se presenta en todo el mundo, particularmente en países en desarrollo (82).

G. lamblia es un protozoo flagelado cuyo ciclo biológico pasa por una fase de trofozoito y otra de quiste.

El quiste es ingerido con agua o alimentos contaminados con materia fecal. La enquistación ocurre en el duodeno y se producen dos trofozoitos por cada quiste maduro. El trofozoito con una superficie dorsal convexa y una ventral plana, tiene un disco que se fija al epitelio intestinal del duodeno y yeyuno proximal (83) donde el pH entre 6.0 y 7.0 es favorable para su crecimiento. Como trofozoito libre sigue a lo largo del intestino, luego se enquista para formar quistes lisos ovoides de pared delgada, mismos que son eliminados por las heces y constituyen la forma infectante (84).

Los trofozoitos pueden ser clasificados en tres grupos basados en criterios de morfología, *G. agilis*, *G. muris*, *G. duodenales*.

G. duodenales (incluyendo *G. lamblia*) puede ser tipificada usando análisis de isoenzimas (85,86).

Después de un período de incubación que abarca entre 6 y 22 días, puede presentarse la enfermedad clínica que se prolonga 1 a 4 semanas. La infección se presenta de forma muy variada, desde la enfermedad asintomática hasta la aguda.

La forma típica se caracteriza por el comienzo repentino de diarrea acuosa, explosiva y fétida, acompañada por notable distensión abdominal, náuseas y anorexia. También puede presentarse fiebre escasa y escalofríos, calambres epigástricos, cefalalgia y malestar. Contrariamente a lo que sucede en los casos de disentería amibiana o bacilar, rara vez hay sangre o mucosidad en las deposiciones.

La fase aguda puede prolongarse semanas y aún meses y se produce mala absorción y considerable pérdida de peso especialmente en los niños.

Entamoeba histolytica

A nivel mundial, la amibiasis está catalogada como la tercera parasitosis causante de muerte (87).

Alrededor del 10 al 20% de la población mundial se considera infectada y el 10 % de esta población presenta sintomatología y la letalidad oscila entre el 0.1 y 0.25 % (en números 500 millones de infectados, 50 millones de enfermos y entre 40 y 110 mil muertes) (87).

La amibiasis intestinal afecta y es más letal en los extremos de la vida, mientras que el absceso hepático es más frecuente en varones entre 30 y 45 años y se asocia con una alta mortalidad (88).

En México se consideran los siguientes porcentajes promedio sobre población total: 20% de portadores, 2 % enfermos y 0.1 a 0.2 % de muertes (en números : 16 millones de portadores, 1.3 millones de enfermos y 10 mil a 30 mil muertes) en base a estos datos puede afirmarse que la amibiasis se encuentra entre las primeras causas de morbimortalidad en el país (30,31) y se considera como la tercera parasitosis causante de muerte en el mundo sólo después del paludismo y la esquistosomiasis (89).

La forma infectante de *E. histolytica* es el quiste maduro tetranucleado. El hombre no es el único pero sí el principal reservorio de *E. histolytica*.

El portador sano o convaleciente, es la principal fuente de excreción de quistes infectantes patógenos. El tiempo en el que se puede ser portador varía desde meses hasta dos años. La forma básica de infección es la ingestión de quistes maduros, que se da en ambientes contaminados, mal saneados y con malos hábitos de higiene que

propician el cierre del círculo ano-mano-boca.(90)

La gravedad y la manera como se presentan las manifestaciones clínicas son variables, con frecuencia la diarrea no es intensa y los síntomas generales son relativamente leves.

El comienzo es gradual, con cólicos, fiebre y dolor abdominal. Hay evacuaciones de consistencia fluida, con sangre y moco, frecuentemente acompañada de tenesmo.

Algunas veces la amibiasis intestinal se presenta como una infección fulminante con diarrea sanguinolenta profusa, acompañada con fiebre alta, náuseas, vómito y anorexia (91,92).

ROTAVIRUS

Ha sido solamente en los últimos 13 años cuando se ha confirmado que muchas de las diarreas en niños son de origen viral. Con el descubrimiento de los virus Norwalk en 1972 y Rotavirus en 1973, se inicia una nueva era en el conocimiento de la gastroenteritis infecciosa por patógenos diferentes a los antes conocidos (93).

Los agentes virales de gastroenteritis más importantes son: Rotavirus, virus Norwalk y Adenovirus (94).

Los Rotavirus son la mayor causa de gastroenteritis viral en niños de todo el mundo (95,96). En países desarrollados es el agente más común de las diarreas en niños que ingresan a los hospitales (97), con un porcentaje de alrededor del 50 al 70 % anual, con variaciones estacionales que disminuyen en verano y aumentan en invierno.

Diversos estudios en países latinoamericanos arrojan porcentajes del 20 al 40 % para niños que acuden a hospitales. En México, D. F se tiene un porcentaje similar que también varía estacionalmente desde el

5% en verano hasta el 50% en invierno (98).

Los rotavirus son transmitidos por ruta fecal-oral y después de un período de incubación de 24 a 48 horas producen una diarrea abundante pero generalmente autocontrolada en un lapso de 4 a 7 días. Durante este tiempo, el niño enfermo excreta alrededor de diez mil millones de partículas virales por gramo de heces (94).

Las partículas virales excretadas en las heces pueden ser fácilmente observadas al microscopio electrónico sin ninguna concentración previa. Esta técnica es muy especializada y precisa, pero el costo tan elevado limita su aplicación.

En todas las especies de rotavirus la infectividad viral parece depender de la presencia de la cápside externa, la cual se pierde cuando las partículas se tratan con agentes quelantes de calcio como el EDTA y el EGTA (99).

Estudios en biopsias de niños enfermos, indican alteraciones funcionales de las células epiteliales que cubren las vellosidades del intestino delgado (100,101), por lo que la infección por Rotavirus, al parecer, está limitada a la capa de células epiteliales del intestino delgado, hay edema y acortamiento de las vellosidades e infiltración mononuclear en la lámina propia, observándose partículas virales fácilmente reconocibles en las cisternas distendidas del retículo endoplásmico rugoso (102). El transporte de sodio acoplado a glucosa se encuentra dañado y, por lo tanto, la absorción de agua está disminuida; también se encuentra dañada la absorción de la D-xilosa y en algunos pacientes se encuentran niveles bajos de disacáridos. Este mal funcionamiento se explica por el desprendimiento y aplastamiento de las células epiteliales de las vellosidades que produce un acortamiento y

desnudamiento de éstas últimas (101).

Los rotavirus están formados por cinco clases de proteínas, dos de ellas (VP3 y VP7) componen la capa externa y tienen un papel fundamental en la infección (98). Una de ellas, VP7, parece ser responsable de la adsorción del virus a la célula y además es el antígeno de neutralización; la otra, la VP3, actúa en la penetración del virus y requiere, para su funcionamiento, ser activada por un corte específico con tripsina, que da como resultado 2 polipéptidos menores, VP5 y VP6 (94). Una vez en el interior de la célula, los genes del virus, constituidos por once moléculas de ARN de doble cadena se activan, produciendo las cinco clases de proteínas que conforman el virus y otras seis que son necesarias para su replicación. Finalmente, las once moléculas de ARN y las distintas proteínas se van ensamblando en un proceso complicado y poco entendido, cargando las células de partículas virales hasta destruirlas (103).

Los once segmentos de ARN de doble cadena pueden ser separados electroforéticamente y mostrar patrones específicos de migración que permiten distinguir los subgrupos 1 y 2 al practicar la tinción de las bandas características en el gel de poliacrilamida (104). Este método llamado Rotaforesis ha resultado muy específico además de económico.

Antigénicamente, los rotavirus se pueden dividir en 2 subgrupos llamados I y II y cuatro serotipos. El subgrupo I corresponde a cepas con un electroferotipo largo y serotipos 1,3 y 4. Alrededor del 80 % de los rotavirus encontrados en México son del subgrupo II y en 60 a 70 % de los casos el serotipo encontrado ha sido el I. Estas proporciones son similares a las descritas en otros países desarrollados y no existe una

explicación clara entre la posible correlación subgrupo-electroferotipo-serotipo y virulencia (94,102).

Citología de moco fecal

En lugares donde se carece de técnicas para estudios bacteriológicos, y aún en medios hospitalarios en los que existen condiciones favorables para efectuar este tipo de estudios, se considera de gran valor contar con un indicador que en un corto lapso de tiempo pueda anticipar si un cuadro diarreico está asociado o no con algún microorganismo enteropatógeno. Wolff y Harris (105) han informado acerca de la búsqueda de leucocitos en materia fecal, a fin de predecir mediante este procedimiento, si se trata de un proceso inflamatorio con invasión de la mucosa colónica o de un proceso no invasor causado por microorganismos enterotoxigénicos o una causa no infecciosa (106).

El examen microscópico para leucocitos fecales ofrece una información diagnóstica rápida y un binomio costo-beneficio positivo. La localización anatómica de los microorganismos patógenos puede también deducirse en base a la presencia o ausencia de leucocitos fecales.

Los microorganismos patógenos invasores suelen infectar el intestino grueso, los patógenos diarreicos productores de toxinas se localizan, en general, en intestino delgado y se caracterizan por la ausencia de leucocitos fecales, al igual que en los procesos virales (106,107).

El estudio de moco fecal es sencillo y rápido, pero puede ser motivo de confusión si no se interpreta de acuerdo con datos clínicos, ya

que la sola presencia de leucocitos en el moco fecal no necesariamente es indicativa de una etiología bacteriana, o por el contrario, puede no haber respuesta celular, aunque un frotis negativo con coprocultivo positivo puede indicar que el paciente es un portador (107).

Por lo tanto, una diarrea voluminosa líquida que no contiene sangre o leucocitos y está asociada con signos de deshidratación, sugiere la colonización del intestino delgado con un microorganismo enterotoxigénico no invasivo o bien con la ingestión de una enterotoxina producida fuera del organismo. Las diarreas con poca cantidad de materia fecal que contienen moco, polimorfonucleares y sangre, sugieren infección del intestino grueso por un microorganismo invasivo (105,106).

PARTE EXPERIMENTAL

MATERIAL Y METODOS

Se estudiaron muestras de heces de 115 niños menores de dos años que presentaban síndrome diarreico agudo. Dichos menores acudieron al hospital Regional "General Ignacio Zaragoza del ISSSTE" en los meses de marzo a junio de 1990. Simultáneamente se realizó el estudio a un grupo de niños que no habían presentado cuadros diarreicos de ningún tipo en los últimos 2 meses y al cual se le denominó grupo control. (Tabla 3)

A cada paciente y control se le practicó citología de moco fecal, coprocultivo, examen coproparasitológico y rotaforesis. Ver Figura 1.

A).- CITOLOGIA DE MOCO FECAL

El análisis de la citología de moco fecal se efectuó obteniendo la muestra por medio de un hisopo estéril el cual se introdujo en el recto del paciente y se hizo girar varias veces con el objeto de recoger de la mucosa la mayor cantidad de muestra.

La muestra se colocó sobre un portaobjetos, realizando un movimiento rotatorio del hisopo. Este frotis se tiñó cubriéndolo con azul de metileno de Loeffler (ver apéndice 2) durante 3 minutos. Se lavó con agua para quitar el exceso de colorante y se dejó secar al aire.

Posteriormente se observó al microscopio con el objetivo de inmersión para el recuento diferencial de células que pudieran identificarse como polimorfonucleares o mononucleares.

B).- COPROCULTIVO

TABLA 3

DATOS DE LOS NIÑOS ESTUDIADOS						
GRUPO	EDAD	PACIENTES		CONTROLES		
		No. NIÑOS	%	NO.NIÑOS	%	
1	0-3 meses	34	29,5	36	36	
2	4-6 meses	25	21,7	12	12	
3	7-12 meses	42	36,5	23	23	
4	13-18 meses	4	3,4	12	12	
5	19-24 meses	10	8,6	17	17	
TOTALES		115	100	100	100	

FIGURA 1

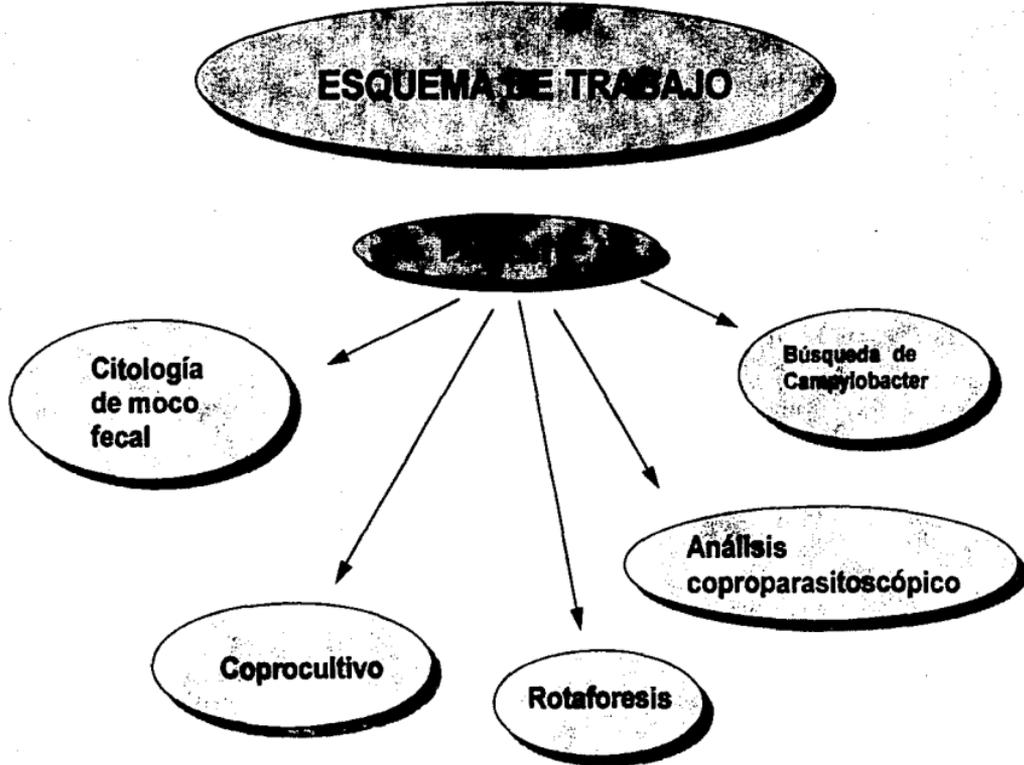
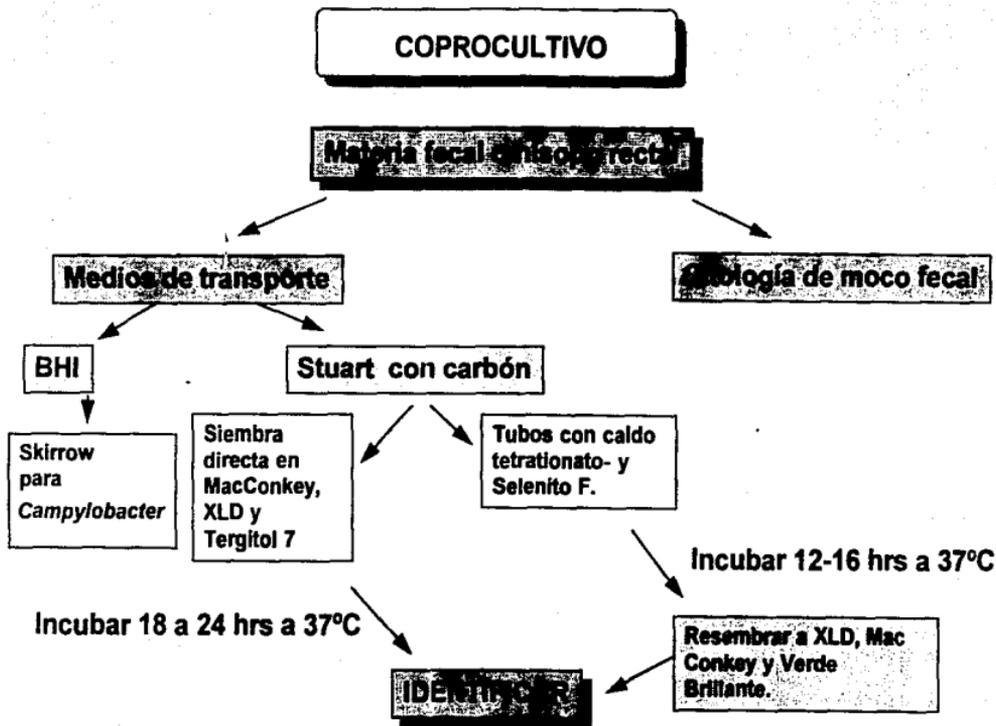


Figura 2



Para el coprocultivo (ver figura 2), la muestra se obtuvo por medio de hisopo rectal, utilizando 2 medios de transporte:

- 1) BHI para recuperación de *Campylobacter*
- 2) Medio de Stuart-Carbón, para recuperación de Enterobacterias, *Aeromonas* y *Plesiomonas* (ver apéndice 1).

El examen de la muestra se realizó dentro de los 15 minutos siguientes de haberla tomado, se sembró sobre placas con medio de cultivo Skirrow (hisopo de BHI), Mac Conkey, Tergitol 7 y XLD (hisopo de Stuart-Carbón) (ver apéndice 1), realizando en cada placa aislamiento por estría cruzada.

Los hisopos que se colocaron en medio Stuart-Carbón se inocularon en tubos de 18 x 160 mm con 4 ml. de caldo selenito y de caldo tetrionato, agregándole a éste último 5 gotas de solución yodo-yodurada (ver apéndice 1 y 2). Ambos tubos y todas las placas, a excepción de la de Skirrow, se incubaron de 18 a 24 horas a 37° C.

I) AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DE *CAMPYLOBACTER*

Las placas con medio de cultivo Skirrow, una vez inoculadas por estría cruzada, se colocaron en jarras de Brewer con un sobre de Anaerocult C, previamente humedecido con 6 ml de agua para producir atmósfera reducida de oxígeno y enriquecida en bióxido de carbono, se cerró herméticamente y se colocó en incubadora a 42° C durante 48 horas, ver figura No.3.

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

FIGURA No. 3

**IDENTIFICACION DE
CAMPYLOBACTER**

Inocular placa con medio de Skirrow

Colocar las placas en jarra de Brewer con "anaerocult C"

Incubar a 42°C por 48 hrs.

Observar Morfología colonial

Frotis teñidos por Gram para colonias sospechosas

Purificar en condiciones de microaerofilia

Realizar pruebas de oxidasa y catalasa (positivas ambas)

Resembrar en placas de Skirrow para purificar

Incubar en microaerofilia por 48 hrs. a 42°C

**Realizar Hidrolisis de hipurato
Producción de ácido Sulfhídrico
Hidrólisis del DNA**

Realizar biotipificación según la tabla 2

El frotis teñido se observó al microscopio con objetivo de inmersión para la búsqueda de bacilos Gram negativos, delgados, pequeños y curvos en forma de "S" o de ala de gaviota. Una vez observada dicha morfología, se procedió a purificar los microorganismos en medio de Skirrow en condiciones de microaerofilia en las mismas jarras de Brewer a 42° C durante 48 horas.

Al microorganismo purificado se le realizaron las pruebas de oxidasa y catalasa.

Prueba de Oxidasa

La prueba de oxidasa se realizó colocando sobre un portaobjetos, una tira de papel filtro previamente impregnada de clorhidrato de dimetilparafenilendiamina (ver **apéndice 2**), que se humedeció con 2 gotas de agua, y se colocó sobre la tira una **asada** de la colonia purificada (previamente se prueba el asa de nicromo para que no tenga reacciones inespecíficas). El **vire** de color del papel filtro a un color violeta intenso o negro indica una reacción positiva.

Prueba de Catalasa

La prueba de catalasa se realizó colocando una **asada** de una colonia purificada sobre un portaobjetos y se le **añadió** una gota de peróxido de hidrógeno al 3 % (ver **apéndice 2**). La **formación** de burbujas indica una **reacción** positiva.

Si ambas pruebas resultaron positivas, se **resembró** la colonia en otra placa con medio de cultivo Skirrow y 24 hrs. después se **procedió** a realizar las siguientes pruebas bioquímicas en las condiciones de incubación señaladas anteriormente.

Hidrólisis del Hipurato

Se inoculó una asada de un cultivo de *Campylobacter* de 24 horas de crecimiento, en tubos de 13 x 100 mm con hipurato de sodio (ver apéndice 2). Se mezcló bien y se incubó en baño maría a 37° C durante 2 horas. Posteriormente se agregaron, resbalando lentamente por la pared del tubo, 0.2 ml de ninhidrina (ver apéndice 2) y se reincubó en el mismo baño maría durante 10 minutos. Si se observa un color púrpura la prueba se considera positiva; un color débil, así como ausencia total de color indican una prueba negativa.

Producción de H₂S

Se inoculó una asada de un cultivo de *Campylobacter* de 24 horas de crecimiento en Caldo Brucella (ver apéndice 2), se mezcló perfectamente y se colocó en el borde del tubo una tira de papel filtro impregnada de acetato de plomo, sin que ésta tocara el medio de cultivo. Se colocó la tapa al tubo sin apretarla y se incubó en jarras de Brewer con un sobre de Anaerocult C, durante 48 horas a 42° C. El vire de la tira de papel filtro impregnada de acetato de plomo a un color negro, indica reacción positiva por la formación de ácido sulfhídrico. Si no se observa ningún vire de color en la tira de papel filtro, la prueba se considera negativa.

Hidrólisis de ADN por la enzima ADNasa

Se inoculó una asada de un cultivo de *Campylobacter* de 24 horas de crecimiento sobre una placa de agar DNAsa en una superficie de 1 cm², colocando el inóculo en forma de botón.

La placa de agar DNAsa, una vez inoculada, se colocó en una jarra de Brewer con un sobre de Anaerocult C y se incubó 48 horas a 42° C. La formación de un halo incoloro alrededor de la zona de crecimiento, se considera una reacción positiva. Si no hay formación de dicho halo, la prueba se considera negativa.

Para la identificación de las especies de *Campylobacter* y sus biotipos, se emplea el esquema señalado con anterioridad en la **tabla 2**.

II) IDENTIFICACION DE ENTEROBACTERIAS

Después de 24 horas de incubación de las placas con medios de cultivo XLD, Tergitol 7, Mac Conkey (ver figura 4 A), se seleccionaron colonias aisladas para resembrarlas en medios específicos para la diferenciación de Enterobacterias.

Se observaron las diferentes colonias de los microorganismos desarrollados, dando especial interés a las colonias lactosa negativa, ya que podría tratarse de *Salmonella* o *Shigella*.

Las colonias que no fermentaron la lactosa, se inocularon en los medios de SIM, Urea de Christensen y Kligler y se incubaron de 18 a 24 horas a 37° C. Se leyeron las pruebas bioquímicas añadiendo al medio de SIM, cuatro gotas de reactivo de Kovac (ver apéndice 2) para ver la producción de indol. El vire a un color rojo indica una reacción positiva. Si no se observa ningún cambio, la prueba se considera negativa.

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

Si el microorganismo se identificó en los medios presuntivamente como *Salmonella*, se procedió a inocularlo en una bioquímica completa que comprendió los siguientes medios: Kligler, Urea de Christensen,

Caldo Malonato, Citrato de Simmons, MIO, Fenilalanina y Lisina en base de Müller, incubándose de 18 a 24 horas a 37° C. Se procedió a leer las pruebas bioquímicas, añadiendo a la fenilalanina 3 gotas de cloruro férrico (ver apéndice 2) y al medio MIO cuatro gotas de reactivo de Kovac. Por último, se procedió a la tipificación serológica con sueros polivalentes y luego con los monovalentes de grupo en existencia (ver apéndice 3).

Si el microorganismo se identificó presuntivamente como *Shigella* se procedió a inocularlo en una bioquímica completa que comprendió los siguientes medios: Kligler, Urea de Christensen, Caldo Malonato, Citrato de Simmons, MIO, Fenilalanina, Arginina y Lisina en base de Müller, se incubaron de 18 a 24 horas a 37° C. Posteriormente se leyeron las pruebas bioquímicas añadiendo los reactivos necesarios y confrontando en tablas (ver apéndice 2).

Por último se procedió a la tipificación serológica con sueros polivalentes de especie (ver apéndice 3).

Debido a que *E. coli* es un microorganismo que fermenta la lactosa, las colonias que mostraron tal propiedad se inocularon en agar de Müller Hinton sembrando una superficie de 1 cm² de cada colonia diferente observada incubándose de 18 a 24 horas a 37° C.

Posteriormente, a las colonias de *E. coli* se les realizó la prueba de aglutinación con acriflavina 1:500. Las que aglutinaron se reportaron como *E. coli* no clasificable y se descartaron. Si la aglutinación fue negativa, se sometieron a pruebas de aglutinación con sueros polivalentes para los serogrupos de *E. coli* considerados enteropatógenos, en caso de ser positiva la aglutinación con alguno de los sueros polivalentes (ver apéndice 3), se procedió a la identificación de los serogrupos mediante los sueros monovalentes específicos

Enriquecimiento.-Después de haber sido incubados los hisopos en los caldos de enriquecimiento, durante 12 a 16 horas se inoculó en placas con medio de cultivo Mac Conkey, SS, XLD y Verde Brillante incubando de 18 a 24 horas a 37° C (ver figura 4 B).

Finalmente se procedió de la forma antes descrita, para la identificación de los microorganismos de interés. Ver Figura 4 A,

Para la identificación de *Aeromonas* y *Plesiomonas* se realizó a las colonias lactosa negativas, la prueba de oxidasa (apéndice 2), urea de Christensen, indol y H₂S. Si la prueba de oxidasa fue positiva y el resto de las bioquímicas concordantes, se procedió a la identificación del microorganismo por medio del sistema API 20E, para lo cual se enviaron las cepas al Hospital 20 de Noviembre del ISSSTE.

C).- EXAMEN COPROPARASITOSCOPICO

Para el análisis coproparasitológico, las muestras de heces recién emitidas se colocaron en frascos y se procesaron mediante la técnica de Faust, de la siguiente manera:

A la muestra fecal se le agregaron 3.0 ml de formaldehído (ver apéndice 2) y se emulsificó. La suspensión fecal perfectamente mezclada se colocó en un tubo de 13 x 100 mm hasta 2 mm antes del borde y se centrifugó durante 5 minutos a 3,500 rpm.

Una vez centrifugado, se decantó el sobrenadante y se añadieron 6.0 ml de sulfato de zinc, con una densidad de 1.180 (ver apéndice 2).

Se emulsificó nuevamente la muestra mezclando el sedimento por completo, inmediatamente después se centrifugó durante dos minutos. Posteriormente se colocaron los tubos en una gradilla, se les colocó un cubreobjetos sobre el borde y se dejaron reposar. Por último, se adicionó

FIGURA 4 A

IDENTIFICACION DE ENTEROBACTERIAS

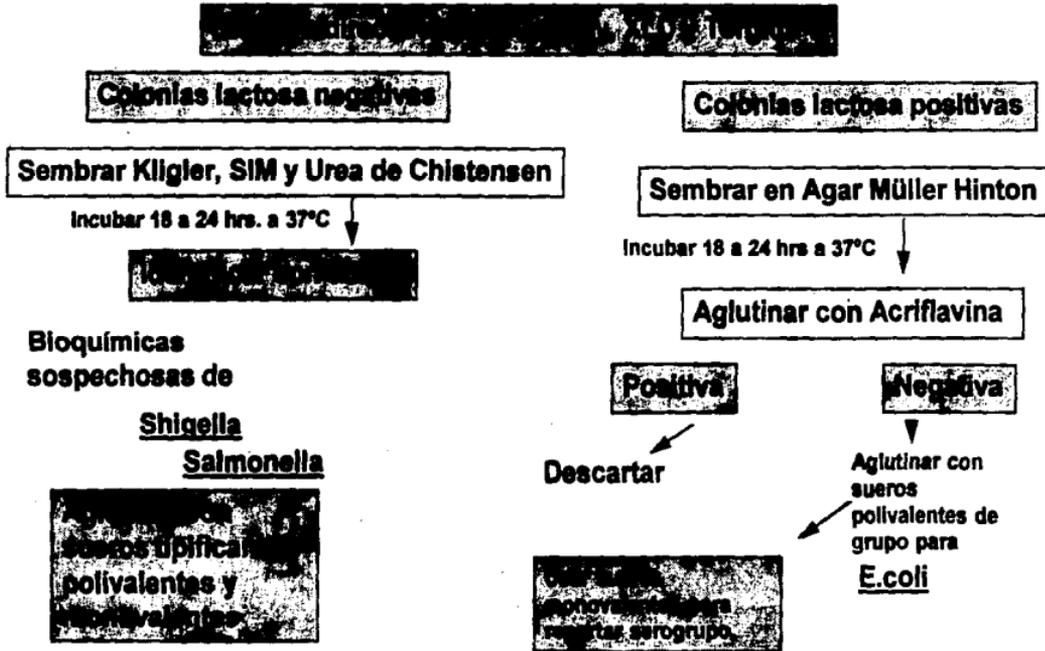
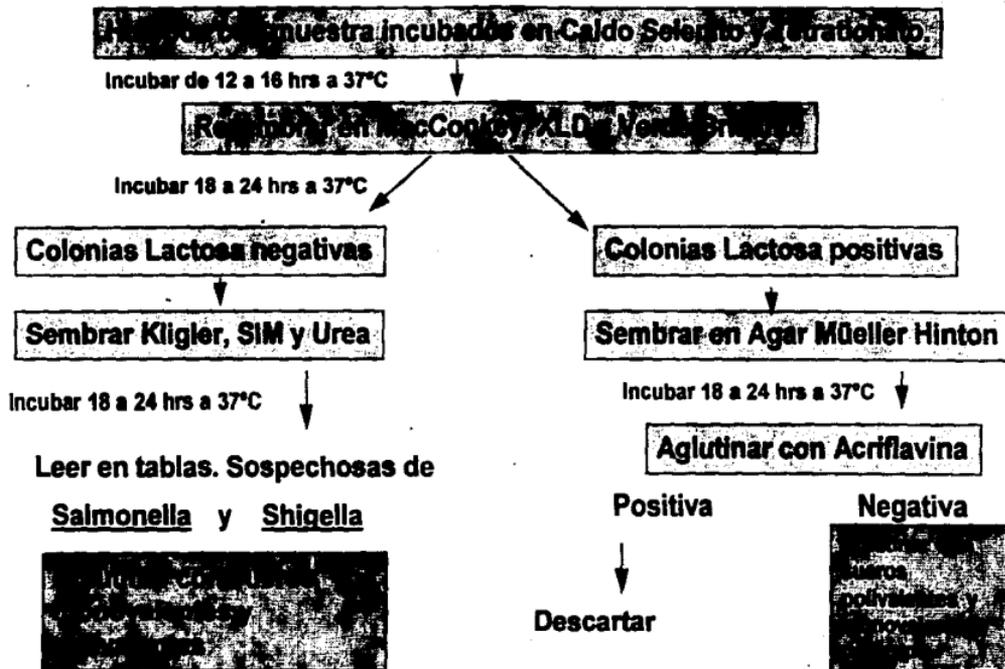


FIGURA No. 4B

IDENTIFICACION DE ENTEROBACTERIAS



una gota de lugol (ver apéndice 2) sobre un portaobjetos, y encima de ésta se invirtió la gota tomada con el cubreobjetos y se observó al microscopio con los objetivos 10X y 45X.

D).- ROTAFORESIS.

La técnica de Rotaforesis se efectuó sobre muestras de materia fecal tomadas directamente por vía rectal con hisopo de algodón el cual se colocó en una solución amortiguadora de fosfatos (PBS) (para la preparación de todos los reactivos, Ver Apéndice 2). El examen de la muestra se realizó de la siguiente manera:

A).-Preparación de la muestra.

1.- Numerar tubos del 1 al 10, a los primeros 9 agregar 0.4 ml de solución amortiguadora de lisis. En el tubo número 10 colocar 0.2 ml de solución amortiguadora de lisis.

2.- Agregar a los tubos numerados del 1 al 9 una gota de la muestra de heces. Si las heces tienen consistencia sólida agregar una gota de una solución de NaCl al 0.85%. En el tubo 10 se colocan 0.2 ml de una muestra positiva (control positivo).

3.- Agregar 0.2 ml de solución amortiguadora de Tris-EDTA con fenol a todos los tubos.

4.- Agitar los tubos en un vórtex cuidando que el fenol y la fase acuosa constituyan una fina emulsión.

5.- Agregar 0.2 ml de cloroformo a todos los tubos y agitarlos nuevamente en el vórtex

6.- Centrifugar a 1,500 rpm durante 10 minutos. Después de la centrifugación deben obtenerse dos fases, la superior debe estar clara.

7.- Tomar 0.15 ml de la fase acuosa (superior) y colocarla en un tubo de 10 x 100 mm.

B).-Electroforesis.

1.- Poner a fundir en baño de agua la solución de agarosa con colorante para corrimiento.

2.- Colocar los tubos que contienen la muestra en baño de agua a 60° C.

3.- Adicionar 0.05 ml de la agarosa con colorante para corrimiento (perfectamente fundida) a los tubos que se encuentran en el baño de agua.

4.- Preparar el gel de acrilamida o si ya se tiene preparado sacarlo de la bolsa, poner los separadores entre los vidrios a ambos lados del gel, cuidando que queden perfectamente adosados.

5.- Con pipetas Pasteur diferentes poner las muestras en los pozos del gel cuidando de no derramar muestras en los pozos adyacentes.

6.- Después de 5 minutos, comprobar que las muestras han solidificado inclinando el gel. Una vez hecho esto se colocan en la cámara de electroforesis, de tal manera que los pozos del gel queden hacia una terminal negativa de la cámara.

7.- Agregar 50 ml de solución amortiguadora Tris-glicina a la cámara. El gel debe quedar totalmente cubierto con esta solución.

8.- Conectar los electrodos, el negativo al lado de los pozos y ajustar la fuente de poder a 100 V. A este voltaje la intensidad de la corriente debe ser de aproximadamente 10 a 30 mA y el colorante debe migrar hacia el polo (+) a una velocidad de 1-2 cm por 30 minutos. Continuar la electroforesis hasta que todo el colorante haya salido del gel. El voltaje puede aumentarse hasta 150 volts si se desean obtener los resultados más rápido, aunque esto causa un poco de deformación en el

TABLA 5

INFECCIONES MIXTAS				
GRUPO	EDAD DEL PACIENTE	MICROORGANISMOS ASOCIADOS		
1 (0-3 meses)	20 DIAS	<i>E. coli</i> O111 y Rotavirus		
2 (4-6 meses)	4 MESES	<i>E. coli</i> O111	y <i>Salmonella</i>	grupo C1
	6 MESES	<i>E. coli</i> O111	y <i>Plesiomonas</i>	<i>shigelloides.</i>
3 (7-12 meses)	12 MESES	<i>E. coli</i> O 111	y <i>Campylobacter jejuni</i>	biotipo 1
5 (19-24 meses)	20 MESES	<i>E. coli</i> O111 y <i>Shigella boydii</i>		

patrón del corrimiento electroforético.

C.-Tinción

Nota: Usar guantes limpios para manipular el gel, ya que la tinción utilizada es muy sensible.

1.- Una vez terminada la electroforesis, levantar uno de los vidrios con una espátula, cortar los dientes que forman los pozos y cortar una esquina del gel para saber cuál es la primera muestra, poner el gel en un recipiente de vidrio de fondo plano y lavar durante 30 minutos con una mezcla de etanol-acético.

2.- Después de retirar completamente la mezcla de etanol-acético, lavar el gel durante 30 minutos con 50 ml. de solución de nitrato de plata.

3.- Enjuagar rápidamente dos veces con agua destilada.

4.- Agregar 50 ml de solución reveladora agitando ocasionalmente. En el momento en que aparezcan bandas en el control positivo retirar la mezcla.

5.- Detener la reacción con 50 ml de ácido acético al 1%.

6.- Enjuagar el gel con agua destilada y proceder a identificar las bandas de ARN en el gel comparándolas con los patrones ya establecidos de Rotavirus.

RESULTADOS

Se estudiaron 115 niños menores de 24 meses con cuadro diarreico agudo y 100 niños sin sintomatología entérica por lo menos 2 meses antes de la toma de la muestra (grupo control). La distribución por grupos de edad se muestra en la **Tabla 2**.

De los 115 pacientes estudiados, 47 (45%) mostraron hallazgos positivos para uno o más de los enteropatógenos buscados. 42 niños (36.52%) tuvieron solo un agente bacteriano, en un caso se detectó rotavirus (0.86%) y en otro quistes de *Giardia lamblia*, (0.86%).

De los 100 niños del grupo control se aislaron 21 agentes considerados clásicamente como patógenos (21%), 17% tuvo un patógeno bacteriano, 2% un patógeno viral (rotavirus), 2% *Giardia lamblia*.

Tabla 4

En todas las muestra de pacientes se practicó citología fecal. En el grupo control no se practicó este ensayo por no presentarse alteraciones en la consistencia y apariencia de las heces.

Los resultados del grupo de pacientes fueron los siguientes: la observación microscópica reporta presencia de leucocitos polimorfonucleares y/o mononucleares en 30 casos de los 115. En 5 pacientes se observaron entre 0-10 leucocitos por campo; en ninguno de estos pacientes se aislaron agentes enteropatógenos.

En 10 pacientes, el recuento de leucocitos fué entre 10-20 por campo, en este grupo se identificaron en total 6 enteropatógenos, 2 *Campylobacter jejuni* biotipo 1 y 4 *E. coli* enteropatógenas, 3 del serogrupo O111 y 1 del serogrupo O119.

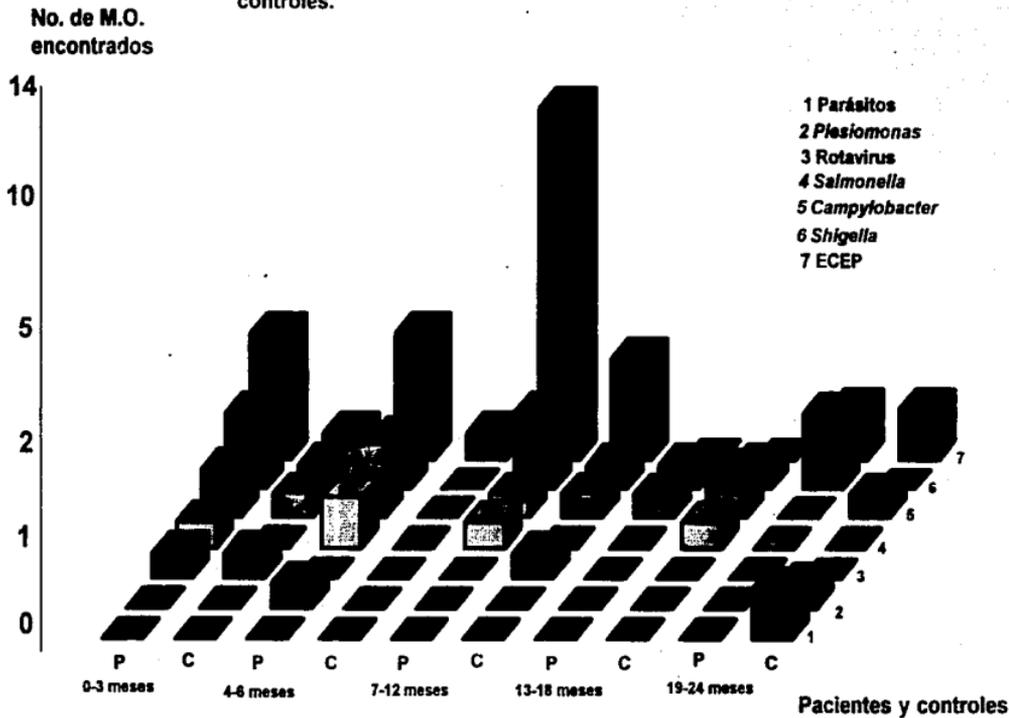
En los 15 pacientes restantes se observaron 20 o más leucocitos

TABLA 4

GRUPO DE EDAD	MICROORGANISMOS AISLADOS EN PACIENTES Y CONTROLES															
	ECEP		SALMONELLA		SHIGELLA		CAMPYLOBACTER		AEROMONAS		FLESIOMONAS		PARASITOS		ROTAVIRUS	
	P	C	P	C	P	C	P	C	P	C	P	C	P	C	P	C
1	5	1	1	0	3	1	2	1	0	0	0	0	0	0	1	1
2	5	1	2	0	2	0	3	0	0	0	1	0	1	0	0	0
3	14	4	1	0	3	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1
4	0	0	0	1	1	1	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0
5	2	2	0	0	3	0	0	1	0	0	0	0	0	2	0	0
TOTALES	26	8	4	1	12	3	7	5	0	0	1	0	1	2	1	2

Grafica 1

Recuperación de microorganismos considerados
causantes de diarrea en los grupos de pacientes y
controles.



por campo y en las muestras se obtuvieron 8 aislamientos, 7 de los cuales fueron *Shigella* y 1 *Salmonella sp.*

En relación a los agentes causales recuperados, se observa que *E. coli* enteropatógena fué, con mucho, el más abundante (34 aislamientos) (15.81%) en ambos grupos. Siendo *E. coli* del grupo O111 el más frecuente tanto en pacientes (15) como en controles (4) seguida de *E. coli* O127 (5 en pacientes y 2 en controles). Otro grupo aislado en menor número fué *E. coli* O26 (2 en pacientes), *E. coli* O119 (2 en pacientes y 1 en controles), *E. coli* O128 (1 en pacientes), *E. coli* O55 (1 en controles), *E. coli* O126 (1 en pacientes).

En el grupo de pacientes el 92.3% (24) de las ECEP recuperadas fueron en niños menores de 12 meses, en tanto que en el grupo control este porcentaje fué de 75% en el mismo rango de edad.

Shigella en sus 4 especies, se recuperó de 12 niños con diarrea y sólo en 3 de los del grupo control. 8 de los aislamientos del grupo de pacientes fueron en niños menores de 12 meses en tanto que los 3 del grupo control se distribuyeron en las diferentes edades. *Shigella boydii* fué la especie más comunmente recuperada (6 en pacientes y 2 en controles), seguida de *Shigella flexneri* (3 en pacientes), *Shigella dysenteriae* (1 en pacientes) y *Shigella sonnei* (2 en pacientes y 1 en controles).

En el caso de *Campylobacter* se obtuvieron un total de 12 aislamientos, 7 en pacientes y 5 en grupo control, 11 de estos aislamientos fueron de *Campylobacter jejuni* biotipo 1 y sólo 1 fue de *Campylobacter coli*. No se obtuvieron aislamientos de *Campylobacter laridis*. En el grupo de pacientes, 6 aislamientos fueron en niños menores de 12 meses en tanto que en el grupo de controles no se notó diferencia significativa respecto a su edad.

El género *Salmonella* se recuperó en un total de 5 casos y se puede apreciar que 4 de los aislamientos de niños con diarrea fueron en los primeros 12 meses de vida. *Salmonella* del grupo B fue la más frecuente (3 en pacientes y 1 en controles), seguidas del grupo C1 (1 caso). Es sabido que en Norteamérica el serotipo *typhimurium* (grupo B) es el más comúnmente recuperado tanto de pacientes como de portadores sanos.

No obstante que se hizo búsqueda detallada de los parásitos, sólo fué posible identificar a *G.lambli*a, en 1 paciente y en 2 controles. No se observaron trofozoitos de *E. histolytica* en ninguno de los niños estudiados.

Aeromonas hydrophila y *Plesiomonas shigelloides*, aún y cuando se reportan en la literatura como posibles agentes causales de diarrea, no estuvieron presentes en número importante en los niños estudiados: de hecho, sólo se aisló una *Plesiomonas shigelloides* en pacientes y ésta, asociada a *E. coli* O111.

Rotavirus, que se ha reportado como agente etiológico viral de diarrea aguda, no resultó importante en número en el presente estudio, quizá por haberse efectuado éste en los meses de primavera y no en meses fríos en los cuales aparece este virus. Ver **Tabla 4 y Gráfica 1**

En el grupo de pacientes se encontraron 5 casos (4.3%) con infecciones mixtas. En todas ellas *E. coli* O111 se asocia a otro agente etiológico como se muestra en la **Tabla 5**. En el grupo control no se observó este fenómeno.

DISCUSION

La gran extensión geográfica de la Cd. de México sugiere que la distribución de agentes causantes de diarrea, así como el acarramiento de los mismos en población sana, puede no ser generalizada a toda el área metropolitana y conurbada, sino restringida a diferentes zonas tomando en cuenta factores ambientales, socioeconómicos, de alimentación, etc. Además, es bien sabido que la frecuencia de agentes causales de diarrea varía con la época del año. En base a todo esto resultó de interés realizar un muestreo entre población menor de 24 meses con cuadro diarreico agudo y comparar los resultados de aislamiento de agentes etiológicos de diarrea con los obtenidos en población abierta aparentemente sana, con iguales características socioeconómicas, edad, sexo y hábitos alimenticios y de higiene, a fin de tratar de definir la importancia clínica de cada uno de los patógenos clásicos y el acarramiento de los mismos.

Conviene aclarar que al realizar este estudio, se presentaron muchas dificultades para captar niños asintomáticos principalmente por la negativa de los padres a que se les tomara muestra y por esta razón, el número de controles no fue posible igualarlo al de pacientes en cada uno de los grupos de edad como hubiera sido nuestro interés.

Estudios previos en México indican un porcentaje de recuperación de agentes enteropatógenos del 66% bajo las mejores condiciones técnicas y a lo largo de 2 años de estudio (108).

Otro trabajo indica que en la Cd. de México muchos niños presentan de 3 a 5 cuadros de diarrea al año con un promedio de 2.7 por

niño (109).

En el presente estudio, bajo las condiciones de un laboratorio de rutina de Bacteriología, se pudo aislar el 45% de los microorganismos involucrados en cuadros diarreicos. No es posible bajo estas condiciones la identificación de ECET, que según datos publicados recientemente por la OMS (108), representan un porcentaje alto (16%) de los agentes etiológicos responsables de cuadros diarreicos.

En un estudio previo en esta zona (110), realizado en los meses de otoño, se encontró un alto porcentaje de microorganismos del género *Campylobacter* (16.15%), sin embargo, al no estudiarse simultáneamente un grupo control, no fué posible relacionar la importancia de este microorganismo con los cuadros diarreicos ni afirmar que la zona oriente de la Cd. de México fuera endémica para este género.

Nuestros datos indican que hay un gran acaramiento de este microorganismo en población sana, dato que concuerda con otros estudios en México y en países en vías de desarrollo (108). Sin embargo, *Campylobacter jejuni* aislado en niños con diarrea se agrupa, marcadamente, en pacientes menores de 12 meses y sólo en un caso se presentó infección mixta con *E. coli* O111, lo cual sugiere que estos microorganismos pueden presentar diferentes grados de patogenicidad que permite, en algunos casos, provocar cuadros diarreicos y en otros pasar inadvertidos.

En un principio llamó la atención el hecho de no haber encontrado, en este estudio, parásitos tradicionalmente presentes en población abierta cuyas condiciones de higiene son precarias, aún y cuando la metodología empleada resulta normalmente satisfactoria. Sin embargo, revisando la literatura (108) y otros trabajos previos en la zona (110), se observó que

los datos obtenidos por otros investigadores, son concordantes con los presentados aquí. Quizá en niños tan pequeños como los estudiados por nosotros, los problemas **diarreicos no se pueden relacionar tanto a parásitos como a bacterias (*Shigella* y ECEP).**

En el caso de *E. coli* enteropatógena, es significativa la proporción de *E. coli* O111 aislada en pacientes, (15 en total) lo cual sugiere que este microorganismo realmente puede jugar un papel importante en los episodios de diarrea. Según la clasificación de Levine (11), este serogrupo pertenece al llamado tipo I de *E. coli* enteropatógena en donde se clasifican los serogrupos frecuentemente involucrados en todo el mundo en diarrea epidémica. Si se toman en cuenta las condiciones de higiene y hacinamiento en que viven los niños de esta zona de la Ciudad, es fácil pensar que efectivamente estas bacterias se asocian a cuadros **diarreicos agudos** y que su mecanismo de patogenicidad puede favorecer, en el caso de las infecciones mixtas, el que otros agentes causales **incrementen su virulencia (tabla 5).**

Al igual que en la mayoría de los estudios previos realizados en México y en otros países en vías de desarrollo, el aislamiento de *Shigella* está estrechamente relacionado a diarrea aguda. De las 12 cepas aisladas de pacientes solo una se presentó asociada con otro microorganismo (*E. coli* O111) por tanto, en 11 casos puede atribuirse plenamente la sintomatología presentada. Son poco frecuentes los reportes de portadores asintomáticos de este microorganismo. Las posibles explicaciones serían: por una parte, la baja dosis infectante que se requiere para producir enfermedad y, por otra, la **eficacia de los mecanismos de patogenicidad de *Shigella*.**

Respecto a Rotavirus, no es posible hacer alguna observación

dado el bajísimo porcentaje de identificación de este microorganismo. Quizá lo único válido sería afirmar que en los meses de calor, no interesa realizar en forma rutinaria la búsqueda de este agente causal.

Los géneros *Aeromonas* y *Plesiomonas* no parecen ser, en nuestro medio y en el momento actual, importante causa de diarrea; sin embargo, es muy recomendable que los laboratorios de Bacteriología Clínica incluyan en su rutina de trabajo la identificación de estos microorganismos, no sólo en materia fecal sino en otras muestras comunes como la sangre, los exudados faríngeos, la orina y otros productos diversos, ya que si bien no son agentes infecciosos muy frecuentes, la gravedad de sus cuadros clínicos amerita su identificación eficaz.

La inclusión rutinaria de la observación del moco fecal, con la idea de acortar tiempo en el diagnóstico, dando datos confiables que permitan al clínico iniciar un tratamiento con cierta especificidad, no resultó del todo satisfactoria.

Del total de 47 pacientes en que se pudo demostrar la presencia de uno o mas agentes enteropatógenos, solo fue posible hacer correlación con presencia de leucocitos en moco fecal en 14 de ellos(29%).

De los 12 pacientes con *Shigella* solo en 7 se observan leucocitos en moco fecal, lo cual indica que este método sólo detecta el 58% de los infectados con este microorganismo. Si tomamos en cuenta que el número de portadores de *Shigella* es muy bajo, y por tanto su aislamiento está estrechamente relacionado con cuadros diarreicos, y su mecanismo de patogenidad primordial es invasor, la sensibilidad de la citología de moco fecal es realmente pobre. (En este estudio sería del 57% si asumimos que las 12 cepas de *Shigella* son verdaderos positivos, o sea

que son la causa de la enfermedad.).

En el caso de *E.coli* enteropatógena no se señalan en la literatura mecanismos de patogenidad que involucren destrucción de la mucosa intestinal, por lo tanto, si en verdad estos microorganismos causan diarrea en los niños, la citología no sería de ayuda en este grupo, como lo confirma el hecho de que solamente 4 pacientes con *E. coli* enteropatógena (3 del serogrupo O111 y 1 del O119) presentan en sus heces polimorfonucleares.

La observación de menos de 10 leucocitos por campo no es significativa, en ningún caso.

CONCLUSIONES

1) Según los datos aquí obtenidos, es de gran importancia la identificación tanto de *E. coli* enteropatógena (en infantes menores de 12 meses), como de *Shigella*, *Salmonella*, y *Campylobacter*:

2) Como el número de portadores sanos de *Campylobacter* en nuestro medio es alto, se podría decir que su aislamiento no implica, necesariamente, que el cuadro diarreico sea a consecuencia de ellos, sin embargo, los mecanismos de patogenicidad de este microorganismo no están totalmente esclarecidos y por esta razón conviene establecer su búsqueda rutinaria en los laboratorios clínicos y periódicamente hacer análisis epidemiológico y de correlación con patología entérica.

3) Los datos obtenidos en este estudio respecto a la observación de leucocitos en moco fecal muestran una sensibilidad muy baja para este método, y no parece ser una herramienta útil, en la mayoría de los casos, para establecer una terapia antimicrobiana específica.

4) A la fecha, la metodología empleada en la identificación de ECET es prácticamente inaccesible a la mayoría de los laboratorios de Bacteriología Clínica, por este motivo no se incluye su búsqueda en este trabajo, sin embargo, los reportes más recientes indican que estos microorganismos representan un porcentaje alto (16%) entre los agentes etiológicos responsables de cuadros diarreicos agudos y sería de gran interés epidemiológico incluirlos en la rutina del laboratorio en el momento en que se desarrolle una metodología accesible.

5) Los microorganismos de los géneros *Aeromonas* y *Plesiomonas* no parecen ser, en nuestro medio, agentes importantes en la etiología de las diarreas, sin embargo se aconseja afinar su identificación en otro tipo de productos, dada la gravedad de los cuadros clínicos que producen.

6) Conviene hacer una recopilación de los datos existentes en diferentes épocas del año en esta zona de la Cd. de México para tener un panorama más claro de la prevalencia de agentes causales de diarrea, de su relación con los cuadros clínicos y de los porcentajes de acarreamiento entre la población sana, a fin de poder ofrecer un diagnóstico bacteriológico cada vez más confiable.

APENDICE 1

MEDIOS DE CULTIVO

La selectividad que presentan los diversos medios de cultivo es un factor de suma importancia, ya que así se tiene una guía que permite escogerlos de acuerdo a los microorganismos que nos interese aislar. En todos los casos se emplearon medios deshidratados comerciales.

MEDIO DE SKIRROW

Fórmula en gramos por litro de agua destilada

Peptona mezcla de proteínas	21.0
NaCl	0.5
Almidón soluble.	1.0
Agar-agar	13.0
pH final	7.3 ± 0.1

Preparación.

Esterilizar la base a 15 libras durante 15 minutos. Posteriormente agregar a cada 200 ml de la base, un vial de antibiótico (suplemento selectivo para *Campylobacter*) que contiene una mezcla de Polimixina, Vancomicina y Trimetoprim. Finalmente agregar 20.0 ml de sangre estéril de carnero. Mezclar en forma homogénea y distribuir en cajas de Petri.

AGAR MAC CONKEY

Fórmula en gramos por litro de agua destilada

Peptona de caseína	17.0
Peptona de carne	3.0
Lactosa	10.0

Mezcla de sales biliares	1.5
Cloruro de sodio	5.0
Rojo neutro	0.03
Cristal violeta	0.001
Agar-agar	13.5
pH final	7.1 ± 0.1

Preparación:

Calentar con agitación frecuente hasta disolver perfectamente.
Esterilizar a 15 libras, 121° C, durante 15 minutos y distribuir en cajas de Petri.

AGAR TERGITOL 7

Fórmula en gramos por litro de agua destilada

Peptona especial	5.0
Extracto de levadura	3.0
Lactosa	10.0
Heptadecil sulfato de sodio	0.1
Azul de bromotimol	0.025
Agar agar	12.0
pH final	6.9 ± 0.1

Preparación:

Calentar hasta disolverlo con agitación frecuente, esterilizar en autoclave a 15 libras, 121° C, durante 15 minutos y distribuir en cajas de Petri.

XILOSA-LISINA-DESOXICOLATO

Fórmula en gramo por litro de agua destilada

D(+) xilosa	3.5
L(+) lisina	5.0

Lactosa	7.5
Sacarosa	7.5
Cloruro de sodio	5.0
Extracto de levadura	3.0
Desoxicolato de Sodio	2.5
Tiosulfato de Sodio	6.8
Citrato de amonio y hierro	0.8
Rojo de fenol	0.08
Agar-agar	13.5

pH final 7.4 ± 0.1

Preparación:

Calentar hasta disolver con agitación frecuente, esterilizar en autoclave a 15 libras, 121°C , durante 15 minutos y distribuir en cajas de Petri.

CALDO SELENITO

Fórmula en gramos por litro de agua destilada

Digerido pancreático de caseína	5.0
Lactosa	4.0
Fosfato de sodio	10.0
Selenito ácido de sodio	4.0
L-Cistina	0.01

pH final 7.0 ± 0.2

Preparación:

Mezclar bien y calentar ligeramente, distribuir 6.0 ml en tubos estériles de 16 X 150 mm con tapón de rosca.

CALDO TETRACIONATO

Fórmula en gramos por litro de agua destilada

Peptona de caseína	2.5
Peptona de carne	2.5
Sales biliares	1.0
Carbonato de calcio	10.0
Tiosulfato de sodio	30.0

Preparación:

Disolver en agua estéril, llevar a ebullición y distribuir en tubos estériles de 16 X 150 mm con tapón de rosca.

VERDE BRILLANTE

Fórmula en gramos por litro de agua destilada

Extracto de levadura	3.0
Peptona de caseína	10.0
NaCl	5.0
Lactosa	10.0
Sacarosa	10.0
Rojo de fenol	0.08
Solución de verde brillante	0.0125
Agar	20.0
pH. 6.9± 0.2	

Preparación:

Agregar 0.0125 g de verde brillante por litro de medio. Pesar 8.0 g de rojo de fenol, en 100.0 ml de agua destilada y agregar 1.0 ml por litro de medio.

Esterilizar a 15 libras, 121° C, durante 15 minutos y distribuir en cajas de Petri.

AGAR PARA *SALMONELLA* Y *SHIGELLA*

Fórmula en gramos por litro de agua destilada.

Extracto de carne de res	5.0
Mezcla de peptonas	5.0
Lactosa	10.0
Mezcla de sales biliares	8.5
Citrato de sodio	8.5
Citrato férrico	8.5
Agar	13.5
Rojo neutro	0.025
Verde brillante	0.330
Tiosulfato de sodio	8.5
pH final	7.0 ± 0.2

Preparación:

Disolver en agua, calentar con agitación frecuente hasta que hierva durante un minuto, distribuir en cajas de Petri.

MEDIO DE TRANSPORTE BHI PARA COPROCULTIVO**INFUSION CEREBRO CORAZON**

Fórmula en gramos por litro de agua destilada

Infusión de cerebro 12.5

Infusión de corazón 5.0

Proteosa-peptona 10.0

D-glucosa 2.0

Cloruro de sodio 5.0

Fosfato disódico 2.5

pH final 7.4 ± 0.2

Preparación:

Calentar hasta disolver con agitación frecuente y distribuir en tubos de 16X150 mm, introducir un hisopo y esterilizar a 15 libras, 121°C, durante 15 minutos.

MEDIO DE TRANSPORTE PARA COPROCULTIVO**STUART- CARBON**

Fórmula en gramos por litro de agua destilada

BHI 3.7

Stuart 0.4

Carbón 1.0

pH 7.4 ± 0.2

Preparación:

Calentar hasta disolver con agitación frecuente y distribuir 2.0 ml en tubos de 16X150 mm, introducir dos hisopos y esterilizar a 15 libras, 121° C, durante 15 minutos.

AGAR HIERRO DE KLIGLER

Fórmula en gramos por litro de agua destilada

Extracto de carne	3.0
Extracto de levadura	3.0
Peptona de caseína	15.0
Peptona de carne	5.0
Lactosa	10.0
D(+)-glucosa	1.0
Citrato férrico amoniacal	0.5
Cloruro de sodio	5.0
Tiosulfato de sodio	0.5
Rojos de fenol	0.024
Agar-agar	12.0

pH final 7.4 ± 0.1 **Preparación:**

Calentar hasta disolver con agitación frecuente, distribuir en tubos de 13X100 mm con tapón de rosca y esterilizar a 15 libras, 121° C, durante 15 minutos. Se deja solidificar en forma inclinada.

MEDIO SIM

Fórmula en gramos por litro de agua destilada

Peptona de caseína	20.0
Peptona de carne	6.6
Citrato de hierro y amonio	0.2

Tiosulfato de Sodio	0.2
Agar-agar	3.0
pH final	7.3 ± 0.2

Preparación:

Calentar hasta disolver con agitación frecuente, distribuir en tubos de 13X100 mm con tapón de rosca y esterilizar a 15 libras, 121° C, durante 15 minutos.

MEDIO MIO

Fórmula en gramos por litro de agua destilada

Extracto de levadura	3.0
Peptona de gelatina	10.0
Peptona de caseína	10.0
L-ornitina	5.0
Dextrosa	1.0
Púrpura de bromocresol	0.02
Agar-agar	2.0
pH final	6.5 ± 0.2

Preparación:

Calentar hasta disolver con agitación frecuente, distribuir en tubos de 13X100 mm con tapón de rosca y esterilizar a 15 libras, 121° C, durante 15 minutos.

FENILALANINA

Fórmula en gramos por litro de agua destilada

DL fenilalanina	2.0
Extracto de levadura	3.0
Cloruro de sodio	5.0

Agar-agar	12.0
Fosfato de sodio	1.0
pH.7.3± 0.2	

Preparación.

Calentar hasta disolución total, distribuir 3.0 ml en tubos de 13X100 mm con tapón de rosca y esterilizar a 21 libras, 121° C, durante 18 minutos. Se deja solidificar en forma inclinada.

CALDO LISINA DESCARBOXILASA

Fórmula en gramos por litro de agua destilada.

Peptona de caseína	5.0
Extracto de carne	5.0
Dextrosa	0.5
L-lisina	5.0
Púrpura de bromocresol	0.01
Piridoxal	0.005
Rojo de cresol	0.005
pH final 6.8 ± 0.2	

Preparación:

Calentar hasta disolver con agitación frecuente y distribuir 3.0 ml en tubos de 13 X 100 mm con tapón de rosca, esterilizar a 15 libras, 121° C, durante 15 minutos.

AGAR PARA HIDROLISIS DE ADN

Fórmula en gramos por litro de agua destilada

Acido desoxirribonucleico	2.0
Peptona de caseína	15.0
Peptona de soya	5.0
Cloruro de sodio	5.0
Agar-agar	15.0
Verde de metilo al 0.5%	10.0 ml
pH final	7.3 +/- 0.2

Preparación:

Calentar hasta disolver con agitación frecuente, esterilizar a 15 libras, 121° C , durante 15 minutos y distribuir en cajas Petri. (Ver apéndice 2 para la preparación de la solución de verde de metilo.)

CALDO MALONATO DE EWING

Fórmula en gramos por litro de agua destilada

Extracto de levadura	1.0
Sulfato de amonio	2.0
Fosfato dipotásico	0.6
Fosfato monopotásico	0.4
Cloruro de sodio	2.0
Malonato de sodio	3.0
Dextrosa	0.25
Azul de bromotimol	0.025
pH final	6.7 ± 0.1

Preparación:

Calentar hasta disolución, distribuir 3.0 ml en tubos de 13X100 mm con

tapón de rosca y esterilizar a 15 libras, 121° C, durante 15 minutos.

AGAR UREA DE CHRISTENSEN

Fórmula en gramos por litro de agua destilada

Peptona de gelatina	1.0
Dextrosa	1.0
Cloruro de sodio	5.0
Fosfato monopotásico	2.0
Urea	20.0
Rojo de feno	0.012
Agar	15.0

pH final 6.8 ± 0.1

Preparación:

Rehidratar 29.0 gr de medio de cultivo en 100 ml de agua destilada.

Esterilizar por filtración.

Rehidratar 15.0 gr de agar-agar en 900.0 ml de agua destilada durante 10 a 15 minutos. Calentar a ebullición hasta disolución completa del agar. Esterilizar a 15 libras, 121° C, durante 15 minutos. Enfriar a 50° C, y agregarlos a los 100.0 ml de la base con la urea estéril. Mezclar bien y distribuir en tubos estériles de 13 X 100 mm con tapón de rosca. Solidificar en forma inclinada.

AGAR NUTRITIVO

Fórmula en gramos por litro de agua destilada

Peptona de gelatina	5.0
Extracto de carne de res.	0.2
Agar	15.0

pH final 6.8 ± 0.2

Preparación:

Calentar a ebullición hasta disolución completa del agar y esterilizar a 15 libras, 121° C, durante 15 minutos y distribuir en cajas de Petri.

AGAR CITRATO DE SIMMONS

Fórmula en gramos por litro de agua destilada

Fosfato monobásico de amonio	1.0
Fosfato dipotásico	1.0
Cloruro de sodio	5.0
Citrato de sodio	2.0
Sulfato de magnesio	0.2
Azul de bromotimol	0.08
Agar-agar	15.0

pH final 6.9 ± 0.1

Preparación:

Calentar hasta disolver con agitación frecuente, distribuir en tubos de 13X100 mm con tapón de rosca y esterilizar a 15 libras, 121° C, durante 15 minutos. Se deja solidificar en forma inclinada.

CALDO BRUCELLA

Fórmula en gramos por litro de agua destilada

Peptona de caseína	10.0
Peptona de carne	10.0
Dextrosa	1.0
Extracto de levadura	2.0
Cloruro de sodio	5.0

Bisulfito de sodio

0.1

pH final 7.0 ± 0.2 **Preparación:**

Al medio se le agrega 0.01 g de L-cisteína, calentar hasta disolución, distribuir en tubos de 13 X 100 mm con tapón de rosca, esterilizar a 15 libras durante 15 minutos.

APENDICE 2**REACTIVOS****REACTIVO DE KOVAC**

Alcohol amílico o isoamílico	150.0ml
p-Dimetil aminobenzaldehído	10.0 g
HCl (concentrado)	50.0 ml

Preparación:

Disolver el aldehído en el alcohol y agregar lentamente el ácido. El reactivo debe ser de color amarillo; si el color es café, no deberá usarse.

Usos: Detección de indol.

REACTIVO PARA OXIDASA

Dimetilparafenilendiamina	1.0 g
Agua destilada	100.0 ml

Preparación:

Pesar la cantidad necesaria e impregnar tiras de papel filtro. Dejar secar las tiras y guardarlas en frasco ámbar a 4°C (estas tiras pueden usarse confiablemente de 15 a 20 días).

Usos: Detección de la enzima citocromo oxidasa.

REACTIVO PARA DETECCION DE CATALASA

Peróxido de hidrógeno	3.0 ml
Agua destilada	97.0 ml

Usos: Detección de la enzima catalasa.

CLORURO FERRICO

Cloruro férrico ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	12.0 g
HCl al 2.0%	100.0 ml

Usos: Reactivo que se agrega al suero fenilalanina para la determinación de la fenilalanina desaminasa.

HIPURATO DE SODIO

Acido hipúrico	0.1 g
Agua destilada	10.0 ml

Preparación:

Mezclar perfectamente y colocar 0.4 ml de la solución en tubos de 10 X 75 mm.

Usos: Para la detección de la enzima hipuricasa.

NINHIDRINA

Ninhidrina	0.175 g
Butanol	2.5 ml
Acetona	2.5 ml

Preparación:

A la ninhidrina se le agrega el butanol y la acetona y se mezcla perfectamente.

Usos: Poner de manifiesto la hidrólisis del ácido hipúrico por medio de la detección de glicina.

ACETATO DE PLOMO

Acetato de plomo	10.0 g
Agua destilada	50.0 ml

Preparación:

Disolver el acetato de plomo en el agua destilada hirviendo, mojar tiras de papel filtro, dejarlas secar y guardarlas en frasco ámbar en refrigeración.

Usos: Se emplea para detectar la producción de ácido sulfhídrico por la reacción de éste con el plomo.

ACRIFLAVINA

Acriflavina	1.0 g
Agua destilada	500.0 ml

Preparación:

Mezclar perfectamente y guardar la solución en frasco ámbar en refrigeración.

Usos: Para la aglutinación de las colonias de *E. coli.* y hacer la primera discriminación entre posibles patógenas y no patógenas.

SOLUCIÓN YODO-YODURADA PARA CALDO TETRATONATO

Yodo	6.0 g
Yoduro de potasio	5.0 g
Agua destilada	20.0 ml

Preparación:

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

Uso: Para adicionar de 1 a 2 gotas al caldo tetratonato, inmediatamente después de inocular la muestra.

VERDE DE METILO PARA AGAR DNAsa

Verde de metilo	0.5 g
Agua destilada	100.0 ml

Preparación:

Preparar una solución al 0.5% de verde de metilo. Lavarla en un embudo de separación con partes iguales de cloroformo por tres veces. Desechar el cloroformo y dejar la fase acuosa. Agregar 1.0 ml de esta solución por cada 100.0 ml de medio.

Usos: Colorante que se agrega al medio de detección de la enzima desoxirribonucleasa para ver el halo incoloro que marca la despolimerización del DNA

FORMALDEHIDO

Cloruro de sodio	34.0 g
Formaldehido	200.0 ml
Agua destilada	4000.0 ml

Preparación:

Mezclar perfectamente hasta disolución total y guardar en frasco ámbar.

Usos: Análisis coproparasitológico.

SULFATO DE ZINC

Sulfato de zinc	33.0 g
Agua destilada	100.0 ml

Preparación:

Mezcle perfectamente el sulfato de zinc, ajustar para obtener densidad de 1.180.

Usos: Análisis coproparasitológico.

CRISTAL VIOLETA**Solución A**

Cristal violeta	2.0 g
Alcohol etílico	20.0 ml

Solución B

Oxalato de amonio	0.8g
Agua destilada	80.0ml

Preparación:

Mezclar la solución A y la solución B, filtrar la mezcla y guardarla en frasco ámbar, no usarse antes de 24 horas.

Usos: Tinción de Gram.

LUGOL

Yodo	1.0 g
Yoduro de potasio	2.0 g
Agua destilada	300.0 ml

Preparación:

Triturar el yodo y el yoduro de potasio en un mortero, añadiendo al mismo tiempo unos mililitros de agua hasta disolución, llevar al volumen adecuado, conservar en frasco ámbar.

Usos: Tinción de Gram.

ALCOHOL - ACETONA

Alcohol etílico	300 ml
Acetona	100 ml

Preparación:

Mezclar perfectamente y guardar en frasco ámbar.

Usos: Tinción de Gram.

SAFRANINA

Safranina O (contenido seco 85%)	1.0 g
Agua destilada	100.0 ml

Preparación:

Mezclar perfectamente y guardar en frasco ámbar.

Usos: Tinción de Gram.

FUCSINA

Solución A

Solución B

Fucsina básica	0.3 g	Fenol fundido	5.0 ml
Etanol	10.0 ml	Agua destilada	95.0 ml

Preparación:

Mezclar perfectamente la solución A y la solución B y guardar en frasco

ámbar.

Usos: Se utiliza para la tinción de Gram modificada para *Campylobacter*, en lugar de la safranina.

AZUL DE METILENO DE LOEFFLER

Azul de metileno	1.0 g
Etanol 96%	10.0 ml

Preparación:

Mezclar perfectamente y guardar en frasco gotero.

Usos: Colorante para la tinción de citología de moco fecal.

SOLUCION AMORTIGUADORA DE FOSFATOS (PBS)

Fórmula por litro de agua destilada

Cloruro de sodio	7.66 g
Fosfato dibásico de sodio	0.724 g
Fosfato monobásico de potasio	0.210 g
pH final	7.2

SOLUCION AMORTIGUADORA PARA LISIS

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

CONTROL POSITIVO (para rotavirus)

Lisado SA111	2.0 ml
Mertiolate	0.5 ml

SOLUCION DE TRIS-EDTA CON FENOL

Fenol	120.0 g
Tris-EDTA. 10mM/1mM	100.0 ml

AGAROSA CON COLORANTE PARA CORRIMIENTO

Agarosa	0.5 g
Agua	33.0 ml
Xilen Cianol	0.2 ml

SOLUCION AMORTIGUADORA DE TRIS-GLICINA

Tris base	7.2 g
Glicina	34.6 g
Agua	cbp 300 ml

SOLUCION DE ETANOL-ACETICO

Etanol	287 ml
Acido acético	3 ml

SOLUCION DE NITRATO DE PLATA

AgNO₃	5.0 g
Agua destilada	30.0 ml

SOLUCION REVELADORA

Formaldehído 38%	0.8 ml
NaOH 3%	7.0 ml
Agua destilada	100.0 ml

APENDICE 3

Sueros para tipificación

Sueros ANTI *E.coli*.

Polivalente I Behring

Polivalente II Behring

Monovalentes contenidos en el Polivalente I

Anti-O119 K69	Behring
Anti-O26 K60	Behring
Anti-O86 K61	Behring
Anti-O114 K	Behring
Anti-O55 K59	Behring
Anti-O78 K80	Behring
Anti-O111 K58	DIFCO*

Monovalentes contenidos en el Polivalente II

Anti-O124 K72	Behring
Anti-O125 K70	Behring
Anti-O126 K71	Behring
Anti-O127 K63	Behring

* El suero DIFCO, se rehidrata en 3.0 ml de cloruro de sodio al 0.85%.

Sueros ANTI *Shigella*

Anti-S. <i>dysenteriae</i> tipo 1	Behring
Anti-S. <i>flexneri</i> polivalente	Behring
Anti-S. <i>sonnei</i> Glattform	Behring
Anti-S. <i>dysenteriae</i> tipo 2	Behring
Anti-S. <i>dysenteriae</i> tipo 3-7 polivalente	Behring
Anti-S. <i>sonnei</i> flachform	Behring
Anti-S. <i>boydii</i> 1-7	DIFCO
Anti-S. <i>boydii</i> 12-15	DIFCO

Sueros ANTI *Salmonella*

Suero S-1

Suero polivalente anti *Salmonella* de los grupos A hasta el I más Vi.

Suero S-2

Suero polivalente anti *Salmonella* de los grupos A hasta el E más Vi.

Suero S-3

Suero anti *Salmonella* grupo A.

Suero S-4

Suero anti *Salmonella* grupo B.

Suero S-5

Suero anti *Salmonella* grupo C1

Suero S-6

Suero anti *Salmonella* grupo C2

Suero S-7

Suero anti *Salmonella* grupo D.

Suero S-8

Suero anti *Salmonella* grupo E

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Diarrhoeal diseases control. Edit World Health Organization OPS (1986).
- 2.- Guerrant, R.L., Hughes, J.M., Lima, N.L. Diarrhea in Developed and Developing Countries: Magnitude, Special Settings and Etiologies. *Rev.Infec. Dis.* 12:41-50 (1990)
- 3.- Boletín Quincenal Cólera/Diarreas infecciosas. INDRE Secretaría de Salud México. Año 1 Número 6, p.p 8-12 (1991).
- 4.- Kumate J.
MANUAL DE INFECTOLOGIA.
7 edición.
Ediciones Médicas del Hospital Infantil de México.
México (1980).
- 5.- Balows A., Hausler W.J., Hermann K.L., Shadomy H.J.
MANUAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY.
Fifth edition.
American Society for Microbiology.
Washington D.C.,U.S.A. (1991)
- 6.- Cravioto A., Reyes R.E., Ortega R., Fernández G., Hernández R., López D. Incidencia y Etiología de la diarrea aguda durante los dos primeros años de vida de una cohorte de niños rurales. *Bol. Med. Inf. Mex.* 44:316/321 (1987)
- 7.- Basualdo, S., Ramírez, P., López, A. Recuperación de *Campylobacter sp* en relación con otros microorganismos clásicos causantes de diarrea en niños menores de dos años en la zona oriente de la Ciudad de México. *Laborat-Acta.* 1(2):15-18 (1989)
- 8.- Persistent Diarrhoea in Children in Developing Countries. Report of a WHO meeting, WHO.17:1-14 (1988)
- 9.- Jawets E., Melnick L., Adelberg E.A.
MICROBIOLOGIA MEDICA
13a.edición.
Editorial El Manual Moderno.
México (1990)
- 10.- Trabulsi, L.R., Toledo,M.R., Prado, V. *E.coli* enteropatógena. *Adel. Microbiol. Enf. Infecc.* 3,62:64-87 (1984)

- 11.- Levine, M.M. *Escherichia coli* that cause diarrhea: Enterotoxigenic, Enteropathogenic, Enteroinvasive, Enterohaemorrhagic and Enteroadherent. *J. Infect. Dis.* 155(3):377-388 (1987)
- 12.- Browne, R.M. Traditional enteropathogenic *Escherichia coli* of infantile diarrhea. *Rev. Infect. Dis* 9(1):28-53 (1987)
- 13.- Orskov, I., Orskov, F. Serology; Chemistry and genetics of O and K antigens of *Escherichia coli*. *Bact. Rev.* 41:667-710 (1977)
- 14.- Cravioto, A., Cross, J.R., Scotland, S.M., Rowe, B. An adhesive factor found in strains of *E. coli* belonging to the traditional infantile enteropathogenic serotypes. *Curr. Microbiol.* 3:95-99 (1979)
- 15.- Levine, M.M., Nataro, J.P., Karch, H., Baldini, M.M., Kaper, J.B., Black R.E. Clements M.L., O'Brien A.D. The diarrheal response of human some classic serotypes of enteropathogenic *E. coli* is dependent on a plasmid encoding an enteroadhesiveness factor. *J. Infect. dis* :152-550 (1985)
- 16.- De, S.N., Bhattacharga, K, Sarkar, J.k. A study of the pathogenicity of strains of bacterium coli from acute and chronic enteritis. *J. Pathol. Bacteriol.* 71:201-209 (1957)
- 17.- Smith, H.W, Gyles, C.L. The relationships between two apparently different enterotoxins produced by enteropathogenic strains of *Escherichia coli* of porcine origin. *J. Med. Microbiol* 3:387-401 (1970)
- 18.- Ryder, R.W., Wachsmuth, A.E. Buxton, D.F. Evans, M.L, Dupont, E, Mason, F.F. Infantile diarrhea produced by heat stable enterotoxigenic *Escherichia coli*. *N. Engl. J. Med.* 295:849-853 (1976)
- 19.- O'Brien A.D., Nataro, J.P.
New concepts in the pathogenesis of enteropathogenic *E. coli* diarrhea.
En: Schlessinger D.
Microbiology. ASM.
Washington (1985)
- 20.- Clements, J.D., Fintelstein, R.A. Isolation and characterization of homogens heat-labile enterotoxin with specific activity from *Escherichia coli* cultures. *Infect. Immun.* 24:760-769 (1979)
- 21.- Holmgren, J., Fredman, P., Lindbland, M. Svennerholm, A., Svennerholm, L. Rabbit intestinal glycoprotein receptor for *E. coli* heat labile enterotoxin lacking affinity for cholera toxin. *Infect. Immun.* 38:424-433 (1982).

- 22.- Dean, A.G., Ching, Y.C., Williams, R.C., Harden, L.B. Test for *Escherichia coli* enterotoxin using infant mice; application in study of diarrhea in children in Honolulu. *J. Infect. Dis.* 125:407-411 (1972)
- 23.- Hughess, J., Murad, F., Chang, B., Guerrat, R. Role of cyclic GMP in the action of heat-stable enterotoxin of *E. coli*. *Nature* 271:755-756 (1978)
- 24.- Greenberg, R.N., Guerrant, R.L. *E. coli* heat-stable enterotoxin. *Pharmac. Ther.* 13:507-531 (1981)
- 25.- Burgess, M.N., Bywater, R.J., Cowley, C.M., Mullan, N.A., Newsome, P.M. Biological evaluation of methanol soluble heat-stable *E. coli* enterotoxin in infants mice, pigs, rabbits. *Infect. Immun.* 21:526-531 (1978)
- 26.- Knutton, S., Mc Connell, M., Rowe B., and McNeish A. Adhesion and ultrastructural properties of human enterotoxigenic *Escherichia coli*. Producing colonization factor antigens III and IV. *Infect. Immun.* 57:3364-3371 (1989)
- 27.- Robins-Browne, R. Traditional enteropathogenic *Escherichia coli* of infantile diarrhea. *Rev. Infect. Dis.* 9:28-53 (1987)
- 28.- Mathewson, J.J., Johnson P.C., Du Pont H.L. A newly recognized cause of traveler's diarrhea. Enteroadherence *E. coli*. *J. Infect, Dis.* 151:471-475 (1985)
- 29.- Sereny, B. Experimental kerato conjuntivitis Shigellosis. *Acta microbial Acad. Sci. Hung* 4:367-76 (1957)
- 30.- Gross, R.J. *Escherichia coli* diarrhoea. *J. Infect.* 7:177 (1983)
- 31.- Riley, L.W., Remis, R.S., Helgerson, S.D., Mac Guee, H.B., Wells, J.G., Hervert, R.J., Olcott, E.S., Johnson, L.M., Hargret, N.T., Blake, P.A., Cohen, M.L. Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. *N. Engl. J. Med* 308:681-685 (1982)
- 32.- Konowalchuk, J., Speirs, J., Stauric, S. Vero Response to a cytotoxin of *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 18:(3) 775-779 (1977)
- 33.- Zepeda, M., Torres, J., Giono, S. Posible producción de dos citotoxinas por una cepa de *Escherichia coli*. *Bol. Med. Hosp. Infant. Mex.* 42(5):310-313 (1985)
- 34.- Johnson, W.M., Lior, H.L., Bezanson, G.S. Citotoxic *Escherichia coli* O157:H7 associated with haemorrhagic colitis in Canada. *Lancet*:76:409-510

(1983)

35.- Levine, M.M., Bergquist, E.J., Nalin, D.R., Waterman, D.H., Hornick, R.B., Young, C.R., Solman, S., Rowe, B. *Escherichia coli* strains that cause diarrhoea but do not produce heat-labile or heat-stable enterotoxins and are non-invasive. *Lancet* 1:1119-1222 (1978)

36.- O'Briend, A.D., Lively, M., Chen, E. *Escherichia coli* O157:H7. Strains associated with haemorrhagic colitis in the United States produce a *Shigella dysenteriae* 1(Shiga) Like Cytotoxin. *Lancet* I:702 (1983)

37.- Karmali, M.A., Fleming, P.C. *Campylobacter* enteritis B.S. (Lond), FRC. *Path J. CMA.*120:1525-1532 (1979)

38.- Véron, M., Chatelain, R. Taxonomic study of the genus *Campylobacter* Sebald and Véron and designation of the neotype strain for the type species, *Campylobacter fetus*. *J. Syst. Bacteriol.* 32:122-134 (1973)

39.- Thompson, L.M., Sminty, R.M., Johnson, J.L., Krieg, N.R. Phylogenetic study of the genus *Campylobacter*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 38:190-200 (1988)

40.- Neill, S.D., Campbell, J.N., O'Brien, J.J., Weatherup S.T., Ellis, W.A. Taxonomic position of *Campylobacter criophilica* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 35:342-356 (1985)

41.- Lori, A., Harris, J., Logan, S.M., Guerry, P. Antigenic variation of *Campylobacter* flagella. *J.* 169:5066-5071 (1987)

42.- Klipstein, F.A., Engert, R.F. Propriertes of crude *Campylobacter jejuni* heat-labile enterotoxin. *Infect. Immun.* 45:314-319 (1982)

43.- Lennette, E.H., Balows, S.A., Hausler, W.J., Shadomy H.J. **MANUAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY.**
Fourth edition.
American Society for microbiology.
Washington D.C. U.S.A. (1985)

44.- Bruce, D. Zoehowski, W. Ferguson, J.R. *Campylobacter* enteritis. *Br. Med. J.* 2:1219 (1977)

45.- Sack, R.B. Tilton, R.C. Weissfeld S.
CUMITECH 12 LABORATORY DIAGNOSIS OF BACTERIAL DIARRHEA.
Coordinating en. S.J. Rubin.
American Society for Microbiology.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

Washington. D.C (1980)

46.- Walker, R.I., Caldwell, M.B., Lee, E.C., Guerry, P., Trust T.J., Ruiz-Palacios, G.M. Pathophysiology of *Campylobacter* enteritis. *Microbiol. Rev.* 50:81 (1986)

47.- Mc Sweegan, E., Burr, D.H., Walker, R.I. Intestinal mucus gel and secretory antibody are barriers to *Campylobacter jejuni* adherence to INT 407 cells. *Infect. Immun.* 55:1431 (1987)

48.- Newell, D.C., McBride, H., Pearson, A.D. The identification of outer membrane proteins and flagella of *Campylobacter jejuni*. *J. Gen. Microbiol.* 130:1201 (1984)

49.- Skirrow. M.B., Fidue, R.G. An outbreak of presuntive food borne *Campylobacter enteritis*. *J. Infect.* 3:234-236 (1981)

50.- Finlay, B.B., and Falkow, S. *Salmonella* as an intracellular parasite. *Molec. Microbiol.* 3(12):1833-1841 (1989)

51.- Gianella, R.A., Gost, R.E., Chaney A.N. Pathogenesis of *Salmonella* mediated intestinal fluid secretions. *J. Gastroenterol.* 69:1238-1245 (1975)

52.- World Health Organization, Center for reference and research on *Salmonella*.

ANTIGENIC FORMULAE OF THE SALMONELLA

WHO International *Salmonella* Center, Institut Pasteur.
Paris (1980)

53.- Ewing, W.H.

IDENTIFICATION OF ENTEROBACTERIACEAE

Fourth edition.

Elsevier Science Publishers B.V.

N.Y. (1986)

54.- Barrett-Connor, E., and Connor, J.D. Extraintestinal manifestations of shigellosis. *Am. J. Gastroenterol* 53:234-245 (1970)

55.- Sansonetti, P.J.H., D'Hanteville, E., Ecobichon, C., and Pourcel, E. Molecular comparison of virulence plasmid in *Shigella* and enteroinvasive *E.coli*. *Ann Microbiol* 50:1-4 (1980)

56.- Sansonetti, P.J.H., Kopecko, J.A. and Formal, S.B. Involvement of a plasmid in the invasive ability of *Shigella flexneri*. *Infect. Immun.* 35:852-860 (1988)

57.- Gemski, P. and Formal, S.
SHIGELLOSIS AND INVASIVE INFECTION OF THE GASTROINTESTINAL TRACT. American Society of Microbiology.
Washington (1975)

58.- Formal, S., Gemski, P., Gianella, R., and Austin, S. Mechanics of *Shigella* pathogenesis. Am. J. Clin. 25:1427-1432 (1982)

59.- Gómez, B.D., González, S.N., y Pérez, E.J.
INFECTOLOGIA CLINICA PEDIATRICA.
4 edición.
Trillas .
México D.F. (1988)

60.- Donohue-Rolfe, A.G., Keusch, G.T., Edson, C.D., Thorley-Lawson, D., and Jacewicz, M. Pathogenesis of *Shigella* diarrhea. IX Simplified in high yield purification of *Shigella* toxin and characterization of composition and function by the use of subunit specific monoclonal and polyclonal antibodies. J. Exp. Med. 160:1767-1781 (1984)

61.- Prado, D.T., Clearly, L.K., Pickering, C.D., Ericson, A.V., Barlet III., Dupont, H.L., and Johnson, P.C. The relationship between cytotoxin production and clinical features in Shigellosis. J. Infect. Dis. 154:149-155 (1986)

62.- Popoff, M., Krieg, N., Holt, J. (ed.).
BERGEY'S MANUAL OF SYSTEMATIC BACTERIOLOGY.
Vol. 1 *Aeromonas* Kluver.
The Williams & Wilkins Co.
Baltimore (1984)

63.- Janda, J.M., and Duffey, P.S. Mesophilic aeromonads in human disease: current taxonomy, laboratory identification, and infectious disease spectrum. Rev. Infect. Dis. 10:980-997 (1988)

64.- Mellersh, A.R., Norman, P., and Smith, G.H. *Aeromonas hydrophila*: an outbreak of hospital infection. J. Hosp. Infect. 5:425-430 (1984)

65.- Reinhrsd, J.F., and W.L. George. Comparative *in vitro* activities of selected antimicrobial agents against *Aeromonas* species and *Plesiomonas shigelloides*. Antimicrob. Agents Chemother. 27:643-645.

66.- Burke, V., M. Gracey, J. Gracey . The Microbiology of childhood gastroenteritis: *Aeromonas* species and other infective agents. J. Infect. Dis. 148:68-75 (1983)

- 67.- Gracey M., Burke, V., Robinson, J. *Aeromonas* associated gastroenteritis. *Lancet* II:1304-1306 (1982)
- 68.- Sack, D.A., Chowdhury, K.A., Hung, J.A., Kay, B.A., and Sayeed, S. Epidemiology of *Aeromonas* and *Plesiomonas* diarrhea. *J. Diarrhea. Dis. Rev.* 6:107-112 (1988)
- 69.- Lawson, M.A., Burke and B.J. Chang. Invasion of Hep-2 cells by fecal isolates of *Aeromonas hydrophila*. *Infect. Immun.* 47(3):680-683 (1985)
- 70.- Ljungh, A., Wretling, H., and Moliyh, R. Toxins of *Aeromonas hydrophila*. *Acta. Path. Microbiol.* 89:309-315 (1982)
- 71.- Morris, J.G.
VIBRIO AND AEROMONAS IN INFECTIOUS DIARRHEA.
 Ed. S. Gorbach Blackwell. Scientific Publications.
 Boston Oxford (1986)
- 72.- Pitarangsi, Ch., Echeveria, P., Whitmire, R., and col. Enteropathogenicity of *Aeromonas hydrophila* and *Plesiomonas shigelloides*; Prevalence among individuals with and without diarrhea in Thailand. *Infect. Immun.* 15(2):666-673 (1982)
- 73.- Schubert, R.H.M. Krieg, N.R., Holt, J.G. (ed.).
BERGEY'S MANUAL OF SYSTEMATIC BACTERIOLOGY. .
 Vol. 1. *Plesiomonas*
 The Williams & Wilkins Co.
 Baltimore.(1984)
- 74.- Millership, S.E., and Chattopadhyay, B. Methods for the isolation of *Aeromonas hydrophila* and *Plesiomonas shigelloides* from faeces . *J. Hyg* 92:145-152 (1984)
- 75.- Desmond, E., Janda, J.M. Growth of *Aeromonas* species on enteric agars. *J. Clin. Microbiol.* 23:1065-1067 (1986)
- 76.- Holmberg, S.D., Wachsmuth, I.K., Hickman-Brenner, F.W., Blake, D.A., Farmer, J.J., *Plesiomonas* enteric infections in the United States. *Ann. Intern. Med.* 105:690-694 (1986)
- 77.- Kain, K.C., and Kelly, M.T., Clinical features, epidemiology, and treatment of *Plesiomonas shigelloides* diarrhea. *J. Clin. Microbiol.* 27:998-1001 (1989)
- 78.- Herrington, D. A., Tzipori, S., Robins-Browne, R.M., Tall, B.D., Levine, M., *In vitro* and *in vivo* pathogenicity of *Plesiomonas shigelloides*. *Infect. Immun.*

55:979-985 (1987)

79.- Graevenitz, V., Sakazaki, R., New O and H antigens and additional serovars of *Plesiomonas shigelloides*. J. Med.Sci. Biol. 38:73-76 (1985)

80.- Graevenitz, V. A., and Bucher, C. Evaluation of differential and selective media for isolation of *Aeromonas* sp and *Plesiomonas* sp. from human feces. J.Clin. Microbiol. 17:16-21 (1983)

81.- Brenden, R.A., Miller, M.A., Janda, J.M. Clinical disease spectrum and pathogenic factors associated with *Plesiomonas shigelloides* infections in humans. Rev. Infect. Dis. 10:303-316 (1988)

82.- Wolfe, M.S. Current concepts in parasitology: giardiasis. N. Engl. J. Med 298:319-321 (1978)

83.- Jones, J.E. Balows, W.J., Hausler, M. Ohashi, A. and Turano, A. (ed).
LABORATORY DIAGNOSIS OF INFECTIOUS DISEASE.
Vol. 1. Giardiasis.
Springer-Verlag.
New York (1988)

84.- Dileep, G., Porter, W.W. La giardiasis en las guarderías infantiles de Tucson, Arizona, E.U.A., Bol. Ofic. Sanit. 5:421-427 (1982)

85.- Bertram, M.A., Meyer, E.A., Lile, J.D., Morse, S.A. A comparison of isozymes of five axenic *Giardia* isolates. J. Parasitol. 69:793-801 (1983)

86.- Meloni, B.P., Thompson, R.C., Comparative studies on the axenic *in vitro* cultivation of *Giardia* of human and canine origin: evidence for intraspecific variation. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 81:637-640 (1987)

87.- Walsh J.A. Problems in recognition and diagnosis of amebiasis: estimation of the global magnitud of morbidity and mortality. Rev Infect Dis. 8:228-237 (1986)

88.- Carrada-Bravo, T. Amibiasis invasora: avances y perspectivas. Rev. Mex. Ped. 54:165-175 (1987)

89.- Gutiérrez, G. Investigaciones mexicanas sobre vacunas. Amibiasis. Epidemiología. 2:125-133 (1987)

90.- Martínez-Palomo A.
AMIBIASIS.
Editorial Médica Panamericana.

México, D. F. (1989)

91.- Gutiérrez, G. Amibiasis intestinal. *Epidemiología* 6:57-71 (1991)

92.- Gutiérrez, G., Muñoz, O. Amibiasis. Su epidemiología hoy. *Rev. Gastroenterología* 54:145-156 (1989)

93.- Arredondo, J. L. Diarrea en el recién nacido. *Bol. Med. Hosp. Infant. México.* 44:360 (1987)

94.- Espejo, R.T. Estudio sobre la etiología de las diarreas por Rotavirus, Adenovirus y otros virus enteropatógenos. Multicentro O.M.S. Segundo seminario internacional sobre enfermedades e hidratación oral (1987)

95.- Brandt, C.D., Kim, H.W., Rodríguez, W.J., Arrobio, J.O., Jeffries, B.C., Stallings, E.P., Lewis, C., Miles, A.J., Chanock, R.M., Kapikian, A.Z., and Parrot, R.H. Pediatric viral gastroenteritis during eight years of study. *J. Clin Microbiol* 18:71-78 (1983)

96.- Kapikian, A.L., Kim, H.W., Wyatt, R.G., Cline, W.L., J.O., Arrobio, Brandt, C.D., Rodríguez, W.J., Sack, D.A., Chanock, R.M., Parrot, R.H. Human reovirus-like agent as the mayor pathogen associated with winter gastroenteritis in hospitalized, infant and young children. *N. Engl. J. Med* 294:965-972 (1988)

97.- Siegel, S.
ESTADISTICA NO PARAMETRICA.
Editorial Trillas.
México, D.F (1978)

98.- Black, R.E., Merson, M.H., Huq, I., Alim, A., Yunus, M.D. Incidence and severity of rotavirus and *Escherichia coli* diarrhoea in rural Bangladesh. *Lancet*, 1:141 (1981)

99.- Ruíz-Morales A.
CARACTERIZACION ANTIGENICA Y MOLECULAR DE UN ROTAVIRUS PORCINO YM, EL CUAL ES UN POSIBLE NUEVO SEROTIPO DE ROTAVIRUS.

Tesis para obtener el título de Maestro en Microbiología.
U.N.A.M., FES Cuautitlán.
México, 1988.

100.- Bishop, R.F., Davidson, G.P., Holmes, I.H., Ruck, B.J. Virus particles in epithelial cells of duodenal mucosa from children with viral gastroenteritis. *Lancet*, 2:1281-1283 (1973)

101.- Mebus, C.A., Wyatt, R.G., Kapikian, A.Z. Pathology of diarrhea in gnotobiotic calves induced by the human reovirus-like agent of infantile gastroenteritis. *Vet.Pathol* 14:273 (1977)

102.- Kepikian, A.Z., Chanock, R.M.

ROTAVIRUSES.

En: Fields B.N.,(ed): *Virology*.

Raven Press.

New York (1990)

103.- Holmes, I.H., Ruck, B.J., Bishop, R.F., Davidson, R. Infantile enteritis viruses: morphogenesis and morphology. *J. Virol* 16:937 (1975)

104.- Hernández, C., Galicia, O., Muciño, L. Equipo para el diagnóstico de Rotavirus elaborado por la Gerencia General de Biológicos y Reactivos. *Bioquímica* 3, XV1 (6):24-26 (1991)

105.-Vega - Franco, L., Berrout, J., Alamis, J. Predicción Etiologica de la diarrea mediante la identificación de leucocitos en la heces *Bol.Med.Hosp.Inf.XXX1* (5):879-885 (1974).

106.- Calubiran, O.V., Domenico, P., Klein, N.C., Cunhas, B.A. Importancia de leucocitos fecales en enfermedad infecciosa. *Infectología* 9:547-550 (1990)

107.- Muñoz, O., Coello, R., Serafín, A. Gastroenteritis infecciosa aguda. Etiología y su correlación con las manifestaciones clínicas y moco fecal. *Arch. Invest. Med. Mex.*10:135-136 (1979)

108.- Hullan, S., Guang-Zhenm, L., Mathan, M., Mathew, M., Olarte, J., Espejo, R., Chin Maung U., Gnafoor, M.A., Khan, M.A., Sami, Z., Sutton, R.G. Etiology of acute diarrhoea among children in developing countries: a multicentre study in five countries. *WHO Bulletin OMS. Vol.69(5)* 549-55 (1991)

109.- Calva, J.J., Ruíz-Palacios, G.M., López-Vidal A.B., Ramos A., Bojalil R. Cohorte study of intestinal infection with *Campylobacter* in mexican children. *Lancet* 1:503-505 (1988)

110.-Ramírez M.T.

RECUPERACION DE *CAMPYLOBACTER SP* EN RELACION CON OTROS MICROORGANISMOS CAUSANTES DE DIARREA EN NIÑOS MENORES DE DOS AÑOS EN LA ZONA ORIENTE DE LA CIUDAD DE MEXICO.

Tesis para obtener el título de Q.B.P.

Universidad Autónoma de Guerrero (1989)