



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**



**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
IZTACALA**

PREVALENCIA DE CUATRO GRUPOS DE *Escherichia coli* QUE
CAUSAN DIARREA, EN NIÑOS MENORES DE DOS AÑOS DE UNA
COMUNIDAD CONURBADA DE LA CIUDAD DE MÉXICO

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

LICENCIADO EN BIOLOGÍA

P R E S E N T A :
MARICELA ABONCE ROSALES

DIRECTOR DE TESIS: Dra. MARIA TERESA ESTRADA GARCÍA

MÉXICO

ABRIL 2006





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

A LA MEMEORIA DE MI MADRE

*A ti que me diste un fragmento de tu ser,
que de la mano me llevaste por el camino de la vida,
hoy la tristeza oprime mi alma, esa inmensa tristeza de no tenerte a mi lado,
para poder decirte lo mucho que te necesito, para poder decirte lo mucho que te amo
Madre te extraño mucho y me haces mucha falta y
ahora entiendo todos tus consejos, tus regaños y hasta tus enojos,
hay algo que nunca te dije y es que fuiste una gran madre,
perdóname por hacerte sufrir, pero nunca fue mi intención herirte
y aunque no te puedo mirar, ni te puedo tocar, se que estas siempre conmigo.
Toda mi vida estarás en mi corazón*

DEDICATORIAS

A Dios por dejarme llegar a este momento, por darme la fortaleza de seguir adelante a pesar de todos los obstáculos.

A mis padres Juan y Adela por haberme dado la vida, por enseñarme con el ejemplo a ser una mujer de bien, por sus desvelos y preocupaciones, por apoyarme incondicionalmente y no bastara una vida para devolverles parte de todo lo que han hecho por mí. Pero a ti padre mío por que estos últimos 11 años te has convertido en padre y madre y se que ha sido muy difícil, pero para mi, siempre serás único y nunca olvidare tu fuerzo y valentía con la que has luchado, desde que yo era una niña. Y hoy te quiero más que ayer porque al pasar el tiempo he valorado tu esfuerzo, siempre te llevo en mi corazón y en mis pensamientos. Gracias y mil gracias doy a Dios por tenerte,

Estoy tan orgullosa de tener un padre como tú TE AMO PAPÁ.

A mis hermanos chucho y Juan por la confianza que han puesto en mí, por apoyarme siempre que lo he necesitado y aunque a veces discutimos y estamos en desacuerdo en algunas cosas, se que el cariño que existe entre nosotros es más grande que las pequeñas diferencias. Los AMO y saben que por ustedes daría (sin pensarlo un segundo) todo lo que tengo.

A mi cuñis Lupe por el apoyo que he recibido en estos últimos años, por darme una hermosa sobrina y por ser una buena esposa para mi hermano, ojala y conservemos esta amistad siempre.

A mis tíos Geno y Rey por el enorme apoyo tanto moral como económico que me ofrecieron cuando mas lo necesitaba, por que ustedes han sido un pilar en mi formación y gracias a ustedes no claudique en los momentos más difíciles que estaba pasando junto a mí familia.

A mis tíos Elvira y Mario por confiar en mi, gracias tío Mario por los buenos momentos que me ha hecho pasar, por que a pesar de sus problemas siempre tiene una sonrisa para alegrar el día, ha sido una dicha ser su sobrina.

A Oscar por tu amistad incomparable e incondicional, por el apoyo que me has brindado en los momentos difíciles, por hacerme ver el verdadero valor de la vida y aunque a veces diferimos en puntos de vista siempre llegamos a un acuerdo.

A mi hijo Gerardo, tú que eres la razón de mí existir, la persona más importante en mi vida. Mil gracias, por que muchas cosas de mí cambiaron con tu llegada. Ilusiones trajiste a nuestras vidas y junto con ella la dicha para mí de saber el significado de la palabra "MAMA".

A mi esposo Sergio, eres un hombre amoroso, estupendo y el mejor padre del planeta, te adoro, por tu compañía, tu sonrisa infinita, tu paciencia de acero y tu serenidad diaria, por que gracias a tí y por tu apoyo infinito he llegado hasta donde estoy. Te quiero muchísimo.

Gracias por todos los momentos que hemos compartido por los momentos llenos de sentimientos y pensamientos compartidos, sueños y anhelos, secretos, risas y lágrimas.

AGRADECIMIENTOS

A mí honorable Facultad de Estudios Superiores Iztacala de la Universidad Nacional Autónoma de México, por la formación profesional que me brindo.

Deseo expresar un Justo reconocimiento a la Dra. Ma. Teresa García Estrada por su paciencia que tuvo en estos años, por su apoyo y asesoría en la realización de esta tesis y por darme la oportunidad de trabajar en su laboratorio.

También quiero agradecer muy especialmente al Dr. Jorge Francisco Cerna Cortés por la dedicación y paciencia que tuvo en la realización de esta tesis, así como toda la enseñanza que me ha brindado en estos últimos años. Gracias Jorge por compartir conmigo tus conocimientos.

A Caty y Rocío por su gran ayuda en la fase experimental de este proyecto y por sus acertados comentarios durante este largo tiempo hacia mí persona, como al trabajo realizado en el laboratorio.

A mis compañeros del Laboratorio Iza, Alejandra, Héctor, Caty, Eunice, Rocío, Miguel, Doña Margarita por haber compartido conmigo sus conocimientos y experiencia.

A mis amigos de la Facultad, Miguel, Gabriel, Leonardo, Israel, Oscar, Andrés, Sergio, Manolo, Maru, Lola, Toño, Daniel, Nancy, Javier, Carlos, Silvia, Ma. Elena, Diana, Lupita, Ingrid gracias por darme un momento de su tiempo. Una vez más a todos ellos y a los que faltaron Mil Gracias.

ESTA TESIS FUE REALIZADA BAJO LA DIRECCION DE LA Dra. Ma. TERESA ESTRADA GARCIA, INVESTIGADOR TITULAR 3-A DEL DEPARTAMENTO DE BIOMEDICINA MOLECULAR DEL CENTRO DE INVESTIGACION Y DE ESTUDIOS AVANZADOS DEL I.P.N. QUE TIENE EL APOYO DEL CONACYT 46068-Q; Y BAJO LA SUPERVISION DEL DR. JORGE FRANCISCO CERNA CORTES PROFESOR TITULAR DEL DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA DE LA ESCUELA NACIONAL DE CIENCIAS BIOLOGICAS DEL INTITUTO POLITECNICO NACIONAL.

QUE COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL TITULO DE **“BIOLOGO”** FUE REVISADA Y APROBADA POR:

DRA. MA. TERESA ESTRADA GARCIA

DR. DIEGO JULIO ARENAS ARANDA

DR. SERGIO VACA PACHECO

M En C. ERIC MONROY PEREZ

DR. JORGE FRANCISCO CERNA CORTES

INDICE GENERAL

Índice de figuras y gráficas.....	I
Índice de tablas.....	II
Resumen.....	III
Introducción.....	1
Diarrea.....	2
Clasificación de las diarreas.....	3
Diarrea aguda acuosa.....	3
Diarrea aguda con sangre (disentería).....	3
Diarrea persistente.....	3
Diarrea con severa malnutrición.....	3
Agentes etiológicos causantes de diarrea.....	4
<i>Escherichia coli</i> (<i>E. coli</i>).....	4
Mecanismos de patogenicidad.....	5
La adherencia.....	5
La producción de toxinas.....	6
La invasión.....	6
<i>E. coli</i> enterotoxigénica (ETEC).....	7
<i>E. coli</i> enteropatógena (EPEC).....	9
<i>E. coli</i> productora de toxinas parecidas a la toxina <i>Shiga</i> (STEC).....	12
<i>E. coli</i> enteroinvasiva.....	14
Diagnostico de los grupos diarreogénicos de <i>E. coli</i> (GDE).....	15
Serotipificación.....	16
Asa ligada de conejo.....	17
Métodos de biología molecular.....	17

Colony blot.....	17
Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	18
Etiología de las diarreas en México.....	19
Justificación.....	23
Objetivos.....	24
Metodología.....	25
Diarrea es definida como.....	25
Diseño del estudio.....	25
Criterios de inclusión.....	25
Criterios de exclusión.....	26
Aislamiento e identificación de las cepas de <i>E. coli</i>	27
PCR Múltiplex.....	27
Genes seleccionados.....	28
Resultados.....	30
Estudio.....	30
Identificación de GDE en heces de niños.....	30
Prevalencia de cada GDE.....	33
Número de casos y distribución de GDE por mes a lo largo del año.....	36
Estacionalidad de los GDE.....	39
Identificación de los GDE como únicos agentes etiológicos.....	40
Infecciones mixtas.....	42
Casos de GDE asociados con diarrea.....	43
Discusión.....	48
Conclusiones.....	59
Referencias.....	60

INDICE DE FIGURAS Y GRÁFICAS

Figura 1. Ubicación del área de estudio.....	26
Figura 2. Productos de PCR.....	31
Gráfica 1. Casos de GDE en niños menores de dos años.....	32
Gráfica 2. Porcentaje de casos de cada uno de los GDE en niños menores de dos años.....	34
Gráfica 3. Casos de GDE identificados a lo largo del año.....	37
Gráfica 4. Distribución de GDE a lo largo del año.....	38
Gráfica 5. Distribución por temporada de los GDE.....	40
Gráfica 6. GDE como único agente etiológico.....	41
Gráfica 7. Identificación de infecciones simples y mixtas de GDE.....	43
Gráfica 8. Porcentaje de casos de GDE con diarrea y sin diarrea.....	44
Gráfica 9. GDE identificados en niños con diarrea.....	45
Gráfica 10. Sexo de los niños que presentaron diarrea y se les identificó algún GDE en heces.....	46
Gráfica 11. Porcentaje de pacientes con diarrea y GDE comparado con el número de casos de GDE.....	47

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Lista de iniciadores, tamaño de la banda y concentración de iniciadores en la mezcla de reacción.....	29
Tabla 2. Frecuencia de aislamiento de los GDE por niño durante el año.....	32
Tabla 3. Lista de GDE y genes identificados en los 231 casos.....	35
Tabla 4. Cuadro general de casos de GDE en niños menores de dos años.....	38
Tabla 5. Casos de GDE por temporada.....	39
Tabla 6. Infecciones simples asociadas con diarrea.....	41
Tabla 7. Infecciones mixtas de GDE más un patógeno.....	42
Tabla 8. Infecciones mixtas de GDE con dos patógenos.....	42
Tabla 9. Niños que presentaron más de un episodio de diarrea al año asociado con GDE.....	47

INTRODUCCION

Las infecciones gastrointestinales representan un problema de salud pública mundial, en especial en países en vías de desarrollo. En donde anualmente ocurren 2.5 millones de muertes en menores de cinco años, siendo la media de mortalidad de 4.9 por cada 1,000 niños al año. Sin embargo, es importante mencionar que la mortalidad en niños menores de cinco años ha disminuido progresivamente en las últimas décadas pasando de 13.6 a 5.6 muertes por cada 1,000 niños por año, debido principalmente a la implementación de terapias de rehidratación oral en dichos países (Kosek *et al.*, 2003). A pesar del mejoramiento de la tendencia en la tasa de mortalidad, la diarrea continúa produciendo el 21% de las muertes de niños menores de cinco años (Kosek *et al.*, 2003).

En México, la mortalidad por diarrea de cada 100,000 niños menores de cinco años disminuyó de 22.7 en 1990 a 18.5 en el año 2002, lo cual implica un descenso del 85% (Tercer Informe de Gobierno, 2003). No obstante, el número de fallecimientos aún es elevado, por ejemplo en el año 2002 se registraron 1,954 muertes por diarrea (Tercer Informe de Gobierno, 2003).

Sin embargo, es importante mencionar que a pesar de la disminución en la tasa de mortalidad por diarrea no se ha reflejado en una disminución en la tasa de morbilidad. Esto se puede deber tal vez, a que no se han mejorado las condiciones

INTRODUCCION

de vida de la población de bajos recursos económicos del mundo, ya que se sabe que en esta población el número de episodios diarreicos en los infantes es mayor que en la población de mejores recursos económicos (Kosek *et al.*, 2003). Se estima que en los países en vías de desarrollo anualmente ocurren de 744 a 1,000 millones de episodios diarreicos, esto significa que existen de 1,400 a 1,900 episodios cada minuto (Bern *et al.*, 1992).

En México, para el año 2002 se registraron 6,323,520 episodios diarreicos (Dirección General de Epidemiología, 2002). Sin embargo, consideramos que este valor está subestimado, ya que se ha reportado que en nuestro país ocurren anualmente entre 30 y 40 millones de episodios diarreicos en esta población (Vega, 2002).

Diarrea. Se define como la eliminación de heces con una frecuencia mayor a tres veces en un día y con una disminución en la consistencia de las heces. La diarrea puede causar deshidratación, lo que significa que el cuerpo pierde suficiente cantidad de líquidos (agua y electrolitos), que son necesarios para el adecuado funcionamiento de las células. Si se pierde más del 10% del fluido corporal puede ocurrir la muerte. Más del 90% de los casos de diarrea aguda son causados por agentes infecciosos, el 10% restante se atribuye a medicamentos, ingestión de sustancias tóxicas, isquemia y otros procesos.

La diarrea infecciosa se adquiere predominantemente por vía fecal-oral al consumir alimentos y/o agua contaminada con algún agente etiológico.

Clasificación de las diarreas. Con base en su patología y en la alteración fisiológica que causan las diarreas se clasifican en cuatro tipos:

Diarrea aguda acuosa. Se caracteriza por presentar gran cantidad de líquido en las heces y puede durar algunas horas o incluso días, cuya principal consecuencia es la deshidratación y la pérdida de peso, que se presenta si no se continúa con la alimentación y rehidratación del paciente.

Diarrea aguda con sangre (disentería). Se caracteriza por presentar sangre en las heces que puede estar acompañada de daño a la mucosa intestinal, lo que produce una rápida pérdida de peso, anorexia, sépsis y desnutrición, además de otras complicaciones como la deshidratación.

Diarrea persistente. Se caracteriza por comenzar como una diarrea aguda, pero tiene una duración mayor de 14 días, cuya principal consecuencia es la desnutrición, aunque también puede haber deshidratación.

Diarrea con severa malnutrición. Se caracteriza por presentar trastornos como infección septicémica grave, deshidratación, problemas cardiacos y deficiencia de vitaminas y minerales.

Agentes etiológicos productores de diarrea. En recién nacidos se considera que la diarrea de etiología viral es debida principalmente a Rotavirus, existiendo una asociación con enterobacterias, específicamente con los grupos de *Escherichia coli* que producen diarrea, los cuales se consideran como una de las principales causas de diarrea infecciosa bacteriana en niños menores de dos años (Velásquez, 2001; Cerna *et al.*, 2003). En México diferentes estudios epidemiológicos, en los que se realizó la búsqueda de agentes etiológicos productores de diarrea, han mostrado la participación principalmente de Rotavirus, Adenovirus, Astrovirus, *Salmonella*, *Shigella*, *Campylobacter*, *Vibrio cholerae*, *Cryptosporidium sp.*, *Aeromonas sp.*, *Giardia sp.*, *Aeromonas sp.*, *Giardia sp.* Y en un alto porcentaje, los grupos diarreogénicos de *Escherichia coli* (GDE) (Cravioto *et al.*, 1987; Sepúlveda-Amor., 1990; Flores-Abuxapqui *et al.*, 1993; Velásquez, 2001).

***Escherichia coli* (*E. coli*).**

De acuerdo con el manual de Bergey's. *E. coli* pertenece al género *Escherichia* y a la familia *Enterobacteriaceae*. Es un bacilo gram negativo, anaerobio facultativo, no esporulado, provisto de flagelos peritricos con fimbrias, pueden presentar cápsula por lo que algunas colonias son mucoides. *E. coli* se ha clasificado con base a sus características serológicas (de acuerdo a los antígenos somáticos **O**, capsulares **K** y Flagelares **H**) (Levine, 1987, Sussman, 1985).

E. coli fue inicialmente descrita por Theodore Escherich en 1885 bajo el nombre de *Bacterium coli commune*, para indicar la presencia de este microorganismo en el intestino de individuos sanos (Sussman, 1985). Sin embargo, no fue hasta 1895 cuando el nombre cambio a *Escherichia coli*. Está bacteria también fue señalada por Escherich como responsable de infecciones extraintestinales, después de haber observado que la bacteria también se aislaba frecuentemente en infecciones urinarias principalmente en niñas (Wasterson *et al.*, 1991). A pesar de que la primera descripción de esta 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 de *E. coli* como agente productor de diarrea.

Está bacteria coloniza el intestino del ser humano pocas horas después del nacimiento y se le considera como el miembro principal de la flora intestinal normal, esta asociación conlleva a un beneficio mutuo entre el hospedero y el microorganismo, el papel de la bacteria en el organismo es mantener la homeostasis. (Nataro y Kaper, 1998).

Mecanismos de Patogenicidad.

Los mecanismos de patogenicidad de *E. coli* incluyen:

- 1) **La adherencia.** Que permite que la bacteria se adhiera y colonice el epitelio de ciertas áreas del intestino.

2) **La producción de toxinas.** Las cuales son liberadas una vez que la bacteria ha colonizado el intestino y dependiendo de éstas, su efecto puede ser la estimulación y secreción de agua y electrolitos (enterotoxinas), o la destrucción celular (citotoxinas).

3) **La Invasión.** En este proceso la bacteria se introduce dentro del citoplasma, después invade las células vecinas, lo que le permite a la bacteria evadir los mecanismos de protección del huésped (Nataro y Kaper, 1998).

Basándose en los mecanismos de patogenia que presentan las cepas de *E. coli* que causan diarrea, junto con su epidemiología y síndromes clínicos que producen, se han clasificado principalmente en cuatro grupos: *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* enteropatógena (EPEC), *E. coli* productora de toxinas parecidas a la toxina *Shiga* (STEC) con un subgrupo de las enterohemorrágicas (EHEC) y *E. coli* enteroinvasiva (EIEC). (Nataro y kaper 1998).

Existen otros dos GDE, sin embargo no se incluyeron en este estudio ya que aun no se conocen completamente los mecanismos de patogenicidad por los cuales producen la diarrea, y estos grupos son: *E. coli* enterodifusa (EDEC) y *E. coli* enteroagregativa (EAEC) (Nataro *et al.*, 1998).

***E. coli* enterotoxigenica (ETEC).** Se define como las cepas de *E. coli* que producen la toxina LT (termolábil), ST (termoestable) o ambas (Levine 1987), Taylor *et al.*, (1961). Utilizando el sistema del asa ligada de conejo, reconocieron que estas cepas ETEC podían producir la secreción de fluidos en el intestino, posteriormente se demostró que las cepas de ETEC eran capaces de causar diarrea en voluntarios adultos (DuPont *et al.*, 1971). Las cepas ETEC colonizan la superficie del intestino delgado y después producen sus toxinas, las cuales incrementan la tasa de secreción del intestino. Las enterotoxinas producidas por ETEC son la termolábil (LT) codificada por el gen *lt* y/o la termoestable (ST) codificada por el gen *st*.

La toxina termolábil (LT) es una proteína dimérica de 86 kDa de peso molecular, compuesta por dos subunidades conocidas como A y B; la subunidad B es un pentámero que tiene la propiedad de unirse al gangliosido GM1, presente en la superficie apical de las células de epitelio intestinal (Sprangler 1992), mientras que la subunidad A posee la actividad enzimática. El blanco celular de la toxina LT es la adenilato ciclasa. La subunidad A1 tiene actividad de ADP-ribosiltransferasa y actúa transfiriendo una unidad de ADP-ribosil del NAD a la subunidad alfa de la proteína Gs unida a GTP, la cual a su vez estimula el adenilato ciclasa de manera permanente, aumentando los niveles intracelulares de AMP cíclico (AMPC). El AMPC dependiente de cinasa se activa, permitiendo la fosforilación de los canales de cloro localizados en la membrana apical de la célula epitelial. El resultado final

INTRODUCCION

es la estimulación de la secreción de iones cloro de las células de las criptas hacia el lumen intestinal y la inhibición de la absorción de NaCl por las células apicales de las vellosidades intestinales. El incremento de estos iones en el lumen conlleva a la salida pasiva de agua de las células a través de la vía para celular, produciendo una diarrea osmótica.

La toxina termoestable (ST) es una toxina pequeña, monomérica, que contiene múltiples residuos de cisteína, algunos de los cuales se encuentran formando enlaces disulfuro haciendo a la toxina estable a temperaturas altas (Kupersztoch *et al.*, 1990). El principal receptor de la toxina ST es la guanilato ciclasa C. La toxina ST se une al guanilato ciclasa C (Sears *et al.*, 1996) originando un incremento de los niveles de guanosin monofosfato cíclico (CMPC). Tanto las cinasas dependientes de CMPC como del AMPc, activan los canales de cloro, permitiendo la estimulación de secreción de los iones cloro y la inhibición de la absorción de NaCl. El incremento de estos iones en el lumen conlleva a la salida pasiva de agua de las células a través de la vía paracelular, produciendo la diarrea osmótica característica de ETEC.

ETEC es uno de los agentes etiológicos más frecuentemente asociado con la diarrea infantil durante el período de destete (Nataro y Kaper, 1998) y con la denominada diarrea del viajero (Hyams *et al.*, 1991). Se estima que ETEC

INTRODUCCION

anualmente causa 500 millones de episodios de diarrea y más 750,000 muertes en niños menores de cinco años en países en vías de desarrollo (Savarino *et al.*, 1999).

Estudios en voluntarios adultos a los cuales se les neutralizó el ácido del estómago mostraron que la dosis infectiva fue de 10^8 unidades formadoras de colonia (ufc) (DuPont *et al.*, 1971). La patología por ETEC se presenta de manera repentina, la cual tiene períodos de incubación cortos de entre 14 a 50 horas, la diarrea es de tipo acuosa, sin sangre y en pocos de los casos se presenta fiebre y vómito (Black *et al.*, 1982).

***E. coli* enteropatógena (EPEC).** EPEC se define como aquellas cepas de *E. coli* que producen diarrea, no producen las toxinas parecidas a toxina Shiga (Stx1, Stx2), no son invasivas y producen lesiones histopatológicas de adherencia y esfacelamiento (A/E) (Trabulsi *et al.*, 2002).

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

Las cepas de EPEC se adhieren a las células HEp-2 en cultivo con un patrón de adherencia localizada (Cravioto *et al.*, 1979).

INTRODUCCION

Las interacciones de EPEC con las células epiteliales pueden dividirse en tres etapas 1) en la agrupación de las bacterias formando microcolonias sobre la superficie de las células, siguiendo el patrón de adherencia localizada, 2) en la traducción de señales, y eventos que conllevan a la movilización del citoesqueleto, y 3) en la unión íntima de la bacteria con la célula (Donnenberg *et al.*, 1992).

La lesión A/E se caracteriza por la adherencia íntima de la bacteria a los enterocitos en su porción apical y al esfacelamiento de las microvellosidades del epitelio intestinal.

La intimina es una proteína de membrana externa de 94 kDa codificada por el gen *eaeA*, la cual es responsable de la adherencia íntima entre la bacteria y el enterocito (Adu-Bobie *et al.*, 1998).

Baldini *et al.*, mostraron que la habilidad de la cepa HB 101 (EPEC) para adherirse de manera localizada a las células HEp-2 en cultivo, era dependiente de un plásmido de 60 MDa, al cual denominaron factor de adherencia a EPEC (EAF). Diferentes estudios han mostrado que el plásmido EAF no es esencial para la formación de la lesión A/E.

En 1991 Girón *et al.*, describieron en EPEC un Pili al que llamaron *Bundle-forming pilus* (Pili que forma un bucle), que está codificado en el plásmido EAF.

INTRODUCCION

Tanto la expresión del BFP como la presencia del gen que codifica para la subunidad estructural del bucle (*bfpA*) se han asociado con la adherencia localizada.

Con base en la presencia o a la ausencia del plásmido EAF y en el patrón de adherencia sobre células HEp-2, las cepas EPEC se clasifican en: EPEC típicas y EPEC atípicas. Las cepas de EPEC típicas son de origen humano y poseen el plásmido EAE y además presentan el patrón de adherencia localizada, mientras que las cepas EPEC atípicas no contienen el plásmido EAF ni presentan el patrón de adherencia localizada.

Las infecciones por EPEC típica se presentan principalmente en niños menores de dos años, especialmente en el grupo de niños menores de seis meses. EPEC sólo causa diarrea en voluntarios adultos después de haber neutralizado el pH estomacal con bicarbonato y de haber administrado una dosis infectiva de 10^8 a 10^{10} ufc. La dosis infectiva en niños no se ha determinado, pero se cree que es mucho menor. Las razones de la relativa resistencia en adultos se desconoce, pero la pérdida de receptores específicos con la edad puede ser una posibilidad (Nataro y Kaper, 1998).

EPEC produce diarrea acuosa, la cual ocasionalmente puede ir acompañada de vómito, dolor abdominal y fiebre (Nataro y kaper 1998). Se estima que EPEC produce anualmente más de un millón de muertes de niños en el mundo (Finlay *et al.*, 1996).

***E. coli* productora de toxinas parecidas a la toxina *Shiga* (STEC).** En 1983, Riley *et al.*, reportaron dos brotes de colitis hemorrágica (CH), en los estados de Oregon y Michigan en los Estados Unidos, los cuales estuvieron asociados con el consumo de hamburguesas en un restaurante de comida rápida.

Los cultivos de las heces de estos pacientes mostraron la presencia de *E. coli* 0157:H7, un serotipo poco común en ese tiempo. Ese mismo año Karmali *et al.*, 1983 en Ottawa, Canadá, reportaron casos esporádicos de síndrome urémico hemolítico (SHU) y púrpura trombocitopénica, ambos relacionados con el aislamiento en estos pacientes de cepas *E. coli* con efecto citotóxico sobre células Vero (células de riñón de mono verde).

El término de *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) se propuso para designar a las cepas de *E. coli* que producen toxinas parecidas a la toxina Shiga de *Shigella dysenteriae* tipo 1, además de contener un plásmido de 60 MDa que codifica para una enterohemolisina y que produce la lesión A/E en células epiteliales (Levine, 1987).

En la actualidad las cepas de *E. coli* productoras de toxinas Stx son llamadas *E. coli* productora de toxinas Shiga (STEC), por lo que las cepas EHEC son un subgrupo de las STEC.

INTRODUCCION

La familia de las citotoxinas Stx que produce STEC, está constituida por dos grupos principales: *Stx1* y *Stx2*, los cuales no cruzan inmunológicamente. Ambas toxinas se encuentran codificadas en genes cromosomales (Scotland *et al.*, 1983; O'Brien *et al.*, 1984). Una cepa STEC puede expresar la toxina Stx1, la Stx2 o ambas. La citotoxina Stx2 es la más frecuentemente identificada en cepas aisladas de brotes.

Las citotoxinas tienen una estructura moléculas AB (70 kDa), la cual es conservada en todos los miembros de familia Stx. La subunidad A, es la fracción con actividad enzimática y se encuentra unida no covalentemente a la subunidad B que es pentámera (Stein *et al.*, 1992). Ésta última subunidad es la que se une a su receptor específico Gb3 o Gb4. La subunidad A es una N-glicosidasa que escinde un residuo de adenina (A-3732) localizada a 376 nucleótidos del extremo 3' de la subunidad 28S del RNA ribosomal (rRNA). Esta escisión conlleva a la inhibición de la síntesis de proteínas en las células y su subsecuente muerte. Este mismo efecto se ha observado con células epiteliales del endotelio renal, líneas celulares Vero, HeLa y sobre cualquier célula que posea los receptores Gb³ o Gb⁴.

Se han descrito otros dos factores que contribuyen a la patogenicidad de este grupo: 1) el gene *hlyA*, presente en el plásmido de 60 MDa, el cual codifica para una hemolisina, y 2) los genes presentes en la isla de patogenia LEE.

INTRODUCCION

El cuadro clínico producido por EHEC se caracteriza por presentar diarrea sanguinolenta, los casos moderados consisten en diarrea, vómito y dolor abdominal. La infección por EHEC O157:H7 está asociada a casos de diarrea hemorrágica y al síndrome urémico hemolítico (SUH), el cual se define por la presencia de anemia hemolítica microangiopática, trombocitopenia e insuficiencia renal aguda. El SUH es la principal causa de insuficiencia renal aguda en niños en los Estados Unidos (Nataro y Kaper, 1998).

***E. coli* enteroinvasiva (EIEC).** Du Pont *et al.*, (1971), fueron los primeros en demostrar que las cepas EIEC eran capaces de causar diarrea en voluntarios adultos.

Las cepas de EIEC tienen características bioquímicas, genéticas y patogénicas relacionadas con las del género *Shigella* (Formal *et al.*, 1978).

Se ha demostrado que las cepas EIEC invaden las células del epitelio intestinal. El modelo de patogénesis propuesto comprende los siguientes pasos: 1) penetración a la célula epitelial, 2) lisis de la vacuola endocítica, 3) multiplicación intracelular, 4) movimiento a través del citoplasma y 5) desplazamiento hacia las células epiteliales adyacentes (Goldberg *et al.*, 1993). Lo cual es mediado tanto por genes plasmídicos como cromosomales.

INTRODUCCION

En 1986, Sansonetti *et al.*, realizaron estudios de cinética de crecimiento intracelular de EIEC y demostraron que estas cepas contienen un plásmido de 140 MDa., en el cual se encuentra los genes, que le permiten a las cepas de EIEC invadir a los enterocitos.

Las infecciones por EIEC, se presentan en la mucosa del colon y se caracterizan por producir diarrea acuosa que precede a disentería, moco, fiebre, vómito así como grave dolor abdominal. Sin embargo, en muchos pacientes con infección por EIEC solamente se presenta la diarrea acuosa (Nataro *et al.*, 1995).

Cuando la infección por EIEC es grave, se presenta una fuerte reacción inflamatoria, la cual se manifiesta por la producción de úlceras (Sansonetti, 1992).

Las cepas EIEC han estado involucradas en brotes, principalmente causados por alimentos o agua (Tulloch *et al.*, 1973), provocando diarrea de tipo disentérico, aunque la transmisión persona a persona también puede ocurrir (Harris *et al.*, 1985). La dosis infectiva es de 10^5 ufc. La incidencia de EIEC en países industrializados es baja sin embargo, pueden presentarse brotes (Gordillo *et al.*, 1992).

Diagnóstico de los Grupos diarreogénicos de *Escherichia coli* (GDE). *E. coli* puede ser recuperada fácilmente de especímenes clínicos, siendo los medios más frecuentemente utilizados para el aislamiento de dicha bacteria el agar MacConkey,

de donde se seleccionan colonias lactosa positivas, que se caracterizan por presentar un color rosa. Las colonias pueden ser redondas, convexas, con bordes definidos (Giono *et al.*, 1994).

Los miembros de la familia *Enterobacteriaceae*, como todas las bacterias, son usualmente identificadas por medio de pruebas bioquímicas, dentro de éstas, el indol es la mejor prueba para identificar las cepas de *E. coli*, ya que el 99% son indol positivo. (Nataro y Kaper, 1998).

La identificación de los GDE es muy complicada debido a dos razones: 1) la utilización de pruebas bioquímicas tradicionales sólo nos permite identificar hasta especie, es decir se trata de *E. coli*, pero no nos dice nada acerca de su patogenicidad, 2) siendo *E. coli* el principal miembro de la microbiota del intestino del humano, se requiere analizar al menos tres colonias por paciente para diferenciar cepas patógenas de entre las comensales, y para saber se el individuo está colonizado con cepas patógenas (Murray *et al.*, 1987).

Serotipificación.

En 1944, Kauffman, propuso un esquema para la clasificación serológica de las cepas *E. coli* (Nataro y Kaper, 1998). Actualmente esta metodología sólo se realiza en pocos laboratorios en el mundo, ya que es difícil contar con los 176 antisueros contra el antígeno somático (O) y los 56 antisueros contra el antígeno flagelar (H).

Asa ligada de conejo.

Es un método que identifica los factores de patogenicidad “*in vitro*”. Originalmente fue desarrollado para identificar la toxina de cólera que producían algunas cepas de *Vibrio cholera*, este método, se adaptó para la identificación de la toxina LT de ETEC. La toxina LT produce secreción de fluidos en el intestino del conejo.

Métodos de biología molecular.

Son una de las más sensibles herramientas de diagnóstico, siendo precisamente el diagnóstico de los GDE uno de los primeros ejemplos en donde se utilizaron estas técnicas. Entre los métodos de biología molecular utilizados para identificar los GDE se encuentran los ensayos de Hibridación (*colony blot*) y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Colony blot. En este procedimiento las dobles cadenas de DNA bacteriano son desnaturalizadas a pH alcalino, así las cadenas de DNA sencillas que están marcadas radiactivamente con P^{32} o biotina (sonda marcada) y que es específica contra los genes de patogenicidad pueden hibridar con los genes del organismo homólogo a la sonda.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), fue desarrollada por Kary B. Mullis en 1983, se define como la reacción cíclica enzimática en la cual se sintetiza DNA *in vitro*, en esta 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 DNA utilizado como plantilla. Los componentes requeridos para una PCR son: iniciadores (oligonucleótidos) específicos que flanquean el gen, mezcla de desoxinucliótidos (dNTP'S), solución amortiguadora de la reacción, MgCl₂, agua y DNA polimerasa.

Cada uno de ciclos de la reacción consta de tres pasos determinados por temperaturas y tiempos específicos, los cuales son:

- 1) **Desnaturalización.** Proceso en el cual se separan las dos cadenas complementarias del DNA blanco.
- 2) **Alineación.** Es la unión específica entre los iniciadores y las cadenas simples del DNA blanco.
- 3) **Extensión.** En este paso la DNA polimerasa sintetiza la cadena complementaria al DNA blanco a partir de los iniciadores (Barrera *et al.*, 1993).

La PCR se ha utilizado exitosamente en la amplificación de los genes de patógena de los GDE. Entre los trabajos realizados se encuentra una PCR múltiplex, la cual amplifica los genes que codifican para las toxinas LT y ST de ETEC (du Toit *et al.*, 1989). La técnica de PCR también se ha utilizado para detectar los genes *stx1* de EHEC (karch *et al.*, 1989), *eaeA* (Gannon *et al.*, 1993), *hlyA* (Schmidt *et al.*, 1995) y el plásmido p0157 (Levine *et al.*, 1987), el gen *bfpA* de EPEC (Tornieporth *et al.*, 1995) y el fragmento *ial* de EIEC (Frankel *et al.*, 1990). Además, se han diseñado un par de iniciadores sensibles y específicos para la amplificación del plásmido EAF de EPEC (Jerse *et al.*, 1990).

En el laboratorio de la Dra. Teresa Estrada-García (CINVESTAV) se ha desarrollado una PCR múltiplex que nos permite identificar 7 genes de patogenia que caracterizan 4 GDE en una sola reacción: *lt* y *st* (ETEC), *stx1*, *stx2* y *eaeA* (STEC), *bfpA* y *eaeA* (EPEC), y *ial* (EIEC) (Lopez-Saucedo *et al.*, 2003).

Etiología de las diarreas en México.

Existen estudios en los que se ha realizado la búsqueda de agentes etiológicos productores de diarrea en niños menores de cinco años. Entre los cuales se encuentran el de Sepúlveda-Amor, en 1990, el cual reportó los agentes etiológicos causantes de diarrea en 125 niños que llegaron al servicio de urgencias médicas, en un hospital al sur de la ciudad (Cd.) de México, durante el año de 1985. En este trabajo se realizó la búsqueda de Rotavirus, ETEC, EPEC, *Shigella*, *Salmonella*,

INTRODUCCION

Campylobacter jejuni, *Giardia lamblia*, *Entamoeba histolytica* y *Entamoeba coli*.

Como resultado se identifico a EPEC en el 28% de los casos, *Campylobacter* en el 15% ETEC en el 13%, *Shigella* en el 9% *Giardia lamblia* en el 8%, Rotavirus en el 6%, *Entamoeba histolytica* en el 1.6%, y *Salmonella* en el 0.8% de los casos.

Cravioto *et al.*, en 1987 publicaron los agentes etiológicos productores de diarrea en 56 niños de una comunidad rural de Cuernavaca, desde su nacimiento hasta los dos años de vida. Para este estudio se incluyeron los niños que nacieron entre marzo de 1982 a marzo de 1983. Los agentes buscados fueron: Rotavirus, ETEC, EPEC, *Shigella*, *Salmonella*, *Campylobacter jejuni*, *Giardia lamblia*, y *Entamoeba histolytica*. Se reportó que los niños tuvieron 3.3 episodios diarreicos por año. En el 27% de los casos no fue posible identificar agente etiológico, pero si en el 73% (270/372) restante. De los 372 episodios, en el 34% (125/372) se aisló ETEC, Rotavirus en el 10%, EPEC en el 8%, *Salmonella* y *Campylobacter jejuni* en el 6%, *Giardia lamblia* y *Entamoeba histolytica* en el 5%, y *Shigella* en el 4%. En el 13% (48/372) de los episodios existieron infecciones mixtas.

Benítez *et al.*, (1991), realizaron la búsqueda de agentes etiológicos que causan diarrea con sangre en 75 niños, desde su nacimiento hasta los dos años de vida, en una comunidad de Cuernavaca, Morelos. De un total de 636 episodios de diarrea, en el 11% (71/636) de los episodios hubo presencia de sangre en heces, aislándose por lo menos un patógeno en el 83% (59/71) de los episodios. En el 35%

INTRODUCCION

se identificó a EAEC, en el 14% a *Shigella*, en 11% a STEC, en 7% a *Campylobacter jejuni*, 7% a ETEC, en el 4% a EPEC, EIEC, *Salmonella*, *Giardia lamblia*, y *Hymenolepis nana*. Se identificaron infecciones mixtas en el 17% de los episodios. Estas infecciones mixtas fueron principalmente entre *Campylobacter jejuni* con EAEC y entre ETEC con EAEC (Benitez *et al.*, 1991).

Estudios epidemiológicos, realizados en México por Cravioto *et al.*, en 1998 y 1990, mostraron que las cepas de EIEC se aíslan con poca frecuencia de pacientes con diarrea y están asociadas con niños mayores de 6 meses.

Morayta *et al.*, en 1993, reportaron los agentes causales de diarrea en 121 niños, cuyas edades variaron entre los 19 días y 14 años. Todos ellos tenían diarrea aguda y acudieron para su atención al servicio de urgencias durante los meses de diciembre de 1998 a julio de 1990. No fue posible identificar agente patógeno en el 33% (57/121) de los casos. Se identificaron agentes etiológicos en el 53% (64/121) de los niños. El mayor número de ellos se encontró en menores de doce meses. Los agentes identificados fueron: Rotavirus en (17.9%), EPEC (12.8%), *Salmonella* en (7.6%), *Campylobacter jejuni* (7%), *Shigella* en (5.1%), *Clostridium difficile* y *Cryptosporidium* en el 0.6%, 6.8 % de los niños se presentaron infecciones mixtas.

En otro estudio realizado en niños menores de cinco años hospitalizados por diarrea aguda en tres hospitales de la ciudad de México (Cerna. 2003), se identificó

INTRODUCCION

a los GDE en el 9% (63/699) de los casos, siendo el grupo más frecuentemente aislado EPEC 3% (22/699) de los casos, en donde el 2% (16/699) le correspondió al grupo de las EPECa y el 1% (6/699) fue para las EPECt. ETEC se identificó en el 2.7% (19/699) de los casos, STEC en el 2.3% (16/699) y finalmente EIEC se identificó en el 0.9% (6/699). En este mismo estudio se identificaron infecciones mixtas en el 6.4% (45/699), siendo Rotavirus el agente etiológico más frecuentemente aislado en estas asociaciones.

Con estos estudios se corrobora la importancia de los GDE como agentes productores de diarrea, sin embargo no existen reportes recientes que nos indiquen la importancia de los GDE en niños menores de dos años de comunidades abiertas.

RESUMEN

Las infecciones gastrointestinales representan un problema de salud pública mundial principalmente en países en vías de desarrollo. Los grupos diarreogénicos de *E. coli* (**GDE**), *E. coli* enterotoxigénica (**ETEC**); *E. coli* enteropatógena (**EPEC**), este grupo dividido en típica (**EPECT**) y atípica (**EPECa**); *E. coli* productora de toxinas parecidas a la de *Shiga* (**STEC**) y *E. coli* enteroinvasiva (**EIEC**), son considerados como una de las principales causas de diarrea infecciosa bacteriana en niños menores de dos años. En México, en diferentes estudios se ha demostrado la importancia de los GDE como agentes productores de diarrea, sin embargo, no existen reportes recientes que nos indiquen la importancia de los GDE en niños menores de dos años en comunidades abiertas. Por tal motivo en el presente estudio se determinó la prevalencia y la estacionalidad de los cuatro principales GDE (ETEC, EPEC, STEC y EIEC) en niños menores de dos años de una comunidad conurbada de la ciudad de México en el periodo de un año. Se evaluó la presencia de GDE en 181 niños menores de dos años de la comunidad de La Magdalena Atlicpac de los cuales se obtuvieron un total de 1556 aislados (casos) de *E. coli*, identificándose GDE en el 15% (231/1556).

El GDE que mostró mayor prevalencia fue EPECa, el cual se identificó en el 41% (93/231), seguido de ETEC con el 39% (91/231), EPECT con el 12% (28/231), mientras que EIEC y STEC con el 4% (9/231) y 3% (7/231) respectivamente. También se identificó en el 1% (3/231) de los casos 2 GDE diferentes, en dos de ellos se identificó ETEC/EPEC y en un caso se identificó ETEC/STEC. Los GDE presentaron una estacionalidad definida, aislándose principalmente durante la temporada P-V y se identificaron más frecuentemente en infecciones simples.

De los 231 casos donde se identificaron los GDE, en el 81% (189/231) se encontraron como único agente etiológico, destacando que de estos casos el 25% (47/189) estuvieron asociados con diarrea. Así mismo, las infecciones mixtas se presentaron en el 18% (42/231), en donde el 85%, estuvieron asociados con diarrea.

JUSTIFICACION

Las enfermedades diarreicas no solo pueden producir la muerte, sino que se ha observado que el niño que presenta cinco o más episodios de diarrea aguda al año, en comparación con un niño que no lo padece, no sólo puede presentar disminución en su talla y peso, si no que también presenta una disminución en su desarrollo cognoscitivo. Lo anterior demuestra claramente la importancia de establecer la prevalencia y la identificación de los agentes causales de diarrea como son los GDE (ETEC, EPEC, STEC y EIEC), para poder implementar medidas necesarias para evitar las diarreas. En México no existen estudios recientes de la prevalencia de los GDE en niños menores de dos años en comunidades conurbadas.

OBJETIVO GENERAL

Determinar la prevalencia de 4 grupos diarreogénicos de *E. coli* (ETEC, EPEC, STEC, EIEC) en niños menores de dos años, de una comunidad conurbada de la Ciudad de México.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Aislamiento de colonias parecidas a *E. coli* a partir de heces de niños menores de dos años de una comunidad conurbada de la Ciudad de México, en un período de un año.
2. Caracterización bioquímica de las cepas de *E. coli*.
3. Identificación de los genes de correspondientes a los cuatro grupos diarreogénicos de *E. coli*, utilizando un PCR múltiplex que identifica a los grupos: ETEC (*lt, st*), EPEC (*bfpA, eaeA*), STEC (*stx1, stx2, eaeA*), y EIEC (*ial*).
4. Análisis estadísticos de los datos.

METODOLOGÍA

Diarrea es definida como:

Un desorden intestinal caracterizado por un incremento anormal en la frecuencia y líquido en las evacuaciones fecales, estas evacuaciones pueden estar acompañadas de otros trastornos como cólicos, fiebre y vomito (Giono *et al.*, 1994).

Con base en su patología y en la alteración fisiológica que causan las diarreas, en este estudio se han clasificado en **Aguda**: cuando la diarrea que presentaban los niños duraba mas de 14 días, así mismo se clasificó como **disentería** cuando las heces llegaban a presentar sangre y por último se clasificó diarrea **Acuosa** cuando las heces presentaban gran cantidad de líquido sin presentar sangre con o sin moco.

Diseño del estudio: Prolectivo, transversal y analítico.

Criterios de inclusion:

Niños recién nacidos a dos años de edad.

Aceptación de los padres para participar en el estudio.

Residencia en la comunidad La Magdalena Atlipac (zona conurbada de la Cd. de México fig. 1).



Fig. 1 Ubicación del área de estudio

Criterios de exclusión.

Enfermedades inmunosupresoras.

Malformación del tubo digestivo.

Niños a los cuales se les administró medicamento antiparasitario y/o antidiarreico.

Aislamiento e identificación de las cepas de *E. coli*

Se colectó una muestra de heces del paciente, la cual se sembró en Agar MacConkey, se incubó a 37°C por 24 horas y se seleccionaron 3 colonias con morfología compatible a *E. coli* y posteriormente se les realizaron pruebas bioquímicas.

Así mismo, se realizó la búsqueda de *Salmonella spp.*, *Shigella spp.*, *Vibrio cholerae*, *Campylobacter spp.*, *Enterobacter spp.*, *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Proteus*. También se realizó microscopia para identificar *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia* y *Ascaris lumbricoides*

PCR múltiplex

Una vez identificadas las cepas de *E. coli*, estas fueron caracterizadas utilizando una PCR múltiplex desarrollada en nuestro laboratorio de Epidemiología Molecular del CINVESTAV (López-Saucedo *et al.*, 2003), la cual nos permite identificar 7 genes de patogenia de cuatro grupos GDE. (ETEC, EPEC, STEC y EIEC) (fig. 2). 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. Cada tubo de PCR contenía 23 µL de la mezcla de reacción compuesta de tri-HCL (10 mM, pH 8.3), KCl (50 mM), MgCl₂ (2 mM), gelatina (10 µg/ml), glicerol (5 % v/v), dATP, dCTP, dGTP y dTTP (200 µM cada uno), polimerasa Ampli tag (GIBCO-BRL) (0.5 U/23 µL), una mezcla de

14 iniciadores (tabla 1), y 2 μ L de 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: Cicler, BiorRad, Hércules, CA, USA). 4 μ L del producto fueron visualizados después por electroforesis en un gel de agarosa al 2% utilizando bromuro de etidio.

Genes Seleccionados. Se seleccionaron los genes de patogenia característico de cada grupo: para ETEC los que codifican para las toxinas LT (*lt*) y ST (*st*), para EPEC los que codifican para la proteína intimina: (*eaeA*) y para la fimbria BFP (*bfpA*), para STEC los que codifican para las toxinas Stx1 (*stx1*), Stx2 (*stx2*) y el de la intimina (*eaeA*) y para EIEC se seleccionó un fragmento del plásmido de invasividad denominado *ial*.

GDE	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' R:5'AGA ACG CCC ACT GAG ATC ATC 3'	150	3.88
STEC	<i>stx2</i>	F:5'GGC ACT GTC TGA AAC TGC TCC 3' 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' R:5'GGA GGC GAA GAA TTA TTT CC3'	650	10.25

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

RESULTADOS

Estudio

El presente estudio consistió en evaluar la presencia de GDE en 181 niños menores de dos años de la comunidad de La Magdalena Atlicpac a lo largo de un año. Después del consentimiento firmado de los padres para participar en el estudio, cada 15 días se tomaron muestras de heces de cada niño, así como cada vez que el niño presentaba diarrea.

Identificación de GDE en heces de niños.

Una vez que se colectaron las muestras de heces fueron sembradas en los medios selectivos, se seleccionaron tres colonias con morfología compatible a *E. coli*, las cuales se caracterizaron bioquímicamente obteniéndose un total de 1556 aislados de *E. coli*. Estos aislados fueron caracterizados mediante una PCR múltiple. Encontrándose GDE en 231/1556 de los aislados, es decir el 15% (Gráfica 1). Estos 231 aislados (casos) se obtuvieron de 104 niños, por lo que es claro que algunos niños presentaron GDE en sus heces más de una vez a lo largo del año (tabla 2).

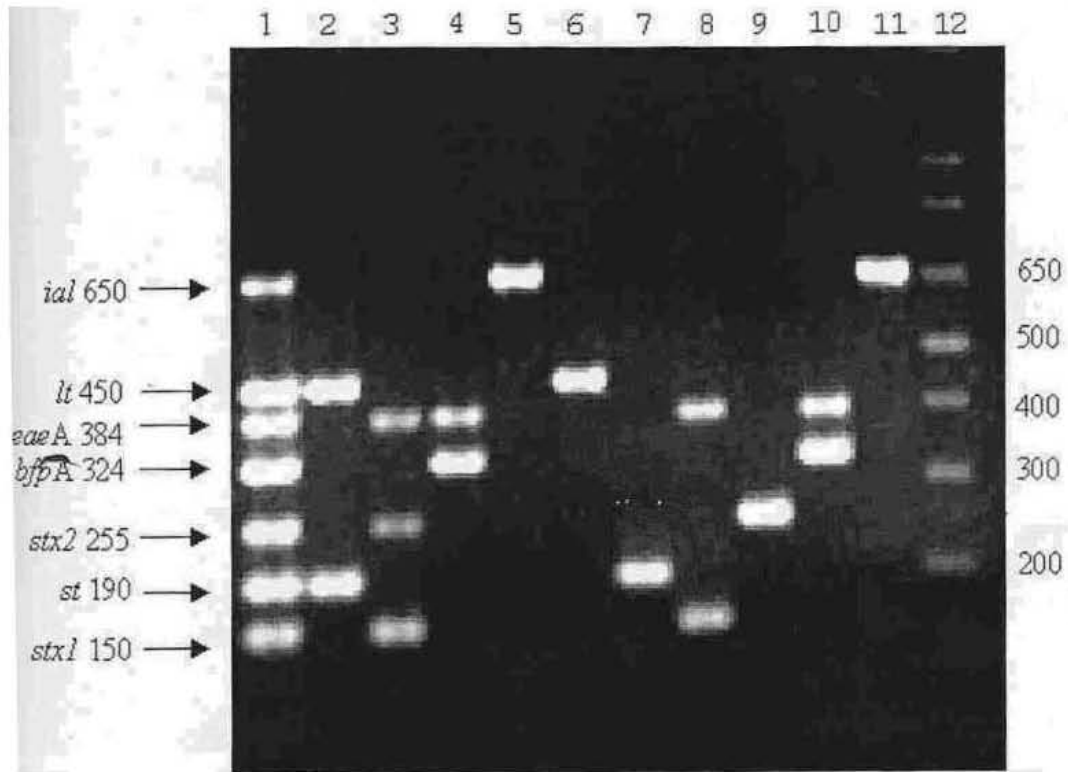
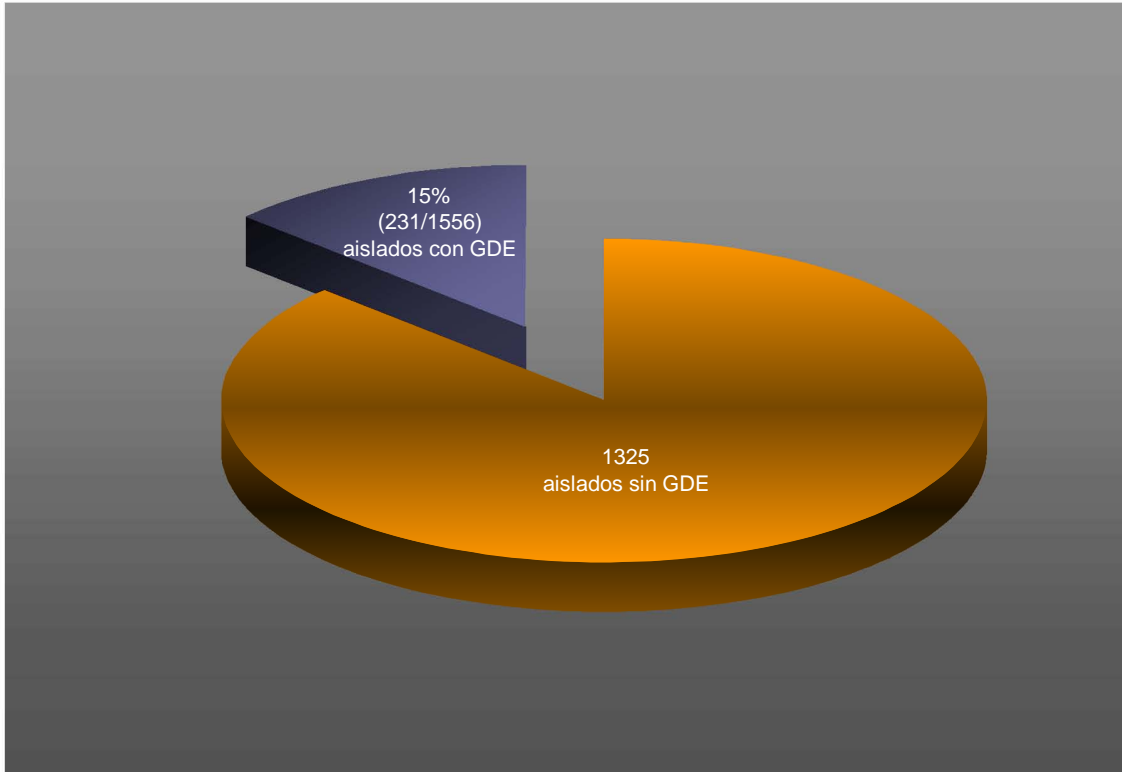


Figura 2. Productos de PCR. Carril 1. Tamaño de los 7 productos de cada uno de los genes en pares de bases (pb), analizados en el PCR múltiplex cuando se utilizó la mezcla del DNA de las cuatro cepas de referencia ETEC, EPEC, EIEC Y STEC y la mezcla de los iniciadores. En los carriles 2-5 se muestran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



Gráfica 1. Casos de GDE en niños menores de dos años

AISLAMIENTO DE GDE EN EL AÑO	NUMERO DE NIÑOS
1	42
2	24
3	21
4	10
5	4
6	3

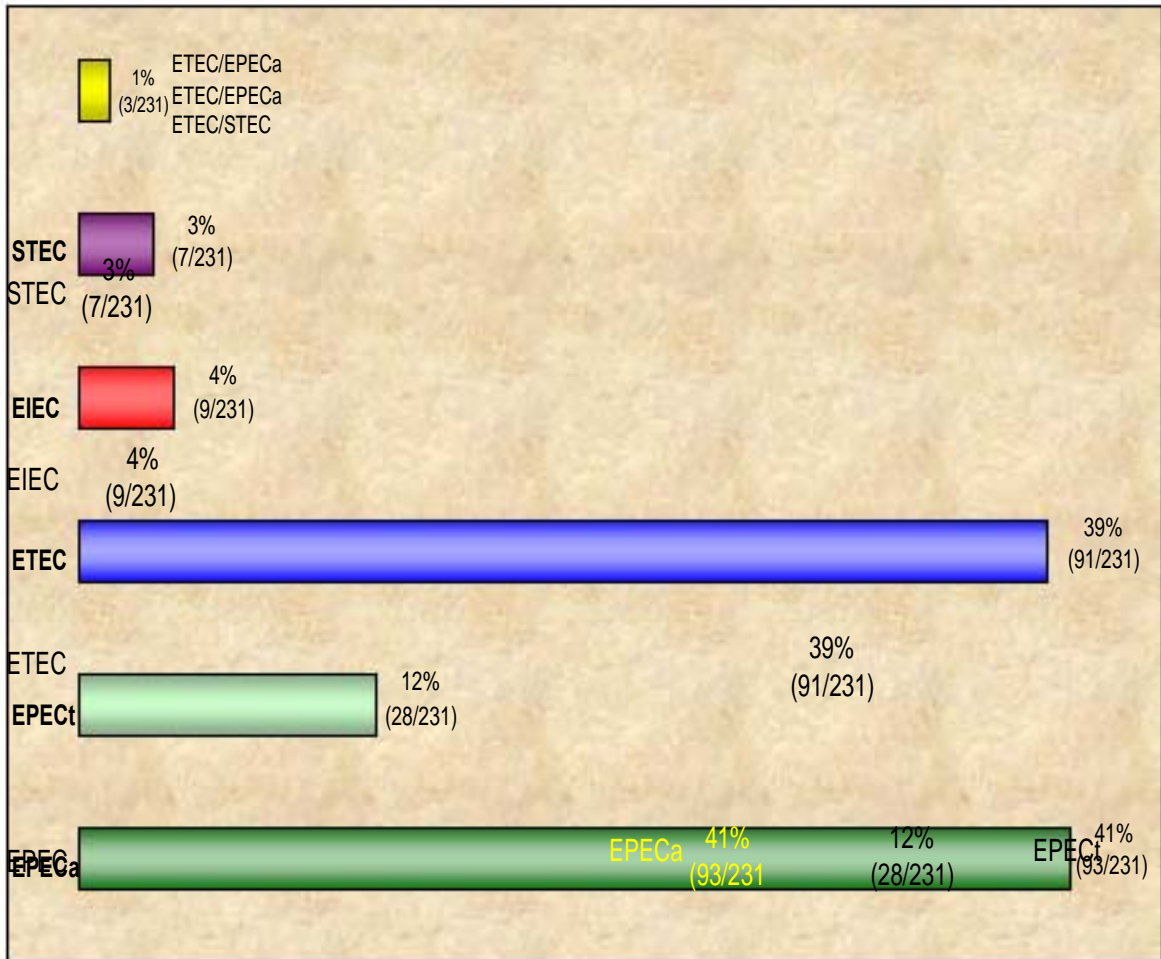
Tabla 2. Frecuencia de aislamiento de los GDE por niño durante el año.

Prevalencia de cada GDE.

Cabe recordar que el grupo de las EPEC se divide en EPEC típicas (EPECt) que contiene tanto el gen *eaeA*, como el *bfpA*, y el de las EPEC atípicas (EPECa), que solo presenta el gen *eaeA*. Los GDE que mostraron mayor prevalencia fueron el de EPECa con el 41% (93/231) y el de ETEC con el 39% (91/231), seguidos por el de las EPECt con el 12% (28/231), mientras que se detectaron EIEC y STEC en el 4% (9/231) y 3% (7/231) respectivamente (Gráfica 2).

También se llegó a identificar en el 1% (3/231) de los casos, 2 GDE diferentes, en dos de ellos se identificó tanto ETEC (*lt*) como EPECa (*eaeA*) y en un caso se identificó ETEC (*lt*) y STEC (*stx1*) (Gráfica 2).

Con respecto a los casos de ETEC el 93% (85/91) se les identificó el gen *lt*, en 5 casos 6% se identificaron ambos genes *lt* y *st* y en un caso, 1% el gen *st*. De los 7 casos de STEC, en 4 se identificó el gen *stx1*, en 2 los genes *stx1* y *eaeA* y finalmente en un caso los genes *stx1* y el *stx2*, Ninguna cepa STEC presento en gen de la enterohemolisina (*hlyA*), ni el lipopolisacarido O157. Para el grupo EIEC se identificó el gen *ial* en el 4% (9/231) de los casos (tabla 3) (figura 1) (Gráfica 2).



Gráfica 2. Porcentaje de casos de cada uno de los GDE en niños menores dos años

GDE	GENE(S) IDENTIFICADO(S)	CASOS
EPECa*	<i>eaeA</i>	93
EPECt*	<i>eaeA, bfpA</i>	28
ETEC	<i>lt</i>	85
ETEC	<i>st</i>	1
ETEC	<i>lt, st</i>	5
STEC	<i>stx1</i>	4
STEC	<i>stx1, eaeA</i>	2
STEC	<i>stx1, stx2</i>	1
EIEC	<i>ial</i>	9
ETEC/EPECa	<i>lt, eaeA</i>	2
ETEC/STEC	<i>lt, stx1</i>	1

Tabla 3. Lista de GDE y genes identificados en los 231 casos.

* EPECa. *Escherichia coli* enteropatógena atípica

* EPECt. *Escherichia coli* enteropatógena típica.

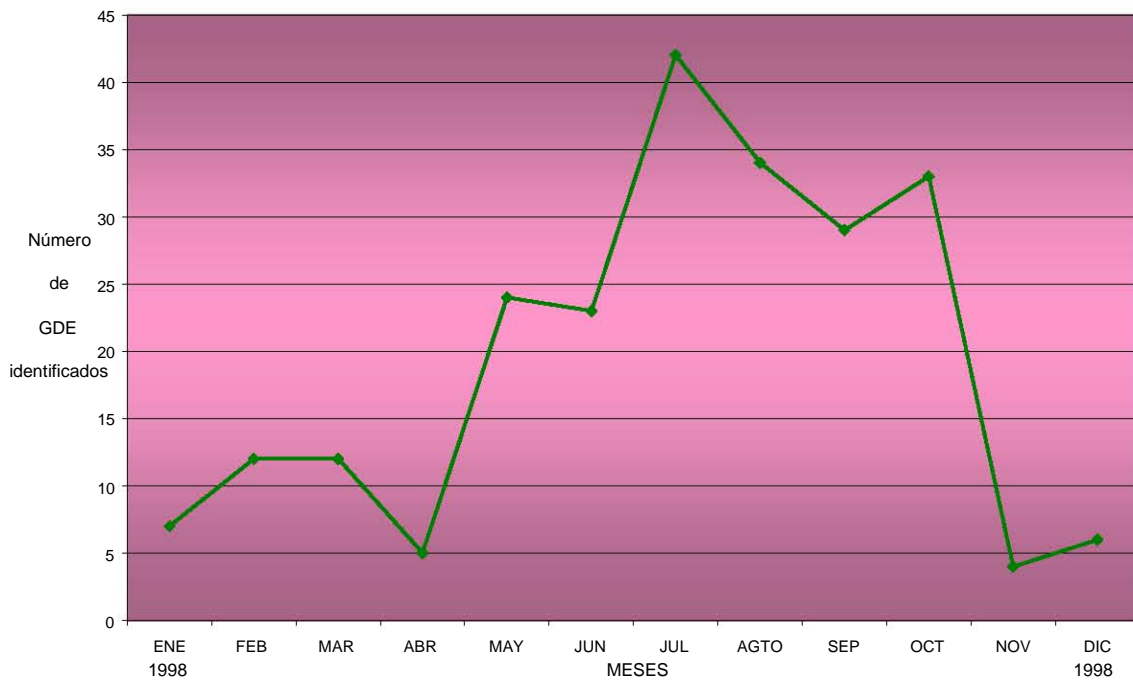
Número de casos y distribución de GDE por mes a lo largo del año

El mes de julio presentó el mayor número de casos de GDE con un total de 42. Se identificaron casi el mismo número de casos durante los meses de agosto (34), octubre (33) y septiembre (29), el menor número de casos se registró durante los meses de Abril y Noviembre con 5 y 4 casos respectivamente (Grafica 3).

Con respecto a las frecuencias de GDE en los meses de mayor distribución se observó que el mes de julio el grupo que tuvo mayor prevalencia fue ETEC con un 52% (22/42), le siguió el grupo de las EPEC atípicas con 28% (12/42), mientras que las EPECt se encontraron en el 12% (5/42). El grupo EIEC se identificó en el 2% (1/42) de los casos, este mismo porcentaje le correspondió a los casos en donde se identificaron a dos GDE diferentes, ya que en este mes de julio, se identificó un caso con ETEC/EPECa, así como un caso con ETEC/STEC; es importante mencionar que no hubo presencia de STEC como único GDE durante este mes. El siguiente mes con mayor número de casos fue agosto en donde el grupo ETEC se identificó en el 59% (20/34), el 26% (9/34) fue para EPECa, el 6% (2/34) les correspondió a los grupos EPECt como a EIEC, mientras que a STEC se logró identificar en el 3% (1/34). En lo que respecta a la frecuencias de los GDE en los meses de octubre y septiembre fue muy similar, ya que en ambos meses el grupo de las EPECa fue el de mayor prevalencia con 51% (17/33) y 34% (10/29) respectivamente.

RESULTADOS

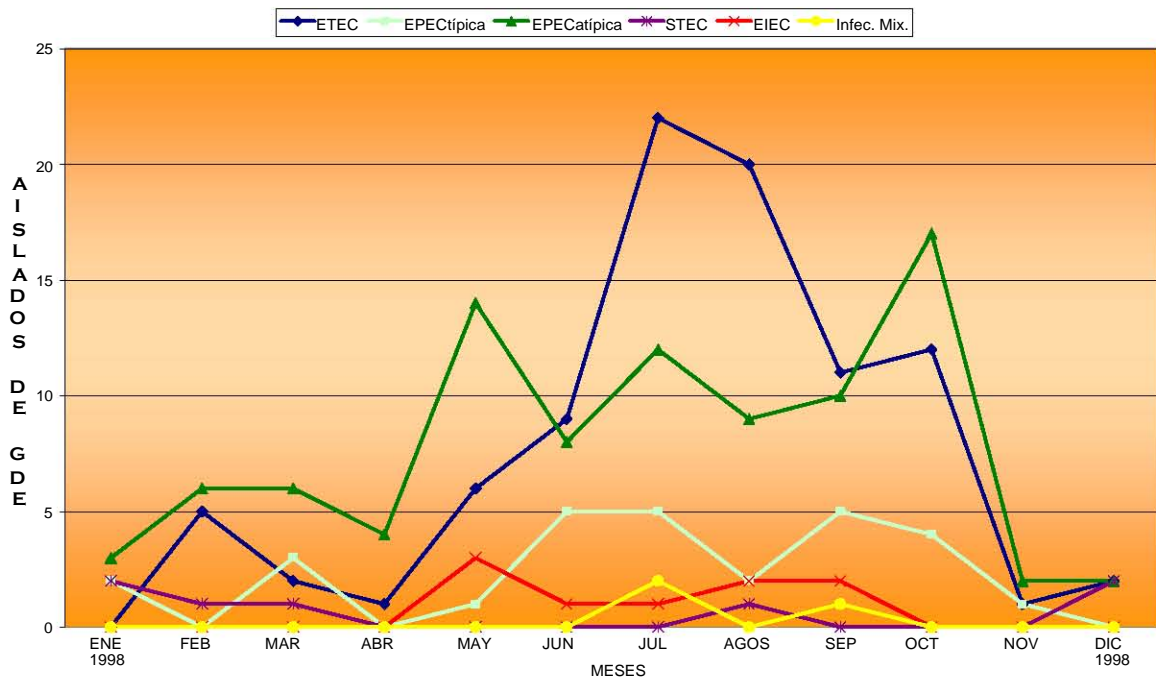
También en ambos meses el grupo ETEC le siguió en distribución con 36% (12/33) y 38% (11/29), las EPECt con 12% (4/33) y 17% (5/29) respectivamente. En octubre no se encontraron casos de EIEC y STEC, sin embargo en septiembre se identificó 7% (2/29) de EIEC, en este mismo mes se encontró un caso 3%, en donde se identificó ETEC/EPEC (tabla 4) (Gráfica 4).



Gráfica 3. Casos de GDE identificados a lo largo del año

GDE MES	EPECa	EPECt	ETEC	STEC	EIEC	ETEC, EPECa	ETEC, STEC	TOTAL
ENERO	3	2	0	2	0	0	0	7
FEBRERO	6	0	5	1	0	0	0	12
MARZO	6	3	2	1	0	0	0	12
ABRIL	4	0	1	0	0	0	0	5
MAYO	14	1	6	0	3	0	0	24
JUNIO	8	5	9	0	1	0	0	23
JULIO	12	5	22	0	1	1	1	42
AGOSTO	9	2	20	1	2	0	0	34
SEPT.	10	5	11	0	2	1	0	29
OCTUBRE	17	4	12	0	0	0	0	33
NOV.	2	1	1	0	0	0	0	4
DIC.	2	0	2	2	0	0	0	6
TOTAL	93	28	91	7	9	2	1	231

Tabla 4. Cuadro general de casos de GDE en niños menores de dos años.



Gráfica 4. Distribución de GDE a lo largo del año.

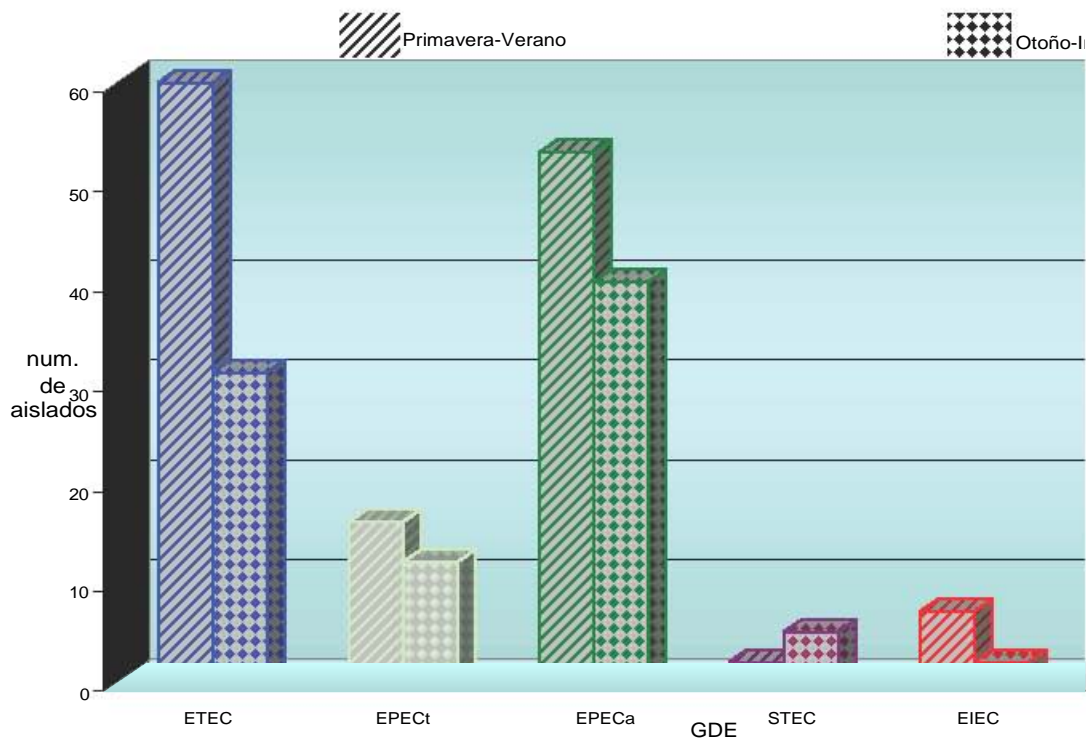
Estacionalidad de los GDE

El mayor número de aislamientos de GDE se presentó principalmente durante la temporada de Primavera-Verano (P-V) que incluye los meses de marzo-agosto con un 60% (140/231), comparados con la temporada de Otoño-Invierno (O-I) que comprende los meses septiembre a febrero, donde se aisló el 40% (91/231) de los casos ($p < 0.0001$) (tabla 5). En lo que respecta a la distribución de cada uno de los GDE a lo largo del año, se observó que los grupos ETEC, EPECt, EPECa, así como EIEC tuvieron el mayor número de casos en el periodo de P-V; mientras tanto el grupo de STEC se presentaron principalmente en la temporada O-I (gráfica5).

	PRIMAVERA- VERANO	OTOÑO-INVIerno
HECES DE NIÑOS CON GDE	140	91
PORCENTAJE	60%	40%

Tabla 5. Casos GDE por temporada

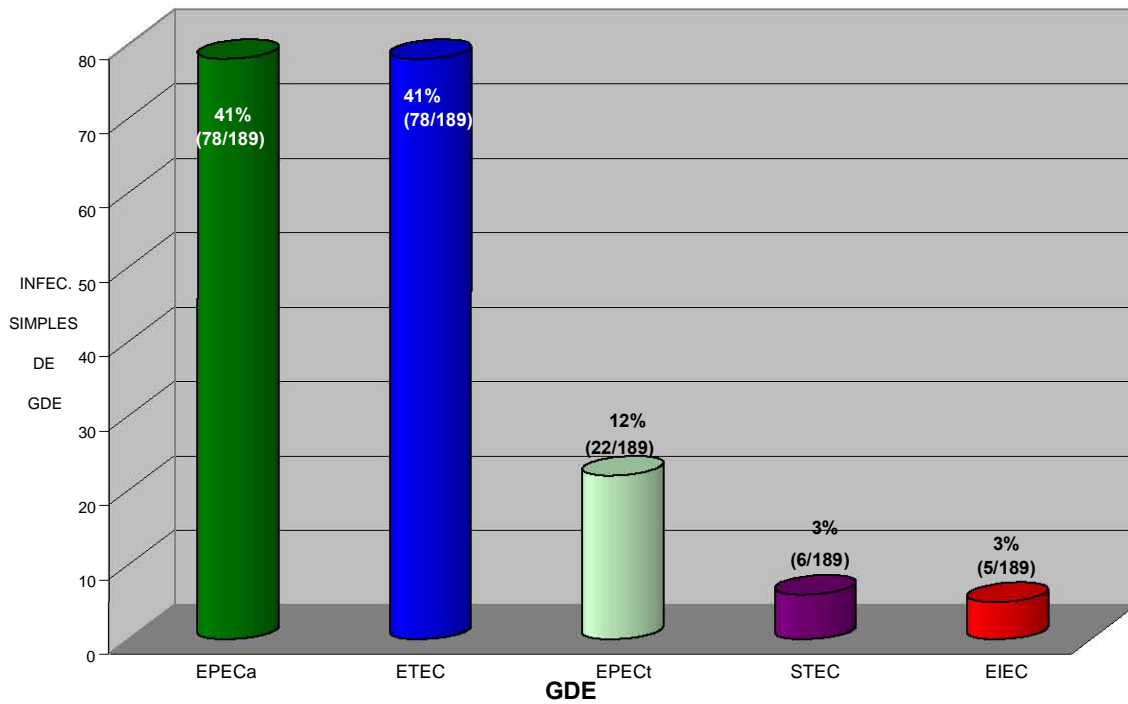
$p < 0.0001$



Grafica 5. Distribución por temporada de los GDE

Identificación de los GDE como únicos agentes etiológicos.

De los 231 casos donde se identificaron los GDE, se observó que en el 81% (189/231) los GDE se encontraron como único agente etiológico (gráfica 6). Siendo el grupo de EPECa y el grupo ETEC los más frecuentemente identificados en el 41.2% (78/189) de los casos, cada uno de ellos. Seguidos por EPECT con el 11.6% (22/189) de los casos, STEC se encontró en el 3% (6/189), y EIEC, en el 2.6% (5/189). Es importante mencionar, que de estos casos en donde los GDE fueron los únicos agentes etiológicos identificados el 25% (47/189) estuvieron asociados con diarrea (tabla 6).



Grafica 6. GDE como único agente etiológico.

	INFECCIONES SIMPLES	CASOS CON DIARREA (%)	CASOS SIN DIARREA (%)
EPECa	78	19 (24%)	59 (76%)
EPECt	22	5 (23%)	17 (77%)
ETEC	78	20 (26%)	58 (74%)
STEC	6	1 (17%)	5 (83%)
EIEC	5	2 (40%)	3 (60%)

Tabla 6. Infecciones simples asociadas con diarrea

Infecciones mixtas

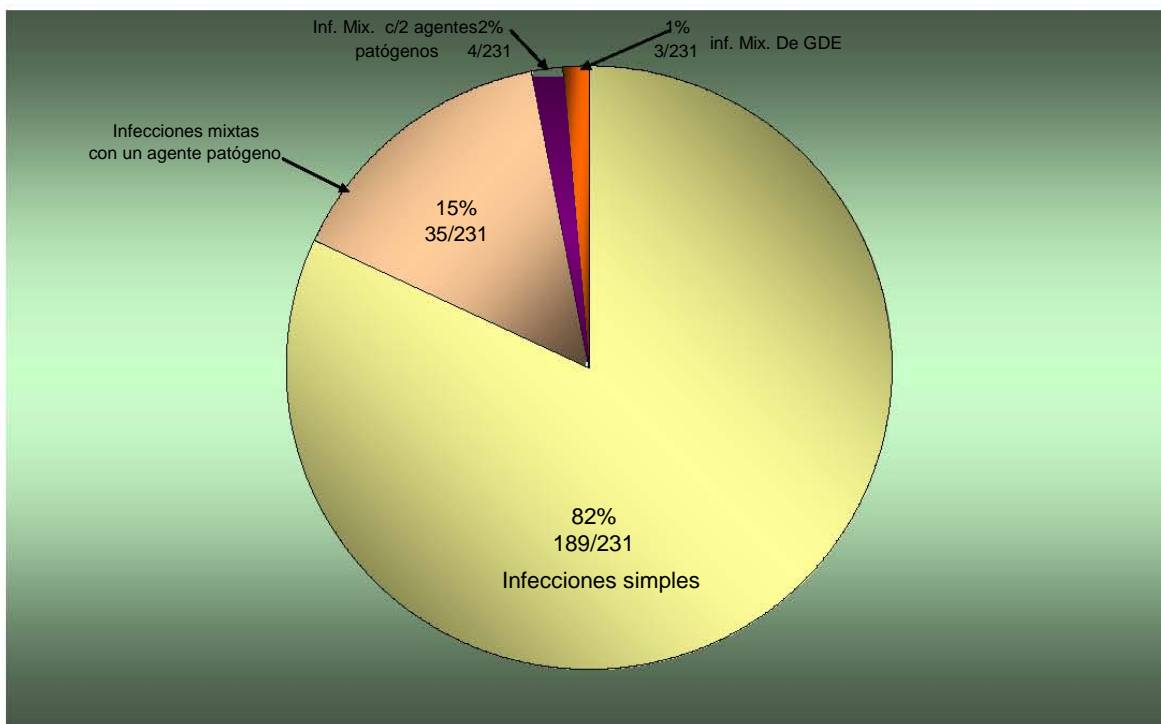
Como se mencionó anteriormente las infecciones mixtas son consideradas cuando en una sola muestra se aíslan más de un grupo patógeno, Observándose que solo en el 18% (42/231) de los casos de GDE presento infecciones mixtas (tabla 7). También se encontró que en 4 casos además de GDE se les identificaron dos patógenos (tabla 8) y en 3 casos 1 (3/231) se aislaron 2 GDE diferentes, en dos de ellos se identificó a los grupos ETEC-EPECa y en un caso se identificó a los grupos ETEC-STECC (Gráfica 7). De estas 39 infecciones mixtas se tiene que el 85% (33/39) se asociaron con diarrea y el 15% (6/39) de estas infecciones no mostraron asociación con diarrea.

GDE	<i>A. lumbricoides</i>	<i>G. lamblia</i>	<i>Enterobacter</i>	<i>Klebsiella</i>	<i>Providencia</i>	<i>Citrobacter</i>	<i>Proteus</i>	<i>Morg Morg</i>
EPECa	1	3	1	2	1	2	1	
EPECt		2	1	1				1
ETEC		3	2	3	1	3	2	
EIEC		1	1		1	1		
STECC			1					

Tabla 7. Infecciones mixtas de GDE más un patógeno

GDE	GRUPOS PATÓGENOS	Num. DE CASOS
EPEC atípica	<i>Enterobacter + E. histolytica</i>	1
EPEC atípica	<i>Enterobacter + Citrobacter</i>	1
EPEC atípica	<i>Enterobacter + Klebsiella</i>	1
EPEC típica	<i>Enterobacter + G. lamblia</i>	1

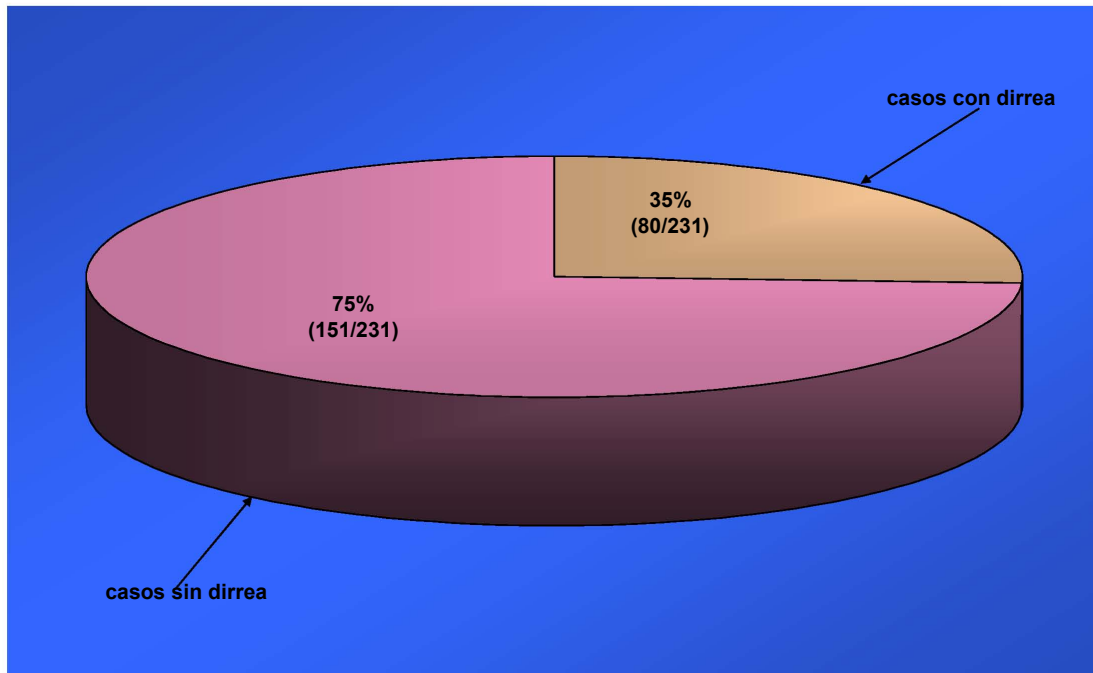
Tabla 8. Infecciones mixtas de GDE con dos patógenos



Gráfica 7. Identificación de infecciones simples y mixtas de GDE.

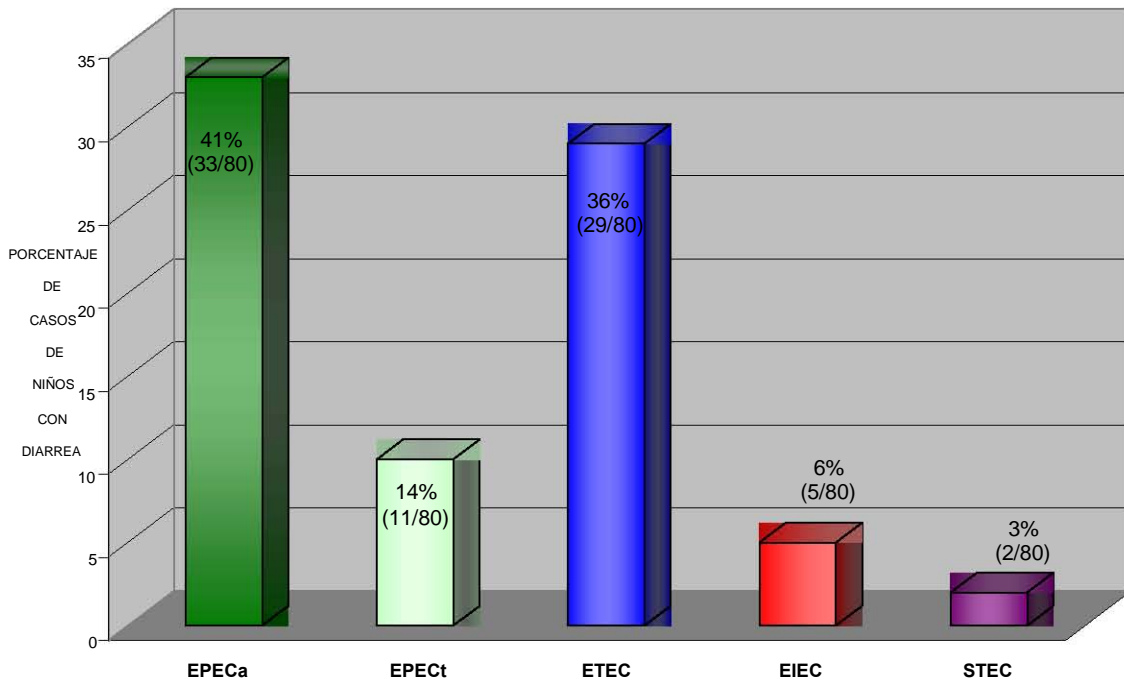
Casos de GDE asociados con diarrea:

Para el presente trabajo se estableció que cuando los niños presentaron algún episodio de diarrea se asociaría con el patógeno identificado, si este se había aislado ya sea 20 días antes o después del episodio diarreico. De tal manera que el 35% (80/231) de los casos con algún GDE se asociaron con diarrea (47 casos fueron infecciones simples y 33 fueron infecciones mixtas) (Gráfica8). Esto representó a un total de 55 niños.



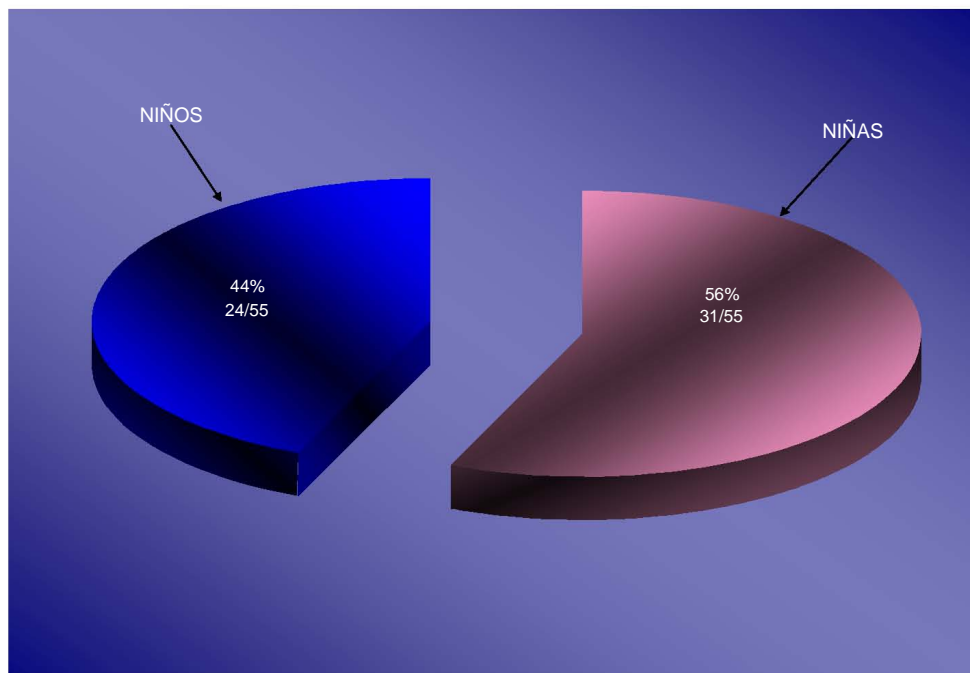
Gráfica 8. Porcentaje de casos de GDE con diarrea y sin diarrea

Como se menciono anteriormente, de los 80 casos provenientes de los niños que presentaron cuadros diarreicos, el aislamiento de GDE se presentó de la siguiente manera,, para las EPEC atípicas le correspondió el 41% (33/80), mientras que las EPEC típicas les correspondió el 14% (11/80). El grupo de las ETEC con un 36% (29/80), después el de las EIEC con un 6% (5/80) y finalmente el grupo de las STEC se identificó en el 3% (2/80) de los casos de niños con diarrea. (Gráfica 9).



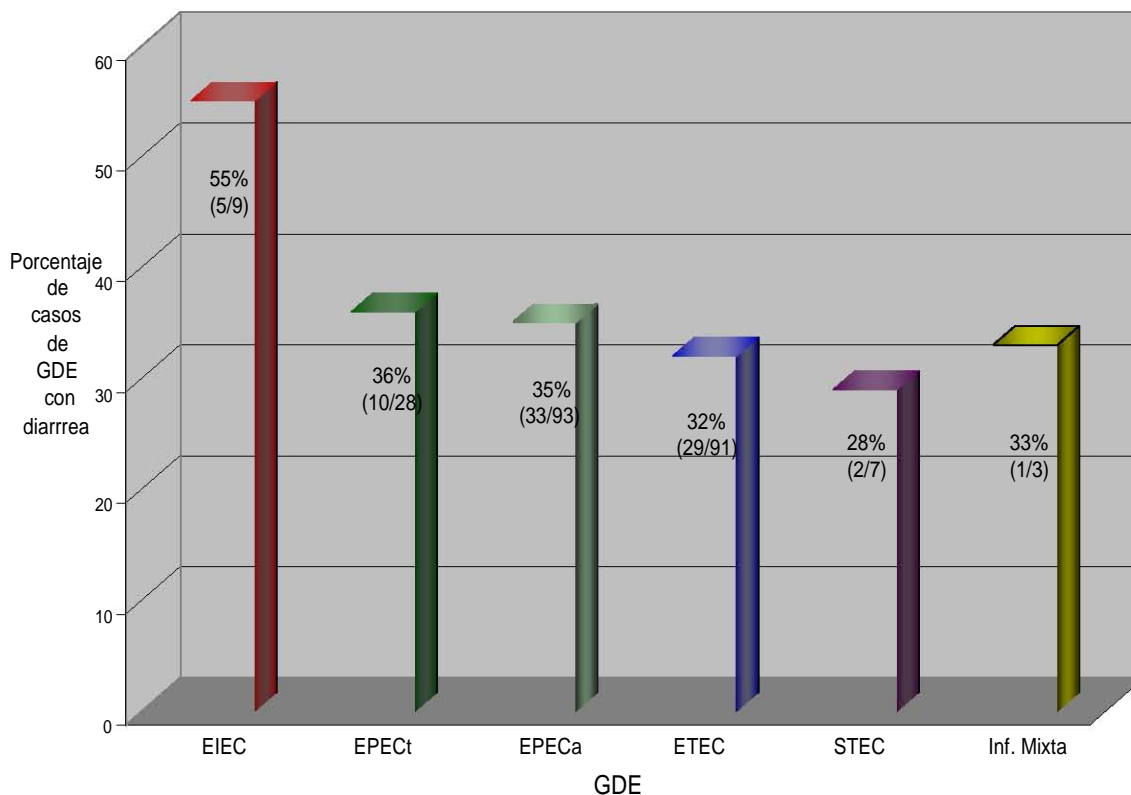
Gráfica 9. GDE identificados en niños con diarrea.

De estos 55 niños el 44% (24/55) fueron del sexo masculino y el 56% (31/55) fueron del sexo femenino (gráfica 10).



Gráfica 10. Sexo de los niños que presentaron diarrea y se le identificó algún GDE en heces

Con lo que respecta al porcentaje de niños con diarrea y algún GDE identificado en heces, EIEC con 55% fue el que mostró la mayor asociación, ya que se observó que de 9 casos en donde se identificó EIEC, 5 presentaron diarrea. Seguido por los grupos EPECt y EPECa ya que en cada uno se identificó en el 36% (10/28), (33/93) respectivamente; porcentaje muy parecido al que mostró el grupo ETEC con un 32% (29/91), por último el grupo de las STEC se encontró en el 29% (2/7) (Gráfica 11).



Gráfica 11. Porcentaje de pacientes con diarrea y GDE comparado con el número de casos de GDE

También se tiene que de estos 55 niños, el 65% (36/55) presentaron un solo episodio de diarrea al año, los niños que presentaron dos episodios de diarrea representaron el 27% (15/55), el 4% (2/55) presentaron 3 episodios, siendo el mismo porcentaje para los niños que presentaron cuatro episodios de diarrea al año (tabla 9).

Episodios de diarrea	Número de niños
1	36
2	15
3	2
4	2

Tabla 9. Niños que presentaron más de un episodio de diarrea al año asociado con GDE

DISCUSION

Las enfermedades diarreicas continúan siendo un problema de salud pública mundial. La Organización Mundial de la Salud 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). La mortalidad que se presenta a causa de estos padecimientos, especialmente en niños menores de cinco años es sorprendente, pero es gracias a las terapias de rehidratación oral que estos casos de mortalidad han disminuido en las últimas décadas. Por ejemplo a nivel mundial de una tasa de 4.9 muertes por cada 1000 niños menores de cinco años, por año, en la década de los 80's ha disminuido a 3.3 muertes por diarrea en la década de los 90's. Sin embargo, a pesar de esta disminución, en la actualidad se estima que existen aproximadamente 2.5 millones de muertes en esta población en los países en vías de desarrollo (Kosek *et al.*, 2003). En décadas recientes se ha observado en los países en vías de desarrollo que la morbilidad de las diarreas parece ir en aumento, esto quizá se deba a que el grupo poblacional de 1 a 5 años se ha incrementado en estos países, así como que la población más afectada es la de bajos recursos económicos, en donde el número de episodios diarreicos es mayor (Kosek *et al.*, 2003).

Las enfermedades diarreicas no solo pueden causar la muerte, debido a la deshidratación, sino que además se ha observado que si un niño presenta cinco o más episodios de diarrea aguda al año tendrá una disminución en talla, así como en el peso y además registrará una disminución en su desarrollo cognoscitivo (Steiner *et al.*, 1998 ; Nataro y Kaper, 1998).

En México la mortalidad por diarrea en cada 100,000 niños menores de cinco años disminuyó de 122.7 en 1990 a 18.5 en el año 2002, lo que implica un descenso del 85% (tercer informe de Gobierno 2003). Sin embargo, la disminución en la tasa mortalidad por diarrea no ha reflejado un decremento en la tasa de morbilidad, ya que se estima que en México se presentan entre 30 y 40 millones de episodios diarreicos en esta población (Vega, 2002). Esto probablemente se deba a que no se han mejorado las condiciones de vida de la población de bajos recursos económicos en México como en el mundo.

Lo anterior establece la importancia de continuar estudiando a las diarreas y sus agentes causales para proponer medidas preventivas y disminuir el número de episodios de diarrea por niño al año. Por lo tanto el propósito de este estudio fue evaluar la prevalencia de los GDE en niños menores de dos años, de una comunidad conurbada de la ciudad de México. Ya que como se dijo anteriormente estos GDE son importantes productores de diarrea aguda grave tanto en México (Cravioto *et al.*, 1987; Sepúlveda-Amor, 1990; Flores-

Abuxapqui *et al.*, 1993; Cerna, 2003; Estrada-García *et al.*, 2005), como en el mundo (Torres *et al.*, 2001; Ericsson, 1998; Cohen *et al.*, 2005).

Por lo tanto en este estudio se analizaron 1556 aislados de *E. coli* provenientes de 181 niños menores de dos años de una comunidad conurbada de la ciudad de México. En donde a través de la utilización de una PCR múltiplex, pudimos identificar GDE en el 15% (231/1556) de los casos, este porcentaje de identificación de los GDE puede ser considerado alto si es comparado con el estudio realizado por Estrada-García *et al.*, 2005; ya que ellos identificaron el 8% (170/2010) de los casos. Sin embargo, es importante mencionar que este último se realizó en niños hospitalizados de la Ciudad de México. A sí mismo Benitez *et al.*, 1991 reportó un 8% en un estudio realizado en una comunidad de Cuernavaca Morelos, México, por otro lado Cravioto *et al.*, 1987, en una comunidad rural del centro de México identificó a los GDE en el 42% (155/372) de los casos. Esta diferencia de porcentajes entre nuestro estudio y los estudios mencionados anteriormente es debido a que quizá en el primero de ellos se hizo en niños hospitalizados por diarrea aguda, y en los otros dos la identificación de los GDE no se llevó a cabo por PCR.

Por otro lado si comparamos nuestros datos con estudios internacionales muestran una alta prevalencia (15%) de GDE identificados, mientras que en

países como Tailandia se reporta prevalencia del 7% (176/2629) de GDE en niños menores de cinco años (Ratchtrachenchai *et al.*, 2004).

Así mismo, en nuestro trabajo el GDE más frecuentemente aislado fue EPEC, el cual representó el 8% (121/1556) del total de los casos analizados, así como en el 41% (33/80) de los GDE de los cuadros clínicos con diarrea, coincidiendo con lo ya reportado para EPEC; que es la principal causa de diarrea bacteriana infantil en niños menores de 6 meses en países en vías de desarrollo (Nataro y Kaper, 1998) además de que producen más de un millón de muertes de niños en dichos países (Finlay *et al.*, 1996). Así mismo Sepúlveda-Amor (1990), identificó a EPEC en el 28% (40/144) y Morayta *et al.*, (1993) identificaron a EPEC en el 17% (20/121) de los casos. Ambos estudios se realizaron en niños de comunidades abiertas que llegaron al servicio de urgencias médicas de 2 hospitales de la Cd. de México durante el año de 1985 y durante el periodo de diciembre de 1988 a julio de 1990 respectivamente. En otro estudio realizado por Cravioto *et al.*, (1987) identificaron a EPEC en el 8% de los episodios diarreicos (30/372) que presentaron 56 niños desde su nacimiento hasta los dos años de vida, en una comunidad rural de Cuernavaca.

Es importante mencionar que en nuestro estudio se aisló el 6% (93/1556) de EPEC atípicas es decir, que sólo se identificó el gen *eaeA*, esto principalmente, en la temporada P-V, de estos casos el 84% (78/93) fue

identificado como único agente etiológico, de los cuales el 76% (59/78) no presentaron diarrea y en el 24% restante (19/78) de los casos se presentó cuadro diarreico. En lo que respecta a la asociación con otro patógeno, es decir, infecciones mixtas, se encontró que el 16% (15/93) fueron de este tipo. Los patógenos a los cuales estuvo asociado fueron los siguientes: en 3 casos con *G. lamblia*, en 2 con *Klebsiella* y *Citrobacter* respectivamente, *Enterobacter*, *A. lumbricoides*, *Providencia* y *Proteus* en un caso cada uno de ellos, así también se encontró que tres casos se asoció con dos patógenos: en uno de ellos con *Enterobacter* + *E. histolytica*, en otro *Enterobacter* + *Klebsiella* y en uno más *Enterobacter* + *Citrobacter*, en todas las infecciones mixtas se presento cuadro diarreico, excepto en un caso en donde estuvo asociado con *G. lamblia*. Por último se encontró una infección mixta con dos GDE.

Mientras que las EPEC típicas, donde se identificó tanto el gen *eaeA*, como el gen *bfpA*, represento el 1.7% (28/1556) de los casos, también aislándose principalmente en la temporada P-V. Así mismo de los 28 casos de EPEC típicas, el 78% (22/28) fueron identificados como infecciones simples, es decir, se aislaron como únicos agentes etiológicos, en donde el 77% (17/22) de los casos no presentaron diarrea y en el 23% (5/22) presentaron cuadro diarreico; en los casos en los cuales se aisló EPEC típica, más otro patógeno, le correspondió el 22% (6/28), estas infecciones mixtas se presentaron de la siguiente manera: en dos casos se asocio con *G. lamblia*, en 1 con *Enterobacter*, 1 con *Klebsiella*, 1

con *Morg. Morg.* y en un caso se asocio con dos patógenos (*Enterobacter* y *G. lamblia*). En todos los casos en donde hubo infección mixta con EPECt se presentó cuadro diarreico.

Con respecto a EPEC atípicas, aun esta en controversia si son agentes etiológicos causantes de diarrea (Trabulsi *et al.*, 2002). Mientras que las EPEC típicas esta claro que si son agentes etiológicos, esto observamos ya que una mayor proporción de casos de EPEC típica con diarrea se asociaron siendo este GDE el único agente etiológico identificado en estos casos.

Entre los 4 grupos de GDE buscados, ETEC fue el segundo de mayor importancia, este se identificó en el 5 % (91/1556) del total de casos, así como en el 36% (29/80) de los cuadros clínicos con diarrea, el porcentaje de aislamiento de este grupo es muy similar al encontrado por Regina *et al.*, (2005), en un estudio realizado en Brasil en niños menores de cinco años, en donde al grupo ETEC lo identifica en el 7% de un total de 119 casos. En lo que respecta al porcentaje encontrado para ETEC en los casos asociados con diarrea es muy similar al encontrado por Cravioto *et al* 1987 en un estudio realizado en una comunidad de Cuernavaca, Morelos, en donde encontró a ETEC en un 34% (125/372) de los casos de diarrea. Por otro lado nuestro porcentaje es alto si es comparado con lo reportado por Benítez *et al.*, (1991), en un estudio en donde se realizó la búsqueda de agentes etiológicos que causaron diarrea con sangre en 75

niños, en de donde se aisló a ETEC en el 7% de 636 episodios de diarrea, esta diferencia de porcentajes probablemente sea debido a que en el estudio de Benítez sólo se hizo la identificación de los GDE en los casos que presentaron diarrea con sangre. En lo referente a estudios fuera del país Valentinier-Branth *et al.*, 2003 llevaron a cabo un estudio en 200 niños de una comunidad de Guinea, donde aislaron a ETEC en un 6% de las heces colectadas. Estos datos como se observan son muy variables con respecto a nuestros resultados debido quizá a que la identificación de los GDE en estos estudios se hicieron por hibridización de DNA y el nuestro al ser identificado el grupo ETEC por PCR podría ser mas confiable, debido a que esta técnica es mucho más sensible, a demás de que es rápida y más económica (Thompson, 2001).

También se puede decir que una de las razones de la prevalencia de cepas ETEC es por que en los alimentos vendidos en la calle están contaminados por estas cepas, como lo reporta Estrada-García *et al.*, 2002 que en el 5% (2/43) de salsas expandidas en un área de la zona norte de la Cd. de México estaban contaminadas por este grupo patógeno.

El GDE que le siguió fue el de EIEC, el cual se identificó en el 0.57% (9/1556) del total de casos y en el 6% (5/80) de casos con diarrea, este bajo porcentaje coincide con lo ya reportado de que a este grupo se le considera como causa poco frecuente de diarrea tanto en México como en el mundo, como lo

muestra el estudio realizado en México por Benítez *et al.* 1991, donde aislaron EIEC en el 4% (3/75) de los casos, en una comunidad rural del estado de Morelos. En lo que respecta a otros países, como es el estudio realizado por Puccinelli *et al.*, 2001, en Brasil en donde reportaron que solo en el 0.8% (1/130) de los casos se identificó EIEC, así mismo en un estudio realizado en Tailandia (Ratchtrachenchai, *et al.*, 2004) encontraron un 0.5% (12/2629) de los casos, lo cual coincide con nuestra Prevalencia para este GDE.

La baja Prevalencia de EIEC puede estar subestimada (Wanke, 2001), esto debido a que se ha reportado que el 60% de las cepas de EIEC son lactosa negativas, por lo que no se seleccionan estas cepas cuando se utiliza el medio semiselectivo MacConkey (Nataro *et al.*, 1998). Por lo que es recomendable en posteriores investigaciones se utilicen medios selectivos para *E. coli* no basados en su capacidad de utilizar lactosa como fuente de carbono, lo cual puede permitir demostrar si en realidad el bajo aislamiento de EIEC reportado hasta el momento es real o se debe a que no lo estamos aislando por ser lactosa negativa.

Poco se sabe acerca de la prevalencia y epidemiología de STEC, tanto en México como en el mundo (Tarr *et al.*, 1996; Nataro y Kaper 1998) ya que este grupo patógeno es emergente. En nuestro estudio se identificó al grupo STEC en el 0.44% (7/1556) de los casos y en el 1% (1/80) de los cuadros clínicos con diarrea. Estos datos coinciden con lo reportado por Albert *et al.*, 1995 y Cravioto

et al., 1990, quienes mencionan que en países en vías de desarrollo la prevalencia de las cepas STEC es baja. Sin embargo, Benítez *et al.*, 1991, reportaron el aislamiento de cepas STEC en el 11% de los episodios diarreicos en niños que presentaron diarrea con sangre en una comunidad rural del estado de Morelos, México. En un estudio de Tailandia (Ratchtrachenchai, *et al.*, 2004) se observa una coincidencia con nuestro resultado ya que aislaron a STEC en el 0.04% (1/2629) de los casos de diarrea.

La alta frecuencia de GDE aislados de niños que no presentaron diarrea en este estudio puede ser debido al alto riesgo de colonización intestinal por los GDE patógenos en estos individuos. La ausencia de un cuadro diarreico pudiera deberse a procesos inmunizantes previos por colonización de GDE a edades más tempranas o a través de inmunidad aportada por factores de protección específica presentes como por ejemplo en la leche materna que estos niños han recibido.

En lo que respecta al aislamiento GDE en las temporadas P-V y O-I, se aislaron en todo el año, presentándose principalmente en la temporada P-V (60%), comparados con la temporada O-I (40%) ($p < 0.001$). Esto confirma lo dicho de que los GDE, parecen tener una estacionalidad definida aislándose principalmente en los meses calurosos del año y es en este periodo que se presentan principalmente las diarreas de tipo bacteriano (Velásquez, 2001).

En lo referente a las infecciones simples que se presentaron en este estudio, se encontró que en 82% (189/231) de los casos fueron de este tipo, y en lo que se refiere a estos casos, como en los cuales se presentó diarrea que fue del 25% (47/189), los grupos identificados con mayor frecuencia fueron ETEC y EPEC. Esto confirma lo ya descrito en otros estudios como en los de Levine *et al.*, 1984 y Cravioto *et al.*, 1990, en donde observaron que en países en vías de desarrollo como México ETEC y EPEC, se encuentran entre los primeros agentes etiológicos de tipo bacteriano causantes de diarrea en niños menores de dos años.

Con respecto a las infecciones mixtas se ha observado que en los países en vías de desarrollo, es frecuente encontrar infecciones mixtas en los pacientes con diarrea, pudiéndose aislar dos o más agentes patógenos a la vez en el mismo individuo. Sin embargo aun no se sabe hasta que punto se pueda presentar una interacción entre los distintos agentes o si estas infecciones mixtas originan cuadros clínicos más graves (Olarte, 1985). Así en nuestro estudio se identificaron infecciones mixtas en el 18% (42/231), de estos casos existió mayor asociación con *G. lamblia* 21% (9/42), de los cuales sólo 4 presentaron diarrea y 5 no presentaron cuadro diarreico, este dato coincide con un estudio realizado en la ciudad de Bangladesh (Albert *et al.*, 1999) en niños menores de cinco años en donde mencionan que *G. lamblia* se identificó en una alta proporción en niños que no presentaron diarrea.

La presencia de infecciones mixtas se ha corroborado en otros estudios multidisciplinarios, como el realizado por la Organización Mundial de la Salud en cinco países (India, Pakistán, Myanmar, China y México), en donde se realizó la identificación de patógenos causantes de diarrea en una población de niños de entre 0-35 meses de edad, en donde las infecciones mixtas se encontraron en el 13% (Pérez *et al.*, 1997)

CONCLUSIONES.

- Se identificaron GDE en el 15% (231/1556) de los casos.
- EPECa 6% (93/1556) fue el GDE que se aisló principalmente, seguido muy de cerca de ETEC 5.8% (91/1556).
- Los GDE se presentan principalmente durante la temporada P-V.
- Las cepas GDE se encuentran presentes principalmente en infecciones simples.

REFERENCIAS

Adu-Bobie, J., G. Frankel, C. Bain, A. G. Goncalves, L. R. Trabulsi y Douce. 1998. Detection of intimins alpha, beta, gamma, and delta, four intimin derivatives expressed by attaching and effacing microbial pathogens. *J. Clin. Microbiol.* 36:662-668.

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.

Albert, M. J., S. M. Faruque, A. S. Faruque, P.K. Neogi, M. Ansaruzzaman, N. A. Bhuiyan, K. Alam y M. S. Akbar. 1995. Controlled study of *Escherichia coli* diarrheal infections in Bangladesh children. *J. Clin. Microbiol.* 33:973-977.

Baldini, M. M., J. B. Kaper, M. M. Levine, D. C. Candy y H. W. Moon. 1983. Plasmid-mediated adhesion in enteropathogenic *Escherichia coli*. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 2:534-538.

Barrera, H. A., R. Ortiz, A. Rojas y D. Reséndez, 1993. Reacción en cadena de la polimerasa. Una 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.

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.

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.

Cerna, C. J. F. 2003. Prevalencia y caracterización molecular de los principales grupos de *Escherichia coli* diarregénicos, en niños menores de cinco años hospitalizados por diarrea aguda, en la Cd. de México. Tesis Doctorado. CINVESTAV.

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 inicial and subsequent colonization by specific enteropathogens. *Am. J. Epidemiol.* 131:886-904.

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

REFERENCIAS

children: Incidente and isolated pathogens during the first two years of life. *Epidem. Rev.* 101:123-134.

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

Dirección General de Epidemiología. **2002.** Boletín semanal de epidemiología. 52: 12.

Donnenber, M. S., y J. B. Koper. **1992.** Enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 60:3953-3961.

DuPont, H. L., S. B. Formal, R. B. Hornick, M. J. Snyder, J. P. Libonati, D.G. Sheahan, E. H. LaBrec y J. P. Kalas. **1971.** Pathogenesis of *Escherichia coli* diarrhea. *N. Engl. J. M*

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.

Estrada-García, T., J. F. Cerna, M. R. Thompson y C. López Saucedo. **2002.** Feacal contamination and enterotoxigenic *Escherichia coli* in street-vended chili sauces in Mexico and its public health relevance. *Epidemiol. Infection.* 129:223-226.

Estrada-García, T., J. F. Cerna, L. Pacheco-Gil, R. F. Velázquez, T. J Ochoa, J. Torres y H. L. Du Pont. **2005** Drug-resistant Diarrheogenic *Escherichia coli*, México. *Emerg. Infect. Dis.:* 11 (8): 1306-1308.

Erisson, C. D. **1998.** Traveler's diarrhea: epidemiology, prevention and selftreatment. *Infect. Dis. Clin. North. Am.* 12:285-303.

Finlay, B. B. , S. Ruschkowski, B. Kenny, M. Stein, D. J. Reinscheid, M. A. Stein y I. Rosenshine. **1996.** Enterophatogenic *E. coli* exploitation of host epithelial cells. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 25:26-31.

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

REFERENCIAS

- Formal, S.,** y R. B. Hornick. **1978.** Invasive *Escherichia coli*. J. Infec. Dis. 137:641-647.
- Frankel, G.,** L. Riley, J. A. Giron, J. Valmossoi, A. Friedman, N. Strockbine, S. Falkow, y G. A. Schoolnick. **1990.** Detection of *Shigella* in feces using DNA amplification. J. Infect. Dis. 161:1252-1256.
- 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.
- Giono, C. S.,** A. Rodríguez, C. Rodríguez, y G. Valdespino. **1994.** Identificación de las enterotoxinas y citotoxinas de *Escherichia coli* por cultivo de células vero e hibridación en fase sólida (hibridización en fase sólida). Rev. Lat. Microbiol. 36:231-241.
- Giono, C. S.,** G. A. Escobar, y G. J. L. Valdespino. **1994.** Diagnóstico de laboratorio de infecciones gastrointestinales. Secretaría de Salud. Pag. 251-266.
- Girón, J. A.,** T. Jones, F. Millan-Velasco, E. Castro-Muñoz, L. Zarate, J. Fry, G. Frankel, S. L. Moseley, B. Baudry, J. B. Koper, G. K. Schoolnik y L. W. Riley. **1991.** Diffuse-adhering *Escherichia coli* (DAEC) as a putative, cause of diarrhea in mayan children in Mexico. J. Infect. Dis. 163:507-513.
- Goldberg, M. B.,** y P. J. Sansonetti. **1993.** *Shigella* subversion of the cellular cytoskeleton: a strategy for epithelial colonization. Infect. Immun. 61:494-4946.
- Gordillo, M. E.,** G. R. Reeve, J. Pâppas, J. J. Mathewson, H. L. DuPon, y B. E. Murria. **1992.** Molecular charecterization of strains of enteroinvasive *Escherichia coli* 0143, including isolates from a large outbreak in Houston, Texas. J. Clin. Microbiol. 30:889-893.
- Harris, J. R.,** J. Mariano, J. G. Wells, B. S. Payne, H. D. Donnel, y M. L. Cohen. **1985.** Person-to-person transmission in an outbreak of enteroinvasive *Escherichia coli*. Am. J. Epidemiol. 122:245-252.
- 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.
- Jerse, A. E.,** W. C. Martn, J. E. Galen, y J. B. Koper. **1990.** Oligonucleotide probe for detection of the enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) adherence factor of localized adherent EPEC. J. Clin. Microbiol. 28:2842-2844.

REFERENCIAS

Karch, H. y T. Meyer. **1989.** Single primer pair for amplifying segments of distinct shiga-like toxin genes by polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* 27:2751-2757.

Karmali, M. A. B., T. Steele. M. Patrc y C. Lim. **1983.** Sporadis case of haemolytic uremia syndrme associated with fecal cytotoxin and cytotoxin-producing *Escherichia coli* in stools. *Lancet* **i**:619-620.

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 ntermediate indistinguishable from the extracellular toxin. *J. Bacteriol.* 172:2427-2432.

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

Levine, M. M., P. Ristaino, G. Marley, C. Smith, S. Knutton, E. Boedeker, R. Black, C. Young, M. L. Clements, C. Cheney y R. Patnaik. **1984.** Coli surface antigens 1 and 3 of colonization factor antigen II-positive enterotoxigenic *Escherichia coli*: morphology, purification and immune responses in humans. *Infect. Immun.* 44:409-420.

López-Saucedo, C., J. F. Cerna, N. Villegas, R. Thompson, F. R. Velásquez, J. Torres, P. Tarr, y T. Estrada-García. **2003.** Single multiplex polymerase Caín to detect diverse loci associated with diarrheagenic *Escherichia coli*. *Emerg. Infect. Dis.* 9(1):127-131.

Morayta, R. A., J. Juárez, R. Macorre, 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, y W. E. Hill. **1987.** Utility of oligodeoxyribonucleotide probes for detecting enterotoxigenic *Escherichia coli*. *J. Infect. Dis.* 155:809-811.

Nataro, J.P., Yikang, S. Cookson, A. Cravioto, S. J. Savarino, L. D. Guers, M. M. Levine, y C. O. Ticket. **1995.** Heterogeneity of enteroaggregative *Escherichia coli* requires two unliked plasmid regions. *Infect. Immun.* 61:1126-1131.

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

REFERENCIAS

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

O'Brien, A. D., J. W. Newland, S. F. Miller, R. K. Holmes H. W. Smith y S. B. Formal. **1984.** Shiga-like Toxin-converting phages from *Escherichia coli* strains that cause hemorrhagic colitis or infantile diarrhea. Science 226:694-696.

Olarte, J. **1985.** Etiopatogenia de las diarreas infecciosas. Bol. Med. Hosp. Inf. Mex. 42(1):66-72.

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

Puccinelli, O. P., T. Silva, G. F. Magalhães, F. Alves, R. P. de Almeida Cunha, R. Durlacher, L. H. Pereira da Silva. **2001.** Enteropathogens Associated with Diarrheal Disease in Infants of Poor Urban Areas of Porto Velho, Rondônia: a Preliminary Study. Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro 96(5):621-625.

Ratchtrachenchai, O., S. Subpasu, H. Hayashi y W. Ba-Thein. **2004.** Prevalence of childhood diarrhoea-associated *Escherichia coli* in Tailand. Journal of Medical Microbiology. 53:237-243.

Regina F. M., R. C. B. Alves, R. Keller, T. A. Tardelli Gomes, L. Beutin, M. Lima Barreto, C. Milroy, A. Strina, H. Ribeiro y L. R. Trabulsi **2005.** Prevalence of diarrheagenic *Escherichia coli* in children with diarrhea in Salvador, Bahia Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro 100(4):359-363.

Riley, L. W., R. S. Remis, S. D. Helgerson, H. B. McGee, J. G. Wells, B. R. Davis, R. J. Hebert, E. S. Olcott, L.M. Johoson, N. Y. Hargrett, P. A. Blake y M. L. Cohen. **1983.** Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. N. Engl. J. Med. 308:681-685.

Sansonetti, P. J., **1992.** Molecular and cellular biology of *Shigella flexneri* invasiveness: from cell assay systems to shigellosis. Curr. Top Microbiol. Immunol. 180:1-19.

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

Savarino, S. J., E. R. Hall, S. Bassily, F. M. Brown, F. Youssef, T. F. Wierzbza, L. Peruski, N. A. El-Masry, M. Safwat, M. Rao, H. E. Mohamady, R. Abu-Elyazeed, A. Naficy, A.M. Svennerholm, M. Jertborn, Y. J. Lee, y J. D. Clemens. **1999.** Oral, inactivated, whole cell enterotoxigenic *Escherichia coli* plus

REFERENCIAS

cholera toxin B subunit vaccine: results of the initial evaluation in children. J. Infect. Dis. 179:107-114.

Scaletsky, I. C. A., M. L. M. Silva y L. R. Trabulsi. 1984. Distinctive patterns of adherence of enteropathogenic *Escherichia coli* to HeLa cells. Infect. Immun. 63:1055-1061.

Scotland, S. M., H. R. Smith, G. A. Willshaw, y B. Rowe. 1983. Vero cytotoxin production en strain of *Escherichia coli* is determined by genes carried on bacteriophage. Lancet ii:216.

Schmidt, H., L. Beutin, y H. Karch. 1995. Molecular analysis of the plasmid-encoded hemolysis of *Escherichia coli* 0157:H7 strain EDL 933. Infect. Immun. 63:1055-1061.

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

Sepúlveda-Amor, 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.

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

Stein, P., A. Boodhoo, G. Tyrrel, J. Bruton, y R. Read. 1992. Crystal structure of the cell-binding B oligomer of verotoxin-1 from *Escherichia coli*. Nature 355:748-750.

Steiner,, T. S., A. M. 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.

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.

Tarr, P.I., y M.A. Neill. 1996. Perspectiva: The problem of non-0157:H7 shiga like toxin (verocitotoxin) producing *Escherichia coli*. J. Infect. Dis. 174:1136-1139.

Taylor J., M. P. Wilkins y J. M. Payne. 1961. Relation of rabbit gut reaction to enteropathogenic *Escherichia coli*. Br. J. Exp. Pathol. 42:43-52.

Tercer Informe de Gobierno. 2003. <http://www.presidencia.gob.mx>.

REFERENCIAS

Thompson, B. M. R. 2001. Utilización de *Escherichia coli* y *Escherichia coli* enterotoxigénica (ETEC), como indicadores de contaminación fecal y de un patógeno humano respectivamente en alimentos de venta callejera. Tesis de Licenciatura. U.N.A.M.

Tornieporth, N. G., J. Jhon, K. Salgado, 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 Microbion.* 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. Tardilla. 2002. Typical and atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. *Emerg Infect. Med.* 79:13-17.

Tulloch, E. F., K. J. Ryan, S. B. Formal, y F. A. Franklin. 1973. Invasive enteropathic *Escherichia coli* dysentery. *Ann. Intern. Med.* 79:13-17.

Valtiner-Branth, P., H. Steinsland, T. K. Fischer, M. Perch, F. Scheutz, F. Dias, P. Aaby, K. Molbak y H. Sommerfelt. 2003. Cohort study of Guinean children: Incidence, pathogenicity, conferred protection, and attributable risk for enteropathogens during the first 2 years of life. *J. Clin. Microbiol.* 41(9):4238-4245.

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

Velásquez, 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 asociado. Las múltiples facetas de la investigación en salud. Pag. 133-152.

Wanke, C.A. 2001. To Know *Escherichia coli* is to know bacterial diarrheal disease. *CDI.* 32:1710-1712.

Wasterson, Y. 1991. Application of molecular biological methods in diagnosis of pathogenic *Escherichia coli*. Dept. Microbiol. Inmun. Oslo. Pag. 3.