

2003

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO



FACULTAD DE QUIMICA

AGENTES ETIOLOGICOS DE DIARREA INFECCIOSA AGUDA EN UNA COMUNIDAD URBANA DEL SUR DE LA CIUDAD DE MEXICO



EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUIMICA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A :

MARIA GUADALUPE SOTO DOTOR

MEXICO, D. F.

1994



TESIS CON FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis 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.

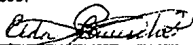
Jurado asignado

Presidente *Profra. Elda Peniche Quintana*
Vocal *Profra. Beatriz Luna Millán*
Secretario *Prof. Raúl Garza Velasco*
1er. Suplente *Profra. Adriana Gpe. Mejía Chávez*
2º Suplente *Profra. Maite Astigarraga Zavaleta*

Sitio donde se desarrolló el tema:

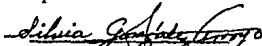
Unidad de Investigación Clínica en Enfermedades Infecciosas y Parasitarias del IMSS (U.I.C.E.I.P). Ubicada en el Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional Siglo XXI, Av. Cuauhtémoc No. 330, C.P. 06725, México, D.F.

Asesor



Q.F.B. Elda Peniche Quintana

Supervisor Técnico



Q.F.B. Silvia González Arroyo

Sustentante



Marta Guadalupe Soto Dotor

A Dios

*Por permitirme disfrutar de la
vida y de su infinito amor.*

A mis Padres

*Benito y Trinidad, con admiración,
respeto y amor, que con su ejemplo,
de esfuerzo, dedicación y amor han
logrado que llegue a la meta deseada.*

A mis Hermanos

*Teresa, Roberto, Benito, Lilia,
Marisela, Patricia, Araceli y
Gerardo, por su cariño, su ayuda
y por todos esos momentos que
hemos compartido juntos.*

A mis Sobrinos

*Esperando que algún día logren
terminar una carrera profesional
y siempre tengan deseos de
superarse.*

A mis Profesores

*Por todos los conocimientos que me
otorgaron al paso del tiempo, que
fueron la base de mi formación como
estudiante y profesionalista.*

A mis amigos

*Por su estímulo y apoyo
durante la realización de este
este trabajo.*

CONTENIDO

INTRODUCCION

OBJETIVOS

I.- GENERALIDADES

1.1.- SINDROME DIARREICO

1.2.- AGENTES ETIOLOGICOS

1.2.1.- SHIGELLA

1.2.2.- SALMONELLA

1.2.3.- YERSINIA

1.2.4.- AEROMONAS

1.2.5.- CAMPYLOBACTER

II.- PARTE EXPERIMENTAL

1.- MATERIAL

1.1.- DE LABORATORIO

1.2.- EQUIPO

1.3.- MEDIOS DE CULTIVO

1.4.- REACTIVOS

1.5.- BIOLÓGICO

2.- METODOLOGIA

2.1.- MUESTRAS BIOLÓGICAS

2.2.- EXAMEN MACROSCÓPICO Y MICROSCÓPICO

2.3.- COPROCULTIVO

III.- RESULTADOS

IV.- DISCUSION

CONCLUSIONES

V.- BIBLIOGRAFIA

INTRODUCCION

Se define como diarrea al aumento en el contenido líquido de las evacuaciones y que, en general, sean más de tres veces al día. La disentería se define como la presencia de evacuaciones de escaso volumen, predominantemente formadas por moco y sangre.

La Diarrea Infecciosa Aguda o Gastroenteritis continúa siendo una de las principales causas de morbilidad y mortalidad de los países en desarrollo, sobre todo en los lactantes, considerándose importante determinar su etiología para un tratamiento más adecuado. En 1970 sólo se reportaba un 20% de frecuencia de aislamiento; actualmente, con la utilización de nuevas técnicas, se ha incrementado hasta un 80%, dándose a conocer nuevos agentes etiológicos potencialmente patógenos en la gastroenteritis. Es por tal razón que se planeó este trabajo, que formó parte integral del proyecto: Implantación de Normas Terapéuticas para el Manejo de Diarrea Infecciosa Aguda en el Primer Nivel de Atención Médica. Para este proyecto se seleccionaron dos unidades médicas de primer nivel de atención del IMSS, localizadas en el sur de la Cd. de México. Sólo se reportaron los datos obtenidos de las muestras tomadas en la Clínica No. 19, ubicada en la Delegación Coyoacán, en donde atienden predominantemente a personas de nivel socioeconómico medio.

Para la investigación se incluyeron a todos los pacientes que acudieron a los servicios de consulta externa en el primer nivel de atención, con diagnóstico de Diarrea Infecciosa Aguda o Disentería. Se considera como primer nivel de atención, a la consulta médica o a los servicios médicos preventivos que se otorgan en la clínica.

OBJETIVOS

Determinar la frecuencia de algunos agentes etiológicos de diarrea aguda en un grupo de pacientes de consulta externa en una Unidad Médico Familiar.

Determinar la frecuencia de los mismos microorganismos en un grupo de pacientes sin diagnóstico de diarrea.

Determinar la presencia de leucocitos en el moco fecal de todos los pacientes sin y con diarrea aguda.

I.-GENERALIDADES

I.1.- SINDROME DIARREICO.

A través de la historia de la humanidad, han existido problemas de gran magnitud, provocados por las grandes epidemias del cólera, la disentería y diarreas en general: este grupo de padecimientos denominados en la actualidad " Síndrome diarreico ", originaron una elevada morbilidad y mortalidad en todo el mundo hasta finales del siglo XIX. en el presente siglo el problema se fue resolviendo en los países industrializados durante los primeros 15 años, al elevarse los niveles generales de vida en las sociedades de dichos países. En contraste con los países en desarrollo, en donde las enfermedades diarreicas de origen infeccioso todavía representan uno de los principales problemas de salud pública (55), mostrando una morbilidad excesivamente elevada (54). Cálculos de la Organización Mundial de la Salud (OMS) indican que cada año, aproximadamente 750 millones de menores de 5 años de edad, enferman de diarrea aguda (DIA) en Asia, Africa y América Latina (25,11). Se reporta que en 1983, fallecieron 5 millones de niños menores de 5 años (48) contrastando con los bajos porcentajes presentados, desde años anteriores en algunas naciones, donde han habido avances notables en este campo, como es el caso de Estados Unidos, Canadá, Puerto Rico y Cuba (73). En 1992 el porcentaje sigue siendo elevado con un promedio de 3.2 millones de muertes en niños menores de 5 años alrededor del mundo (63) y 5-10 millones de muertes relacionadas con diarrea entre los 3 billones de gentes que viven en Africa, Asia y América Latina (40).

En la República Mexicana, en el transcurso de los últimos 55 años, la morbimortalidad por diarrea ha disminuído en forma sostenida. Sin embargo, a pesar de la considerable disminución en las defunciones informadas entre 1960 y 1980 (cuadro I), se puede observar que el porcentaje de muertes en menores de un año, se

incrementó de 44 a 56%, y si se comparan las tasas de mortalidad observadas por diarrea con las de los otros países (cuadro II), se puede apreciar que en 1990 este problema seguía siendo muy importante ya que ocupaba un tercer lugar dentro de los países latinoamericanos (5). La DTA, ocupa el segundo lugar en morbilidad con 3,204,419 casos notificados en 1985 (25), en 1991 se incrementó este número a un total de 11,715,000 casos en niños <5 años con un promedio de 4.5 episodios diarreicos por niño por año. La O M S reportó en 1992 52,718,000 episodios diarreicos en niños <5 años (76), constituyendo la segunda causa más frecuente de consulta médica a esta edad (49). Actualmente se sabe que en la población atendida por el Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), las diarreas representan una de las primeras causas de consulta médica y ausentismo al trabajo (55,73).

En los últimos años, la OMS y el Fondo de las Naciones Unidas para la Infancia (UNICEF) han tratado de disminuir la morbilidad y mortalidad por diarrea, logrando avances importantes al determinar los agentes causales, sus mecanismos de patogenidad y trastornos fisiopatológicos que caracterizan el síndrome diarreico (60).

Por tal razón, es importante el esclarecimiento de la etiología de la diarrea aguda, la cual ha seguido un proceso lento. Hasta 1960 sólo podía determinarse en aproximadamente 20% de los casos, reconociéndose como agentes causales a un número pequeño de microorganismos como: Shigella, Salmonella, E. coli enteropatógena (ECEP), Vibrio cholerae y E. histolytica. Sin embargo, en las últimas dos décadas, en base a las investigaciones realizadas y al desarrollo de nuevas técnicas de diagnóstico, se identificaron nuevos agentes infecciosos como: Rotavirus, cepas enterotoxigénicas, enteroinvasivas, enterohemorrágicas y enteroadherentes de E. coli, Vibrio parahaemolyticus, Campylobacter jejuni/coli, Yersinia enterocolitica,

Clostridium difficile, *Cryptosporidium spp* y otros agentes bacterianos y virales menos comunes (3). Siendo posible identificar actualmente al agente etiológico en más del 60% de los casos (47).

Diversos estudios nacionales e internacionales han mostrado una proporción variable de los agentes patógenos mencionados cuadros III (3), IV (58,42,73,21) y V(19,38,8,78). Estas variaciones pueden depender de numerosos factores como son: la edad de los niños, el rigor clínico con que se establezca el diagnóstico de diarrea, la selección de los pacientes, el tiempo de evolución del padecimiento en el momento mismo de realizar el estudio, cambios epidemiológicos y estacionales de los distintos agentes infecciosos, posibles variaciones de la virulencia de los microorganismos, por último, diferencias en la calidad, especificidad y sensibilidad de las distintas técnicas microbiológicas que se utilicen (54).

Se han realizado estudios concernientes a la importancia de virus y bacterias en niños con gastroenteritis en diversas ciudades, particularmente en ciudades industrializadas. Rotavirus en un 58%, ha sido la mayor causa de diarrea (74), a diferencia de las ciudades en desarrollo, en donde la mayor frecuencia de aislamiento corresponde a los agentes bacterianos, encontrándose sobre el 45% (47,70). Más investigaciones se han enfocado a pacientes menores de edad hospitalizados y pocas a pacientes no hospitalizados (74). Los pacientes que asisten a un hospital, generalmente presentan diarreas con complicaciones, observándose un sesgo hacia las formas más graves, por lo que las proporciones obtenidas no son necesariamente representativas de lo que ocurre en población abierta, donde la mayoría de los casos, son diarrea de curso leve o moderado, sin complicaciones (47). En esta situación conviene efectuar estudios de prevalencia de los distintos agentes en diferentes áreas, y en pacientes no hospitalizados. La información epidemológica,

que proporcionan estos estudios es necesaria para integrar el panorama de la etiología de la diarrea aguda en nuestra población (28,47).

CUADRO 1. DEFUNCIONES POR DIARREA Y GRUPOS DE EDAD EN LA REPUBLICA MEXICANA

GRUPO/AÑO	1960	1980
1 AÑO	44.0%	68.0%
1-4 AÑOS	35.0%	20.0%
5 AÑOS	21.0%	24.0%

Fuente: Dirección General de Estadística (48).

CUADRO II. TASA DE MORTALIDAD POR DIARREA

(A)

PAIS	1970-1975	1975-1980	1980-1985	1985-1990
Argentina	1.51	0.98	0.50	0.31
Belice	2.95	2.86	1.11	0.86
Brasil	---	4.82	3.02	1.94
Colombia	4.77	3.98	1.56	---
Costa Rica	3.30	1.16	0.37	0.27
Cuba	0.87	0.37	0.24	0.18
Chile	2.79	1.19	0.31	0.17
República Dominicana	7.57	4.73	3.01	---
Ecuador	8.20	7.54	4.65	3.53
El Salvador	9.88	---	4.09	---
Guatemala	10.90	9.35	7.46	---
Honduras	11.29	8.57	6.56	---
Jamaica	2.51	1.99	1.32	---
México	5.97	4.25	2.69	2.17
Nicaragua	10.96	9.83	---	---
Panamá	2.23	1.45	0.70	0.66
Paraguay	3.92	4.50	2.95	2.36
Perú	8.28	7.80	5.50	---
Uruguay	1.16	1.03	0.61	0.31
Venezuela	3.31	2.27	1.55	1.08

(A) no. de muertes por 1000 habitantes entre 5 años de edad (5).

CUADRO III.**FRECUENCIA DE AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS EN NIÑOS
CON Y SIN DIARREA AGUDA**

AUTORES	CASOS POSITIVOS	CASOS POSITIVOS	CASOS POSITIVOS
	CON DIARREA %	CON INF. MIXTA CON DIARREA %	SIN DIARREA %
DONTA Y COLABORADORES *	58.0	10.0	4.0
PICKERING EN HOUSTON	54.9	2.7	5.3
PICKERING EN MEXICO	58.5	4.7	7.1
GUERRANT Y COLABORADORES	53.3	17.7	41.0
MUÑOS Y COLABORADORES	59.8	7.0	11.3
ALVARADO Y COLABORADORES	88.0	36.0	30.0

* No se investigaron agentes virales
México, 1985 (3).

CUADRO IV.
FRECUENCIA DE MICROORGANISMOS ENTEROPATOGENOS
EN NIÑOS CON DIARREA AGUDA EN LA
REPUBLICA MEXICANA

MICROORGANISMOS	1978	1985	1988	1991
	PICKERING D. F. (N=438) %	MATHEWSON GUADALAJARA (N=154) %	OLARTE D. F. (N=—) %	GIRON CHIAPAS (N=63) %
Rotavirus	17	1.3	12 a 20	0
Adenovirus	1	**	4	**
SR virus	**	**	5	**
<u>Escherichia coli:</u>				
EPEC	7	21.4	10 a 22	17.2
EPEC	**	4.5	5 a 10	**
EIEC	1	**	1	0
<u>Campylobacterium</u>	**	5.8	12 a 15	25.9
<u>Shigella sp.</u>	14	6.5	8 a 12	6.9
<u>Salmonella sp.</u>	12	1.3	2 a 6	0
<u>Giardia lamblia</u>	1	4.5	2 a 6	**
<u>Entamoeba histolytica</u>				
(trofozoitos)	2	3.9	1	**
<u>Cryptosporidium</u>	**	2.6	2	**
Desconocidos	40	20.8	30 a 35	41.3
Infecciones multiples	3.6	***	15 a 20	8.7

** Microorganismo no estudiado

*** Dato no reportado

EPEC =E. coli enterotoxigénica

EPEC =E. coli enteropatógena

EIEC =E. coli enteroinvasiva

CUADRO V.
FRECUENCIA DE AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS
ENTEROPATOGENOS EN NIÑOS CON DIARREA DURANTE 1992

MICROORGANISMOS	% DE AISLAMIENTO			
	FITZROY BANGLADESH (N =363)	CABRITA ITALIA (N =2811)	ZAMAN-R ARABIA (N =217)	LANATA PERU (N =677)
ROTAVIROS	3.9	**	**	12.5
<i>Escherichia coli:</i>				
ETEC	8.8	**	**	20.8
<i>Shigella</i> spp	9.7	4.6	4.2	4.2
<i>Salmonella</i> spp	0.4	14.8	5.2	0
<i>Campylobacter</i> spp	1	5.3	4.5	20.8
<i>Aeromonas</i> spp	8.8	**	**	8.3
<i>Yersinia</i> spp	**	1.1	**	**
<i>G. lamblia</i>	9.9	**	**	16.7
<i>E. histolytica</i>	0.7	**	**	**
<i>Cryptosporidium</i> spp	**	**	**	8.3

** Microorganismos no estudiados

ETEC =E. coli enterotoxigénica

1.2.- AGENTES ETIOLOGICOS.

1.2.1.- Shigella spp.

Entre 1898 y 1901, Shiga en el Japón, Flexner en las Filipinas y Kruse en Alemania, demostraron el papel de Shigella en las diarreas y disenterías (26). Shigella continúa siendo una causa común e importante de diarrea, principalmente en escolares en todo el mundo, causando más problemas en países en desarrollo, porque la enfermedad tiende a hacerse más severa por la deshidratación de los individuos, además puede provocar grandes epidemias.

Desde 1972 la mayoría de los brotes que se presentan en los grandes centros de salud en los Estados Unidos se deben a Shigella. El primero de estos casos de shigelosis lo reportó el Centro para el Control de las Enfermedades de Atlanta (CDC) (62,26). América Central, Bangladesh, África Central y Sur de Asia han sufrido recientes pandemias; en Guatemala se estimaron 120,000 casos y 12,000 muertes durante un período de 12 meses (62,68).

La shigelosis es universal, mostrando una incidencia que puede variar del 5 al 20% aproximadamente. En México, en 1986 se encontró Shigella del 10 al 13% en los casos de diarrea en niños. Por lo general, la transmisión de la infección es directa de hombre a hombre, esto es posible por el pequeño inóculo requerido (10^1 - 10^2 microorganismos), por esta razón es difícil de controlar, así como también por la presencia de infecciones inaparentes, su diseminación a otros centros de salud cuando un niño es transferido, y su diseminación hacia la comunidad aún después de la recuperación del paciente (54,55,50,62). Ocasionalmente se presentan estos brotes epidémicos por contaminación con Shigella a fuentes comunes como el agua y los alimentos. Las epidemias por Shigella en el trópico se han atribuido a la transmisión a partir de heces infectadas, transportadas en las patas de las moscas (62).

Los miembros del género Shigella son el prototipo de microorganismos invasivos que producen disentería . Si bien estos microorganismos son muy importantes como causa de infecciones gastrointestinales, rara vez producen otro tipo de infecciones (39). La enfermedad típica puede presentarse en dos fases, en la primera se presentan los síntomas característicos de la enfermedad que terminan con la aparición de sangre y moco en las heces; en la segunda fase se multiplica el microorganismo a través de la mucosa del colon hasta provocar una respuesta inflamatoria y la muerte de las células que pueden contribuir a la formación de úlceras (62), el periodo de incubación es de 36 a 72 horas.

El enfermo presenta fiebre alta, molestias abdominales y, en ocasiones, vómito. La diarrea es inicialmente líquida y abundante, pero luego puede disminuir mostrando moco, sangre y leucocitos polimorfonucleares (PMN) en las evacuaciones, presentándose el cuadro clínico como una verdadera disenteria (54,7). El curso de la shigelosis es extremadamente variable. Los niños tienden a tener infecciones leves, que duran no más de tres días, pero los síntomas en los adultos persisten a veces por 7 días. Durante 3 o 4 semanas pueden presentarse recidivas (22).

Se requieren por lo menos 3 factores de virulencia para que Shigella cause la enfermedad: presencia de un antígeno de pared celular de naturaleza lipopolisacárido; capacidad de invadir y proliferar en las células epiteliales y liberación de una toxina después de la invasión a la célula (62,53,46,13). Las shigelas invaden las células de la mucosa, causando la muerte y desprendimiento de éstas hacia el lumen intestinal, rara vez invaden más allá de la mucosa (39). Las cepas virulentas primero colonizan temporalmente el intestino delgado presentándose en el enfermo los síntomas clásicos; posteriormente, la colonización

de la bacteria se extiende hacia el intestino grueso, invadiendo las células epiteliales, la multiplicación intracelular produce la muerte de las células invadidas, en la última fase invade mucosa y submucosa llegando a diseminarse dentro del tejido conjuntivo de la lámina propia, dando inicio a una respuesta inflamatoria con la infiltración de PMN y cambios vasculares, esta etapa de acumulación de metabolitos y liberación de endotoxinas, conduce a la formación de úlceras. En ocasiones las células del infiltrado inflamatorio en la lámina emigran al epitelio de la cripta, bloquean su luz e inician la formación de abscesos (68,51,66,73).

Shigella spp y E. coli enteroinvasiva (ECEI) comparten un plásmido de 120 - 140 MDa que permiten a la bacteria penetrar a la mucosa intestinal del colon (72). Las formas más graves de disentería las origina S. dysenteriae tipo I, que además del poder invasor, elabora una enterotoxina, la toxina de Shiga (54,62,31). que produce diversos efectos: Parálisis lumbar en animales inferiores (Neurotóxica), muerte de las células en cultivos de tejido (Citotóxicos); estimulación de secreción intestinal (Enterotóxica). Actualmente se ha determinado que otras especies o serotipos de Shigella producen una toxina semejante a la de Shiga en menor concentración (62,59). diversos grupos de investigadores han demostrado que la toxina de Shiga inhibe la síntesis de proteínas en células eucariontes (53).

Las especies de Shigella están estrechamente relacionadas en la secuencia de pares de bases del DNA con E. coli, presentando de un 70 a 100% de hibridación considerándose por esto taxonómicamente, como miembros de la tribu I Escherichiae (39,50). En el Manual de Bergey se clasifican en la sección 5, como el género II de la familia I, Enterobacteriaceae (35). Se conocen 4 especies de Shigella: S. dysenteriae, S. flexneri, S. boydii y S. sonnei (39), que serológicamente corresponden a los grupos A, B, C, D, dentro de los cuales se encuentran más de

40 serotipos basados en las características de sus antígenos somáticos "O" (53). Algunos estudios muestran que las especies flexneri y sonnei, predominan más frecuentemente y que las especies boydii y dysenteriae se aíslan en menor proporción (72,59).

El mejor método de obtención para cultivar esta bacteria, es utilizar un hisopo rectal para aumentar la probabilidad de aislamiento por ser un microorganismo intracelular, en la práctica se utilizan más comunmente muestras fecales recién emitidas, (no más de 2 horas). La presencia de PMN en la muestra, se utiliza como prueba presuntiva de identificación (75), recordando que el hallazgo de PMN se relaciona con la localización anatómica y el grado de inflamación de la mucosa (50), en el caso de este microorganismo el tipo de lesión ocasionada en el intestino delgado contribuye a la formación de un gran número de leucocitos fecales (41), por lo que pueden encontrarse en mayor cantidad en pacientes con shigelosis, que en pacientes con salmonelosis, fiebre tifoidea, disentería amibiana y diarrea ocasionada por E. coli invasiva. Con el método del moco fecal pueden contarse hasta más de 50 células por campo en infecciones ocasionadas sobre todo por Shigella dysenteriae tipo I, la técnica se realiza con muestras de heces o hisopos rectales con una pequeña cantidad de moco a la que se le adiciona azul de metileno para examinarla a través del microscopio y observar claramente los núcleos de los leucocitos (75). Los métodos para el aislamiento de Shigella son ampliamente aprovechados alrededor del mundo (62). Los miembros de este género dentro de las enterobacterias, son los menos reactivos bioquímicamente, inmóviles, fermentan la glucosa sin producción de gas, reducen los nitritos, no fermentan la lactosa en 24 horas y presentan otras reacciones bioquímicas características de este género.

La identificación de las especies de Shigella es importante por sus implicaciones clínicas y epidemiológicas. Tres pruebas bioquímicas son útiles en la separación de las especies, Manitol, Ornitina y ONPG, pero aunque 2 especies son bioquímicamente distintas, las otras dos son iguales, por esta razón y debido a que pueden presentar reacciones cruzadas con E. coli y otras Enterobacterias, la determinación de los grupos serológicos es esencial para la identificación de las especies (39,75).

1.2.2.- Salmonella spp

La participación de Salmonella en las enfermedades diarreicas humanas es variable, siendo inferior a Shigella spp (72,42); en México se encuentra una frecuencia de aislamiento en niños del 2 al 6% aprox (55). La fuente de contagio, además de la materia fecal, pueden ser los alimentos de origen animal (75). En el caso de la salmonelosis en México, al igual que en muchos otros países, se ha demostrado que una extensa variedad de animales (pollos, reses, cerdos etc.) se encuentran infectadas o son portadores de un sinnúmero de serotipos de Salmonella patógenos tanto para el hombre como para los propios animales (73). Los serotipos asociados a diarrea se encuentran principalmente en animales de granja.

En 1984, un brote de diarrea severa en Estados Unidos fue ocasionado por S.newport, ésta se encontró en una manada de reses, alimentadas con dosis subterapéuticas de un antimicrobiano en promoción, lo que demostró la resistencia del microorganismo hacia las drogas (62). Algunos investigadores han determinado la presencia de Salmonella spp en aderezos para ensaladas fabricados industrialmente, en vegetales congelados y en una gran variedad de alimentos preparados con vegetales cocidos. García-Villanova y col. aislaron diversos serotipos de Salmonella en aguas residuales de ríos y lagos, en cosechas irrigadas

con estas aguas y en materia fecal humana de pacientes con diarrea, determinando una mínima relación entre los serotipos aislados de estas aguas y los que causaron infección humana. La contaminación por irrigación de agua; el consumo de animales; la falta de higiene de los manejadores de alimentos y el proceso industrial de vegetales en el mercado contribuyen a la transmisión de Salmonella (20). La participación del hombre en este tipo de infección es importante, porque pueden existir portadores; en tal caso, el estado de portador suele prolongarse por semanas, meses y aún años, con eliminación intermitente del microorganismo en las evacuaciones (73). Niños con 5 meses de edad han llegado a ser portadores de Salmonella hasta dos años (74).

Miembros del género Salmonella son agentes causales de infección, que fluctúa entre gastroenteritis leve de corta duración, gastroenteritis severa con y sin septicemia y fiebre tifoidea (39). El período de incubación del bacilo varía de 8 a 36 horas (54). La presentación típica de gastroenteritis por Salmonella se limita a diarrea acuosa, con náusea, dolor abdominal y fiebre (62), en ocasiones se presenta vómito y diarrea con sangre (71). Aproximadamente el 5% de los niños manifiestan materia fecal con sangre, moco y presencia de leucocitos polimorfonucleares (PMN) en las heces, siendo indistinguible de S. dysenteriae. La bacteremia particularmente en niños menores de 3 meses de edad o en hospederos debilitados puede acompañarse de diarrea debida a algunos serotipos de Salmonella enteritidis (62). Los síntomas clínicos pueden variar, de acuerdo con los diferentes serotipos del patógeno y el estado de salud del paciente (75).

La patogénesis de la enfermedad ha sido bien estudiada en animales inferiores. Después de la ingestión y tránsito a través del estómago, el microorganismo invade el intestino delgado y colon. Como un paso inicial,

Salmonella se adsorbe en el borde en cepillo de los enterocitos, después entra a la célula por un mecanismo semejante a la pinocitosis, en este proceso las microvellosidades inicialmente son destruidas y después reparadas. La bacteria permanece en las vacuolas pinocíticas migrando a la superficie de la lámina propia donde son extruídas (62). Al entrar a la lámina propia los bacilos producen una reacción inflamatoria compuesta por leucocitos polimorfonucleares e histiocitos. Los PMN fagocitan y eliminan de manera eficaz a las Salmonellas; sin embargo algunas especies de salmonella sobreviven dentro de los fagocitos debido a la liberación de endotoxinas y viajan al tejido linfático intestinal (73,77). Si el proceso se prolonga, como en la tifoidea y paratifoidea, el infiltrado se torna básicamente de linfocitos mononucleares (73). Dependiendo de la virulencia de las cepas en particular y de la respuesta del hospedero, las bacterias pueden invadir y multiplicarse en el torrente sanguíneo o en el linfático o ambos (39). El mecanismo preciso por el cual Salmonella causa secreción intestinal, manifestándose como diarrea, no es claro, aparentemente son necesarias la invasión de la mucosa y la producción de enterotoxinas (62).

El género Salmonella exhibe una gran heterogeneidad en cuanto a sus efectos enteropatogénicos, algunos no invaden la mucosa intestinal y no producen inflamación, ni diarrea y resultan poco virulentos cuando se inoculan intraperitonealmente al ratón. Otras cepas que penetran el epitelio intestinal no producen diarrea y los estudios realizados por inoculación de asas ileales de conejo con diferentes cepas de S. typhimurium indican que la capacidad para producir una reacción inflamatoria no es condición para la aparición de la diarrea (73). Se ha reportado la elaboración de una enterotoxina en S. typhimurium que se relaciona antigénicamente con la toxina del cólera por su comportamiento en varios

bioensayos, adicionalmente se ha descrito una enterotoxina termoestable en Salmonella (62).

Salmonella se clasifica en el Manual de Bergey, en la sección 5 como el género III de la familia Enterobacteriaceae (35). La clasificación de esta especie ha sido controvertida a través de los años. En 1972, el CDC reportaba sólo 3 especies distintas, S. typhi, S. cholerae-suis y S. enteritidis. Los estudios de Crosa y col demostraron que el grupo Arizona está estrechamente relacionado con el género, reportándose dentro de los subgrupos 3a y 3b. Farmer III y col han aceptado la clasificación de Salmonella de acuerdo a los subgrupos, basados en la hibridación del DNA y los análisis fenotípicos. De acuerdo a esto existen 6 subgrupos (1, 2, 3a, 3b, 4 y 5), subdivididos a su vez en un gran número de serotipos (15). Hasta el momento se han identificado al menos 2,200 serotipos potencialmente patógenos para el hombre y los animales (77).

La gran mayoría de las especies de Salmonella aisladas de muestras clínicas humanas pertenecen al subgrupo 1, éste incluye los serotipos: S. typhimurium, S. enteritidis y S. heidelberg; siendo bioquímicamente muy activos. Sin embargo, los serotipos S. typhi, S. cholerae-suis y S. paratyphi A son menos activos bioquímicamente. Estos últimos son importantes en enfermedades humanas y se aíslan de cultivos, tanto de heces como de sangre. Los otros subgrupos pueden presentarse en diarrea y se consideran como patógenos entéricos si no existe otro patógeno, pero es más probable que se encuentren en animales de sangre fría y en el medio ambiente (15).

Se diagnostica la gastroenteritis por Salmonella cuando el microorganismo se aísla por cultivo bacteriológico de las heces, en una persona con diarrea. Cuando las

heces recién emitidas se observan con microscopía electrónica, en el moco fecal los leucocitos pueden encontrarse en escaso número, contándose menos de 20 células por campo en los pacientes. Para el aislamiento de este microorganismo en el cultivo bacteriológico de heces recién emitidas ó tomadas con hisopo rectal es recomendable utilizar medios de cultivo de baja selectividad. Adicionalmente pueden usarse medios de enriquecimiento (75).

La mayoría de los aislamientos se caracterizan por reacciones positivas para movilidad y fermentación de glucosa con producción de gas y negativas para indol, ureasa y fermentación de lactosa. La producción de H_2S es una característica variable, porque sólo el 50% de S. cholerae-suis y 10% de S. paratyphi A la dan positiva. Muestran otras reacciones características del género (39), pero también las producen muchas cepas de Citrobacter causando confusión en la interpretación de los resultados. Las cepas de Citrobacter pueden excluirse porque fermentan el glicerol en agua peptonada, en 24 horas y Salmonella no lo hace (75).

Salmonella tiene una estructura antigénica compleja posee dos clases principales de antígenos; Somático o endotoxinas, llamadas también "O" y flagelares ó "H". Algunos serotipos poseen además un antígeno de envoltura llamado también "Vi", en ciertos casos, como en S. typhi (35). Los aislamientos identificados bioquímicamente como miembros del género Salmonella, pueden confirmarse con sueros polivalentes que contienen aglutininas para los antígenos O, H y Vi de este microorganismo. Cuando un aislamiento se clasifica bioquímicamente como miembro del género Salmonella y no aglutina con el suero polivalente, una suspensión del microorganismo puede calentarse durante 15 minutos, enfriarse y reexaminarse (39).

1.2.3.- Yersinia enterocolitica

Desde su descubrimiento, Yersinia enterocolitica ha sido una causa importante de diarrea en el mundo industrializado (56,36). El microorganismo fué descrito por Schleifstein y Coleman en 1939 como un patógeno para el hombre, no identificado, semejante a Bacterium lignieri y Pasteurella pseudotuberculosis.

Los diversos aislamientos de éste fueron nombrados como Bacterium enterocoliticum P. X, P. pseudotuberculosis typo b, Germen X y P. pseudotuberculosis X, hasta que en 1964 Frederiksen propuso el nombre de Yersinia enterocolitica (16,10), en dicha fecha se aisló este microorganismo de un paciente con ileitis aguda terminal (65). Desde las dos décadas anteriores se ha incrementado la frecuencia de aislamiento, se ha encontrado en humanos de muchas ciudades del mundo, su incidencia y prevalencia es variable pero existen datos de una frecuencia proporcional de aislamiento en heces de pacientes con diarrea. En Montreal, durante un periodo de 15 meses, de 1977 a 1978, se aisló Yersinia enterocolitica de 6,364 niños sintomáticos en un 2.8%; en Holanda se aisló de 827 pacientes menores de 40 años con enteritis en un 2.9%; en Italia, se aisló de 2,500 niños con diarrea en un 1.4%. En contraste, en Detroit no se aisló de muestras de heces en 1,262 pacientes con diarrea (10).

La enfermedad atribuida a Y. enterocolitica en el norte de Europa ha sido alta, reportes de Bélgica indican que Yersinia patógena frecuentemente está implicada con gastroenteritis aguda, tanto como Salmonella spp y Campylobacter spp. La mayoría de los reportes europeos son causados por Y. enterocolitica serogrupo 0:3 y el 0:9 en una menor proporción. En los Estados Unidos la enfermedad por Y. enterocolitica se presenta en menor grado y los brotes se han asociado a los serogrupos 0:8, 0:5, 27, 0:13, 18 y 0:21; sin embargo, el serogrupo

0:3 surge como una importante causa de brotes asociados a gastroenteritis. En Noruega, los casos debidos a Yersinia se han incrementado a través de los años, entre 1986 y 1987 su número reportado es cerca del doble, de 156 a 274 con una incidencia de 6.7 casos/100,000 habitantes, específicamente en la región de Oslo también se ha incrementado el número de casos de infección por Yersinia, durante Octubre de 1988 a Enero de 1990 se obtuvo una incidencia de 6.4 casos/100,000 habitantes en niños menores de 5 años de edad (56).

Y. enterocolitica es un bacilo cocoide, facultativo, Gram negativo, es móvil a 25°C e inmóvil a 37°C y semejante a otras Enterobacterias. El microorganismo fermenta la glucosa, es oxidasa negativo y reduce los nitratos. Las colonias de Y. enterocolitica no fermentan la lactosa en medios que contienen sales biliares, las cepas típicas dan reacción positiva en agar urea de Christensen y reacciones negativas para utilización de citrato.

Y. enterocolitica puede caracterizarse por pruebas bioquímicas, las características que la separan de otras especies de Yersinia incluyen pruebas positivas para ornitina descarboxilasa y fermentación de sacarosa y pruebas negativas para fermentación de melobiosa, rafinosa y ramnosa (39, 10).

La recuperación óptima del microorganismo por inoculación en los medios entéricos de rutina se obtiene en las placas de agar MacConkey si se incuban a 25°C durante 48 horas. Existen medios selectivos diferenciales más efectivos que los medios entéricos de rutina como el Irgasan para la recuperación de Y. enterocolitica a partir de heces. Como Y. enterocolitica se multiplica a temperaturas frías, los caldos de enriquecimiento en frío facilitan la recuperación del microorganismo de muestras contaminadas. Los aislamientos de Y. enterocolitica

son usualmente susceptibles in vitro a trimetoprim-sulfametoxazol, aminoglucósidos, cloramfenicol, tetraciclinas, cefalosporinas de tercera generación y quinolinas. Los aislamientos son típicamente resistentes a cefalosporinas de primera generación y más a penicilinas (10).

Y. enterocolitica se ha aislado de una diversidad de reservorios vivos entre ellos: aves, ranas, pescados, moscas, caracoles, ostiones y una amplia variedad de mamíferos (10). Los puercos se han implicado como el principal reservorio de las cepas patógenas (37) involucradas en infecciones humanas, las que se encuentran en la cavidad oral y tracto intestinal del animal sano (36). También albergan al microorganismo, reservorios inanimados como la leche cruda, crema, helados, carne de res, de cordero y de aves de corral, lagos, ríos, suelos y vegetales (10). En Europa, se observó una mayor frecuencia de aislamiento en los meses fríos de acuerdo con los reportes de infecciones estrechamente relacionadas con los meses de Otoño e Invierno (45,10).

La transmisión de Y. enterocolitica a humanos ocurre primeramente por la ingestión de alimentos, agua y/o leche contaminados. El consumo de leche y carne de puerco contaminadas ha sido la causa de transmisión en diversos brotes o casos esporádicos de enfermedad. La transmisión hacia humanos a partir de perros, gatos y puercos es por vía fecal-oral u oral-oral. Las picaduras por insectos no se han mencionado como vehículo de transmisión, al igual que la transmisión fecal-oral de persona a persona (10); sin embargo, se han reportado brotes familiares ocurridos por la transmisión de manos contaminadas con heces humanas así como por alimentos contaminados en el momento de la preparación (57). Otra vía de transmisión de persona a persona puede ser por la transfusión de productos sanguíneos (10)

El período de incubación de Y. enterocolitica está en un rango de 1 a 11 días (57,10). La dosis infectiva mínima para humanos no se ha determinado exactamente, pero la ingestión de 3.5×10^9 microorganismos en voluntarios ha producido diarrea. La duración de la excreción del microorganismo en las heces está en un rango de 14 a 97 días (10).

Y. enterocolitica es un patógeno entérico versátil responsable de una variedad de desórdenes, incluyendo diarrea y colitis (64), causa síndromes gastrointestinales con un amplio rango de manifestaciones clínicas, desde diarrea moderada hasta adenitis mesentérica (29,36,37). Las manifestaciones clínicas de la enfermedad dependen, en algún grado, de la edad y estado físico del hospedero, la enterocolitis por Y. enterocolitica se caracteriza por fiebre y dolor abdominal, en algunos casos, náuseas y vómito así como la presencia de leucocitos y eritrocitos, con sangre evidente en las heces (10), los síntomas intestinales pueden persistir hasta por dos semanas (57). Las características clínicas predominantes en niños mayores de 5 años de edad son diarrea, fiebre y, con menos frecuencia, dolor abdominal; la adenitis mesentérica se caracteriza por fiebre, dolor abdominal y leucocitosis comunmente en adolescentes (12). El síndrome pseudoapendicular frecuentemente se confunde con apendicitis ocurriendo principalmente en adolescentes. Las complicaciones debidas a esta infección son: artritis, eritema nudoso y, con menor frecuencia, septicemia que puede ocurrir en adultos, más comunmente en mujeres (29,10). Se han observado otro tipo de complicaciones después de la enfermedad como: pancreatitis aguda, colecistitis aguda, hepatitis aguda, y esplenomegalia (65).

La virulencia de Y. enterocolitica es un fenómeno complejo. Un número distinto de genes en los cromosomas y plásmidos son los responsables de la patogenicidad y fenotipos de virulencia. Los plásmidos que codifican la virulencia son poco estables durante la manipulación en el laboratorio (36).

Las cepas patógenas caracterizadas por un cromosoma invaden los cultivos de células y al poseer un plásmido de virulencia (pYV), se facilita la supervivencia dentro del hospedero (64). La expresión de virulencia de Y. enterocolitica requiere de un plásmido de 70 kilobases (kb) llamado pYV el cual sintetiza y secreta una gran cantidad de proteínas, éstas son óptimas cuando la bacteria se incuba en ausencia de calcio (69). La expresión de plásmidos que secretan proteínas en la superficie de membrana (Yops) es un determinante importante de la patogenicidad en Y. enterocolitica. Tal expresión ocurre in vitro a 37°C, pero no a 25°C ni en presencia de altas concentraciones de calcio. Los plásmidos que secretan Yops se han detectado en el lumen y tejido intestinal de ratas infectadas experimentalmente después de una hora de inoculación intragástrica. La expresión de estas proteínas se asocia con la resistencia para mediar la opsonización, la fagocitosis por neutrófilos y la resistencia a la actividad bactericida del suero.

Los anticuerpos contra estas proteínas se detectan en el suero de pacientes convalecientes infectados con Y. enterocolitica. El hierro es un factor esencial en el desarrollo de estas bacterias, lo obtienen a través de sideróforos; Y. enterocolitica no produce sideróforos pero los usa sintetizados por otras bacterias. El hierro permite incrementar substancialmente la virulencia de Y. enterocolitica en animales infectados experimentalmente, quizá porque atenúa la actividad bactericida del suero (10).

Los serobiogrupos invasivos de Y. enterocolitica producen una enterotoxina termoestable, conocida como YST, producida por un gen cromosómico *yst*. El papel de YST en las enfermedades permanece controvertido (64). De acuerdo con la secuencia de ácidos nucleicos, la YST se sintetiza como un polipéptido de 71 aminoácidos. Sus propiedades fisicoquímicas y antigénicas son similares a la toxina termoestable (STI) de Escherichia coli, ambas toxinas activan la guanilato ciclasa e inducen la acumulación de fluido por incremento del GMP cíclico en células epiteliales intestinales. La enterotoxina YST de Y. enterocolitica también incrementa los niveles de GMP cíclico intracelular en cultivos de líneas celulares(12).

Los ratones se usan para estudiar la patogénesis de Yersinia; la inoculación oral con Y. enterocolitica ocasiona invasión de las placas de Peyer, los nódulos linfáticos mesentéricos y, dependiendo de las condiciones experimentales, también del bazo y del hígado. En contraste, la infección de conejos jóvenes por inoculación oral, induce una diarrea franca y una invasión sistémica.

La similitud entre YST y STI sugieren que la YST puede ser responsable de la diarrea inducida por Y. enterocolitica (12). Un estudio reciente en animales puestos en contacto con una suspensión de mutantes de YST, indica que la toxina es una causa importante de la diarrea asociada a Y. enterocolitica (64).

Y. enterocolitica y las especies estrechamente relacionadas, Y. frederiksenii, Y. intermedia y Y. kristensenii están ampliamente distribuidas en la naturaleza. También existen otras especies de Yersinia como Y. aldovae, Y. rohdei, Y. bercovieri, Y. mollaretii, Y. ruckeri, Y. pseudotuberculosis y Y. pestis que se han

estudiado (39,37,16,36). Y. enterocolitica es heterogénea, con más de 50 serotipos y diversos biotipos, pero solamente unos pocos de los bioserotipos son patógenos para el hombre (37). Los serotipos que causan enfermedad difieren en su distribución geográfica y su patogenicidad (4), los serotipos más comunmente asociados a yersiniosis humana se limitan a cepas europeas (0:1, 0:3, 0:9, 0:5, y 0:27) y cepas Americanas (0:8, 0:13a, 13b, 018, 0:20, 0:21, y 0:4,32) (29).

1.2.4.- Aeromonas spp.

Han existido numerosos reportes en todo el mundo acerca del aislamiento de Aeromonas spp de casos de diarrea en humanos: Lautrop 1962, Rosner 1964, Cooper y Brown 1968, Chatterjee y Neogy 1972, Bhat y col 1982 (6), Agger en 1985, Altwegg y Geiss en 1989, Mikhail y col en 1990 (6,61). Sin embargo, la importancia de estas especies como patógenos intestinales ha sido objeto de controversia (18), algunos autores dudan que Aeromonas spp sea causa de enfermedad entérica. No obstante, algunas Aeromonas spp tienen propiedades similares a otros microorganismos bien reconocidos como patógenos entéricos (61).

Las infecciones intestinales debidas a Aeromonas spp se identifican frecientemente en el sureste de Asia, India y Australia, pero raramente en Estados Unidos (33). Un estudio de los agentes causales de diarrea aguda en niños (< 5 años) en Tasmania, establece que Aeromonas spp se aísla fácilmente como un solo patógeno con una frecuencia del 4.7% (34). En Italia se reportó que Aeromonas puede aislarse junto con otros patógenos intestinales en las heces de niños con gastroenteritis (18). Algunos investigadores han aislado este microorganismo en muestras de heces de pacientes con diarrea más frecientemente que de muestras de pacientes asintomáticos (23,67), otros no han

encontrado diferencias significativas en la proporción de aislamiento entre los dos grupos estudiados (1,18). Estos resultados divergentes pueden relacionarse con la localización geográfica, la época del año en la que se realiza la recolección de la muestra y los medios microbiológicos usados para su aislamiento. La distribución de la edad de los individuos en quienes se identifica Aeromonas es similar a aquellos con enfermedad diarreica por Salmonella, revelando un gran número de casos en individuos menores de 7 años y en adultos, especialmente en los mayores de 60 años (1).

Su hábitat normal son fuentes de agua estancada y corriente, pero eventualmente se han observado en estuarios de agua salada, suelos húmedos, desechos alimenticios, animales de sangre fría y humanos infectados, es muy rara la infección en animales de sangre caliente (39), con motivo de esta predominancia acuática, las infecciones intestinales por este microorganismo son más frecuentes en los meses cálidos (32), mostrando un punto máximo durante el verano (23,1). La enfermedad natural debida a estas especies de Aeromonas se ha encontrado en anfibios, por ejemplo la enfermedad de la pata roja, en ranas. Los portadores sanos son tanto humanos como animales.

Con técnicas selectivas, se han visto en Inglaterra, Estados Unidos y Australia, en una proporción del 2 al 3 % de portadores; en Tailandia, recientemente se vió una proporción del 8 al 16% en niños y 27% en adultos (39), generalmente su frecuencia de aislamiento reportada en heces de pacientes sanos varía entre 0.2 y 8 % (34). La enfermedad por Aeromonas generalmente no requiere tratamiento específico generalmente (23), sólo se requiere en pacientes con diarrea prolongada cuando este microorganismo se aísla de las heces. Se ha determinado que las cepas aisladas e identificadas como A. hydrophila son

sensibles al *ác. nalidíxico*, tetraciclina, trimetoprim-sulfametoxazol y sulfametoxazol (1), siendo el cloramfenicol el antibiótico más efectivo (33).

La especie *A. hydrophila* se ha encontrado asociada con enfermedades humanas, aunque también pueden causar enfermedad otras especies (44). El microorganismo recientemente ha sido objeto de diversas revisiones, reconociéndosele una asociación con diversos tipos de infección humana, que incluyen los siguientes: gastroenteritis aguda en adultos y niños, fluctuando de diarrea con sangre de corta duración a prolongada; infecciones en heridas con agua contaminada, con un inicio rápido de celulitis; septicemia en hospederos inmunocomprometidos, especialmente aquéllos con leucemia y otras infecciones menos frecuentes incluyendo: osteomielitis, peritonitis, meningitis, endocarditis y neumonía (32). De estas infecciones clínicas la mas común ha sido la diarrea aguda (1).

Las características clínicas asociadas a gastroenteritis por *Aeromonas* son: diarrea acuosa de corta duración asociada con fiebre moderada, observándose en una pequeña proporción sangre y moco (23). Agger y col incluyen otras características además de la fiebre (38°C) como dolor abdominal, vómito y duración de la enfermedad alrededor de 10 días. La enfermedad es diferente a la shigelosis y más semejante a las diarreas toxigénicas, no causa tenesmos ó hematoxia (1). En Asia y África el género *Aeromonas* causa enfermedad semejante al cólera debido a la producción de enterotoxinas termolábil y termoestable, siendo los efectos similares a los de la toxina del cólera, probada en asa ileal de conejo (33). Debido a la controversia existente con respecto a la importancia de especies de *Aeromonas* como patógenos intestinales, se debe determinar si las propiedades de virulencia del microorganismo se asocian con enfermedad diarreica,

evaluando el papel de la producción de citotoxinas y enterotoxinas por cepas de Aeromonas en la patogénesis de la gastroenteritis aguda (32). Los mecanismos exactos por los que estos microorganismos causan enfermedad, aún se desconocen (62). Algunas investigaciones acerca de los posibles mecanismos de patogenicidad han sido incompletas. Muchas cepas de Aeromonas hydrophila han mostrado poseer factores de virulencia, incluyendo adherencia a células bucales y hemaglutinación mediados por pilis (1), producción de citotoxinas (32), de varias exotoxinas, incluyendo hemolisinas y, por último, una enterotoxina (39). Además la actividad enterotoxigénica probablemente es causada por una sola toxina, demostrada en el asa ileal de conejo (67). La capacidad para desarrollar a 43°C fue propuesta como un marcador de virulencia (34). Estos microorganismos muestran ser invasivos y poseer hemaglutininas que pueden correlacionarse con diarrea. Esto no es un acuerdo general con relación al papel de estos factores como mecanismos de virulencia para Aeromonas (32). Se han encontrado cepas enteroinvasivas, pero los esfuerzos para inducir diarrea en animales han fallado (39). En algunos estudios las cepas de Aeromonas no producen enterotoxinas, mientras que en otros la actividad se notó en un 84% de las cepas (32).

Sarawathi demuestra que las cepas aisladas de A. hydrophila y las enteropatogénicas de Vibrio cholerae 569.B, tienen un comportamiento semejante en el lleo de conejo, no se muestran cambios histológicos pero sí una pequeña infiltración de mononucleares; todos los aislamientos de A. hydrophila de pacientes con diarrea causaron acumulación de fluido en el asa ileal de conejo debido a la liberación de sustancias enterotoxigénicas por parte de la bacteria durante su multiplicación, siendo comparable a la causada por la toxigenicidad de Vibrio cholerae 569.B, en que se han reportado otros resultados similares (67). Atkinson y Traust describen patrones de hemaglutinación que

correlacionan con la capacidad para adherirse a enterocitos humanos y células epiteliales bucales. Se involucra más de un mecanismo en esta hemaglutinación uno de los cuales es mediado por pilis. Sin embargo, los estudios de pilis en relación al origen, biotipo y virulencia de Aeromonas han sido pocos y controversiales.

Algunos estudios muestran que Aeromonas aisladas de agua producen citotoxinas en alta proporción (34). Kindschuh y col. encuentran que la mayoría de los microorganismos aislados del ambiente y de humanos también producen citotoxinas y que estas son inmunológicamente distintas a la toxina de Shiga, afirmando que la producción de citotoxinas no es un factor de patogénesis de A. hydrophila relacionadas a gastroenteritis.

La mayoría de las cepas examinadas de A. hydrophila y A. sobria producen enterotoxinas independientemente de la fuente de aislamiento. Además no se encuentran diferencias significativas en la prevalencia de enterotoxinas, citotoxinas o hemolisinas, ni se observan en sus cepas, una correlación entre hemolisinas y enterotoxinas de acuerdo a otros reportes (18). Recientemente se demostró que las características enterotóxicas, citotóxicas y hemolíticas de A. hydrophila las determinan diferentes genes localizados en 3 diferentes segmentos cromosomales. Esta observación puede explicar la existencia de las diversas propiedades de virulencia entre las cepas en diferentes partes del mundo. La importancia de otros factores de virulencia permanece sin determinar (32).

En el Manual de Bergey de Bacteriología Sistemática se clasifica en la sección 5 a estos microorganismos, como el género III de la familia II Vibrionaceae, y reconoce 4 especies de Aeromonas: A. hydrophila, A. caviae, A. sobria y A. salmonicida, de ésta última reconoce 3 subespecies: salmonicida, achromogenes

y masoucida (9,35). Recientemente surgieron nuevas especies acuáticas como A. media, no móvil, semejante a A. salmonicida y que se encuentra en muestras humanas (39).

Popoff, al igual que Schubert, sugieren que las especies de Aeromonas mesofílicas y móviles pueden dividirse en tres especies: A. hydrophila, A. sobria, A. caviae (sólo considerando las que causan gastroenteritis en humanos) (18,34).

A pesar de los estudios sobre A. hydrophila, no se busca comunmente en cultivos de heces de rutina y la enteritis causada por este microorganismo ha tenido pocas evaluaciones clínicas (1). Miembros del género Aeromonas presentan una morfología semejante a otras Enterobacterias, poseen un flagelo polar usualmente monotrico que en cultivos viejos suele ser mas corto. El contenido G-C del DNA es 57 a 67 mol % (39).

En la fase aguda de la enfermedad este microorganismo está presente en gran número (75). El primo-cultivo de Aeromonas, se efectúa en medios de laboratorio usuales. Sin embargo, no todas las cepas desarrollan bien en medios de cultivo diferenciales o selectivos (30,33).

Un estudio reciente ha comparado 9 medios sólidos y 2 líquidos para aislar adecuadamente Aeromonas de heces humanas (24). El método con sensibilidad y especificidad es el agua peptonada alcalina. Otros medios recomendados son agar sulfito dextrina fucsina (DFS), agar xilosa desoxicolato de sodio citrato (XDCA), agar ampicilina pril xilosa (PXA), agar sangre con 43g de p-nitrofenol glicerina / l, agar Mac Conkey con trialosa y un caldo de enriquecimiento con sales biliares y

novobiocina. En agar sangre muchas cepas de Aeromonas muestran una gran zona de β -hemólisis.

El rango de temperatura para desarrollar es entre 0°C y 41°C. Su rango de pH es de 5.5 a 9.0. Son heterotróficas, producen oxidasas y catalasa (desarrolladas en medios no selectivos) (39), xilosa negativa, fermentan glucosa y otros carbohidratos con producción de ácido y/o gas (43), reducen los nitratos a nitritos. Incapacidad para desarrollar a una concentración del 6.5% de cloruro de sodio. Produce muchas exoenzimas como amilasa, DNasa, lipasa, fosfatasa, proteinasas, etc (39,2). La producción de oxidasas no es exclusiva de este género, por tal razón pueden confundirse con varios microorganismos, entre ellos Pseudomonas spp (43).

Las pruebas usadas para la diferenciación entre A. hydrophila y A. sobria son la hidrólisis de esculina y salicina y la fermentación de arabinosa, siendo más útiles como pruebas discriminatorias. Otras reacciones propuestas son la capacidad para desarrollar en presencia de KCN y el uso de histidina y arginina como fuentes de carbono (34). En los estudios de aglutinación se ha observado una reactividad cruzada, de Plesiomonas shigelloides con A. hydrophila y A. sobria (39).

1.2.5.- Campylobacter jejuni

El género Campylobacter consiste en un grupo bien definido de bacterias, son bacilos curvados en espiral, de 0.2 a 0.5 micras de ancho por 0.5 a 5 micras de largo. Presentan formas curvadas en c, con un solo flagelo polar en cada extremo, con diámetro de 0.27 μ m y longitud de 1.31 micras, correspondiendo a células jóvenes de reciente división, formas bi, tri y tetracurvadas con un flagelo polar

en cada extremo, su longitud promedio es de 1.82 micras y su diámetro de 0.20 micras, correspondiendo a células maduras. Estos microorganismos pueden tener forma de coma, de S ó de ala de gaviota y constituyen cadenas cortas u ocasionalmente largas. Las células pueden volverse esféricas o cocoides, en especial en cultivos envejecidos. Las células son esporuladas, móviles mediante un solo flagelo polar en los extremos y en ocasiones hay cepas inmóviles. Son microaerófilos y tienen un tipo de metabolismo en el que no fermentan ni oxidan los hidratos de carbono (39).

La taxonomía del género Campylobacter corresponde al sistema aprobado oficialmente por la comisión Internacional de Bacteriología Sistemática. Las especies son: Campylobacter fetus, C. fetus subesp. fetus, C. fetus subesp. venerealis, C. jejuni, C. coli, C. sputorum, C. sputorum subesp. sputorum, C. sputorum subesp. buhulus, C. sputorum subesp. mucosalis, C. concisus. Existen otras especies de Campylobacter que se han reportado en la literatura como: C. fecalis (35), C. laridis, C. linitrofigilis, C. hyointestinalis, C. cineadi, C. fennelliae y otros grupos de Campylobacter o semejantes al género.

Las especies de Campylobacter se ubican generalmente en dos grupos amplios: Catalasa positivos y Catalasa negativos. Las cepas más a menudo asociadas con enfermedades humanas son catalasa positivas las que a su vez se pueden separar en dos grupos, según el intervalo de temperatura en la cual desarrollan. Los termófilos tienen una temperatura óptima de desarrollo a 42°C y no desarrollan a 25°C. Los termófilos asociados con enfermedades humanas son C. jejuni, C. coli y C. laridis. La resistencia al ácido nalidíxico distingue generalmente a C. laridis de C. jejuni y C. coli. La clave para diferenciar C. jejuni de C. coli es la prueba de

hidrólisis de hipurato, el primero puede hidrolizarlo a glicina y ácido benzoico; en cambio el segundo y otros campylobacteres no hidrolizan hipurato (39).

Las cepas catalasa positivas de Campylobacter que desarrollan a 25 °C y no a 42°C son C. fetus y C. hyointestinalis. Unas pocas cepas termotolerantes de éstas desarrollan a 42°C, sin embargo el desarrollo a 25°C es la clave diferencial para distinguir las cepas termotolerantes de las termófilas. C. fetus subesp. fetus puede producir enfermedad en el ser humano y se distingue de la subesp. venerealis por la prueba de la glicina al 1 % y de C. hyointestinalis por la prueba de H₂S en triple azúcar hierro. C. cineadi y C. fennelliae son los catalasa positivos asociados con enfermedades humanas, las especies desarrollan a 37°C y no a 25 ó 42°C (39).

La campylobacteriosis se considera una zoonosis, los primeros hallazgos que relacionaban a Campylobacter spp con episodios de diarrea, provienen de la década de los 50; pero sólo a fines de los años 70 con la publicación del trabajo de Skirrow, se comenzó a reconocer y caracterizar a Campylobacter jejuni como patógeno intestinal para el ser humano (17). El interés médico surgió, luego del desarrollo de métodos diagnósticos que permitieron su aislamiento e identificación a partir de heces, incriminandosele con la etiología de un 10 a 15 % de los casos de diarrea aguda (27). Las técnicas apropiadas de cultivo, permitieron investigar a este microorganismo en diversas condiciones clínicas y ubicándolo como uno de los principales agentes de diarrea infecciosa aguda en países desarrollados y en desarrollo.

La fuente más común de infecciones humanas son los aislamientos de origen animal, especialmente a partir de la leche no pasteurizada (39). Numerosas especies animales albergan al agente, probablemente las más estudiadas son las

aves; sin embargo, los perros y los gatos también han sido vectores en brotes intrafamiliares. Los pollos son igualmente una fuente de infección para el ser humano. Los microorganismos se aislaron en un 33% en el agua de bebida de un criadero de aves y en un 25 % en las cáscaras y membranas de los huevos, en un estudio realizado en Santiago de Chile en 1985 (27). Otra fuente probable la constituyen los cerdos. Diversos alimentos también se asocian con brotes de campylobacteriosis (17). Se estima en los E.E.U.U. que anualmente se producen alrededor de 2 millones de casos de infecciones por campylobacterias. Esta cifra es equivalente al número estimado de casos de shigelosis. Los portadores sanos son infrecuentes en los E.E.U.U, pero no lo son en los países en desarrollo.

La enfermedad producida por C. jejuni y C. coli es semejante por lo que puede confundirse. Estudios realizados en Canadá e Inglaterra indican que C. coli es responsable del 3 al 5% de casos humanos. C. coli se encuentra muy a menudo en cerdos sanos. (39). En un estudio realizado en México en el periodo de diciembre a junio de 1981, se mostró una frecuencia de aislamiento de Campylobacter spp del 9.8% en un grupo de niños hospitalizados. Su mayor frecuencia de aislamiento ocurrió en los meses calurosos del año. Se identificó Campylobacter spp simultáneamente con otros agentes potencialmente enteropatógenos, como Rotavirus, Shigella y Salmonella. El porcentaje de portadores asintomáticos fué de 4.2% semejante al comunicado por otros autores (47). Un estudio comprendido entre abril de 1984 y mayo de 1985 mostró un aislamiento del 14.7 % de C. jejuni con otros microorganismos.

En los niños con diarrea predominó notablemente en los menores de un año de edad, en un 78%. La mayor frecuencia de aislamiento asociada con C. jejuni se observó en los meses de Julio a Octubre, que en el Valle de México

corresponde a la estación lluviosa del año así como también en el mes de Enero. La alta frecuencia de aislamiento de C. jejuni en coprocultivos de niños sanos (9.9%) indicó una prevalencia elevada de portadores asintomáticos en la población, hecho observado en otros países en desarrollo como África y Bangladesh, lo cual permite la existencia de un importante reservorio humano para C. jejuni además de los ya conocidos reservorios naturales, siendo las aves y mamíferos domésticos un factor preponderante en la prevalencia de la enfermedad en nuestra población (79).

Las manifestaciones de la diarrea aguda asociada a C. jejuni son autolimitadas, duran de 3 a 5 días. En el ser humano la enfermedad aparece como diarrea caracterizada por deposiciones líquidas frecuentes; a menudo se acompaña de sangre (39,17). La fiebre, náuseas y vómitos son comunes y probablemente el signo más constante es el dolor abdominal severo. Se ha registrado una serie de localizaciones extraintestinales, así como la presencia de C. jejuni en enfermedades inflamatorias del intestino y en el síndrome de la diarrea del viajero.

La respuesta serológica frente a la infección aguda por C. jejuni incluye anticuerpos de las clases IgM, IgG e IgA, en la mucosa intestinal es posible detectar anticuerpos secretores IgA que parecen ser de corta duración, estimándose que su presencia indica infección actual o reciente. La detección de anticuerpos específicos de tipo IgG o IgM para C. jejuni en individuos que habitan en países en desarrollo, no parece ser un buen instrumento de diagnóstico o manejo epidemiológico. A pesar de esto, podría ser útil para los pacientes porque proveen algún grado de protección. Se ha postulado que la menor gravedad de la diarrea en individuos que habitan países en desarrollo podría relacionarse con la presencia

de estos anticuerpos. Estudios en voluntarios han demostrado que los anticuerpos homólogos coinciden con altos niveles de protección para los que los poseen, pues ellos no desarrollan síntomas clínicos ante nuevos contactos con el agente. Sin embargo un número importante de sujetos asintomáticos excretaban al microorganismo, demostrando colonización intestinal. El empleo de antibióticos en el tratamiento de la colitis por Campylobacter no acorta la fase aguda de la enfermedad ni modifica los síntomas clínicos, en algunos casos se reduce o suprime el período de excreción fecal del agente, fenómeno frecuente entre los pacientes con campylobacteriosis (17).

Las características clínicas de la enfermedad no permiten hacer un diagnóstico etiológico ya que son indiferenciables de las encontradas en otras infecciones entéricas, se puede apreciar que la enteritis asociada con Campylobacter jejuni tiende a adoptar dos variantes clínicas: Un síndrome diarreico secretor con heces líquidas, abundantes y vómito acompañado de deshidratación y un síndrome disenteriforme con heces mucosanguinolentas y presencia de abundantes leucocitos polimorfonucleares en el examen del moco fecal; posiblemente con base en la existencia de dos mecanismos de patogenicidad diferentes en Campylobacter jejuni, uno productor de enterotoxinas y otro con capacidad invasora (79).

La capacidad patógena de Campylobacter jejuni como agente de diarrea aguda, se relaciona con su capacidad de invadir la mucosa del colon, donde aparentemente por acción de una citotoxina, altera tanto morfológica como funcionalmente el epitelio. Se ha identificado además actividad enterotóxica derivada de la presencia de una sustancia semejante a la toxina del cólera y a la toxina termolábil de E. coli. Como éstas, reconoce los receptores glucosídicos del

Guanosín- 3,5 -monofosfato (GMP) cíclico en la mucosa del intestino delgado y provoca aumento en la concentración celular del Adenosín - 3,5 - monofosfato (AMP) cíclico, lo que determina que dichas células entren en fase secretora, típica de la diarrea ocasionada por este agente (17).

La presencia de sangre y leucocitos en las heces de personas infectadas, indica que Campylobacter jejuni puede ser invasor; sin embargo, produce una forma secretora de diarrea, especialmente en niños, lo cual sugiere la intervención de una enterotoxina. Diversos investigadores han descrito sustancias semejantes a enterotoxinas, producidas por este agente, entre ellos, Ruiz Palacios, una enterotoxina tipo colérico y Klipstein y Engert. una enterotoxina termolábil. Sin embargo, Olsvick no detecta genes para la producción de toxina colérica ni de enterotoxina termolábil. Observaciones clínicas sugieren que la patogénesis de C.coli y C. laridis es semejante a la de C. jejuni (39).

Las heces o las muestras tomadas con hisopos rectales deben recogerse de pacientes con diarrea, se deben inocular en medios selectivos, preferiblemente dentro de las 2 hrs siguientes a su obtención. Si ello no es posible, los hisopos rectales con heces deben colocarse en medios de transporte, como el Cary-Blair y deben mantenerse en refrigeración. Los especímenes pueden conservarse durante una o dos semanas a 4°C.

El examen de las heces por microscopía directa, es útil para una rápida identificación presuntiva en caso de diarrea aguda. La técnica más efectiva es utilizar el microscopio de contraste de fase o de campo oscuro y observar bacilos espirilados con movilidad de flecha, también es útil la observación de bacilos curvos teñidos con fucsina básica al 1% (39).

Son importantes los siguientes factores en el aislamiento de la especie termófila de Campylobacter: 1). El uso de medios selectivos; 2). La incubación de las placas en atmósfera microaerofílica y 3). La incubación de placas de aislamiento primario a 42°C. Los medios selectivos de Skirrow, Butzler y Campy-BAP, son ampliamente utilizados. El aislamiento de C. jejuni de heces humanas en estos medios muestra un número comparable de positivos con cada uno, cuando las placas se incuban 24, 48 y 72 h. Se han desarrollado numerosos caldos selectivos de enriquecimiento para mejorar la recuperación de C. jejuni a partir de muestras clínicas(39).

Kaplan obtuvo un aumento del 10% en la tasa de aislamiento de C. jejuni de muestras fecales, con enriquecimiento en frío durante 16 a 18h en Blaser Campy Thio. La utilidad de un caldo de enriquecimiento puede variar de acuerdo al tipo de muestras que se procesa.

Las placas inoculadas se incuban a 42 - 43°C en la atmósfera necesaria para el desarrollo adecuado de las especies de Campylobacter produciéndose de acuerdo a las condiciones del laboratorio. Para obtener un máximo aislamiento, las placas deben examinarse a las 24, 48 y 72h. Las colonias de Campylobacter termófilas son no hemolíticas, grises o incolores. pueden ser planas y acuosas, con bordes irregulares, o redondas y convexas con bordes enteros. Las colonias pueden ser del tamaño de cabezas de alfiler o diseminadas en grandes áreas de la placa. Las colonias sospechosas deben seleccionarse con tres pruebas presuntivas: 1). movilidad y morfología por observación en campo oscuro o contraste de fases, 2). oxidasa 3). tinción con fucsina básica. Las especies de Campylobacter poseen movilidad de tipo de flecha o en espiral, son oxidasa positiva y aparecen en forma de alas de gaviota, como bacilos espirilados ó forma de sacacorcho. Las colonias presuntivas se confirman por pruebas de identificación bioquímica. El inóculo

usado en dichas pruebas es de un desarrollo de 24 a 48h en agar sangre, suspendido en caldo infusión cerebro corazón (BHI). En ocasiones las cepas pueden requerir 3 días de incubación para obtener suficiente desarrollo. Las pruebas confirmatorias son: producción de sulfuro de hidrógeno, reducción de nitrato e hidrólisis del hipurato (39).

Producción de sulfuro de hidrógeno.- Esta se detecta en agar triple azúcar hierro y un tira de papel de Pb suspendida sobre un tubo de caldo brucela que contiene 0.02% de L-Cisteína. El agar se puede inocular directamente con un asa estriando la superficie y atravesando el agar hasta el fondo, con el desarrollo de 24 a 48h en agar sangre.

La prueba de reducción de nitrato se determina en un caldo especial, preparado con 25 g de BHI, 2g de nitrato de potasio y 1,000 ml de H₂O dest. A un cultivo de 3 días en 4 ml de caldo nitrato, añadir 0.25 ml de los reactivos: I (8g de ác. sulfanílico en 1000 ml de ác. acético 5N) y II (6 ml de dimetil-alfa naftilamina en 1000 ml de ác. acético 5N). La aparición de color rojo indica una reacción positiva y la producción de nitrato reductasa por el microorganismo. Si no aparece el color rojo, añadir Zn en polvo para determinar si los nitratos están presentes.

La prueba del hipurato.- Una asa llena de con un cultivo de 18h en BHI con 5% de sangre de conejo desfibrinada, se emulsiona en 0.4 ml de solución acuosa de hipurato de sodio al 1% y la suspensión se incuba en un baño de agua a 37°C durante 2h. tras la incubación, añadir lentamente 0.2 ml de solución de ninhidrina al 3.5% (mezcla de 1:1 de acetona y butanol), por las paredes del tubo hasta formar una capa superior. Incubar 10 min en un baño de agua a 37 °C y examinar la suspensión para ver si hay color. Un púrpura intenso se considera reacción positiva, las reacciones débiles se consideran negativas (39).

II.- PARTE EXPERIMENTAL

1.- MATERIAL

1.1.-De laboratorio.

- algodón
- asas calibradas
- cajas desechables para recolección de heces
- cajas petri
- cinta testigo
- cubreobjetos
- desecador
- espátula
- frascos goteros
- gradillas de metal para tubos de ensayo
- gradillas para cajas petri
- hisopos estériles
- jarras gas-pack (BBL, Microbiology Systems Cockeysville)
- matices Erlenmeyer
- mechero Fisher
- pipetas graduadas
- portaobjetos
- probetas graduadas
- tubos de vidrio de 12 x 75
- tubos de vidrio de 13 x 100
- vasos de precipitados
- viales con tapón de hule y tapón de rosca

1.2.- Equipo

- *agitador magnético*
- *autoclave*
- *balanza analítica*
- *balanza granataria*
- *congelador a -30°C*
- *incubadora a 37°C*
- *incubadora a 42°C*
- *microscopios ópticos y con aditamentos de lentes para contraste de fase*
- *olla expres con válvula de presión*
- *refrigeradores a 4°C*
- *tanques de gases (dioxido de carbono y nitrógeno)*
- *tanque de nitrógeno líquido a - 70°C*

1.3.- Medios de cultivo

- *agar citrato de Simmons (C)*
- *agar entérico hektoen (HE)*
- *agar fenilalanina (Fe)*
- *agar Kligler (KIA)*
- *agar mac conkey (Mc)*
- *agar Salmonella shigella (SS)*
- *agar skirrow modificado*
- *agar tergitol-7 (T-7)*
- *agar tripticasa soya (TSA)*
- *agar xilosa-desoxicolato de sodio-citrato (XDCA)*
- *agar xilosa lisina desoxicolato (XLD)*
- *agar yersinia*

- caldo base Moeller descarboxilasa
- caldo base rojo de fenol
- caldo infusión cerebro corazón (BHI)
- caldo lisina descarboxilasa (LIA)
- caldo malonato (Ma)
- caldo rojo de metilo-voges proskauer (MR-VP)
- caldo selenito-F
- caldo tioglicolato de sodio
- caldo urea (U)
- caldo yersinia
- gelosa sangre, adicionado con 10 µg/ml de ampicilina (GSamp)
- medio DNA asa
- medio gelosa especial
- medio OF
- movilidad -indol-ornitina (MIO)

1.4.- Reactivos

- ácido clorhídrico 1N
- ampicilina
- anfotericina
- arabinosa
- cláforan
- cloruro de sodio (NaCl)
- colorante azul de metileno
- dimetil-p-fenilendiamina
- fucsina básica al 1%
- glicerol
- glucosa

- inositol
- manitol
- peroxido de hidrógeno
- polimixina
- solución salina isotónica (SSI)
- trimetoprim
- vancomicina

1.5.- Biológico

- Muestras de materia fecal provenientes de niños y adultos que asistieron a la consulta externa de la Unidad Médico Familiar No. 19 del IMSS.

2.- METODOLOGIA

2.1.- Muestras Biológicas

Se analizaron 190 muestras de individuos (niños y adultos), con diagnóstico de diarrea aguda, con tiempo de evolución menor o igual a 15 días y sin ningún otro padecimiento de fondo. No se excluyeron los casos que habían recibido antimicrobianos durante ese lapso. Simultáneamente se analizaron 50 muestras de materia fecal de niños y adultos con diagnóstico diferente de diarrea y paridad en edad, tomándose como grupo control o testigo. Los pacientes y controles se seleccionaron en forma aleatoria, tomando dos casos de pacientes diariamente y un control por cada cuatro casos. Todos los individuos acudieron a los servicios de consulta externa en la Unidad Médico Familiar número 19 del IMSS, ubicada al sur

de la Ciudad de México (Delegación Coyoacán), durante los meses de Mayo a Julio y Septiembre a Diciembre.

A todos los casos se les tomó una muestra de heces recién emitidas que se solicitó el día de la consulta, durante el tiempo en que el paciente permanecía en la clínica; la muestra se procesó inmediatamente, tomándose una pequeña cantidad para el examen microscópico y en 4 hisopos para su procesamiento en forma inicial, efectuado en el laboratorio de la clínica, el mismo día se trasladó al laboratorio de Bacteriología de la Unidad de Investigación Clínica en Enfermedades Infecciosas y Parasitarias del IMSS para su procesamiento final.

2.2.- Examen Macroscópico y Microscópico

Se analizaron las características de las heces como son: líquida, pastosa, con moco, con sangre y se anotaron en las hojas de control, diseñadas para el estudio de laboratorio (hoja 1).

Se realizó la búsqueda de leucocitos fecales a todas las muestras por microscopía óptica de luz, utilizando la técnica del moco fecal con SSI y la utilización del colorante azul de metileno para la cuenta diferencial de leucocitos polimorfonucleares (PMN), la observación se hizo con el objetivo de mayor aumento.

2.3.- Coprocultivo

Los procedimientos de laboratorio para la identificación de los microorganismos se llevaron a cabo de acuerdo con lo recomendado por la OMS (75). Se realizó coprocultivo para el aislamiento de las siguientes bacterias:

- Salmonella y Shigella (esquema I)

Aislamiento.- Con hisopos estériles se descargaron las muestras en un extremo de los siguientes medios de cultivo: Agar Mac Conkey (Mc), Agar tergitol-7 (T-), Agar Salmonella y Shigella (SS), Agar entérico Hektoen (HE). Las placas se estrilaron con el asa y se incubaron a 37°C durante 24 horas, para obtener colonias aisladas, se seleccionaron las colonias lactosa negativas.

Enriquecimiento.- Simultáneamente a la siembra directa, se inocularon las muestras en tubos con 2 ml. de caldo selenito-F, incubándose a 37°C durante 18 horas, posteriormente se subcultivaron en los medios: Agar HE y Agar Xilosa Lisina Desoxicolato (XLD), se incubaron a 37°C durante 24 horas. La selección de colonias se realizó de acuerdo a la incapacidad que tienen estos microorganismos para fermentar la lactosa.

Identificación bioquímica.- Todas las colonias sospechosas se inocularon en los siguientes medios diferenciales: Agar hierro Kligler (KIA), Agar Citrato de Simmons (C), Agar fenilalanina (Fe), medio para determinar movilidad-indol-ornitina (MIO), Rojo de Metilo-Voges Proskauer (MR-VP), Caldo Lisina Descarboxilasa (LLA), Caldo Urea (U) y Caldo Malonato (Ma), se incubaron a 37°C durante 24 horas. Se realizó la lectura de las pruebas de acuerdo a manuales existentes. Se compararon los resultados con las tablas de identificación de enterobacterias, en donde se presenta el comportamiento bioquímico que siguen estas especies.

Identificación serológica.- Por medio de la identificación bioquímica se determinó la presencia de Salmonella y Shigella, para su confirmación se realizaron las pruebas de aglutinación con sueros específicos y sueros antiespecie, de acuerdo al método descrito por Edwards y Ewing.

Conservación de cepas.- Las cepas de Salmonella y Shigella identificadas se sembraron en un medio rico sin inhibidores, como es el Agar Trypticase Soya (TSA); para la obtención de un crecimiento masivo y puro. El almacenamiento de las cepas se hizo con el empleo de dos métodos para probar cuál era el mejor. Ambos métodos se describen a continuación:

a).- Conservación en gelosa especial.- De un cultivo puro en TSA se tomó una asada y se inocularon dos viales de 3 ml con tapón de hule por cada cepa. Se incubaron a 37°C durante 24 horas, se engargolaron y conservaron en la obscuridad a temperatura ambiente.

b).- Conservación en el medio de caldo infusión cerebro corazón (BHI) con glicerol al 15%. Con una asada del cultivo puro se inocularon dos viales con tapón de rosca conteniendo 2 ml del medio, se guardaron posteriormente, uno a -30°C y el otro a -70°C.

Se conservaron las cepas con el fin de utilizarlas en otros trabajos de investigación referentes a factores de patogenicidad.

- Aeromonas hydrophila (esquema I)

Aislamiento.- La muestra se sembró en los medios: Gelosa-sangre, adicionado con 10 µg/ml de ampicilina (GSamp) y Agar Xilosa-Desoxicolato de sodio-Citrato (XDCA). Ambos se incubaron a 37°C durante 24 horas. La selección de las colonias sospechosas fue mediante los siguientes criterios, a partir del medio GSamp, las β-

hemolíticas y no hemolíticas, y de las placas de XDCA, las colonias no fermentadoras de xilosa.

Identificación bioquímica.- Las colonias sospechosas con actividad citocromo oxidasa positiva, se inocularon en los siguientes medios diferenciales: Medio KIA, Agar Citrato de Simmons, Agar Fe, medio MIO, Caldo LIA, Caldo Ma, Caldo U, Caldo MR-VP, agregando a éstos los siguientes medios: Para reducción de nitratos, para determinar su crecimiento en diferentes concentraciones de sales, en caldo BHI con NaCl al 3.0, 6.5 y 7.5%, caldos para determinar la utilización de diferentes hidratos de carbono: Caldo base rojo de fenol adicionado con inositol (1%), glucosa (1%), arabinosa (1%) y manitol (1%), caldo base Moeller descarboxilasa (arginina), medio OF con glucosa al 1%. Los resultados se compararon con el comportamiento bioquímico que presenta Aeromonas, reportado en las tablas de identificación. Se determino la actividad DNA asa, haciendo las resiembras en este medio para obtener el resultado con el HCl IN.

Conservación de cepas.- De un cultivo puro se tomó una asada y se inocularon dos viales de 2 ml con el medio gelosa especial, se incubaron a 37°C durante 24 horas y se guardaron en la obscuridad a temperatura ambiente, para utilizarlas posteriormente en otros trabajos de investigación.

- Campylobacter jejuni (esquema II)

Aislamiento.- Se sembró la muestra en forma directa en el medio selectivo Skirrow modificado, se colocaron las placas en jarras Gas-Pack. Se les extrajo 95% de aire sustituyéndose con la misma cantidad de una mezcla de CO₂ (10%) y N₂ (85%), para proporcionar las condiciones de microaerofilia. Posteriormente se incubaron a 42-43°C durante 48 horas y se examinaron las placas, las colonias

sospechosas presentaron las siguientes formas: Colonias redondas, brillantes, convexas, bordes enteros, color gris claro y colonias extendidas, bordes irregulares de tipo acuoso.

Enriquecimiento.- Simultáneamente a la siembra directa, la muestra se inoculó también en el medio caldo tioglicolato de sodio, se conservó a 4°C durante 48 horas para favorecer su crecimiento. Se subcultivó en el medio Skirrow modificado, se incubó a 42-43°C en una atmósfera microaerofílica (5% de O₂ 10% de CO₂ y 85% de N₂) durante 48 horas.

Identificación presuntiva.- Se realizó la observación microscópica de las colonias sospechosas de dos formas diferentes: Una preparación en fresco para observar el movimiento característico, utilizando el microscopio en contraste de fases y la otra fijando y tiñendo con solución acuosa de fucsina básica al 1%, para observar la morfología característica por medio de microscopía óptica con el objetivo de 100X. A las colonias que presentaron morfología característica de Campylobacter, se les hizo la prueba de la oxidasa y catalasa.

Identificación final.- Las colonias con pruebas de oxidasa y catalasa positiva se sembraron para observar crecimiento a temperaturas de 42°C, 37°C y 25°C en una atmósfera microaerofílica, se realizaron las pruebas de resistencia a la cefalotina, sensibilidad al ácido nalidíxico y capacidad de hidrólisis de hipurato para diferenciar entre Campylobacter jejuni y Campylobacter coli.

Conservación de cepas.- Se realizó empleando los métodos previamente descritos para las especies de Salmonella y Shigella, con el mismo fin.

- Yersinia enterocolitica (esquema II)

Aislamiento.- Las muestras se sembraron en forma directa en el medio selectivo, Agar Yersinia. Las placas se incubaron a 25°C durante 48 horas, se examinaron a las 24 y 48 horas, para determinar como sospechosas todas aquellas colonias, lactosa negativa y de forma redonda, con bordes irregulares de apariencia puntiforme.

Enriquecimiento.- Se inocularon tubos conteniendo 2 ml de Caldo Yersinia, se sometieron a enriquecimiento manteniéndose a 4°C durante 15 días, se subcultivaron en el medio agar Yersinia y agar SS a 25°C durante 24-48 horas.

Identificación bioquímica.- Todas las colonias sospechosas se inocularon en los medios diferenciales: Medio KIA, Agar Citrato de Simmons, Agar fenilalanina, Caldo Lisina Descarboxilasa, Caldo malonato; por duplicado los medios: caldo MR-VP, caldo Urea (U) y medio MIO. Se incubaron a 37°C durante 24 horas, dejando en incubación el caldo U, por 24 horas más, debido a su lenta utilización. Los medio que se inocularon por duplicado, se incubaron uno de los tubos de cada uno a temperatura ambiente durante 24 horas. Los resultados se compararon con las tablas para identificación de enterobacterias.

Conservación de cepas.- De un cultivo puro se tomó una asada y se inocularon viales conteniendo 2 ml del medio gelosa especial, se incubaron a 37°C durante 24 horas, se engargolaron y se conservaron bajo la obscuridad a temperatura ambiente

para su futura utilización en trabajos de investigación relacionados a factores de patogenicidad.

V. LABORATORIO

No. registro

Nombre: _____
 Paterno Materno Nombre

Sexo Edad

Fecha de la toma de muestra

Características macroscópicas de la muestra (si=1; no=2)

pastosa _____ líquida o semilíquida _____
moco _____ sangre _____

Moco fecal polimorfonucleares por campo _____

si se tomó =1
no se tomó =2

E. histolytica * _____ si =1
Giardia lamblia * _____ no =2

ELISA PARA

*Trofozoitos

Rotavirus:

_____ si se tomó =1
no se tomó =2

Positiva _____ si =1 no =2

Cryptosporidium

_____ si se tomó =1
no se tomó =2

Positiva _____ si =1 no =2

Coprocultivo

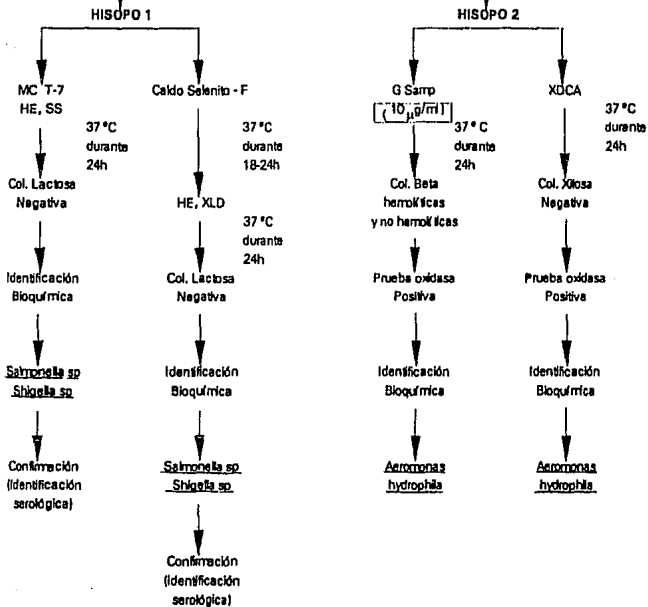
Bacterias patógenas aisladas

_____ si se tomó =1
no se tomó =2
hisopo rectal =3

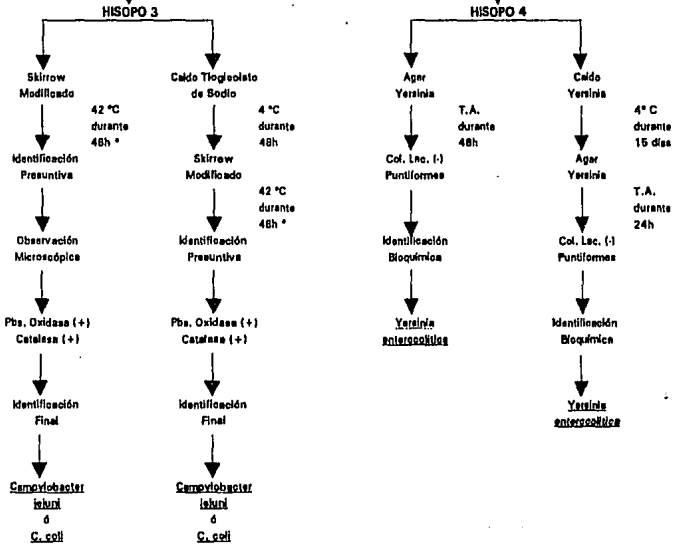
1. _____
2. _____
3. _____
4. _____
5. _____

Observaciones: _____

MUESTRA BIOLÓGICA



MUESTRA BIOLÓGICA



* $CO_2 = 10\%$, $N_2 = 85\%$, $O_2 = 3\%$

ESQUEMA II

III.- RESULTADOS

El estudio comprendió el análisis de 190 muestras de individuos con diarrea con < de 15 días de evolución y 50 de sujetos controles o testigos, todos ellos pacientes ambulatorios de consulta externa. De los 190 pacientes estudiados, 23 presentaron diarrea con sangre y 167 diarrea sin sangre. La distribución por edad de los sujetos control y de los pacientes estudiados presentando diarrea con sangre y diarrea sin sangre puede verse en la tabla I.

En el proyecto general se incluyó la identificación de bacterias, virus y parásitos provenientes de muestras de pacientes con diarrea obtenidas de dos clínicas diferentes. En el presente estudio sólo se reportan los resultados obtenidos en una de las clínicas en estudio (Clínica No. 19 del IMSS). Los patógenos bacterianos fueron predominantes, con una identificación porcentual que correspondió al 18.4%.

El total de microorganismos identificados en los pacientes fue 53; identificándose 12 (52%) en el grupo de diarrea con sangre y 41 (25%) en el grupo de diarrea sin sangre. En los controles se identificaron 5 (10%) microorganismos potencialmente patógenos. El porcentaje de cada uno de los microorganismos identificados se presenta en la tabla II.

Como parte del trabajo en conjunto se investigaron para Rotavirus los 190 pacientes y los 50 testigos utilizando la técnica de Rotazyme II. Los casos positivos fueron 14 (7%) en los pacientes y 1 (2%) en los controles; así como la detección de trofozoitos de Giardia lamblia en 3 de los pacientes, representando el 2% y en uno de los controles, representando igualmente el 2%. Se identificaron ooquistes de

Cryptosporidium spp en un paciente, (1%), en los controles no se identificaron. En el caso de Entamoeba histolytica no se identificó en ningún caso, ni en pacientes ni en controles.

Los microorganismos no identificados correspondieron al 74% en los pacientes y al 92% en el grupo control. Se identificó más de un microorganismo en el 1% de los pacientes y en el 2% en los controles (infecciones mixtas), por lo cual las sumas de los porcentajes son mayores de 100% (Tabla II).

Las especies identificadas de los diferentes patógenos durante los dos periodos en estudio que comprendieron los meses de Mayo a Julio y de Septiembre a Diciembre se aislaron de pacientes con diarrea sin sangre y con sangre, el mayor porcentaje de aislamiento se observó en los pacientes que presentaron diarrea con sangre, principalmente en S. flexneri, en ambos periodos. Los resultados obtenidos de las diferentes especies identificadas durante ambos periodos pueden observarse en la tabla III.

La distribución de las bacterias identificadas con respecto a los diferentes grupos de edad se muestra en la tabla IV. En la mayor parte de los grupos etarios se observó que la frecuencia más alta de identificación en pacientes correspondió a Shigella con excepción de los mayores de 44 años en quienes se obtuvo una frecuencia de aislamiento de Shigella igual a la de Yersinia enterocolitica que correspondió al 5%. Con respecto a las especies de Shigella, la mayor frecuencia de aislamiento se observó en los grupos etarios correspondientes a 2-4 años para S. dysenteriae, S. boydii y S. sonnei y 5-14 años para S. flexneri.

Respecto al estudio del moco fecal, en la mayor parte de las bacterias la cantidad de leucocitos polimorfonucleares (PMN) por campo fue de 0-5, en el caso de las especies de Shigella se observó una mayor cantidad, encontrando un 50% de casos con > de 15 PMN por campo, los porcentajes obtenidos para cada bacteria se aprecian en la tabla V. De los signos y síntomas que presentaron los pacientes a quienes se les identificó alguna bacteria, el más característico fue el cólico y los menos característicos fueron el tenésmo y el eritema glúteo, los resultados para cada microorganismo se muestran en la tabla VI.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

Clínica 19 Coyoacán IMSS
DIARREA INFECCIOSA AGUDA

Tabla I CARACTERÍSTICAS DE LA MUESTRA ESTUDIADA

GRUPO ETARIO (AÑOS)	CONTROLES N=50		DIARREA CON SANGRE N=23		DIARREA SIN SANGRE N=167	
	N	%	N	%	N	%
< 2	9	18	3	13	37	22
2 - 4	3	6	5	22	14	8
5 - 14	9	18	4	17	17	10
15 - 44	23	46	8	35	80	48
> 44	6	12	3	13	19	12

N = Número de casos estudiados

Clinica 19 Coyoacán IMSS

Tabla II ETIOLOGIA DE LA DIARREA INFECCIOSA AGUDA

MICROORGANISMOS	PACIENTES		CONTROLES		DIARREA CON SANGRE		DIARREA SIN SANGRE	
	TOTAL N=190		N=50		N=23		N=167	
	N	%	N	%	N	%	N	%
<u>Shigella spp *</u>	25	13	1	2	11	48	14	8
<u>Salmonella enteritidis *</u>	3	2	1	2	0	0	3	2
<u>Aeromonas hydrophila</u>	3	2	0	0	0	0	3	2
<u>Campylobacter jejuni *</u>	1	1	1	2	0	0	1	1
<u>Yersinia enterocolitica</u>	3	2	0	0	0	0	3	2
<u>Rotavirus *</u>	14	7	1	2	1	4	13	8
<u>Entamoeba histolytica</u>	0	0	0	0	0	0	0	0
<u>Giardia lamblia *</u>	3	2	1	2	0	0	3	2
<u>Cryptosporidium spp</u>	1	1	0	0	0	0	1	1
No identificados	140	74	46	92	11	48	129	77

N=Numero de casos estudiados

*Estos microorganismos formaron infecciones mixtas en dos pacientes y un control.

Clínica 19 Coyoacán IMSS

Tabla III FRECUENCIA DURANTE LOS PERIODOS EN ESTUDIO

MICROORGANISMOS	Mayo - Julio				Septiembre - Diciembre			
	Sin Sangre		Con Sangre		Sin Sangre		Con Sangre	
	N=86	%	N=12	%	N=81	%	N=11	%
<u>Shigella dysenteriae</u>	0	0	1	8	3	4	0	0
<u>Shigella flexneri</u>	2	2	2	17	3	4	4	36
<u>Shigella boydii</u>	0	0	2	17	1	1	1	9
<u>Shigella sonnei</u>	4	5	1	8	1	1	0	0
<u>Salmonella enteritidis</u>	0	0	0	0	3	4	0	0
<u>Aeromonas hydrophila</u>	1	1	0	0	2	2	0	0
<u>Campylobacter jejuni</u>	0	0	0	0	1	1	0	0
<u>Yersinia enterocolitica</u>	1	1	0	0	2	2	0	0
No identificados	76	88	6	50	53	65	5	45

N=Numero de casos estudiados

Clinica 19 coyoacán IMSS

MICROORGANISMOS IDENTIFICADOS EN PACIENTES
CON DIARREA INFECCIOSA AGUDA, POR GRUPOS DE EDAD

Tabla IV

Mayo-Julio Septiembre-Diciembre

MICROORGANISMOS	TOTAL N=190	Por Grupo de Edad en Años									
		<2		2-4		5-14		15-44		>44	
		N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
<u>Shigella dysenteriae</u>	4	1	3	2	10	0	0	1	1	0	0
<u>Shigella flexneri</u>	11	1	3	1	5	2	10	6	7	1	5
<u>Shigella boydii</u>	4	1	3	2	10	1	5	0	0	0	0
<u>Shigella sonnei</u>	6	1	3	4	20	1	5	0	0	0	0
<u>Salmonella enteritidis</u>	3	0	0	0	0	1	5	2	2	0	0
<u>Aeromonas hydrophila</u>	3	1	3	1	5	0	0	1	1	0	0
<u>Campylobacter jejuni</u>	1	0	0	1	5	0	0	0	0	0	0
<u>Yersinia enterocolitica</u>	3	1	3	0	0	0	0	1	1	1	5
No identificados	140	25	63	9	45	15	75	72	82	19	86

N=Número de casos estudiados

Clínica 19 Coyoacán IMSS

Tabla V ESTUDIO DE MOCO FECAL

MICROORGANISMOS	TOTAL N=190	Leucocitos PMN por campo					
		0 - 5		6 - 15		> 15	
		N=164	%	N=12	%	N=14	%
<u>Shigella dysenteriae</u>	4	2	8	0	0	2	8
<u>Shigella flexneri</u>	11	7	28	1	4	3	12
<u>Shigella boydii</u>	4	2	8	1	4	1	4
<u>Shigella sonnei</u>	6	2	8	3	12	1	4
<u>Salmonella enteritidis</u>	3	2	67	1	33	0	0
<u>Aeromonas hydrophila</u>	3	2	67	0	0	1	33
<u>Campylobacter jejuni</u>	1	1	100	0	0	0	0
<u>Yersinia enterocolitica</u>	3	3	100	0	0	0	0
No Identificados	140	129	92	5	4	6	4

Clinica 19 Coyoacán IMSS

Tabla VI

DIARREA INFECCIOSA AGUDA EN UNA COMUNIDAD URBANA

MICROORGANISMOS	Pacientes Total N=180	% Signos y Síntomas									
		Deshidratación leve	Náuseas	Vómito	Sed	Cólico	Pujo	Tenestmo	Eritema gástrico	Fiebre	Evacuaciones en 24 hrs.
<u>Shigella spp</u>	25	40	48	40	44	92	24	12	16	68	7* (1-18)
<u>Salmonella enteritidis</u>	3	100	100	50	100	100	50	0	0	100	5* (4-5)
<u>Aeromonas hydrophila</u>	3	33	67	33	67	100	0	0	0	100	4* (3-8)
<u>Campylobacter jejuni</u>	1	100	100	100	100	100	0	0	0	0	8
<u>Yersinia enterocolitica</u>	3	33	33	67	0	100	33	0	0	33	6* (5-7)
No identificados	140	36	47	37	35	78	14	11	28	37	2*

*Mediana

IV.- DISCUSION

La mayor proporción de los pacientes estudiados con respecto a la distribución por edad correspondió al grupo entre 15 y 44 años, a diferencia de otros estudios realizados (28,79,14), los cuales se enfocan a menores de edad, esta diferencia se debe a que el trabajo se realizó en una clínica de primer nivel de atención médica a donde acuden con mayor frecuencia personas en edad productiva.

La frecuencia de identificación de microorganismos obtenida en este estudio en el grupo de pacientes es muy parecida a la encontrada por otros autores tanto en nuestro país como en el extranjero. La identificación de uno o más agentes potencialmente patógenos fue posible en un 28% de las muestras diarreicas, quedando un 74% como etiología desconocida, la suma del porcentaje es mayor del 100% por la presencia de infecciones mixtas. En un 10% de los individuos considerados como controles, se identificó uno o más microorganismos patógenos, lo que indica la presencia de portadores entre la población sana, los cuales constituyen una fuente importante de contagio. En las zonas de bajos recursos la existencia de portadores asintomáticos es común siendo un reflejo de las malas condiciones sanitarias en las que vive la población.

En el caso de infecciones mixtas, las asociaciones observadas fueron: En un paciente Shigella dysenteriae y Rotavirus, en otro paciente Shigella dysenteriae - Campylobacter jejuni y Giardia lamblia y en un individuo considerado control Salmonella enteritidis y Giardia lamblia. La frecuencia de identificación en infecciones mixtas en los pacientes en comparación con el grupo control no fue estadísticamente significativa ($P=0.59$). Sin embargo, en el total de microorganismos

identificados, la frecuencia de identificación en el grupo de pacientes en comparación con el grupo control, sí fue estadísticamente significativa ($P=0.008$).

En la población estudiada, Shigella spp fue uno de los microorganismos más frecuentemente aislado; el porcentaje de aislamiento fue similar a lo encontrado en otros estudios en México (3,42,58), correspondiendo a un 13% en 25 pacientes, la mayor frecuencia de aislamiento para las especies de Shigella correspondió a S. flexneri al igual que en otro estudio realizado en Calcuta (14), sobre todo en aquellos pacientes que presentaron diarrea con sangre, en menor porcentaje de aislamiento se identificó a S. sonnei y por último en igual proporción S. dysenteriae y S. boydii, ninguna de estas especies mostró una preferencia característica por alguna época del año, predominó su identificación en los niños preescolares y escolares, como ya también se ha descrito (50). Del resto de los microorganismos, su frecuencia fue similar a lo encontrado en otros estudios (52,58), a excepción de Campylobacter jejuni y Entamoeba histolytica.

Respecto a la baja frecuencia de aislamiento de Campylobacter jejuni; este microorganismo se ha identificado más frecuentemente en pacientes hospitalizados (47), en comunidades semiurbanas y rurales en México (9,26) y en menores de edad (156), sobre todo en los menores de 2 años (79).

El estudio del moco fecal fue más característico para las especies de Shigella ya que se identificaron mayor cantidad de leucocitos polimorfonucleares (PMN) por campo, en comparación con los otros microorganismos identificados en los que la cantidad de PMN fue tan baja que se considera este estudio como negativo. El estudio del moco fecal no es muy significativo en la mayoría de los casos solo en aquellos en los que la infección es producida por especies de Shigella sobre todo por S. flexneri

como podemos ver en este trabajo, en donde encontramos un 12% de casos en los que se observaron > de 15 PMN por campo.

En los pacientes que presentaron diarrea con sangre se identificó con una frecuencia significativamente mayor, Shigella spp en un 48%. Otros datos clínicos o características de la evolución de los pacientes no permiten sospechar, con cierto grado de seguridad otros tipos de microorganismos. En Shigella spp el dato clínico más característico es la presencia de fiebre, sin embargo en este trabajo el 92% de los pacientes presentaron cólicos y sólo el 68% de ellos presentaron fiebre, en Salmonella enteritidis, los pacientes no presentaron tenesmo ni eritma glúteo; en el caso de los demás signos y síntomas los porcentajes fueron muy altos. En Aeromonas hydrophila los porcentajes más altos correspondieron a los pacientes que tuvieron cólicos y fiebre; en Yersinia enterocolitica el mayor porcentaje fue para los pacientes que presentaron cólicos, en la infección por Campylobacter jejuni se observó la presencia de deshidratación, náusea, vómito sed y cólico en un elevado porcentaje, pero hay que tomar en consideración que sólo se identificó en un paciente. El número de evacuaciones en 24 horas fue variable, pero el mayor número correspondió a 18 en 24h, en aquellos pacientes que presentaron infección ocasionada por especies de Shigella, (mediana de 7), en el caso de los microorganismos no identificados se encontró una mediana baja, de 2.

Los signos y síntomas clínicos que presentan los pacientes con diarrea aguda no complicada, no son suficientes para que los médicos familiares puedan dar un tratamiento específico, porque no saben que agente etiológico es el causante de la enfermedad, solo en aquellos casos en los que la diarrea se presenta con fiebre y sangre en las evacuaciones, pueden suponer que la enfermedad es ocasionada por

especies de Shigella, pero no siempre concuerdan estos datos, ya que como observamos en este trabajo, no todas las especies de Shigella producen fiebre. La información que proporciona este estudio permite conocer la etiología de la diarrea infecciosa aguda en esta población del área urbana, lo cual es necesario para que los médicos familiares que manejan pacientes en el primer nivel de atención médica tengan un panorama más amplio y de esta forma puedan proporcionar al paciente un tratamiento más adecuado.

CONCLUSIONES

-- La frecuencia de identificación de microorganismos obtenida en el grupo de pacientes provenientes de una población abierta del área urbana es estadísticamente más significativa en comparación con el grupo testigo.

-- Con los resultados obtenidos, se confirma la presencia de portadores entre la población sana de esta área urbana.

-- Existe un porcentaje apreciable de casos en los cuales el agente etiológico permanece sin identificar; las razones pueden ser diversas, entre las que se pueden mencionar: la toma de la muestra al inicio de la enfermedad, la cantidad de microorganismos en el momento de realizar el primoaislamiento y el uso de antimicrobianos en forma indiscriminada .

-- Los patógenos bacterianos siguen siendo predominantes en infecciones gastrointestinales en nuestro medio.

-- El agente bacteriano predominante como productor de diarrea infecciosa aguda fué Shigella spp; sin embargo, debe tenerse en cuenta que en este trabajo no se incluyeron los porcentajes de E. coli con sus distintos factores de patogenicidad.

-- Dentro de las especies de Shigella, este trabajo mostró que S. flexneri, es la principal especie productora de diarrea infecciosa aguda.

-- Shigella flexneri se identifica más frecuentemente en pacientes que presentan diarrea con sangre.

-- Campylobacter jejuni tiene poca importancia en la etiología de la diarrea infecciosa aguda en esta comunidad del área urbana, lo cual podría explicarse por el hecho de que las familias no tienen criadero de animales, principalmente aves.

-- El estudio del moco fecal, aunque no fué analizado en forma extensa permite concluir sobre todo en los casos de diarrea con sangre, que es orientador del diagnóstico de shigelosis.

-- Los signos y síntomas clínicos por sí solos, no fueron orientadores para determinar la presencia de un patógeno intestinal específico.

-- Es conveniente seguir realizando estudios en pacientes ambulatorios en el primer nivel de atención médica que permitan determinar los agentes potencialmente patógenos en la diarrea infecciosa aguda para establecer esquemas de tratamiento médico más adecuados.

V.- BIBLIOGRAFIA

- 01.- Agger WA., Mc Cormick JD. and Gurwith MJ. Clinical and microbiological features Aeromonas hydrophila associated diarrhea. *J. Clin. Microbiol.* 1985; 21(6): 909-913
- 02.- Alabi SA. and Odugbemi T. Biochemical characteristics and a simple scheme for the identification of Aeromonas species and Plesiomonas shigelloides. *J. Trop. Med. Hyg.* 1990; 93: 166-169.
- 03.- Alvarado AFJ., Bustillo GC., Galindo E., Méndez TE., Alvarado GS. y Velásquez JL. Frecuencia de microorganismos enteropatógenos aislados en niños con y sin diarrea aguda. *Bol. Med. Hosp. Infant. Méx.* 1985; 42(6): 354-359.
- 04.- Beer KB. and Miller VL. Amino acid substitutions in naturally occurring of variants ail result in altered invasion activity. *J. Bacteriol.* 1992; 174(4): 1360-1369.
- 05.- Bern C., Martines J., Zoysa I. and Glass RI. The magnitude of the global problem of diarrhoeal disease: a ten-year update. *WHO Bulletin OMS.* 1992; 70(6): 705-714.
- 06.- Burke V., Gracey M. Robinson J., Peck D., Beaman J. and Bundelle C. The microbiology of childhood gastroenteritis: Aeromonas species and other infective agents. *J. Infect. Dis.* 1983; 148(1): 68-74.
- 07.- Butler T., Speelman P., Kabir I. and Banwell J. Colonic dysfunction during shigellosis. *J. Infect. Dis.* 1986; 154(5): 817-824.
- 08.- Cabrita-J., Pires-I., Vlaes-L., Coignau-H., Levy-J., Goossens-H., Gonca-IAP., de-Mol-P. and Butzler-JP. Campylobacter enteritidis in Portugal: epidemiological features and biological markers. *Eur. J. Epidemiol.* 1992; 8(1): 22-26.
- 09.- Calva JJ., Ruiz-Palacios GM., Lopez Vidal AB., Ramos A. and Bojalil R. Cohort study of intestinal infection with Campylobacter in Mexican children. *Lancet* 1988; I(8584): 503-506.

- 10.- Cover TL. y Aber RC. Yersinia enterocolitica. *New Eng. J. Med.* 1989; 321(1): 16-24.
- 11.- Cuéllar RA. Estudio diacrónico del síndrome diarreico en México, análisis de 1930 a 1984. Un enfoque terapéutico. *Salud Pública Méx.* 1984; 26(5): 492-500.
- 12.- Delor I. and Cornelis YG. Role of Yersinia enterocolitica Yst toxin in experimental infection of young rabbits. *Infect. Immun.* 1992; 60(10): 4269-4277.
- 13.- Donohue-RA., Achenson DWK. and Keush GT. Shiga toxin: purification, structure and function. *Rev. Infect. Dis.* 1991; 13(suppl 4): S293-S297.
- 14.- Dutta P., Bhattacharya SK., Sen D., Bhattacharya MK., Mitra U., Rasaily R., Manna B., Mukherjee A. and Pal SC. shigellosis in children: a prospective hospital based study. *Indian pediatrics* 1992; 29: 1125-1130.
- 15.- Farmer III JJ., Davis BR., Hickman-Brenner FW., Mc Whorter A., Huntley C., Asbury MA., Riddle C., Wathen-Grady HG., Elias C., Fanning GR., Steigerwalt AG., O'Hara CM., Morris GK., Smith PB and Brenner DJ. Biochemical identification of new species and biogroups of Enterobacteriaceae isolated from clinical specimens. *J. Clin. Microbiol.* 1985; 21(1): 46-76.
- 16.- Farmer III JJ., Carter GP., Miller VL. Falkow S. and Wachsmuth IK. Pyrazinamidase, CR-mox agar, salicin fermentation-esculin hydrolysis and d-xylose fermentation for identifying pathogenic serotypes of Yersinia enterocolitica. *J. Clin. Microbiol.* 1992; 30(10): 2589-2594.
- 17.- Figueroa GG. y Araya QM. Infecciones sintomáticas y asintomáticas por Campylobacter jejuni. *Rev. Chil. Pediatr.* 1985; 56(6): 486-490.
- 18.- Figura N., Marri L. Verdiani S., Ceccherini C. and Barberi A. Prevalence, species differentiation, and toxigenicity of Aeromonas strains in cases childhood gastroenteritis and in controls *J. Clin. Microbiol.* 1986; 23(3): 595-599.

- 19.- Fitzroy JH., Udoz SA., Wanke ChA and Aziz KMA. Epidemiology of persistent diarrhea and etiologic agents in Mizapur Bangladesh. *Acta Pediatr.* 1992; Suppl 381: 27-31.
- 20.- García-Villanova RB., Espinar CA. and Bolaños CMJ. A comparative study of strains of Salmonella isolated from irrigation waters, vegetables and human infections. *Epidem. Inf.* 1987; 98: 271-276.
- 21.- Girón JA., Jones T., Millán VF., Castro ME., Zárate L., Fry J., Frankel G., Moseley SL., Baudry B., KaperJB., Schoolnik GK and Riley LW. Difusse-adhering Escherichia coli (DAEC) as a putative cause of diarrhea in Mayan children in Mexico. *J. Infect. Dis.* 1991; 163: 507-513.
- 22.- Gorbach SL. Bacterial diarrhoea and its treatmen. *Lancet* 1987; II(8572): 1378-1382.
- 23.- Gracey M., Burke V. and Robinson J. Aeromonas associated gastroenteritis. *Lancet* 1982; II(8311): 1304-1306.
- 24.- Graevenitz A. and Bucher C. Evaluation of differential and selective media for isolation of Aeromonas and Plesiomonas spp from human feces *J. Clin. Microbiol.* 1983; 17(1): 16-21.
- 25.- Guisacafre H., Muñoz O. y Gutiérrez G. Normas para el tratamiento de la diarea infecciosa aguda. *Bol. Med. Hosp. Infant. Méx.* 1986; 43(11): 702-707.
- 26.- Gutiérrez G. Martínez MC. Guisacafre H., Gómez G., Peniche A y Onofre M. Encuesta sobre el uso de antimicrobianos y de hidratación oral en la diarrea infecciosa aguda en el medio rural mexicano. *Bol. Men. Epidemiol. Sector Salud Méx.* 1986; I(5): 66-71.
- 27.- Hernández, F., Cipagauta L., Rivera P., Herrera ML. y Rodríguez RM. Estudio ultraestructural de Campylobacter fetus spp jejuni. *Rev. Lat-amer. Microbiol.* 1985; 27: 11-20.

- 28.- *Henriquez OM., Venegas VG., Soto TG., Rudolf PT. y Salas CJ. Etiología bacteriana de la diarrea aguda del lactante en otoño a invierno. Rev. Chil. Pediatr. 1985; 56(6): 451-454.*
- 29.- *Ibrahim A., Liesack W and Stackebrandt E. Polymerase chain reaction-gene probe detection system specific for pathogenic strains of Yersinia enterocolitica. J. Clin. Microbiol. 1992; 30(8): 1942-1947.*
- 30.- *Kay AB., Guerrero EC. and Sack BR. Media for the isolation of Aeromonas hydrophila. J. Clin. Microbiol. 1985; 22(5): 888-890.*
- 31.- *Keush GT., Jacewicz M., Mobassaleh and Donohue-RA. Shiga Toxin: intestinal cell receptors and pathophysiology of enterotoxic effects. Rev. Infect. Dis. 1991; 13(suppl 4): S304-S310.*
- 32.- *Kindschuh M., Pickering LK., Cleary TG. and Ruiz-Palacios G. Clinical and biochemical significance of toxin production by Aeromonas hydrophila. J. Clin. Microbiol. 1987; 25(5): 916-921.*
- 33.- *Kipperman H., Ephros M., Lambdin M. and White-RK. Aeromonas hydrophila a treatable cause of diarrhea. Pediatrics. 1984; 73(2): 253-254.*
- 34.- *Kirov SM., Rees B., Wellock RC., Goldsmid JM. and Van Galen AD. Virulence characteristics of Aeromonas spp in relation to source and biotype. J. Clin. Microbiol. 1986; 24(5): 827-834.*
- 35.- *Krieg NR., Holt JG.*
BERGEY'S MANUAL OF SYSTEMATIC BACTERIOLOGY
Vol. I
The Williams & Wilkins Co.
Baltimore/London. 1984
- 36.- *Kwaga JKP and Iversen JO. Laboratory investigation of virulence among strains of Yersinia enterocolitica and related species isolated from pigs and pork products. Can. J. Microbiol. 1992; 38: 92-97.*

- 37.- Kwaga J., Iversen JO and Misra V. Detection of pathogenic Yersinia enterocolitica by polymerase chain reaction and digoxigenin-labeled polynucleotide probes. *J. Clin. Microbiol.* 1992; 30(10): 2668-2673.
- 38.- Lanata FC., Black ER., Maúrtua D., Gil A., Gabilondo A., Yi A., Miranda E., Gilman HR., León BR. and Bradley SR. Etiologic agents in acute vs persistent diarrhea in children under three years of age in peri-urban Lima, Perú. *Acta. Pediatr.* 1992; Suppl 381: 32-38.
- 39.- Lennette EH., Balows A., Hausler WJ., Shadomy HJ.
 MANUAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY
 4th Edition
 American Society for Microbiology
 Washington DC, EUA. 1985
- 40.- Lima AAM. and Guerrant RL. Persistent diarrhea in children: Epidemiology, risk factors, pathophysiology, nutritional impact and management. *Epidemiol. Rev.* 1992; 14: 222-242.
- 41.- Mathan VI. and Mathan MM. Intestinal manifestations of invasive diarrheas and their diagnosis. *Rev. Infect. Dis.* 1991; 13(suppl 4): S311-S313.
- 42.- Mathewson JJ., Oberhelman AR., Dupont LH., Cebada JF. and Garibay VE. Enteroadherent Escherichia coli as a cause of diarrhea among children in México. *J. Clin. Microbiol.* 1987; 25(10): 1917-1919.
- 43.- Millership SE. and Chattopadhyay B. Methods for the isolation of Aeromonas hydrophila and Plesiomonas shigelloides from faeces. *J. Hyg.* 1984; 92: 145-152.
- 44.- Mills KCh. and Gherna LR. Hydrolysis of indoxil acetate by Campylobacter species. *J. Clin. Microbiol.* 1987; 25(8): 1560-1561.
- 45.- Mingrone GM., Fantasia M., Figura N., and Guglielmetti P. Characteristics of Yersinia enterocolitica isolated from children with diarrhea in Italy. *J. Clin. Microbiol.* 1987; 25(7): 1301-1304.

- 46.- Mobassalch M., Donohue-RA., Jacewicz M., Grand RJ. and Reush GT. Patogenesis of Shigella diarrhea: Evidence for a developmentally regulated glycolipid receptor for Shigella toxin involved in the fluid secretory response of rabbit small intestine. *J. Infect. Dis.* 1988; 157(5): 1023-1031.
- 47.- Morales C., García P., Pedraza J., D'Amico A., Palacios T. y Muñoz HO. Frecuencia de Campylobacter fetus ss jejuni y Yersinia enterocolitica en niños con diarrea aguda. *Bol. Med. Infant. Méx.* 1984; 41(2): 86-89.
- 48.- Mota HF. Programa nacional de hidratación oral en diarreas. 1983-1986. Evaluación y perspectivas. *Salud Pública Méx.* 1987; 29(4): 268-275.
- 49.- Mota HF. y Zamora HF. Tratamiento de niños con enfermedad diarreica aguda. Conocimiento y actitudes del personal de salud. *Bol. Med. Hosp. Infant. Méx.* 1992; 49(10): 659-665.
- 50.- Muñoz HO., Coello-Ramírez P., Serafín AF., Olarte J., Pickering LK., Dupont H y Gutiérrez G. Gastroenteritis infecciosa aguda, etiología y su correlación con las manifestaciones clínicas y el moco fecal. *Arch. Invest. Med.* 1979; 10: 135-145.
- 51.- Nassif X., Mazert MCh., Mounier J. and Sansonett PJ. Evaluation with an iuc:: Tn 10 mutant of role of aerobactin production in the virulence of Shigella flexneri. *Infect. Immun.* 1987; 55(9): 1963-1969.
- 52.- Nelson JD. Etiology and epidemiology of diarrreal diseases in the United States. *Am. J. Med.* 1985; 78(suppl 6B): 76-80.
- 53.- O' Brien AD. and Holmes RK. Shiga and Shiga-like toxins. *Microbiol. Rev.* 1987; 51(2): 206-220.
- 54.- Olarte J. Etiología y diagnóstico de las diarreas infecciosas. *Rev. Méx. Ped.* 1983;1:101-110.
- 55.- Olarte J. y Gutiérrez G. El problema de las diarreas infecciosas. *Bol. Men. Epidemiol. Sector Salud Méx.* 1986., 1(5): 61-65 .

- 56.- Ostroff SM., Kapperud G., Jorgen Lassen J., Aasen S. and Tauxe RV. Clinical features of sporadic Yersinia enterocolitica infections in Norway. *J. Infect. Dis.* 1992; 166: 812-817.
- 57.- Pasley JW. and Lauer BA. Neonatal Yersinia enterocolitica enteritis. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 1992; 11(4): 331-332.
- 58.- Pickering L., Evans D., Muñoz O., DuPont HL., Coello RP., Vollet jj., Conklin RH., Olarte J. and Kohl S. Prospective study of enteropathogens in children with diarrhea in Houston and Mexico. *J. Pediatr.* 1978; 93(3): 383-388.
- 59.- Prado D., Cleary TG., Pickering LK., Ericson ChD., Bartlett III AV., Dupont HL. and Johnson PC. The relation between production of cytotoxin and clinical features in Shigellosis. *J. Infect. Dis.* 1986; 154(1): 149-155.
- 60.- Prado J., Sim A. y Avendaño C. Prevalencia de agentes enteropatógenos en síndrome diarreico agudo en niños hospitalizados y ambulatorios. *Rev. Chil. Pediatr.* 1987; 58(4): 285-290.
- 61.- Quinn DM., Wong YF., Atkinson HM. and Flower LR. Isolation of carbohydrate-reactive outer membrane proteins of Aeromonas hydrophila. *Infect. Immun.* 1993; 61(2): 371-377.
- 62.- Rennels MB. and Levine MM. Clasical bacterial diarrhea: perspectives and update-Salmonella, Shigella, Escherichia coli, Aeromonas and Plesiomonas. *Pediatr. Infect. Dis.* 1986; 5(1): S91-S100.
- 63.- Richards L., Cleason M. and Pierce FN. Management of acute diarrhea in children: lessons learned. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 1993; 12(1): 5-9.
- 64.- Robins BRM., Takeda T, Fasano A., Bordun AM., Dohi S, Kasuga H., Fong G., Prado V., Guerrant RL. and Morris JG. Assessment of enterotoxin production by Yersinia enterocolitica and identification of a novel heat-stable enterotoxin produced by a noninvasive Y. enterocolitica strain isolated from clinical material. *Infect. Immun.* 1993; 61(2): 764-767.

- 65.- Saebo A. and Lassen J. Acute and chronic gastrointestinal manifestations associated with Yersinia enterocolitica infection. *Ann. Surg.* 1992; 215(3): 250-255.
- 66.- Sansonetti PJ. Genetic and molecular basis of epithelial cell invasion by Shigella species. *Rev. Infect. Dis.* 1991; 13 (suppl 4): S285-S292.
- 67.- Saraswathi K. and Deodhar LP. Diarrhoea associated, with Aeromonas hydrophila. *Indian J. Med. Res.* 1986; 84: 571-573.
- 68.- Sekizaki T., Harayama S., Brasil GM. and Timmis KN. Localization of *stx*, a determinant essential for high-level production of Shiga toxin by Shigella dysenteriae serotype 1, near *pyrF* and generation of *stx* transposon mutants. *Infect. Immun.* 1987; 55(9): 2208-2214.
- 69.- Sory MP., Kaniga K., Goldenberg S. and Cornelis GR. Expression of the eukaryotic Trypanosoma cruzi CRA gene in Yersinia enterocolitica and induction of an immune response against CRA in mice. *Infect. Immun.* 1992; 60(9): 3830-3836.
- 70.- Stoll BJ., Glass RJ., Mimdadal HM., Holt JE. and Banu H. Surveillance of patients attending a diarrhoeal disease hospital in Bangladesh. *British Medical J.* 1982; 285: 1185-1188.
- 71.- Tauxe VR., Tormey PM., Mascola L., Hargrett-Bean TN. and Blake AP. Salmonellosis outbreak on transatlantic flights; foodborne illness on aircraft: 1947-1984. *Am. J. Epidemiol.* 1987; 125(1): 150-157.
- 72.- Taylor ND., Echeverria P., Pál T., Sethabutr O., Saiborisuth S., Sricharmorn S., Rowe B. and Crooss J. The role of Shigella spp., enteroinvasive Escherichia coli and other enteropathogens as causes of dysentery in Thailand. *J. Infect. Dis.* 1986; 153(6): 1113-1138.

- 73.- *Torregrosa Fl., Olarte J., Rodríguez y col.*
ENFERMEDADES DIARREICAS EN EL NIÑO.
 9ª Edición.
Ediciones médicas del Hospital Infantil de México
México, 1988.
- 74.- *Uhnöo I., Wadell G., Svensson L., Olding SE., Ekwall E. and Molby R.*
Epidemiology: aetiology and epidemiology of acute gastro-enteritis in Swedish
children. J. Infect. 1986; 13: 73-89.
- 75.- *WHO. Manual for laboratory investigations of acute enteric infections.* *World*
Health Organization. Geneva, Switzerland, 1987: publication no. CDD/83.3 Rev.1
- 76.- *WHO. Programme for control of diarrhoeal diseases. Interim programme report*
1992. World Health Organization. Geneva, Switzerland, 1993: publication no.
CDD/93.40
- 77.- *Wyngaarden JB., Smith LH.*
TRATADO DE MEDICINA INTERNA VOL. 2
 18ª Edición
Interamericana Mc Graw Hill
México, 1991.
- 78.- *Zaman-R. Campylobacter enteritidis in Saudi Arabia. Epidemiol-Infect. 1992;*
108(1): 51-58.
- 79.- *Zamora-Chávez A., Galindo-HE., Mejía AME., Ramírez AML. Infección por*
Campylobacter jejuni en niños. Bol. Med. Hosp. Infant. Méx. 1987; 44(8): 155-
160.