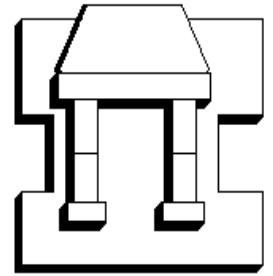




UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA



PREVALENCIA DE LOS PRINCIPALES GRUPOS
DIARREOGENICOS DE *Escherichia coli* EN NIÑOS
MENORES DE CINCO AÑOS HOSPITALIZADOS POR
DIARREA AGUDA GRAVE EN LA CIUDAD DE MEXICO

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

LICENCIADO EN BIOLOGIA

P R E S E N T A

OSCAR LUNA MENDEZ

DIRECTOR DE TESIS: Dra. MARIA TERESA ESTRADA GARCIA

MEXICO.

2003





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

DEDICATORIAS

A MIS PADRES PEPE Y MARY: por que gracias a su compañía, apoyo y consejo he llegado a realizar una de la metas en mi vida, la cual constituye la herencia más valiosa que pudiera recibir, deseo de todo corazón que mi triunfo profesional lo sientan como suyo.

A MI HERMANO CESAR: por quererme, aguantarme y apoyarme todo este tiempo. Cuando se quiere alcanzar algo, poniendo dedicación y empeño se pude lograr.

A MIS TÍAS Y TÍOS: Mellos, Tomás, Tere, Lucas, Chelo y Memo, por estar siempre pendientes de Mi.

A MIS PRIMAS, PRIMOS Y SOBRINOS: Nancy, Sergio, Isabel, Norma, Gustavo, Estefanía, Yazmín, Israel, Omar, Sandy, Fabián, Isaac, Damián, Cristian, Nury y Ricardo; por haber crecido a mi lado y por todo lo vivido este tiempo.

A MARICELA: por que también por ti, he podido llegar a este momento tan importante en mi vida, ya que estuviste a mi lado a lo largo de toda la carrera, en los momento de alegría que fueron muchos, pero también estuviste ahí cuando necesitaba palabras de aliento. POR TODO ESTO Y MAS GRACIAS.

A G R A D E C I M I E N T O S

A Dios, por haberme permitido llegar a esta etapa de mi vida y por tener a la mejor familia del mundo.

A la Universidad Nacional Autónoma de México por dejarme formar y crecer en sus aulas y por todo lo que he vivido en ella.

A la Doctora Ma. Teresa Estrada García por darme la oportunidad de trabajar en su laboratorio y haber confiado en mi. Muchas Gracias.

A mis compañeros y amigos del laboratorio: Caty, Jorge, Alejandra, Rocío, Héctor e Iza por todos sus consejos y apoyo. Un agradecimiento muy especial a Jorge Cerna, por toda la dedicación y tiempo invertido para la realización de ésta tesis. A todos Gracias

A mis amigos de la facultad: Gabriel, Andrés, Checo, Lola, Javier, Daniel, Silvia, Israel, Leonardo, Paul, Ana, Diana y a todos los que compartieron un instante de sus vidas junto a mi en la FES Iztacala.

Í N D I C E G E N E R A L

ÍNDICE DE TABLAS	I
ÍNDICE DE GRÁFICAS Y FIGURA	II
RESUMEN	III
INTRODUCCIÓN	1
Infecciones Gastrointestinales.....	1
Tipos de diarrea.....	2
Diarrea acuosa.....	3
Diarrea aguda con sangre.....	3
Diarrea persistente.....	3
Diarrea con severa malnutrición.....	3
Fisiopatología de las diarreas.....	3
Diarrea secretora.....	4
Diarrea por alteración en el tránsito gastrointestinal.....	4
Diarrea por exudación.....	4
Enterobacterias.....	4
Etiología de las diarreas en México.....	4
<i>Escherichia coli</i> (<i>E. coli</i>).....	6
Características generales de <i>E. coli</i>	7
Mecanismos de patogenicidad.....	9
<i>E. coli</i> enterotoxigénica (ETEC).....	10
<i>E. coli</i> enteropatógena (EPEC).....	12
<i>E. coli</i> enterohemorrágica (EHEC) y <i>E. coli</i> productora de toxina parecida a la de Shiga (STEC).....	14
<i>E. coli</i> enteroinvasiva (EIEC).....	16
<i>E. coli</i> enteroagregativa (EAEC).....	17
Diagnóstico de las cepas de <i>E. coli</i> que producen diarrea.....	19
Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	22
JUSTIFICACIÓN	25
OBJETIVOS	26

DISEÑO DEL ESTUDIO	27
Definición de diarrea.....	27
Criterios de inclusión de pacientes.....	27
Criterios de no inclusión de pacientes.....	27
Controles del estudio.....	28
Criterios de eliminación.....	28
METODOLOGÍA	28
Pacientes.....	28
Aislamiento e identificación de las cepas de <i>E. coli</i>	28
PCR múltiple.....	29
Análisis estadístico.....	30
RESULTADOS	32
Análisis de las infecciones mixtas de los grupos diarreogénicos de <i>E. coli</i> identificados con otros agentes etiológicos.....	39
Grupos diarreogénicos de <i>E. coli</i> como únicos agentes etiológicos.....	40
Análisis del aislamiento de los grupos diarreogénicos de <i>E. coli</i> por temporada.....	42
Aislamiento de los grupos diarreogénicos de <i>E. coli</i> por mes.....	43
Análisis de los agentes bacterianos identificados en los pacientes con diarrea aguda en los 3 hospitales durante el año.....	46
DISCUSIÓN	47
CONCLUSIONES	57
REFERENCIAS	58

Í N D I C E D E T A B L A S

Tabla 1. Lista de iniciadores, tamaño de la banda y concentración de iniciadores en la mezcla de reacción.....	31
Tabla 2. Ingresos hospitalarios por edad.....	32
Tabla 3. Lista de los grupos diarreogénicos de <i>E. coli</i> identificados en pacientes, así como los genes identificados.....	36
Tabla 4. Aislamiento de los grupos diarreogénicos de <i>E. coli</i> con respecto a las edades de los niños hospitalizados por diarrea aguda.....	38
Tabla 5. Incidencia de los grupos diarreogénicos de <i>E. coli</i> y pacientes en cada hospital de marzo de 1998 a febrero de 1999.....	38
Tabla 6. Infecciones mixtas de los grupos diarreogénicos de <i>E. coli</i>	40
Tabla 7. Infecciones simples de los grupos diarreogénicos de <i>E. coli</i>	42
Tabla 8. Aislamiento de los grupos diarreogénicos de <i>E. coli</i> por temporada.....	44
Tabla 9. Aislamiento de los grupos diarreogénicos de <i>E. coli</i> por mes.....	44
Tabla 10. Grupos bacterianos identificados en el año de estudio.....	46

Í N D I C E D E G R Á F I C A S Y F I G U R A

Gráfica 1. Total de pacientes hospitalizados, pacientes con aislados de <i>E. coli</i> y pacientes con grupos diarreogénicos de <i>E. coli</i>	33
Gráfica 2. Porcentaje de los grupos diarreogénicos de <i>E. coli</i> que se identificaron en aislados de pacientes.....	37
Gráfica 3. Infecciones mixtas y simples en los pacientes en los cuales se identificaron los grupos diarreogénicos de <i>E. coli</i>	41
Gráfica 4. Aislamiento de los grupos diarreogénicos de <i>E. coli</i> por mes.....	45
Figura 1. Productos del PCR.....	34

R E S U M E N

Las infecciones gastrointestinales representan un problema de salud pública mundial. En países subdesarrollados anualmente ocurren de 744 a 1000 de episodios diarreicos y 2.5 millones de muertes en niños menores de cinco años. En México, el promedio de episodios de diarrea en los menores de cinco años es de 4 por año. Por lo que se estima que en este grupo poblacional ocurre aproximadamente entre 30 y 40 millones de episodios de diarrea al año. Entre los principales agentes etiológicos de las diarreas bacterianas en niños menores de cinco años se encuentran los grupos diarreogénicos de *Escherichia coli* (gd. *E. coli*) enterotoxigénica (ETEC), enteropatógena (EPEC), enteroinvasiva (EIEC) y la productora de la toxina parecida a la de *Shiga* (STEC), con su subgrupo, la enterohemorrágica (EHEC). En México posterior al brote del cólera de 1991, el patrón estacional de las enfermedades diarreicas cambió, observándose una disminución en el número de episodios durante el verano y un incremento durante el invierno. De tal manera que se determinó la prevalencia de los principales gd. *E. coli* en niños menores de cinco años hospitalizados por diarrea aguda en la ciudad de México, utilizando un PCR múltiple que identifica a cuatro grupos: (ETEC), (EPEC), (EIEC) y (STEC/EHEC), durante el período de un año. Se encontró que de 399 niños menores de cinco años hospitalizados por diarrea aguda el 9% (37/399) se les identificó alguno de los gd. *E. coli*, siendo EPEC el grupo más frecuentemente aislado con 43% (16/37), seguido de STEC 24% (9/37), ETEC 22% (8/37) y por último EIEC 11% (4/37). La mayoría de los pacientes a los cuales se les identificó los gd. de *E. coli* presentaron infecciones mixtas 78% (29/37). En lo que respecta a la temporalidad no se observaron diferencias significativas entre los aislamientos en el periodo de primavera-verano, con respecto al de otoño-invierno y por último los gd. de *E. coli* se aislaron en el 9.2%, sólo por debajo de *Shigella sp.* 13% del total de niños hospitalizados. Estos resultados confirman que los gd. de *E. coli* son agentes importantes de diarrea aguda en niños menores de cinco años que requieren ser hospitalizados. En este estudio los gd. de *E. coli* ocuparon el segundo lugar como agentes productores de diarrea de tipo bacteriana sólo después de *Shigella*. Los gd. de *E. coli* se encuentran presentes principalmente en infecciones mixtas y los gd. de *E. coli* no presentaron estacionalidad.

**PREVALENCIA DE LOS PRINCIPALES GRUPOS DIARREOGÉNICOS DE
Escherichia coli EN NIÑOS MENORES DE CINCO AÑOS
HOSPITALIZADOS POR DIARREA AGUDA GRAVE EN LA CIUDAD DE
MÉXICO**

INTRODUCCIÓN

Infecciones Gastrointestinales

Las infecciones gastrointestinales representan un problema de salud pública mundial. La OMS estima que se producen de 744 a 1,000 millones de episodios diarreicos y 1.5 a 5.1 millones de muertes en niños menores de cinco años de edad en países en vías de desarrollo (Bern *et al.* 1992). Lo cual equivale a que ocurren de 1,400 a 1,900 episodios y de 3 a 10 muertes por diarrea, cada minuto.

En México en el año 2002 se presentaron más de 6 millones de episodios diarreicos (Dirección General de Epidemiología. 2002). Anualmente ocurren de dos a cuatro episodios de diarrea por niño en áreas urbanas, y de cuatro a nueve episodios en áreas rurales. La mortalidad por diarrea por cada 100,000 niños menores de cinco años ha disminuido, de 122.7 en 1990 a 22.1 en 2000, lo cuál implica un descenso de 82% (Comisión Nacional de Acción en Favor de la Infancia 1990-2000).

Las enfermedades diarreicas están caracterizadas por evacuaciones frecuentes de heces semisólidas, o líquidas y pueden estar acompañadas de algunos otros trastornos: como cólicos intestinales, fiebre y vómito. En general se define como diarrea aguda cuando el paciente presenta más de tres evacuaciones líquidas o semilíquidas en 24 horas y la duración de la diarrea es menor de 14 días. Es precisamente debido a esta eliminación de agua y electrolitos en las heces y en la frecuencia de las evacuaciones que las enfermedades diarreicas pueden producir deshidratación (Giono *et al.* 1994).

La diarrea aguda, es una enfermedad cuya duración usualmente es de uno a dos días y que cede espontáneamente sin ningún tratamiento. Sin embargo, la diarrea puede causar deshidratación, lo que significa que el cuerpo pierde suficiente cantidad de líquidos: agua y electrolitos, los cuales son necesarios para el adecuado funcionamiento de las células. Si se pierde más del 10% del fluido corporal puede ocurrir la muerte. Además, si la diarrea dura más de 14 días (diarrea persistente), puede acarrear otros problemas tales como retardo en el crecimiento de niños, tanto en talla como en peso (Steiner *et al.* 1998; Nataro *et al.* 1998).

Tipos de diarrea

Cuatro tipos de diarrea pueden ser reconocidos clínicamente de acuerdo a su patología y alteración fisiológica.

Diarrea aguda acuosa, la cual puede durar algunas horas o incluso días. El principal peligro en esta patología es la deshidratación, la pérdida de peso también puede ocurrir si no se continúa con la alimentación.

Diarrea aguda con sangre, también llamada disentería, aquí el principal peligro es el daño intestinal que se produce, la sepsis y la malnutrición, otras complicaciones como la deshidratación también pueden ocurrir.

Diarrea persistente, la duración es mayor de 14 días o más, el principal peligro es la malnutrición, aunque también puede ocurrir la deshidratación.

Diarrea con severa malnutrición, los principales trastornos son: una severa infección septicémica, deshidratación, problemas cardíacos y deficiencia de vitaminas y minerales.

FISIOPATOLOGÍA

Diarrea tipo osmótica: se debe al aumento de componentes no absorbibles en el tubo digestivo, aumentando la concentración osmolar y absorbiendo líquido del componente vascular. Ocurre cuando aumenta la ingesta de carbohidratos en grandes cantidades.

Diarrea secretora: se produce por que los enterocitos aumentan la secreción de electrolitos al lumen intestinal acompañados de agua, se observa en los procesos patológicos como el cólera.

Diarrea por alteración en el tránsito gastrointestinal: Se debe a una hipermotilidad de uno o más segmentos del intestino, es típica del síndrome de colon irritable.

Diarrea por exudación: Se produce cuando existen lesiones en la mucosa intestinal, a través de las cuales existe secreción de componente mucoso y sanguinolento. Se presenta en enfermedades inflamatorias del intestino así como en infecciones debidas a *Escherichia coli* (*E. coli*), *Salmonella* y *Shigella*.

Enterobacterias

Diferentes estudios epidemiológicos señalan la participación de las enterobacterias como agentes etiológicos causantes de la diarrea; entre los más importantes se encuentran *Salmonella*, *Shigella*, y en un alto porcentaje los grupos diarreogénicos de *E. coli*. (Cravioto *et al.* 1987; Sepúlveda, 1990).

Etiología de las diarreas en México.

Referente a la etiología de las diarreas en nuestro país. Morayta *et al.* en 1993, sólo identificaron en un 53% agentes patógenos en heces de niños que acudieron

al servicio de urgencias por diarrea en la ciudad de México, en el 47% restante no identificaron agente etiológico. Siendo en los niños menores de doce meses en donde se encontró el mayor número de patógenos. Los agentes etiológicos identificados fueron: *Rotavirus* (17.9%), *E. coli* enteropatógena (**EPEC**) (12.8%), *Salmonella sp.* (7.6%), *Campylobacter sp.* (7%), *Shigella sp.* (5.1%), *Clostridium difficile* (0.6%), *Cryptosporium sp.* (0.6%). Se identificaron infecciones mixtas en un 6.8% de los pacientes.

Por otro lado Cravioto *et al.* en 1988, evaluaron en niños de una comunidad rural, la incidencia y la prevalencia de patógenos que producen diarrea, desde su nacimiento hasta los dos años de vida. Encontrando que las cepas de *E. coli* enterotixigénica (**ETEC**), rotavirus y *Shigella*, estaban asociadas al 75% de los casos de diarrea.

Mientras que en un estudio realizado en una comunidad de Cuernavaca por Benítez *et al.* en 1991, reportaron que la disentería en niños estaba asociada principalmente a *E. coli* enteroagregativa (**EAEC**) (35%), *Shigella sp.* (13%), *E. coli* productora de toxina parecida a la Shiga (**STEC**) (11%), **ETEC** (7%), **EPEC** (4%), *E. coli* enteroinvasiva (**EIEC**) (4%), *Salmonella sp.* (4%), e *Hymenollepsis nana* (4%).

A pesar de que en México existen pocos estudios que incluyan la búsqueda de los grupos diarreogénicos de *E. coli*. Los estudios antes descritos muestran claramente su importancia como agentes productores de diarrea. Estos estudios ponen en evidencia que en México no existen reportes recientes que nos indiquen que porcentaje de las diarreas agudas graves que requieren hospitalización son causadas por los grupos diarreogénicos de *E. coli*.

Escherichia coli

Theodore Escherich, bacteriólogo alemán, en 1885, fue quien primero describió a esta bacteria la cual denominó *Bacterium coli commune*. El primer aislamiento del microorganismo se realizó de las heces de un infante sano. A pesar de esto, Escherich desde sus primeras observaciones propuso la posible participación de la bacteria como un agente productor de diarrea.

Lo anterior, sin embargo, no era aceptado por la comunidad médica por el hecho de que *E. coli* se aislaba tanto de las heces de niños sanos como de aquellos con cuadros clínicos de diarrea. Escherich también mostró la participación de *E. coli* como agente responsable de infecciones extraintestinales puesto que también aisló esta bacteria frecuentemente de infecciones urinarias principalmente en niñas.

A pesar de que la primera descripción de la bacteria ocurrió en el siglo XIX, no fue hasta finales de la década de los cuarenta del siglo pasado, que se pudo establecer plenamente la participación *E. coli* como un agente patógeno causante de diarrea.

E. coli de acuerdo al manual de Bergey's forma parte de la familia *Enterobacteraceae*, dentro de la tribu *Escherichieae* la cual incluye los géneros *Escherichia* y *Shigella*. El género *Escherichia* comprende las especies de *E. coli*, *E. hermannii*, *E. blattae*, *E. vulneris* y *E. fergusonii*. Por técnicas de hibridación del DNA se ha logrado establecer que los géneros *Shigella* y *E. coli* están relacionados estrechamente, sin embargo, la separación entre las dos especies se ha mantenido principalmente por razones prácticas. *E. coli* es la especie que mejor se conoce en relación a su capacidad patogénica, las cuatro especies restantes están siendo estudiadas para determinar su participación en la producción de enfermedades (Brenner, 1978).

Características Generales de *E. coli*

E. coli es un bacilo corto, gram negativo, no esporulado, generalmente con flagelos peritricos y fimbrias. Frecuentemente presenta una cápsula, por lo que algunas cepas producen colonias mucoides. Es un anaeróbio facultativo, crece en medios de cultivo simple y sintéticos, donde utiliza glicerol o glucosa como única fuente de carbono y energía. Sobre medios sólidos, las colonias son

circulares y lisas, con borde bien definido. Algunas cepas al crecer en un medio de gelosa sangre producen α o β -hemólisis, relacionadas con la producción de hemolisinas (Sussman M. 1985). Otros métodos para caracterizar la bacteria son: tipificación por fagos, antígenos somáticos (**O**), fimbriales (**F**) y capsulares (**K**) (Jann *et al.* 1985).

E. coli, es el miembro principal de la microbiota del colon humano, la cual coloniza el tracto gastrointestinal del recién nacido solo horas después de su nacimiento. Esta asociación conlleva a un beneficio mutuo entre el hospedero y el microorganismo; el papel importante que tiene ésta bacteria es mantener la homeostásis del organismo (Nataro *et al.* 1998).

E. coli es una especie que muestra gran diversidad antigénica, esto ha permitido utilizar diferentes antígenos para su tipificación. La caracterización serológica de la bacteria se realiza mediante el análisis de 175 antígenos somáticos (**O**) y 56 flagelares (**H**), y por medio de este procedimiento ha sido posible establecer algunos serotipos asociados con la enfermedad diarreica (Orskov *et al.* 1984).

Es importante señalar que durante el proceso evolutivo de *E. coli* la transferencia horizontal de información genética ha jugado un papel muy importante en la aparición de clonas que tienen la capacidad de causar un amplio espectro de enfermedades. Las infecciones por *E. coli* pueden limitarse a la superficie de las mucosas o pueden presentarse en diversos órganos y tejidos.

Como resultado inherentemente de este tipo de infecciones se han descrito hasta el momento tres síndromes clínicos causados por *E. coli*: **i)** infección del tracto urinario, **ii)** septicemia/meningitis y **iii)** enfermedades diarreicas.

Mecanismos de patogenicidad

A semejanza de muchos patógenos de mucosas, *E. coli* sigue una secuencia de infección, y sus mecanismos básicos de patogenicidad son de tres tipos: **1)** Adherencia: esta permite que la bacteria pueda adherirse y colonizar el epitelio de ciertas áreas del intestino. **2)** Producción de toxinas: estas son liberadas una vez que la bacteria ha colonizado el intestino, dependiendo de las características de éstas, su efecto puede ser la estimulación de secreción de agua y electrolitos (enterotoxinas) o la destrucción celular (citotoxinas). **3)** Invasión: por este mecanismo la bacteria se introduce dentro del citoplasma de las células epiteliales del intestino; para posteriormente dividirse y pasar a células vecinas sin salir hacia el lumen nuevamente, lo que le permite a la bacteria evadir los mecanismos de protección del huésped. La participación de cada uno de estos eventos celulares conduce al daño de órganos y/o tejidos del hospedero. (Nataro *et al.* 1998).

Basándose en los factores de virulencia que poseen las cepas de *E. coli* causantes de diarrea, en conjunto con su distribución, epidemiología y cuadros

clínicos que producen, se han clasificado en seis grupos principalmente (Nataro *et al.* 1998):

***E. coli* enterotoxigénica (ETEC).** Se estima que ETEC produce más de 650 millones de casos y 800, 000 muertes en el mundo.

En casi todos los países en vías de desarrollo la presencia de ETEC es endémica. Diversas investigaciones epidemiológicas han implicado a los alimentos y al agua como los vehículos más comunes de la infección. La patología por ETEC se presenta de manera repentina, la cual tiene periodos de incubación cortos de 14 a 50 horas, la diarrea es de tipo acuosa, sin sangre, ni fiebre y el vómito se presenta en la minoría de los casos (Black *et al.* 1982).

Las cepas ETEC elaboran al menos una de las dos enterotoxinas: toxina termolábil (**LT**) y toxina termoestable (**ST**). Estas cepas fueron primero reconocidas como causantes de enfermedades diarreicas letales en cerdos recién nacidos. Estas mismas cepas son causa frecuente de diarrea severa en niños durante el período de destete en países en vías de desarrollo, así como la causa más común de diarrea del viajero (Hyams *et al.* 1991).

La toxina termolábil (LT) es una proteína dimérica de 86 kDa de peso molecular, compuestas por dos subunidades conocidas como A y B; la subunidad B es un pentámero que tiene la propiedad de unirse a las células de epitelio intestinal a través de receptores de la superficie celular (gangliosido GM1)

(Sprangle. 1992). La subunidad A tiene actividad de ADP ribosil transferasa y actúa transfiriendo un ADP-ribosil del NAD hacia la subunidad alfa de la proteína de unión GTP (Gs), la cual estimula la actividad del adenilato ciclasa. La ribosilación del ADP de la subunidad Gs estimula la activación permanente del adenilato ciclasa, produciendo un incremento del AMP cíclico (AMPc). La proteína cinasa A dependiente del AMPc es activada, induciendo la fosforilación de canales de Cl⁻ localizados en la membrana apical de las células epiteliales. El resultado final es la estimulación de la secreción de iones Cl⁻ de las células de las criptas hacia el lumen intestinal y la inhibición de la absorción del NaCl por las microvellosidades intestinales. El incremento de la concentración de los iones Cl⁻ en el lumen, conlleva a la salida pasiva de agua de las células a través de la vía paracelular, resultando en una diarrea osmótica. Además LT puede inducir la producción de las prostaglandinas de la serie E (PGE₁ y PGE₂) y del factor activador de las plaquetas.

La toxina termoestable (ST) es un péptido de bajo peso molecular, de entre 1 y 6 kDa, que puede ser o no soluble en metanol y como su nombre lo dice es resistente al calentamiento (Kupersztoch *et al.* 1990). ST incrementa los niveles de la guanosina monofosfato cíclico (GMPc) al estimular la enzima guanilato ciclasa (Sears *et al.* 1996). Dicha actividad tiende a estimular la secreción de iones Cl⁻ al lumen y/o inhibición de la absorción de NaCl, resultando en una secreción del fluido intestinal.

***E. coli* enteropatógena (EPEC).** EPEC produce diarrea principalmente en niños menores de 6 meses de edad y junto con ETEC son la causa principal de diarrea bacteriana en niños en países en vías de desarrollados (Donnenberg, 1995).

Las cepas EPEC se adhieren a las células HEp-2 en cultivo con un patrón de adherencia localizada (Cravioto *et al.* 1979), caracterizada por la formación de microcolonias en la superficie celular. En necropsias de niños fallecidos a consecuencia de diarrea severa causada por estas cepas EPEC, se ha observado la destrucción del epitelio del intestino delgado. El análisis de microscopía electrónica de estas lesiones, ha mostrado como las cepas de EPEC se adhieren a la membrana del enterocito de manera íntima, observándose la desaparición (esfacelamiento) de las microvellosidades intestinales (Knutton *et al.* 1987), siendo este último evento tal vez lo que provoque la diarrea.

La fase de adherencia íntima, se ha relacionado con la expresión de una proteína de 94 kDa, denominada íntima (Nataro *et al.* 1985). Cuya producción esta controlada genéticamente por un locus en el cromosoma de la bacteria denominado *eaeA* (Jerse *et al.* 1991). Se ha señalado que el proceso de adherencia íntima da lugar a que en las células epiteliales se acumule actina, talina y ezrina, lo que conduce a la elevación del Cl⁻ intracelular, a través del sistema de la proteína cinasa C, lo cual da lugar a un incremento en la salida de agua, cloro y potasio (Knutton *et al.* 1989). Este incremento junto con la disminución en la capacidad de absorción del intestino por falta de las

microvellosidades, propicia la diarrea secretora aguda y quizá la persistencia del padecimiento en alguno de los casos.

Cravioto *et al.* en 1979 observaron que cepas de *E. coli* tienen la capacidad de adherirse a células HEp-2 en cultivo. Posteriormente, Scaletsky *et al.* en 1984 y Nataro *et al.* en 1985 reportaron la existencia de diferentes patrones de adherencia, definidos como: 1) localizada, 2) difusa y 3) agregativa.

El patrón de adherencia localizada, que poseen las cepas de EPEC, tienden a aglutinar las células en áreas localizadas de la superficie celular. Este fenómeno está asociado con la presencia del plásmido EAF (factor de adherencia a EPEC), en este plásmido se encuentran los genes que codifican para el pilus (BFP) (Nataro *et al.* 1998), que está involucrado en la adhesión a las células del huésped, incrementando la eficiencia en la formación de la lesión de adherencia y esfacelamiento (Frankel *et al.* 1998).

Sin embargo, desde 1995 en el segundo Simposium Internacional sobre EPEC, se aceptó que las EPEC típicas de origen humano poseen el plásmido conocido como EAF, que codifica la adherencia localizada sobre cultivos de células epiteliales, mediadas por el pilus BFP, mientras que las EPEC atípicas no poseen este plásmido. De acuerdo con esta definición, la diferencia básica entre EPEC típica y atípica es la presencia del plásmido EAF en el primer grupo y la ausencia de este en el segundo grupo, hasta el momento sólo se han aislado las cepas típicas de humanos (Trabulsi *et al.* 2002).

***E. coli* enterohemorrágica (EHEC) y *E. coli* productora de toxina parecida a la de *Shiga* (STEC)**

Las citotoxinas que produce STEC, reciben dos diferentes nombres: enterotoxina semejante a la producida por *Shigella dysenteriae* tipo 1 (*stx*) y el término de verotoxina (VT) por su efecto citotóxico sobre monocapas de células Vero.

El término *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) incluye aquellas cepas que causan colitis hemorrágica (HC) y/o síndrome urémico hemolítico (HUS), el cual es definido por la presencia de anemia hemolítica microangiopática, trombocitopenia e insuficiencia renal aguda. Estas cepas expresan las toxinas Stx que causa la lesión de adherencia/esfacelamiento (A/E) sobre células epiteliales y poseen un plásmido de 60 MDa, que codifica para la enterohemolisina (*hlyA*) (Levine *et al.* 1984), de tal manera que EHEC denota un subgrupo de STEC e incluye una connotación clínica que no está implicada con STEC. Así no todas las cepas STEC pueden ser patógenas y si todas las cepas EHEC son consideradas patógenas (Nataro *et al.* 1998).

Las cepas de EHEC especialmente el serotipo O157:H7 están asociadas a casos de diarrea hemorrágica en países industrializados y al síndrome urémico hemolítico (HUS), el cual es la principal causa de insuficiencia renal en niños en los Estados Unidos.

La designación “*Shiga like toxin* (SLT)” fue acuñada cuando se demostró que las citotoxinas producidas por EHEC estaban estrechamente relacionadas con la toxina Shiga (Stx), la cual es producida por *Shigella dysenteriae* tipo 1 (Jackson, 1991).

La familia Stx, contiene dos grupos principalmente llamados Stx1 y Stx2. Una cepa STEC puede expresar solamente Stx1, Stx2 o ambas toxinas; estas toxinas se identifican en las subunidades A y B. La estructura básica de la subunidad A-B se encuentran en todos los miembros de la familia Stx (Nataro *et al.* 1998).

La subunidad A de 32 KDa cortada enzimáticamente en un péptido (A1) de 28 KDa y en un péptido (A2) de 4KDa, estos péptidos permanecen unidos por un puente disulfuro. El péptido A1 contiene la actividad enzimática, mientras que el péptido A2, sirve para unir la subunidad A a un pentámero de 5 subunidades idénticas de 7.7 KDa, llamado subunidad B. Este pentámero B une a la toxina a un receptor específico la globotriasilceramida o Gb3, que es el principal receptor para Stx, el cual esta presente sobre la superficie de las células eucariontes (Nataro *et al.* 1998).

Después de la unión la holotoxina llega al citoplasma y es transportada al aparato de Golgi y posteriormente al retículo endoplásmico (Sandvig *et al.* 1994). La subunidad A es translocada al citoplasma, donde actúa sobre la subunidad ribosomal 60S. Específicamente el péptido A1, es una N-glicosidasa que remueve

a un sólo residuo de adenina del RNAr 28S de ribosomas eucarióticos, en consecuencia se inhibe la síntesis de proteínas, lo que conduce a la muerte de las células endoteliales renales y de las células epiteliales del intestino (Nataro *et al.* 1998a).

En México Cravioto *et al.* en 1988, reportaron que este tipo de microorganismos STEC, sólo se relacionan con diarrea de tipo secretor leve o moderada. Los serogrupos identificados más frecuentemente en este estudio fueron O26, O111, O121, O145, O119, O128 y particularmente O157.

***E. coli* enteroinvasiva (EIEC).** Las cepas de EIEC tienen características bioquímicas, genéticas y patogénicas relacionadas con las del género *Shigella*. A semejanza del género *Shigella*, las cepas EIEC son generalmente lisina descarboxilasa negativa, no móviles y no fermentadores de la lactosa (Formal *et al.* 1978).

San-Sonetti *et al.* en 1986, realizaron estudios de cinética de crecimiento intracelular de EIEC, demostrando que estas cepas contienen un plásmido de 140 MDa, en donde se encuentran los genes responsables de la capacidad de invadir a los enterocitos. Por lo que el modelo de patogénesis de EIEC comprende los siguientes pasos: 1. Adherencia la epitelio intestinal. 2. Endocitosis y lisis de la vacuola endocítica. 3. Multiplicación intracelular. 4. Movimiento a través del citoplasma. 5. Muerte de la célula huésped y movimiento a las células epiteliales adyacentes. Cuando la infección es severa estos eventos provocan una fuerte

inflamación, la cual se manifiesta como ulceración del tejido epitelial. Las infecciones por EIEC se caracterizan por producir una diarrea acuosa seguida de una diarrea con sangre y moco (Giono *et al.* 1994a).

Estudios epidemiológicos, realizados por Cravioto *et al.* en 1988 y 1990, muestran que las cepas de EIEC se aíslan con poca frecuencia de pacientes con diarrea y en general están asociadas en niños mayores de 6 meses. Sin embargo, el hecho de que se aíslen con poca frecuencia se puede deber a que el 60% de las cepas de EIEC son lactosa negativa, por lo que no se identifican en medios de crecimiento como el medio MacConkey.

***E. coli* enteroagregativa (EAEC).** EAEC ha sido implicado como agente etiológico causal de diarrea persistente (mayor a 14 días de duración) tanto en niños en países en vías de desarrollo como en países industrializados (Sheikh *et al.* 2002).

Las cepas enteroagregativas derivan su nombre por la forma de adherencia que presentan sobre células HEp-2 en cultivo (Scaletsky *et al.* 1984 y Nataro *et al.* 1985). Esta adherencia se caracteriza por la formación de agregados bacterianos, con una apariencia de ladrillos apilados “*stacked brick*”, que se observa tanto en las células como en la superficie del vidrio de la preparación. La adherencia agregativa está relacionada con la presencia de un plásmido de alrededor de 60 MDa.

Las características clínicas de la infección producida por EAEC, muestran una diarrea secretora acuosa con moco, fiebre y en ocasiones vómito (Paul *et al.*, 1994). La presencia de sangre en heces se ha reportado en un poco más de la tercera parte de pacientes con diarrea (Cravioto *et al.*, 1991). En estudios con voluntarios adultos, la cepa O42 (O44:H18) provocó diarrea con moco, sin sangre; en este estudio se observó que todos los voluntarios permanecieron sin fiebre, observándose también que el período de incubación fue de 8 a 18 horas (Nataro *et al.* 1995). Recientemente Steiner *et al.* en 1998, observaron que en un porcentaje elevado de los pacientes infectados con cepas enteroagregativas, presentaban lactoferrina fecal (un indicador sensitivo de leucocitos fecales), sugiriendo que la infección por estas cepas puede estar provocando una inflamación leve de las mucosas. Sin embargo no todas las cepas con patrón enteroagregativo son patógenas encontrándose que cepas EAEC se aíslan en la misma proporción tanto en niños hospitalizados por diarrea, así como en niños sanos (Albert *et al.* 1999).

Diagnóstico de cepas de *E. coli* que producen diarrea

E. coli, puede ser recuperada fácilmente de especímenes clínicos, siendo los medios más frecuentemente utilizados para su aislamiento de dicha bacteria el agar MacConkey (que selecciona cepas lactosa positivas, las cuales se caracterizan por presentar un color rosa, las colonias pueden ser redondas, convexas) (Giono *et al.* 1994).

Los miembros de la familia *Enterobacteriaceae*, así como todas bacterias en general, son usualmente identificadas por medio de pruebas bioquímicas. Para el caso de *E. coli* se ha observado que el 99% de las cepas son indol positivas (Nataro *et al.* 1998).

La identificación de los grupos diarreogénicos de *E. coli*, ha sido difícil por dos razones, el primero es porque por pruebas bioquímicas tradicionales no es posible identificarlas y segundo, siendo *E. coli* miembro de la microbiota intestinal, se ha demostrado que 5 colonias por paciente, son suficientes para tener oportunidad de aislar una cepa patógena o para saber si el individuo esta colonizado.

Desde hace varias décadas se han desarrollado métodos de identificación de los grupos diarreogénicos de *E. coli*, tales como el asa ligada de conejo, el cual fue diseñado para identificar la toxina producida por el *Vibrio cholera* (CT), la cual se adaptó para la identificación de la toxina LT de ETEC. Este método consiste en la inoculación de una solución bacteriana, en el intestino delgado de un conejo previamente ligado de un extremo. Una vez realizada la inoculación, se liga el otro extremo del intestino y se sutura al animal. Al cabo de 6 a 18 horas el animal se sacrifica y se extrae el intestino delgado, el órgano separado se mide y se pesa para determinar la cantidad de liquido acumulado, debido a la presencia de la toxina. Sin embargo, este método ha caído en desuso debido a la dificultad

para realizar esta prueba y al número de animales que se necesitan (5 conejos por paciente).

Las pruebas de toxicidad en cultivos celulares que se realizan *in vitro*, son específicas para las toxinas estudiadas, como es el caso en el que se utiliza la línea celular de ovario de hámster chino (CHO), para la identificación de LT, donde dicha toxina causa elongación de las células (Guerrant *et al.* 1974).

Para el diagnóstico de EPEC, la prueba de la adherencia sobre células HEp-2, donde las cepas EPEC se adhieren con un patrón de adherencia localizada. Mientras que EAEC se adhiere de manera agregativa (Fang *et al.* 1995). Así, también los cambios celulares ocasionados en la fase de adherencia íntima se han podido evidenciar *in vitro*, mediante un sistema de tinte de la actina con fluoresceína, "FAS", que permite observar los acúmulos de actina polimerizada asociados con lesiones de adherencia y esfacelamiento (Knutton *et al.* 1991).

Los ensayos HEp-2 permanecen como el estándar de oro para la detección de EAEC. Las células He La y células Vero se han utilizado para la identificación de las toxinas parecidas a la *Shiga* de STEC (Stx1, Stx2), las cuáles causan un efecto citotóxico en dichas células (Konowalchuk *et al.* 1977). Sin embargo, para la realización de estas pruebas se requiere personal con experiencia y una infraestructura adecuada para mantener las líneas celulares.

Existen inmunoensayos los cuáles son capaces de detectar los antígenos **O**, **H** para realizar serotipificación ó anticuerpos contra las toxinas en el mercado hay una variedad de kits comerciales. El uso de anticuerpos monoclonales contra Stx1 y Stx2 (STEC) ha sido utilizado con gran éxito. Sin embargo se necesita realizar un inmunoensayo para cada toxina.

Los métodos de biología molecular son una de las más recientes herramientas de diagnóstico, tal es el caso de los ensayos de hibridación. Se han desarrollado sondas para identificar la presencia de genes que codifican para las toxinas LT y ST de ETEC (Lanata *et al.* 1985). Las sondas pueden estar marcadas radiactivamente con P³², o con biotina entre otros, las dobles cadenas del DNA son desnaturalizadas a pH alcalino, por lo que las cadenas sencillas pueden hibridar con los genes del organismo en pruebas. Sondas de DNA han sido utilizadas para detectar la presencia de los genes para las toxinas *stx1* y *stx2* de STEC (Newland *et al.* 1988), genes *lt* y *st* de ETEC (Murray *et al.* 1987).

Mientras que para la identificación de EPEC, se han utilizado sondas derivadas del plásmido EAF (Nataro *et al.* 1985). Dos sondas han sido descritas para la identificación de EIEC, la sonda pMR17 el cuál es un fragmento derivado de la digestión del plásmido de *Shigella flexneri* y *ial*, el cuál es un fragmento de 1 Kb de DNA obtenido de la digestión del plásmido de invasividad (pInv) de EIEC, cualquiera de estas sondas son 100 % sensibles y específicas para cepas de EIEC (Gómez *et al.* 1987). El inconveniente de estos métodos de hibridización, es que se necesita una sonda para la detección de cada gen. Por lo que si

quisiéramos caracterizar las cepas de EHEC, se necesitaría el uso de cuatro sondas (*stx1*, *stx2*, *eaeA*, *hlyA*), por lo que los costos serían muy altos.

REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), fue desarrollada por Kary B. Mullis en 1985, se define como el proceso bioquímico de la síntesis *in vitro* de copias de segmentos específicos de DNA, mediante el cual las cadenas individuales de DNA blanco son duplicadas por la DNA polimerasa en cada uno de los ciclos (generalmente entre 20 y 30) que integran la reacción. Estas nuevas cadenas vuelven a ser duplicadas por la misma enzima, lográndose una producción exponencial de millones de copias del segmento de DNA específico sometido al proceso en general. Los componentes requeridos para un PCR son: DNA, iniciadores (oligonucleótidos) específicos que flanquean el gen, estos segmentos actúan como blanco para la amplificación, mezcla de desoxinucleótidos (dNTP'S), solución amortiguadora de la reacción, y DNA polimerasa.

Cada uno de los ciclos de la reacción consta de tres pasos determinados por temperaturas y tiempos específicos, que son: 1) desnaturalización: proceso en el cual se separan las dos cadenas complementarias de DNA blanco. 2) alineamiento: se realiza el acoplamiento específico entre los iniciadores y las cadenas simples del DNA blanco y 3) extensión: la DNA polimerasa extiende el

DNA formado por los iniciadores acoplados al DNA blanco, resultando en nuevas cadenas complementarias a las dos cadenas sencillas que se tenían al inicio de la reacción, lográndose una producción exponencial de millones de copias del gen o segmento de DNA específico sometido al proceso (Barrera *et al.* 1993).

Los ensayos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), se ha utilizado exitosamente en la amplificación de genes de patogenicidad de los grupos diarreogénicos de *E. coli*. Entre los trabajos realizados se encuentra: un PCR múltiplex, el cuál amplifica a los genes que codifican para las toxinas LT y ST de ETEC (du Toit *et al.* 1993), dicho método es sensible y también es utilizado en muestras clínicas (Stacy-Phipps *et al.* 1995). La técnica de PCR también ha sido utilizada para detectar los genes de EHEC, *stx1* (Karch *et al.* 1989), *eaeA* (Gannon *et al.* 1993), *hlyA* (Schmidt *et al.* 1995) y el plásmido p0157 (Levine *et al.* 1987).

En general en estas técnicas de PCR se utilizan tan solo un par de iniciadores (PCR simple) o cuando mucho 2 pares en PCR múltiplex, que permite identificar más de un gen en una sola reacción (Cebula *et al.* 1995). Hasta el momento se han probado con buenos resultados con respecto a su sensibilidad y especificidad un gran número de iniciadores para detectar el gen *eaeA* de EHEC y EPEC (Gannon *et al.* 1993). Así como para la amplificación del plásmido EAF de EPEC (Jerse *et al.* 1990). La clonación *bfpA* de EPEC, permitió desarrollar un PCR específico para la detección de dicho gen (Tornieporth *et al.* 1995). También se ha desarrollado un PCR específico para EIEC utilizando un par de iniciadores

de 21 pares de bases, para identificar al plásmido de invasividad presente en esta bacteria. (Frankel *et al.* 1989).

Sin embargo, hasta el momento no se ha desarrollado un PCR múltiplex que nos permita identificar en una sola reacción varios grupos de *E. coli* que causan diarrea, tanto en México como en el mundo, debido a las dificultades técnicas que implican su desarrollo. Es por eso que en nuestro laboratorio nos dimos a la tarea de desarrollar un PCR múltiplex, en el cual en una sola reacción permite identificar 7 genes de cuatro grupos diarreogénicos de *E. coli* (ETEC, EPEC, STEC y EIEC) (López-Saucedo *et al.* 2003).

JUSTIFICACIÓN

Las enfermedades diarreicas en México muestran una variación en el patrón de las diarreas, con un incremento en el número de ingresos hospitalarios en la temporada otoño-invierno y un descenso en primavera-verano (Velázquez. 2001).

Se considera en general que las diarreas durante el periodo de primavera-verano son debidas principalmente a bacterias, mientras que las diarreas durante el periodo otoño-invierno están asociadas a virus. Con el cambio en el patron de las enfermedades diarreicas en la ciudad de México antes mencionado, surge la pregunta ¿cuales son ahora los agentes etiológicos que están causando diarrea aguda grave que requiere hospitalización?.

En México no se ha realizado hasta el momento un estudio epidemiológico amplio que nos permita conocer que papel juegan los principales grupos diarreogénicos de *E. coli* (ETEC, EPEC, STEC, EIEC) como agentes productores de diarrea aguda que requiere hospitalización en niños menores de cinco años.

Por lo que se desconoce la prevalencia de estos agentes causantes de diarrea en esta población, así como su estacionalidad, y epidemiología.

OBJETIVO GENERAL

Conocer la prevalencia y la epidemiología de los principales grupos diarreogénicos de *E. coli* (ETEC, EPEC, STEC y EIEC) que causan diarrea aguda en niños menores de cinco años hospitalizados.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Aislamiento de colonias parecidas a *E. coli* a partir de heces de niños menores de cinco años hospitalizados por diarrea aguda, de marzo de 1998 a febrero de 1999.
2. Identificación bioquímica de las cepas de *E. coli*.
3. Identificación de los grupos diarreogénicos de *E. coli* utilizando un PCR múltiple que identifica los genes de 4 grupos diarreogénicos: ETEC (*lt, st*), STEC (*stx1, stx2, eaeA*) EPEC (*bfpA, eaeA*), EIEC (*ial*).
4. Análisis estadístico de los datos.

DISEÑO DEL ESTUDIO: Transversal, prolectivo, descriptivo y analítico.

DIARREA (variable operacional) ES DEFINIDA COMO:

Presencia de tres o más evacuaciones líquidas en 24 horas.

Disminución en la consistencia de las heces en un número de dos o más del patrón habitual diario del niño.

Una evacuación con sangre con disminución de la consistencia.

CRITERIOS DE INCLUSIÓN DE PACIENTES:

Edad: recién nacidos a cinco años de vida.

Aceptación por escrito de los padres o tutores del niño que participan en el estudio.

Residencia en la ciudad de México en los últimos seis meses.

CRITERIOS DE NO INCLUSIÓN DE PACIENTES:

Malformación del tubo digestivo.

Enfermedad crónica diferente a desnutrición.

Diarrea aguda adquirida en el hospital.

Diarrea de evolución mayor de tres días.

Diarrea tratada con antibióticos por más de dos días.

CONTROLES DEL ESTUDIO:

Niños menores de cinco años hospitalizados por otra causa que no sea diarrea, los cuales estarán apareados con edad, sexo y fecha de ingreso.

CRITERIOS DE ELIMINACIÓN:

Información clínica y/o de laboratorio insuficiente.

METODOLOGÍA

Pacientes: los pacientes fueron niños menores de 5 años hospitalizados por diarrea aguda, en tres hospitales de 2do. Nivel del Instituto Mexicano del Seguro Social, ubicados estratégicamente en la ciudad de México: el hospital Villa Coapa, al sur de la ciudad; el hospital de Tlatelolco al norte y el hospital Gabriel Mancera, ubicado en el centro de la ciudad.

Aislamiento e identificación de las cepas de *E. coli*: Se tomó una muestra de heces durante la fase aguda de la enfermedad, la cual se colocó en medios de transporte y después se sembró en el medio selectivo: Agar MacConkey. Se seleccionaron 5 colonias con morfología compatible a *E. coli* y se les realizó pruebas bioquímicas. Una vez identificadas las cepas de *E. coli* se les realizó el PCR múltiplex.

PCR múltiplex: Se utilizó un PCR múltiplex desarrollado en nuestro laboratorio de Epidemiología Molecular del CINVESTAV (López-Saucedo *et al.* 2003), el cual nos permite identificar 7 genes de patogenia de cuatro grupos diarreogénicos de *E. coli* (ETEC, STEC, EIEC, EPEC). Los lisados de bacterias fueron preparados por resuspensión de una colonia en 1 ml de agua desionizada estéril (Milli Q o Milli pore), se hirvió durante 1 min. y se colocó a -20°C hasta su uso. *E. coli* O86:H18 (3030) fue el control negativo en todos los ensayos,

mientras que como control positivo se utilizó una mezcla de DNA de las 4 cepas de referencia (ETEC, EPEC, STEC y EIEC). Cada tubo de PCR

contenía 23 μ L de la mezcla de reacción compuesta de tris-HCl (10 mM, pH 8.3), KCl (50 mM), MgCl₂ (2 mM), gelatina (100 μ g/ml), glicerol (5 % v/v), dATP, dCTP, dGTP, y dTTP (200 μ M cada uno), polimerasa Ampli Taq (GIBCO-BRL) (0.5 U/23 μ l), una mezcla de 14 iniciadores (tabla 1), y 2 μ l del lisado de la bacteria (DNA).

La concentración final de cada iniciador se describe en la tabla 1. Los genes se amplificaron con el siguiente programa: 50°C (2 min, 1 ciclo), 95°C (5 min, 1 ciclo), 95°C, 50°C, y 72°C (45 seg. cada temperatura, 40 ciclos), y un paso de extensión final de (10 min. 72°C), en un termociclador: Cyler, BioRad, Hércules, CA, USA).

4 μ l del producto fueron visualizados después por electroforesis en un gel de agarosa al 2% utilizando bromuro de etidio. El tamaño esperado de las bandas para cada uno de los genes se muestra en la tabla 1 y en la figura 1, en el carril 1 se pueden observar cada una de las bandas para cada gen.

Análisis estadístico

Para establecer la prevalencia estacional de las enfermedades diarreicas se determinó el número de episodios diarreicos/número de egresos, durante primavera-verano y otoño-invierno.

Para establecer el cuadro clínico y la gravedad de la diarrea con los diferentes grupos diarreogénicos de *E. coli*, se comparó mediante la prueba de chi cuadrada y/o t student.

Tabla 1. Lista de iniciadores, tamaño de la banda y concentración de iniciadores en la mezcla de reacción.

Grupos diarreogénicos de <i>E. coli</i>	gen	Iniciadores	Tamaño en pb	Iniciadores (pMol) en la mezcla
ETEC	<i>lt</i>	F:5'GGC GAC AGA TTA TAC CGT GC3' R:5'CGG TCT CTA TAT TCC CTG TT3'	450	5.0
ETEC	<i>st</i>	F:5'ATT TTT CTT TCT GTA TTG TCT T3' R:5'CAC CCG GTA CAA GCA GGA TT3'	190	6.47
EPEC	<i>bfpA</i>	F:5'AAT GGT GCT TGC GCT TGC TGC3' R:5'GCC GCT TTA TCC AAC CTG GTA3'	324	2.5
EPEC STEC	<i>eaeA</i>	F:5'GAC CCG GCA CAA GCA TAA GC3' R:5'CCA CCT GCA GCA ACA AGA GG3'	384	3.88
STEC	<i>stx1</i>	F:5'CTG GAT TTA ATG TCG CAT AGT G3' (Genbank M17358) R:5'AGA ACG CCC ACT GAG ATC ATC3'	150	3.88
STEC	<i>stx2</i>	F:5'GGC ACT GTC TGA AAC TGC TCC3' R:5'TCG CCA GTT ATC TGA CAT TCT G3'	255	2.5
EIEC	<i>ial</i>	F:5'GGT ATG ATG ATG ATG AGT CCA 3' (Genbank D13663) R:5'GGA GGC CAA CAA TTA TTT CC 3'	650	10.25

RESULTADOS

Durante marzo de 1998 a febrero de 1999, se hospitalizaron un total de 399 pacientes menores de cinco años, con diagnóstico de diarrea aguda grave, en tres hospitales de segundo nivel del Instituto Mexicano del Seguro Social en el Distrito Federal. Los hospitales seleccionados fueron el Hospital Villa Coapa (sur) en donde se hospitalizaron 93 pacientes; el Hospital Tlatelolco (norte) con 176 pacientes; y el Hospital Gabriel Mancera (centro) con 130 pacientes.

En los tres hospitales la mayoría de los pacientes hospitalizados fueron menores de 12 meses de edad: H. Villa Coapa 46%, H. Tlatelolco 53%, y H. Gabriel Mancera 51%, seguidos por los de 13 a 24 meses, siendo los menos frecuentes el grupo constituido por niños de 4 a 5 años (tabla 2).

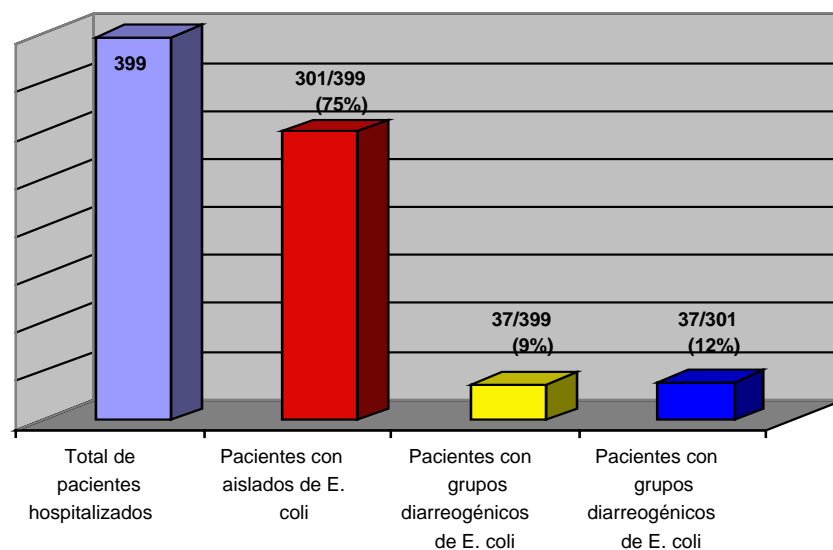
Tabla 2. Ingresos hospitalarios por edad.

EDAD EN MESES	H. VILLA COAPA	H. TLATELOLCO	H. GABRIEL MANCERA
0-12	43/93 (46%)	93/176 (53%)	67/130 (51%)
13 a 24	23/93 (25%)	42 /176 (24%)	41/130 (32%)
25 a 36	10/93 (11%)	20/176 (11%)	12/130 (9%)
37 a 48	13/93 (14%)	14/176 (8%)	8/130 (6%)
49 a 60	4/93 (4%)	7/176 (4%)	2/130 (2%)

Se aislaron cepas de *E. coli* en 301/399 (75%) pacientes, obteniéndose un total de 1607 cepas. Se seleccionaron 34 pacientes como controles de donde

se aislaron 170 cepas. Por lo que se caracterizaron bioquímicamente y analizaron por el PCR múltiplex un total de 1777 cepas.

Considerando los 399 pacientes incluidos en el estudio, utilizando el PCR múltiplex, se logró identificar grupos diarreogénicos de *E. coli* en 37/399 pacientes, es decir en el 9% de los pacientes (grafica 1). Todos los controles fueron negativos. Si sólo consideramos los pacientes en los cuales se aisló *E. coli*, el porcentaje es del 12% (grafica 1). De las 1777 cepas analizadas 79 (4.4%) presentaron algún gene(s) de patogenia de alguno de los 4 grupos diarreogénicos de *E. coli*.



Gráfica 1. En la primera barra se muestra el número total de pacientes hospitalizados, en la segunda barra el porcentaje de pacientes en los cuales hubo aislamiento de *E. coli*, en la tercera barra se muestra el porcentaje de pacientes en los cuales se aislaron los grupos diarreogénicos de *E. coli* del total del número de pacientes y en la cuarta barra el número de pacientes en los cuales se aislaron los grupos diarreogénicos de *E. coli* del total de pacientes a los cuales se les aisló *E. coli*

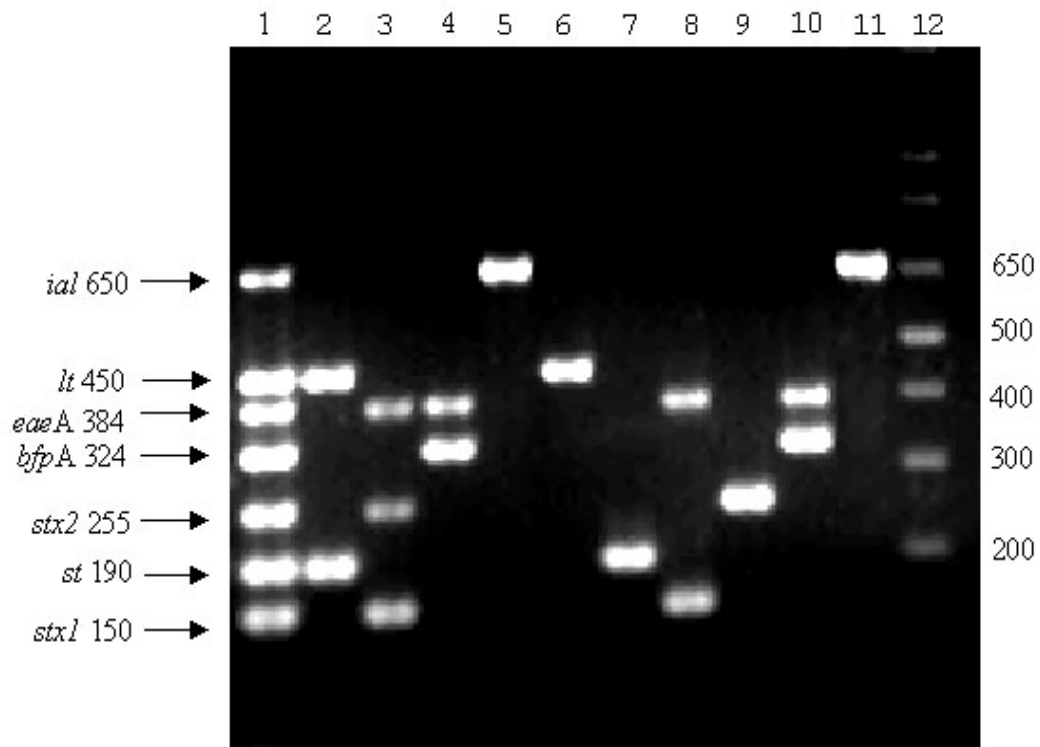


Figura 1. Productos de PCR. Carril 1: tamaño de los 7 productos de cada uno de los genes en pares de bases (pb), analizados en el PCR múltiplex cuando se utilizó la mezcla del DNA de las cuatro cepas de referencia ETEC, EPEC, EIEC y EHEC y la mezcla de los iniciadores. En los carriles 2-5 se muestran los productos del PCR usando solo el DNA de ETEC (2), STEC (3), EPEC (4) y EIEC (5) y la mezcla de iniciadores. Carriles 6-11: se muestran los productos del PCR obtenidos cuando se utilizó el DNA aislado de las cepas de algunos pacientes y la mezcla de los iniciadores. Carril 12: marcador de peso molecular de 1 kb en pb.

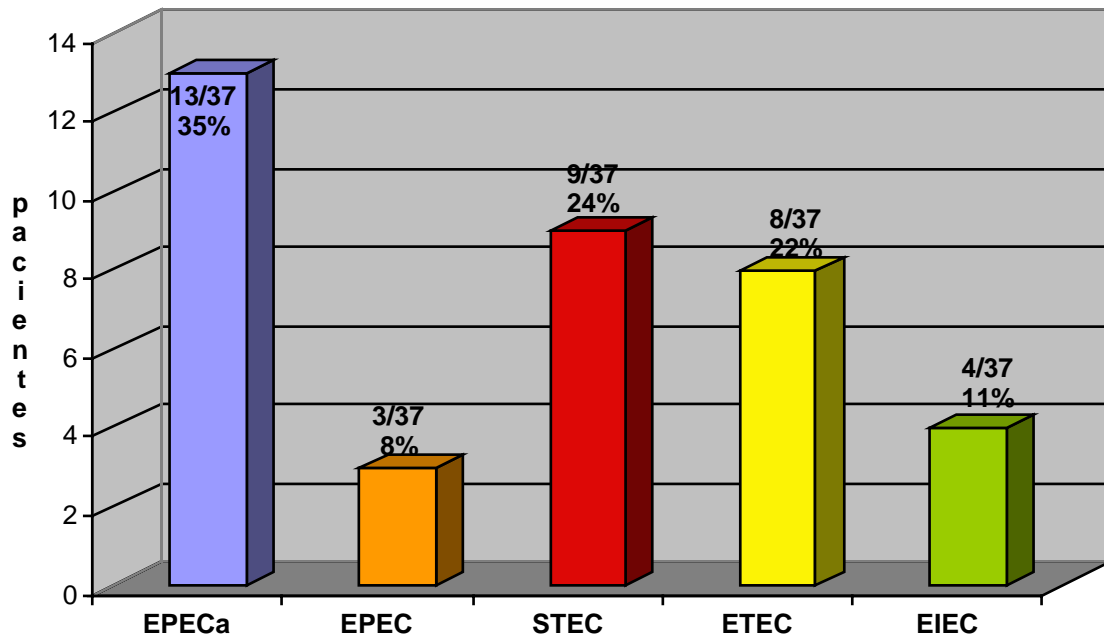
El PCR múltiplex nos permitió identificar genes de patogenia de los cuatro grupos diarreogénicos de *E. coli* en 37 pacientes (tabla 3, gráfica 2), siendo el grupo patógeno más frecuente aislado EPEC, el cual se identificó en 16/37 pacientes (43%). Cabe mencionar que en 13 de los pacientes las cepas fueron de las denominadas EPEC atípicas es decir que sólo contienen el gen *eaeA*, mientras que en los tres pacientes restantes se identificaron cepas EPEC típicas; puesto que presentan además del gen *eaeA* el gen *bfpA*, este último codifica para la fimbria BFP. En 9 pacientes (24%) se identificaron cepas STEC, en 3 pacientes se aislaron cepas con el gen *stx1*, mientras que el gen *stx2* se encontró en 4 pacientes, y en 2 pacientes las cepas contenían tanto el gen *stx1*, como el gen *eaeA*. ETEC se identificó en 8 pacientes (22%), en 6 pacientes las cepas contenían el gen *lt*, mientras que en los aislados de dos pacientes se amplificó el gen *st*. Finalmente EIEC fue identificado en 4 pacientes (11%).

Las cepas STEC fueron caracterizadas además utilizando un PCR para el gen de la enterohemolisina (*hlyA*) y para la presencia del antígeno somático O157 se utilizó la técnica de aglutinación en placa. Sin embargo, ninguna de las cepas STEC resultaron positivas para éstas dos pruebas. Es interesante mencionar que estas cepas STEC solo se aislaron en niños menores de dos años.

Tabla 3. Lista de los grupos diarreogénicos de *E. coli* identificados en pacientes, así como de los genes identificados.

Grupo DE	Gene(s) Identificado(s)	Número de Pacientes
EPEC	<i>bfpA, eaeA</i>	3
EPECa	<i>eaeA</i>	13
STEC	<i>stx1</i>	3
STEC	<i>stx2</i>	4
STEC	<i>stx1, eaeA</i>	2
ETEC	<i>lt</i>	6
ETEC	<i>st</i>	2
EIEC	<i>ial</i>	4

EPECa= *Escherichia coli* enteropatógena atípica.



Grafica 2. Porcentaje de los grupos diarreogénicos de *E. coli* que se identificaron en aislados de pacientes.

Los grupos diarreogénicos de *E. coli* identificados en este estudio, se aislaron con mayor frecuencia en niños de 25 a 36 meses de edad, registrándose solamente dos aislamientos en el grupo de 4 a 5 años (tabla 4). El mayor aislamiento de grupos diarreogénicos de *E. coli* fue en el Hospital Tlatelolco con 10.2 %, continuando con el Hospital Villa Coapa con un 8.6 % y 8.5% en el Hospital Gabriel Mancera (Tabla 5). Sin embargo no hubo diferencia significativa en la proporción de aislamientos de estos grupos entre los tres hospitales ($p=0.80$).

Tabla 4. Aislamiento de los grupos diarregénicos de *E. coli* con respecto a las edades de los niños hospitalizados por diarrea aguda.

MESES	EPEC	EPECa	STEC	ETEC	EIEC	TOTAL
0-12	1/3 (33%)	6/13 (46%)	7/9 (78%)	5/8 (63%)	1/4 (25%)	20/203 (9.8%)
13-24	2/3 (67%)	2/13 (15%)	2/9 (22%)	1/8 (12%)	1/4 (25%)	8/106 (7.5%)
25-36		4/13 (31%)		2/8 (25%)	1/4 (25%)	7/42 (16.6%)
37-48						
49-60		1/13 (8%)			1/4 (25%)	2/13 (15.3%)

Tabla 5. Incidencia de los grupos diarregénicos de *E. coli* y pacientes en cada hospital de marzo de 1998 a febrero de 1999.

INCIDENCIA DE PATÓGENOS POR HOSPITAL			
	H. Villa Coapa	H. Tlatelolco	H. Gabriel Mancera
Ingresos	93	176	130
Identificación de grupos diarregénicos de <i>E. coli</i>	8 pacientes	18 pacientes	11 pacientes
Porcentaje	8.6 %	10.2 %	8.5 %

Análisis de las infecciones mixtas de los grupos diarreogénicos de *E. coli* identificados con otros agentes etiológicos.

Se identificaron infecciones mixtas de los grupos diarreogénicos de *E. coli* con otro (s) agente (s) etiológico (s) en 29/37 (78%) pacientes: EPEC en 13/37 (35%), STEC en 8/37 (22%), ETEC en 5/37 (13%), finalmente EIEC en 3/37 (8%).

Se observó que fue precisamente con rotavirus con quien se identificaron mayor número de infecciones mixtas 20/37 (54%), en 9/37 (24%) pacientes se identificó a EPEC y STEC en 8/37 (21.6 %) pacientes, mientras que ETEC lo estuvo en 3/37 (8%) pacientes (tabla 6). Estas infecciones mixtas se presentaron principalmente durante la temporada otoño-invierno ($p = <0.001$).

Con respecto a las asociaciones con bacterias, en 3/37 (8%) pacientes EIEC se encontró asociado con *Shigella flexneri* y en 2/37 (5%) pacientes se identificó ETEC, así como EPEC con *Shigella flexneri*. EPEC se encontró asociado a *Campylobacter jejuni* en 1/37 (3%) pacientes. Mientras que en 2/37 (5%) pacientes se aisló a EPEC con dos agentes etiológicos (tabla 6).

Tabla 6. Infecciones mixtas de los grupos diarreogénicos de *E. coli* con otro (s) agente (s) etiológico (s) patógeno (s).

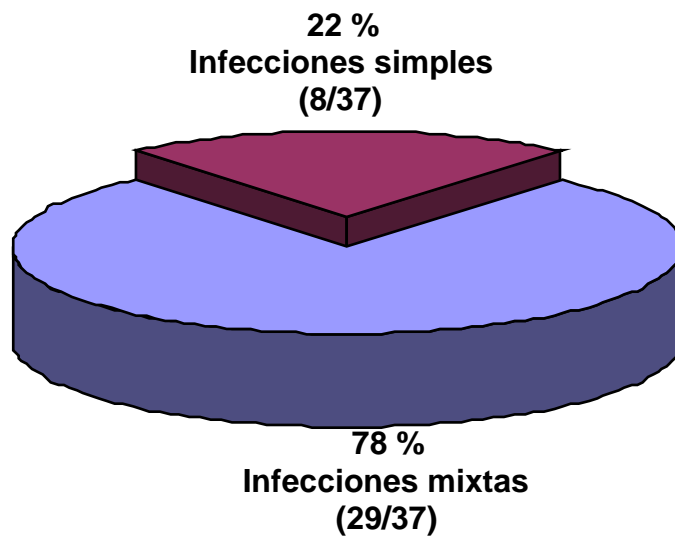
Grupos patógenos	No. de pacientes	Porcentaje
EPEC + RV	8	21.6 %
STEC + RV	8	21.6 %
ETEC + RV	3	8.1 %
EIEC + <i>Shigella flexneri</i>	3	8.1 %
ETEC + <i>Shigella sonnei</i>	2	5.4 %
EPEC + <i>Shigella sonnei</i>	1	2.7 %
EPEC + <i>Shigella dysenteriae</i>	1	2.7 %
EPEC+RV+<i>Campylobacter jejuni</i>	1	2.7 %
EPEC + <i>Campylobacter jejuni</i>	1	2.7 %
EPEC+ADNV+<i>Campylobacter jejuni</i>	1	2.7 %
TOTAL	29/37	78 %

RV= Rotavirus; ADNV= Adenovirus

Identificación de las grupos diarreogénicos de *E. coli* como únicos agentes etiológicos.

En el total de los 37 pacientes, encontramos que en 8/37 (22%) pacientes los grupos diarreogénicos de *E. coli* se encontraron como único agente etiológico (grafica 3). Encontrando que ETEC, así como EPEC se identificaron en 3/37 (8%) pacientes mientras que EIEC y STEC se aislaron en 1/37 (3%) pacientes (tabla 7).

De los 8 pacientes en donde los grupos diarreogénicos de *E. coli* se aislaron como únicos agentes etiológicos 5 pacientes corresponden al periodo Primavera-Verano (P-V) y 3 pacientes al período Otoño-Invierno (O-I).



Grafica 3. Infecciones mixtas y simples en los pacientes en los cuales se identificó los grupos diarreogénicos de *E. coli*.

Tabla 7. Infecciones simples de los grupos diarreogénicos de *E. coli* identificados en niños hospitalizados.

Grupo patógeno	Número de casos	Porcentaje
ETEC	3/8	37.5 %
EPEC	3/8	37.5 %
STEC	1/8	12.5%
EIEC	1/8	12.5%

Análisis del aislamiento de los grupos diarreogénicos de *E. coli* por temporada

Para este estudio se tomo el período de primavera-verano (P-V) de marzo '98 a agosto '98 y otoño-invierno (O-I) de septiembre '98 a febrero '99. Encontrando que se aislaron grupos diarreogénicos de *E. coli* en 11/138 (7.9%) pacientes durante P-V y 26/261 (9.9%) pacientes durante O-I. Cuando se realizó un análisis estadístico no encontramos diferencias significativas, por lo que podemos concluir que los grupos diarreogénicos de *E. coli* no presentan estacionalidad, es decir, podemos aislar estos grupos patógenos a lo largo del año (Tabla 8).

Aislamiento de los grupos diarreogénicos de *E. coli* por mes.

El aislamiento de los grupos diarreogénicos de *E. coli* fue principalmente durante los meses de (O-I) 26/37 (70%), comparados con (P-V) en donde sólo hubo 11/37 (30%) ($p < 0.0001$). En el mes de octubre de 1998 se aisló el mayor número de grupos diarreogénicos de *E. coli* 4/17 (23.5%) pacientes, el mes que le siguió en número de casos fue marzo con 4/23 (17.4%) pacientes, casi en la misma proporción que en el mes de Febrero '99 con 13/77 (17%). En el mes de junio se aislaron 2/24 (8.3%) pacientes. En el mes de enero se aislaron 6/88 (6.8%) y en el mes de mayo se aislaron 1/17 (5.9%), seguido con una proporción muy parecida el mes de diciembre, en el cual se aislaron 1/18 (5.5%). En los meses de noviembre, septiembre y agosto se aisló casi la misma proporción de grupos diarreogénicos de *E. coli*, 1/29 (3.5%), 1/31 (3.2%) y 1/32 (3.1%) pacientes respectivamente. En abril de 1998 no se identificó ningún paciente infectado con alguno de los grupos diarreogénicos de *E. coli* (tabla 9) (gráfica 4).

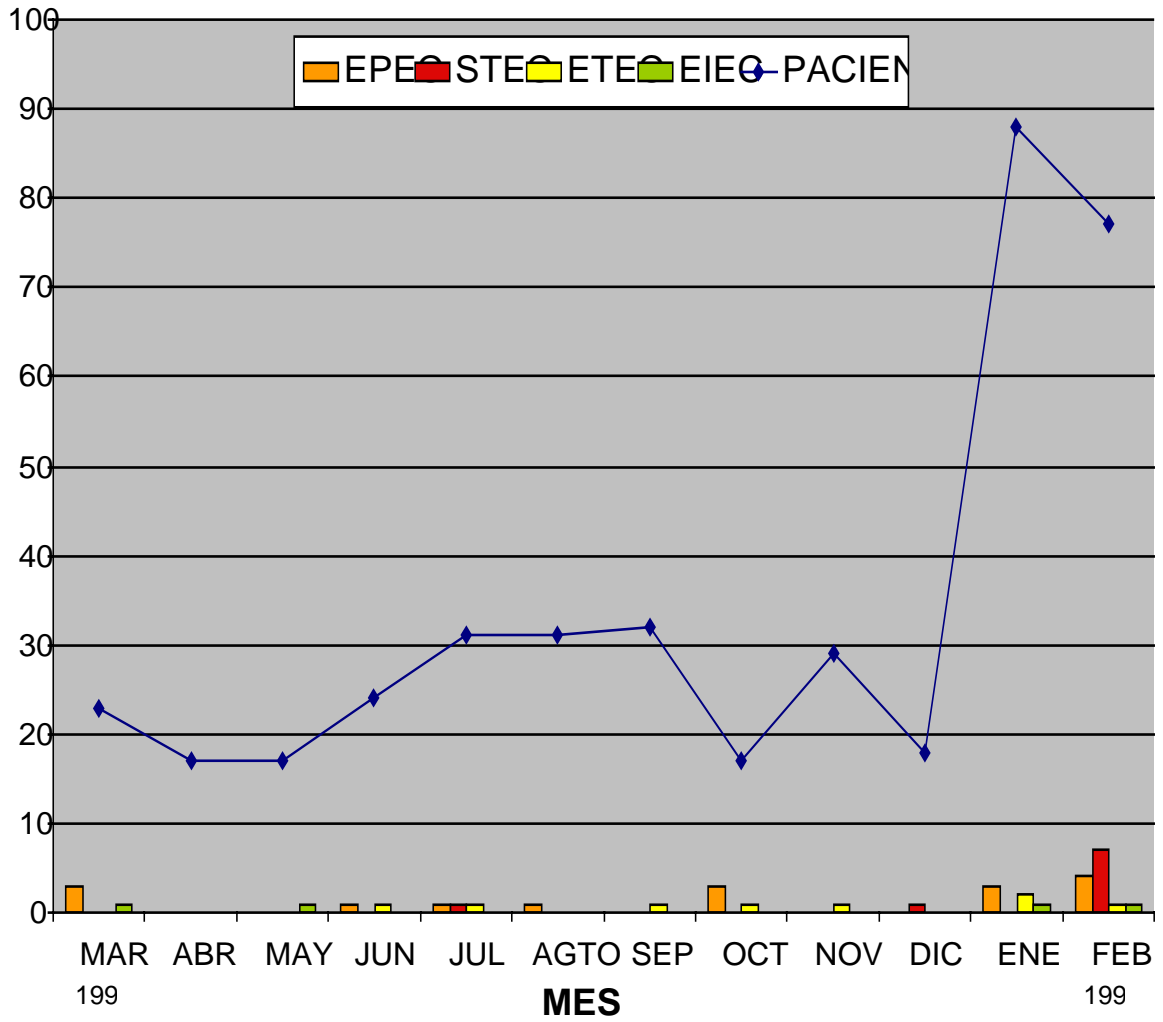
Tabla 8. Aislamiento de los grupos diarreogénicos de *E. coli* por temporada.

	Primavera-Verano	Otoño-Invierno
Pacientes	138	261
Pacientes con grupo diarreogénico de <i>E. coli</i>	11	26
Porcentaje	7.9	9.9

p = 0.638

Tabla 9. Aislamiento de los grupos diarreogénicos de *E. coli* por mes.

MES/ HOSPITAL.	MAR. '98	ABR.	MAY.	JUN.	JUL.	AGTO	SEPT.	OCT.	NOV.	DIC.	ENE. '99	FEB.
Tlatelolco	11	5	11	21	8	15	13	9	13	4	40	26
Gabriel Mancera	7	1	5	2	14	10	12	4	12	8	27	28
Villa Coapa	5	6	1	1	9	6	7	4	4	6	21	23
Grupos diarreogénicos	4/23	0/12	1/17	2/24	3/31	1/31	1/32	4/17	1/29	1/18	6/88	13/77
Porcentaje	17.4%	0%	5.9%	8.3%	9.7%	3.2%	3.1%	23.5%	3.5%	5.5%	6.8%	17%



Grafica 4. Aislamiento de los grupos diarreogénicos de *E. coli* por mes.

Análisis de los agentes bacterianos identificados en los pacientes con diarrea aguda en los tres hospitales durante el año.

Todas las muestras fueron analizadas por la sección de bacteriología de la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Infecciosas y Parasitarias del Centro Médico Nacional, Siglo XXI. Encontrándose para el período de marzo '98 a febrero '99, 7 diferentes especies bacterianas (tabla 10). Observándose que los grupos diarreogénicos de *E. coli* fueron el segundo grupo bacteriano identificado con 9.2% de todos los pacientes, solo por debajo de *Shigella* que se identificó en el 13.2% de los pacientes y por arriba de *Salmonella* que se aisló en un 5.8 %, *Campylobacter* en un 5.8%, *Aeromonas* en el 1%, mientras que *Vibrio cholerae* y *Acinetobacter* en un 0.3% de los pacientes hospitalizados por diarrea.

Tabla 10. Grupos bacterianos identificados en el año de estudio.

AGENTE ETIOLÓGICO (BACTERIAS)	HOSPITAL VILLA COAPA	HOSPITAL TLATELOLCO	HOSPITAL GABRIEL MANCERA	TOTAL
<i>Shigella (sonnei, flexneri y dysenteriae)</i>	12/93 (13%)	27/176 (15%)	14/130 (11%)	53/399 (13.2 %)
Grupos diarreogénicos (ETEC, EPEC, STEC y EIEC)	8/93 (8.6%)	18/176 (10.2%)	11/130 (8.5%)	37/399 (9.2%)
<i>Salmonella (enteritidis, cholerae)</i>	3/93 (3%)	12/176 (7%)	8/130 (6.0%)	23/339 (5.8%)
<i>Campylobacter (jejuni, laridis)</i>	2/93 (2 %)	16/176 (9%)	5/130 (4 %)	23/399 (5.8 %)
<i>Aeromonas</i>		3/176 (1.8 %)	1/130 (0.8 %)	4/399 (1 %)
<i>Vibrio cholerae</i>			1/130 (0.8 %)	1/399 (0.3 %)
<i>Acinetobacter</i>		1/176 (0.6 %)		1/399 (0.3 %)

DISCUSION

La mortalidad que se presenta en el mundo a causa de las enfermedades diarreicas, especialmente en niños menores de cinco años en países subdesarrollados es asombrosa. Sin embargo, ha sido gracias a las terapias de rehidratación oral, que los casos de mortalidad por diarreas a nivel mundial han descendido progresivamente en las últimas décadas. Puesto que han pasado de una tasa de 4.9 muertes por diarrea aguda por cada 1000 niños menores de cinco años por año en la década de los 80's a 3.3 muertes por diarrea aguda aproximadamente en 1992. Por lo que actualmente se estima que existe 2.5 millones de muertes en esta población en países en vías de desarrollo (Kosek *et al.* 2003).

Sin embargo, se ha observado que la morbilidad de las diarreas parece ir en aumento, esto tal vez se deba a que precisamente el grupo poblacional de 1 a 5 años se ha incrementado en esos países, así como que se concentran principalmente en áreas pobres en donde el número de episodios diarreicos en niños son mayores (Kosek *et al.* 2003). En México, se ha observado que el promedio de episodios de diarrea en los menores de cinco años es de 4 por año. Por lo que se estima que en este grupo poblacional en México ocurren entre 30 y 40 millones de episodios de diarrea al año. (Vega, 2002).

En el presente estudio se analizaron cepas de *E. coli* aisladas en 399 niños menores de cinco años que fueron hospitalizados por diarrea aguda. Se encontró que la mayoría de estos niños eran menores de 12 meses y que el número de niños hospitalizados por grupo de edad, disminuye conforme la edad aumenta, siendo el grupo de 4-5 años el que presentó un menor número de niños hospitalizados. Esto concuerda con lo ya descrito por Flores *et al.* 1993, en donde también se determinó la prevalencia de enteropatógenos en niños hospitalizados por diarrea aguda. Observando que 84/148 (57%) de los pacientes eran menores de un año de edad. Así mismo, Benítez *et al.* en 1991 observó que los niños entre los 6 y 12 meses de edad eran los que presentaban un mayor número de episodios diarréicos y que el número de episodios disminuye conforme la edad del niño aumenta, este estudio fue realizado en una comunidad en la ciudad de Cuernavaca, Morelos.

La proporción de aislamientos de los grupos diarreogénicos de *E. coli* en los diferentes hospitales fue más o menos la misma ya que no se observó una diferencia significativa entre ellos ($p=0.638$) (ver tabla 5). Esto muestra que independientemente de la zona de la ciudad de México, los grupos diarreogénicos de *E. coli* son los responsables de más o menos el mismo número de casos de diarrea aguda que requieren de hospitalización.

En lo que respecta a la identificación de los principales grupos diarreogénicos de *E. coli*, se lograron identificar en 37/399 pacientes, es decir, en el 9%. Es importante señalar que este porcentaje observado es alto, si se considera que en estudios donde se realiza la búsqueda de agentes etiológicos que causan diarrea solo se logra identificar el agente etiológico en el 40 al 60 % de los pacientes (Suárez *et al.* 1993).

El grupo diarreogénico de *E. coli* más frecuentemente aislado fue EPEC, el cual se identificó en 16/37 (43%) pacientes, estos resultados concuerdan con lo ya observado, de que EPEC es la principal causa de diarrea bacteriana infantil en niños menores de 6 meses en países subdesarrollados (Nataro *et al.* 1998). Vergara *et al.* 1992 en Misiones, Argentina reportan que en niños menores de cinco años con diarrea, EPEC fue el grupo diarreogénico que se aisló más frecuentemente. Para el caso de México, Cravioto *et al.* 1987, 1990; observaron en dos estudios la misma tendencia etaria para la diarrea causada por EPEC. Los estudios se realizaron durante '82 a '83 y de '85 a '87, ambos en el estado de Morelos, y observaron que la mayoría de los aislados de EPEC se registraron en niños menores de un año en ambos estudios.

En nuestro estudio se encontró que EPEC se aisló en el 16/399 (4%) de los pacientes hospitalizados, esto concuerda con el estudio realizado por Benítez *et al.* en 1991 en una cohorte de 75 niños en la ciudad de Cuernavaca, en donde observaron una frecuencia del 4% de aislados de EPEC. Pero es importante señalar que las cepas que se trabajaron tanto en los estudios de Benítez *et al.*

1991, como en los de Cravioto *et al.* 1987, 1990 son de una comunidad abierta a diferencia del nuestro que es de niños hospitalizados por diarrea aguda.

Por otra parte, en un estudio de diarrea aguda en niños que acudieron al servicio de urgencias en la ciudad de México realizado por Morayta *et al.* 1993, observaron una prevalencia del 13% para EPEC. Este es un porcentaje alto en comparación con lo obtenido en este estudio. Sin embargo, el estudio de Morayta *et al.* 1993, se realizó de diciembre del '89 a julio del '90, antes de la llegada del cólera a México y ahora se sabe que después de este acontecimiento se observó un mejoramiento en las condiciones de higiene, a partir de la intensificación de las campañas de salud pública, dando como resultado un cambio en el patrón de las diarreas, así como de los agentes etiológicos (Velázquez, 2001). Por lo que la disminución en el porcentaje de EPEC en nuestro estudio probablemente sea el resultado del impacto de estas campañas de salud pública.

Es importante señalar que de los 16 pacientes a los cuales se les aisló EPEC, solamente 3 fueron EPEC típicas, es decir, que tienen tanto el gen *bfpA*, así como el gen *eaeA* y los 13 pacientes restantes fueron EPEC atípicas, por lo que solamente contienen el gen *eaeA*. En 2/3 (67%) de los pacientes se les identificó EPEC típica, como agente etiológico único, durante la temporada primavera-verano (P-V), en niños menores de 2 años, mientras que el otro paciente se encontró asociado a una infección mixta con rotavirus (RV), en la temporada otoño-invierno (O-I), también en un menor de 2 años.

En los 13 pacientes en los cuales se les aisló EPEC atípica, 12 pacientes presentaron infecciones mixtas, 7 asociados con RV (2 en P-V menores de 2 años y 5 en O-I menores de 2 años), 2 con *Shigella* (1 en P-V y 1 en O-I, ambos en niños mayores de 2 años), 2 con *Campylobacter* (ambos en O-I en menores de dos años) y en un paciente se encontró una infección mixta con 2 agentes etiológicos RV y *Campylobacter* (en O-I, en un paciente mayor de dos años). Solamente en 1 paciente se aisló EPEC atípica como único agente etiológico (en P-V en un paciente mayor de 2 años).

A pesar de que los casos de EPEC típica son pocos, parecería que sí pueden ser agentes etiológicos causantes de diarrea que requiere hospitalización. Mientras que las EPEC atípicas parecen estar principalmente asociadas a causa de diarrea mixta poniendo en manifiesto que aun no se puede definir si estos agentes son verdaderamente responsables de casos de diarrea aguda (Trabulsi *et al.* 2002).

El segundo grupo diarreogénico de *E. coli* que se aisló en nuestro estudio fue STEC 9/37 pacientes (24%). Este es un porcentaje alto en relación con el estudio realizado por Benítez *et al.* 1991, en donde reportan que hubo aislamiento de este grupo diarreogénico en 12/75 pacientes (16%). Sin embargo, Cravioto *et al.* 1988, reporta la presencia de cepas STEC en 32/52 (60%) de niños con diarrea, de una comunidad del estado de Morelos, México. Todo esto quizá pone en evidencia que STEC es un patógeno emergente de diarrea aguda que requiere hospitalización en nuestro país.

ETEC se aisló en 8/37 (22%) pacientes, un número muy cercano a STEC dejando de manifiesto que este grupo diarreogénico continúa siendo un importante agente de diarrea aguda hospitalaria (Nataro *et al.* 1998). Así lo demuestra también, el trabajo realizado por Flores *et al.* 1993, observando la prevalencia de enteropatógenos en niños con diarrea líquida, en la ciudad de Mérida, Yucatán, en donde el agente enteropatógeno que se asoció con mayor frecuencia a la diarrea líquida fue ETEC en un 9%. Cabe señalar que en algunos estudios realizados en niños con diarrea, se menciona que el segundo grupo diarreogénico asociado más comúnmente con diarrea es ETEC (Vergara *et al.* 1992 y Torres *et al.* 2001).

El grupo diarreogénico de *E. coli* que se aisló en menor proporción fue EIEC, el cual se identificó solamente en 4 pacientes (1%). Esto quizá se deba a que EIEC parece ser una causa poco frecuente de diarrea, como lo reportan los siguientes estudios: Suárez *et al.* 1993, observaron la prevalencia de bacterias enteropatógenas en niños con diarrea aguda con sangre, en el estado de Yucatán, México, encontrando a EIEC en 2/148 (1%) de los pacientes, lo cual concuerda con nuestros resultados. Así mismo, Benítez *et al.* 1991, solamente reportan 3/75 (4%) e niños con diarrea con sangre a lo cuales se les aisló el grupo EIEC, es importante mencionar que este último estudio se realizó en una comunidad abierta. Esta baja incidencia de aislamientos del grupo EIEC se ha observado también en otros países, tal es el caso del estudio de Torres *et al.* 2001 en Montevideo, Uruguay realizado en niños con diarrea aguda, de los cuales solamente en dos pacientes (0.9%) se les identificó el grupo EIEC. También

Kyung-Hee *et al.* 1989 sólo encontraron al grupo EIEC en 1/231 (0.4%) de niños coreanos con diarrea. Sin embargo, también se sabe que el 60% de las cepas de EIEC son lactosa negativas, por lo que no se seleccionan estas cepas en medios de cultivo como MacConkey (Nataro *et al.* 1998).

En lo referente a las infecciones simples, se encontró que solamente en 8/37 (22%) de los pacientes se les aisló un grupo diarreogénico de *E. coli* como único agente etiológico. Siendo EPEC y ETEC los grupos identificados con mayor frecuencia, ambos en 3/37 (8%) pacientes. Estas observaciones confirman lo ya descrito por otros autores en trabajos de diarrea realizados en comunidad (Levine *et al.* 1984 y Cravioto *et al.* 1990), en donde observaron que en países en vías de desarrollo como México EPEC y ETEC, se encuentran entre los primeros agentes etiológicos de tipo bacteriano causantes de diarrea en niños menores de dos años. Estos datos también concuerdan con lo reportado en un estudio realizado en 218 niños hospitalizados por diarrea aguda en Calcuta, India, donde EPEC, fue el principal agente etiológico identificado en infección simple, seguido por ETEC y rotavirus (Ghosh *et al.* 1991). Solamente en 1/37 (3%) pacientes se encontró STEC al igual que EIEC como agentes etiológicos únicos. Tal vez sea necesario realizar estudios de mayor número de años consecutivos, para determinar la importancia de las infecciones causadas por los grupos diarreogénicos de *E. coli*, como agentes únicos en diarreas agudas que requieran hospitalización.

La mayoría de los pacientes presentaron infecciones mixtas 29/37 (78%), es decir, pacientes en donde se les identificó *E. coli* diarreogénica más otro agente etiológico, esto ya ha sido reportado en países en vías de desarrollo, en los enfermos con diarrea. Es frecuente encontrar infecciones mixtas en los casos de diarrea en estos países, pudiéndose aislar dos o más agentes etiológicos a la vez en el mismo individuo (Olarde, 1985), sin embargo se desconoce hasta que punto pueda presentarse alguna interacción entre los distintos agentes etiológicos identificados o si estas infecciones mixtas originan cuadros clínicos más graves (Olarde, 1981). Morayta *et al.* en 1993, también observó infecciones mixtas en 16/121 (13.2%) pacientes, en niños con diarrea aguda, de un servicio de urgencias pediátricas, siendo los agentes etiológicos más frecuentemente aislados de infecciones mixtas *E. coli* con RV. Esto concuerda con nuestros resultados ya que las asociaciones más frecuentemente observadas fueron precisamente de los grupos diarreogénicos de *E. coli* con RV (EPEC, 8 pacientes; STEC, 8 pacientes y ETEC, 3 pacientes). Datos similares han sido reportados también en otros países, tal es el caso del estudio realizado por Vergara *et al.* 1992, en niños con diarrea en Misiones, Argentina, en donde menciona que la frecuencia de las asociaciones entre dos o más agentes etiológicos, alcanzaron el 16.2%, siendo la mas frecuente EPEC más RV.

La presencia de infecciones mixtas a sido corroborado también en estudios multidiciplinarios, por ejemplo el realizado por la Organización Mundial de la Salud en cinco países (China, India, Pakistán, Myanmar y México), en donde se realizó

la búsqueda de agentes etiológicos causantes de diarrea aguda en una población de niños de entre 0 a 35 meses de edad, encontrando infecciones mixtas en un 13%, observando que las asociaciones mas frecuentes fueron de *E. coli*-rotavirus y *E. coli*-*Campylobacter* (Pérez *et al.* 1997).

En lo que respecta a la temporalidad de los grupos diarreogénicos de *E. coli* a lo largo del año no se observaron diferencias significativas entre los aislamientos en el período de primavera-verano, con respecto al de otoño-invierno ($p= 0.638$). Puesto que en primavera-verano se aislaron, 11/138 (7.9%) pacientes y en otoño-invierno 26/261 (9.9 %). Estos datos nos permiten concluir que el aislamiento de los grupos diarreogénicos de *E. coli*, parecieran no tener estacionalidad como se mencionaba anteriormente (Velázquez. 2001).

Los grupos diarreogénicos de *E. coli* se aislaron en el 9.2% sólo debajo de *Shigella sp* 13.2% y por encima de *Salmonella* 5.8%, *Campylobacter sp.* 5.8%, *Aeromonas sp.* 1%, *Vibrio cholerae* 0.3% y *Acinetobacter* 0.3%. Algunos de estos agentes bacterianos, como *Shigella*, *Salmonella* y *Campylobacter*, ya han sido identificados con anterioridad en estudios en donde se ha observa la etiología de las diarreas en niños en nuestro país, tal es el caso de Cravioto *et al.* 1987 y 1990. Así como por Benítez *et al.* 1991, Morayta *et al.* 1993 y por Suárez *et al.* 1993. Sin embargo, en los trabajos anteriores no se realizó la búsqueda de *Aeromonas*, *Vibrio cholerae* y *Acinetobacter*.

CONCLUSIONES

Los resultados anteriormente mostrados confirman que los grupos diarreogénicos de *E. coli* son agentes importantes de diarrea aguda en niños menores de cinco años que requieren ser hospitalizados.

En este estudio los grupos diarreogénicos de *E. coli* ocuparon el segundo lugar como agentes productores de diarrea aguda de tipo bacteriana sólo después de *Shigella*.

Las cepas diarreogénicas de *E. coli* se encuentran presentes principalmente en infecciones mixtas en los niños hospitalizados.

Los grupos diarreogénicos de *E. coli* no presentaron estacionalidad.

REFERENCIAS

Albert, M. J. , A. S. Faruque, S. M. Faruque, R. B. Sack y D. Mahalanabis. 1999. Case-control study of enteropathogens associated with childhood diarrhea in Dhaka, Bangladesh. *J. Clin. Microbiol.* **37**:3458-3464.

Barrera, H. A. , R. Ortíz, A. Rojas y D. Reséndez. 1993. Reacción en cadena de la polimerasa. Una nueva época dorada en la biología molecular. *Ciencia y desarrollo. Facultad de Medicina UNAM*, **6**:50-59.

Benítez, O. , F. Uribe, A. Navarro, D. Hernández, J. Ruíz y A. Cravioto. 1991. Etiología de diarrea con sangre en niños de una comunidad rural. *Bol. Med. Hosp. Infant. Mex.* **48**(2): 65-70.

Bern, C. , J. Martínez, I. De Soyza y R. I. Glass. 1992. The magnitude of the global problem of diarrheal disease: a ten year update. *Bull WHO* **70**:705-714.

Black, R. E. , K. Brown y S. Becker. 1982. Contamination of weaning foods and transmission of enterotoxigenic *Escherichia coli* diarrhoea in children of Bangladesh. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **76**:259-264.

Brenner, D. J. 1978. Characterization and clinical identification of *Enterobacteraceae* by DNA hybridization. *Prog. Clin. Pathol.* **7**:71-117.

Cebula, T. A. , W. L. Payne y P. Feng. 1995. Simultaneous identification of strains of *Escherichia coli* serotype O157:H7 and their Shiga-like toxin type by mismatch amplification mutation assay-multiplex PCR. *J. Clin. Microbiol.* **33**:248-250.

Comisión Nacional de Acción en Favor de la Infancia. Evaluación 1990-2000.

Cravioto, A. R. , J. Gross, S. M. Scotland y B. Rowe. 1979. An adhesive factor found in strains of *Escherichia coli* belonging to the traditional enteropathogenic serotypes. *Curr. Microbiol.* **3**:95-99.

Cravioto, A. , R. E. Reyes, R. Ortega, G. Fernández, R. Hernández y D. López. 1987. Incidencia y etiología de la diarrea aguda durante los dos primeros años de vida de una cohorte de niños rurales. *Bol. Med. Hosp. Inf. Mex.* **44**:316-321.

Cravioto, A. , R. E. Reyes, R Ortega, G. Fernández, R. Hernández y D. López 1988. Prospective study of diarrhoeal disease in a cohort of rural Mexican children: Incidence and isolated pathogens during the first two years of life. *Epidem. Rev.* **101**: 123-134.

Cravioto, A. , V. Vázquez, A. Soria, A. Navarro y M. Ortiz. 1988a. Producción de citotoxina tipo *Shiga* en cepas de *Escherichia coli* aisladas de niños con diarrea en una comunidad rural. *Bol. Med. Hosp. Infant. Mex.* **45**:206-210.

Cravioto, A. , R. E. Reyes, F. Trujillo, F. Uribe, A. Navarro, J. M. De la Roca, J. M. Hernández, G. Pérez y V. Vázquez. 1990. Risk of diarrhea during the first year of life associate with initial and subsequent colonization by specific enteropathogens. *Am. J. Epidemiol.* **131**:886-904.

Cravioto, A. , A. Tello, A. Navarro, J. Ruiz, H. Villafan, F. Uribe y C. Eslava. 1991. Association of *Escherichia coli* HEp-2 adherence patterns with type and duration of diarrhoea. *Lancet.* **337**:262-264.

Dirección General de Epidemiología. 2001. Boletín semanal de epidemiología. Numero 51.

Donnenberg, M. S. 1995. Enteropathogenic *Escherichia coli*. In: Blaser, M. J. , Smith, P. D. , Ravdin, J. I. , Guerrant, R. L. (eds). Infections of the Gastrointestinal Tract. New York: Raven Press. p. 709.

du Toit, R. , T. C. Victor y P. D. van Helden. 1993. Empirical evaluation of conditions influencing the polymerase chain reaction: *Escherichia coli* as a test case. Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem. **31**:225-231.

Fang, G. D. , A. A. Lima, C. V. Martins, J. P. Nataro y R. L. Guerrant. 1995. Etiology and epidemiology of persistent diarrhea in northeastern Brazil: a hospital-based, prospective, case-control study. J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr. **21**:137-144.

Flores, A. J. , G. H. Suárez, M. F. Puc, M. N. Herédia, M. J. Franco. 1993. Prevalencia de enteropatógenos en niños con diarrea líquida. Rev. Latinoam. Microbiol. **35**:351-356.

Formal, S. B. y R. B. Hornick. 1978. Invasive *Escherichia coli*. J. Infect. Dis. **137**:641-647.

Frankel, G. , J. A. Giron, J. Valmassoi y G. K. Schoolnik. 1989. Multi-gene amplification: simultaneous detection of three virulence genes in diarrhoeal stool. Mol. Microbiol. **3**:1729-1734.

Frankel, G. , A. D. Phillips, I. Rosenshine, G. Dougan, J. B. Kaper y S. Knutton. 1998. Enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*: more subversive elements. Mol. Microbiol. **30**:911-921.

Gannon, V. P. , M. Rashed, R. K. King y E. J. Thomas. 1993. Detection and characterization of the eae gene of Shiga-like toxin producing *Escherichia coli* using polymerase chain reaction. J. Clin. Microbiol. **31**:1268-1274.

Ghosh, A. R. , G. B. Nair, P. Dutta, S. C. Pal y D. Sen. 1991. Acute diarrhoeal diseases in infants aged below six months in hospital in Calcutta, India: an aetiological study. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **85**:796-798.

Giono, C. S. , G. A. Escobar y G. J. L. Valdespino, 1994a. Diagnóstico de Laboratorio de Infecciones Gastrointestinales. Secretaria de Salud. Pag. 251-266.

Giono, C. , A. Rodriguez, C. Rodriguez y G. Valdespino. 1994. Identificación de las enterotoxinas y citotoxinas de *Escherichia coli* por cultivo de células Vero e hibridación en fase sólida (colony blot). *Rev. Latinoam. Microbiol.* **36**:231-241.

Guerrant, R. L. , L. L. Brunton, T. C. Schnaitman, L. L. Rebhun y A. G. Gilman. 1974. Cyclic adenosine monophosphate and alteration of Chinese hamster ovary cell morphology: a rapid, sensitive in vitro assay for the enterotoxins of *Vibrio cholera* and *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* **10**:320-327.

Gómez, T. A. , M. R. Toledo, L. R. Trabulsi, P. K. Wood y J. G. Morris. 1987. DNA probes for identification of enteroinvasive *Escherichia coli*. *J. Clin. Microbiol.* **25**:2025-2027.

Hyams, K. C. , A. L. Bourgeois, B. R. Merrell, J. Escamilla, S. A. Thornton, A. Burke, P. Echevarria y K. Y. Green. 1991. Diarrheal disease during Operation Desert Shield. *N. Engl. J. Med.* **325**:1423-1428.

Jann, K. y B. Jann. 1985. Cell surface components and virulence: *Escherichia coli* O and K antigens in relation to virulence and pathogenicity. In: Sussman M. (ed). *The virulence of Escherichia coli*. Academic Press, Inc., New York, p. 157-177.

Jerse, A. E. , W. C. Martin, J. E. Galen y J. B. Kaper. 1990. Oligonucleotide probe for detection of the enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) adherence factor of localized adherent EPEC. *J. Clin. Microbiol.* **28**:2842-2844.

Jerse, A. E. , K. G. Gicquelais y J. B. Kaper. 1991. Plasmid and chromosomal elements involved in the pathogenesis of attaching and effacing *Escherichia coli*. Infect. Immun. **59**:3869-3875.

Knutton, S. , D. R. Lloyd y A. S. McNeish. 1987. Adhesion of enteropathogenic *Escherichia coli* to human intestinal enterocytes and cultured human intestinal mucosa. Infect. Immun. **55**:69-77.

Knutton, S. , T. Baldwin, P. H. Williams y A. S. McNeish. 1989. Actin accumulation at sites of bacterial adhesion tissue culture cells: basis of a new diagnostic test for enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*. Infect. Immun. **57**:1290-1298.

Knutton, S. , A. D. Phillips, H. R. Smith, R. J. Gross, R. Shaw y P. Watson. 1991. Screening for enteropathogenic *Escherichia coli* in infants with diarrhea by the fluorescent actin staining test. Infect. Immun. **59**:365-371.

Konowalchuk, J. , J. I. Speirs y S. Stavric. 1977. Vero response to a cytotoxin of *Escherichia coli*. Infect. Immun. **18**:775-779.

Kosek, M. , C. Bern y R. L. Guerrant. 2003. The global burden of diarrhoeal disease, as estimated from studies published between 1992 and 2000. Bull WHO **81**:197-204.

Kupersztoch, Y. M. , K. Tachias, C. R. Moomaw, L. A. Dreyfus, R. Urban, C. Slaughter y S. Whipp. 1990. Secretion of methanol insoluble heat-stable enterotoxin (STB): energy-and-secA-dependent conversion of pre STB to an intermediate indistinguishable from the extracellular toxin. J. Bacteriol. **172**:2427-2432.

Kyung-Hee, K. , S. Inn-Soo, K. Jung-Moog. 1989. Etiology of childhood diarrhea in Korea. *J. Clin. Microbiol.* **27**:1192-1196.

Lanata, C. F. , J. B. Kaper, M. M. Baldini, R. E. Black y M. M. Levine. 1985. Sensitivity and specificity of DNA probes with stool blot technique for detection of *Escherichia coli* enterotoxins. *J. Infect. Dis.* **152**:1087-1090.

Levine, M. M. y R. Edelman. 1984. Enteropathogenic *Escherichia coli* of classic serotypes associated with infant diarrhea: epidemiology and pathogenesis. *Epidemiol. Rev.* **6**:31-51.

Levine, M. M. 1987. *Escherichia coli* that cause diarrhea: enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic and enteroadherent. *J. Infect. Dis.* **155**:377-389.

Levine, M. M. , J. G. Xu, J. B. Kaper, H. Lior, V. Prado, B. Tall, J. P. Nataro, H. Karch y K. Wachsmuth. 1987. A DNA probe to identify enterohemorrhagic *Escherichia coli* of O157:H7 and other serotypes that cause colitis and hemolytic uremic syndrome. *J. Infect. Dis.* **156**:175-182.

López-Saucedo, C. , J. F. Cerna, N. Villegas-Sepiueda, R. Thompson, F. R. Velázquez, J. Torres, P. I. Tarr y T. Estrada-García. 2003. Single multiplex polymerase chain reaction to detect diverse loci associated with diarrheagenic *Escherichia coli*. *Emerg. Infect. Dis.* **9**:127-131.

Jackson, M. P. 1991. Detection of shiga toxin producing *Shigella dysenteriae* type 1 and *Escherichia coli* by using polymerase chain reaction with incorporation of digoxigenin-11-dUTP. *J. Clin. Microbiol.* **29**(9):1910-1914.

Morayta, R. A. , J. Juárez, R. Macorra, R. Sarmiento, S. Gutiérrez y M. A. Pezzotti. 1993. Etiología del síndrome diarreico agudo en un servicio de urgencias Pediátricas. Rev. Mex. Ped. **60**:10-15.

Murray, B. E. , J. J. Mathewson, H. L. DuPont, W. E. Hill. 1987. Utility of oligodeoxyribonucleotide probes for detecting enterotoxigenic *Escherichia coli*. J. Infect. Dis. **155**:809-811.

Nataro, J. P. , M. M. Baldini, J. B. Kaper, R. E. Black, N. Bravo y m. M. Levine. 1985. Detection of an adherence factor of enteropathogenic *Escherichia coli* with a DNA probe. J. Infect. Dis. **152**:560-565.

Nataro, J. P. , I. C. Scaletsky, J. B. Kaper, M. M. Levine y L. R. Trabulsi. 1985. Plasmid-mediated factors conferring diffuse and localized adherence of enteropathogenic *Escherichia coli*. Infect. Immun. **48**:378-383.

Nataro, J. P. y J. B. Kaper. 1998. Diarrheagenic *Escherichia coli*. Clin. Microbiol. Rev. **11**(1):142-201.

Nataro, J. P. , T. Steiner y R. L. Guerrant. 1998. Enteroaggregative *Escherichia coli*. Emerg. Infect. Dis. **4**:251-261.

Newland, J. W. y R. J. Neill. 1988. DNA probes for Shiga-like toxins I and II and for toxin-converting bacteriophages. J. Clin. Microbiol. **26**:1292-1297.

Olarte, J. 1981. Avances en el conocimiento de la etiopatogenia de las diarreas. Analectas de Medicina Mexicana 2. México: Academia Nacional de Medicina.

Olarte, J. 1985. Etiopatogenia de las diarreas infecciosas. Bol. Med. Hosp. Infant. Mex. **42**:66-72.

Orskov, F. y I. Orskov. 1984. Serotyping of *Escherichia coli*. In Bergan T. (ed.). Methods in Microbiology. Vol.14, Academic Press, London, p. 43-112.

Paul, M. , T. Tsukamoto, A. R. Ghosh, S. K. Bhattacharya, B. Manna, G. B. Nair, D. A. Sack y Y. Takeda 1994. The significance of enteroaggregative *Escherichia coli* in the etiology of hospitalized diarrhoea in Calcutta, India, and the demonstration of a new honey-combed pattern of aggregative adherence. FEMS. Microbiol. Lett. **117**:319-326.

Pérez, M. A. y A. E. Mejía. 1997. Evolución temporal del patrón de aislamiento de enteropatógenos en diarrea aguda. Bioquímica **23** (3):873-877.

Sandvig, K. y B. van Deurs. 1994. Endocytosis and intracellular sorting of ricin and Shiga toxin. FEBS Lett. **346**:99-102.

Sansonetti, P. J. , A. Ryter, P. Clerc, A. T. Maurelli y J. Mounier. 1986. Multiplication of *Shigella flexneri* within HeLa cells: lysis of the phagocytic vacuole and plasmid mediated contact hemolysis. Infect. Immun. **51**:461-469.

Scaletsky, I. C. , M. L. Silva y L. R. Trabulsi. 1984. Distinctive patterns of adherence of enteropathogenic *Escherichia coli* to HeLa cells. Infect. Immun. **45**:534-536.

Schmidt, H. , L. Beutin y H. Karch. 1995. Molecular analysis of the plasmid-encoded hemolysin of *Escherichia coli* O157:H7 strain EDL 933. Infect. Immun. **63**:1055-1061.

Sears, C. L. y J. B. Kaper. 1996. Enteric bacterial toxins: mechanisms of action and linkage to intestinal secretion. Microbiol. Rev. **60**:167-215.

Sepulveda, J. 1990. Malnutrition and infectious diseases. A longitudinal study of interaction and risk factor. *Perspectivas en Salud Pública*. No. 9 Instituto Nacional de Salud Pública. México.

Sheikh, J. , J. R. Czeczulin, S. Harrington, S. Hicks, I. R. Henderson, C. Le Bouguenec, P. Guonon, A. Phillips y J. P. Nataro. 2002. A novel dispersin in enteroaggregative *Escherichia coli*. *J. Clin. Invest.* **110**:1329-1337.

Spangler, B. D. 1992. Structure and function of cholera toxin and the related *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. *Microbiol. Rev.* **56**:622-647.

Stacy-Phipps, S. , J. J. Mecca y J. B. Weiss. 1995. Multiplex PCR assay and simple preparation method for stool specimens detect enterotoxigenic *Escherichia coli* DNA during the course of infection. *J. Clin. Microbiol.* **33**:1054-1059.

Steiner, T. S. , A. A. Lima, J. P. Nataro y L. R. Guerrant. 1998. Enteroaggregative *Escherichia coli* produce intestinal inflammation and growth impairment and cause interleukin-8 release from intestinal epithelial cells. *J. Infect. Dis.* **177**:88-96.

Suárez, G. , J. J. Flores, M. R. Heredia, M. A. Puc y J. Franco. 1993. Prevalencia de bacterias enteropatógenas en niños con diarrea aguda con sangre. *Bol. Med. Hosp. Infant. Mex.* **50**(3):151-155.

Sussman, M. 1985. *Escherichia coli* in human and animal disease. In: Sussman M. (ed). *The virulence of Escherichia coli*. Academic Press, Inc., New York, p. 7-45.

Tornieporth, N. G. , J. John, K. Salgado, P. de Jesus, E. Latham, M. C. Melo, S. T. Gunzburg y L. W. Riley. 1995. Differentiation of pathogenic *Escherichia coli* strains in Brazilian children by PCR. *J. Clin. Microbiol.* **33**:1371-1374.

Torres, M. E. , M. C. Pirez, F. Schelotto, G. Varela, V. Parodi, F. Allende, E. Falconi, P. Gaione, M. V. Méndez, A. M. Ferrari, A. Montano, E. Zanetta, A. M. Acuna y E. Ingold. 2001. Etiology of children's diarrhea in Montevideo, Uruguay: associated pathogens and unusual isolates. *J. Clin. Microbiol.* **39**:2134-2139.

Trabulsi, L. R. , R. Keller y T. A. Tardelli Gomes. 2002. Typical and Atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. *Emerg. Infect. Dis.* **8**:508-513.

Vega, F. L. 2002. Reportes de vigilancia epidemiológica que el pediatra debe conocer. *Rev. Mex. Ped.* **69**:3-4.

Velázquez, C. F. R. 2001. Importancia de los agentes virales como causa de diarrea grave en los niños menores de cinco años de edad que requieren hospitalización, y factores de riesgo asociados. Las múltiples facetas de la investigación en salud. Pag. 133-152.

Vergara, M., M. Quiroga, S. Grenón, V. Villalba, E. Pegels, M. Chade, C. González, N. Binsztein, T. Eiguer y A. Depetris. 1992. Identificación de enteropatógenos en la diarrea de la infancia en un estudio realizado en la ciudad de Posadas, Misiones, República Argentina. *Rev. Latinoam. Microbiol.* **34**:71-75.