



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

CUAUTITLAN

Investigación hemero-bibliográfica de aspectos más recientes de la producción de diarrea por los diferentes patotipos de *Escherichia coli* en México, haciendo énfasis en ETEC y EHEC.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA:

NOEMÍ DEL CARMEN PEÑA

ASESOR:

MVZ. GERARDO CRUZ JIMÉNEZ



CUAUTITLAN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO

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.

DEDICATORIA

A mis Adorados Padres

Con mucho cariño, Esperanza Peña Rojas y Rodolfo Del Carmen Mimbrera; que han sido todo para mí, gracias por su amor y sacrificios, por haberme formado como mujer profesionista y ser humano.

Quiero que sientan que el objetivo logrado también es suyo, y que la fuerza que me ayudó a conseguirlo fue su incondicional apoyo y confianza.

Tengan presente que no tengo como pagarles y que les estaré eternamente agradecidos LOS AMO.

A mis hermanos y hermana

Dulce Areli: Espero que éste trabajo sea como una motivación y ejemplo, para que tengas el gusto y hábito de estudiar. Gracias por quererme chaparrita y de disfrutar de tu presencia, te quiero mucho.

Oscar y Rodolfo: Gracias por compartir éste momento, apoyarme en el trayecto de mi formación académica, los quiero mucho.

Le doy gracias a DIOS por tener a mis padres y hermanos junto a mi, LOS AMO.

A mis sobrinas: Paulina, Aranzazu y Ximena que comparten su pureza, ternura, sensibilidad y alegría; a mis cuñadas: Alma y Angela que hoy por hoy hicieron crecer a mi familia.

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mis más sinceras muestras de agradecimiento:

A ti Dios

Por enseñarme el camino correcto de la vida, guiándome y fortaleciéndome cada día, dándome fé, estando siempre en mi corazón, brindandome la oportunidad de vivir y de regalarme una familia maravillosa.

A mi asesor de Tesis

MVZ. Gerardo Cruz Jiménez por su apoyo, confianza, su colaboración en este trabajo y por infundir en todo aquel que le conoce respeto, cariño y amistad.

A mis sinodales

Gerardo Cruz, Andrea Becerril, Amparo Londoño, Guadalupe Avilés y Leticia Badillo. Por su tiempo, asesoría y apoyo en la revisión de éste trabajo.

A la FES Cuautitlan

Gracias a los academicos, instituciones y a la máxima casa de estudios por haberme formado como Universitaria.

A mi Amiga Ale

Gracias por construir una amistad sólida, sabes que eres como mi hermana. Todo lo que hemos vivido juntas dejó huella.

A Iván

Gracias por tu apoyo, asesoría, paciencia, motivación y cariño. Hoy esta Tesis es una realidad.

Y a todas aquellas personas que no he mencionado y que de una manera u otra me brindaron su apoyo e hicieron posible la confección y elaboración de éste trabajo.

Muchas gracias...

Contenido

Cuadros	iv
Figuras	v
Tablas	vii
Gráficas	viii
Abreviaturas	ix
Introducción	1
I. Marco Teórico	3
Capítulo 1. Diarrea	5
1.1 Peligros principales de diarrea	5
1.2 Clasificación clínica de diarrea	6
1.3 Etiología	6
Capítulo 2. <i>Escherichia coli</i> (E. coli)	8
2.1 Características Generales de <i>E. coli</i>	8
2.1.1 Estructura Antigénica, <i>E. coli</i>	12
2.1.2 Mecanismos de patogenicidad, <i>E. coli</i>	15
2.1.3 Evolución de la patogenicidad en <i>E. coli</i>	15
2.1.4 Diversidad de elementos móviles de <i>E. coli</i>	17
2.2 Clasificación de cepas de <i>E. coli</i> que causan diarrea	18
2.3 Diagnóstico de los grupos de <i>E. coli</i> diarreogénicos (GED)	20
2.3.1 Serotipificación	22
2.3.2 Asa ligada de conejo	22
2.3.3 Efecto de las toxinas sobre líneas celulares	22
2.3.4 Inmunoensayos	23
2.3.5 Métodos de biología molecular	23
2.3.5.1 <i>Colony blot</i>	23
2.3.5.2 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	24
Capítulo 3. <i>E. coli</i> enterotoxigénica (ETEC)	25
3.1 Factores de virulencia de ETEC	25
3.1.1 Adhesinas	25
3.1.2 Enterotoxina termolábil (LT)	28
3.1.2.1 Mecanismo de acción de LT	29
3.1.3 Enterotoxina termoestable (ST)	30
3.1.3.1 Mecanismo de acción de ST	30
3.2 Modo de transmisión, ETEC	31
3.3 Cuadro Clínico, ETEC	32
3.4 Frecuencia, ETEC	32
3.5 Diagnóstico de laboratorio, ETEC	32
3.6 Tratamiento, ETEC	32

Capítulo 4. <i>E. coli</i> enterohemorrágica, productora de toxina Vero ó toxina semejante a Shiga (EHEC, VTEC ó TSEC)	34
4.1 Factores de virulencia, (EHEC, TSEC ó VTEC)	35
4.1.1 Características generales y biología molecular de SLT-I (VT-1) y SLT-II (VT-2)	37
4.1.1.1 Similitud entre VT-1 y VT-2	38
4.1.1.2 Diferencias entre la actividad biológica de VT-1 y VT-2	38
4.1.1.3 Mecanismo de acción de VT	39
4.2 Clasificación de EHEC en función de sus factores de patogenicidad	40
4.3 Clasificación de EHEC en función del serotipo	42
4.4 Signos y síntomas, EHEC	42
4.5 Modo de transmisión, EHEC	43
4.6 Reservorio, EHEC	43
4.7 Cuadro clínico, EHEC	43
4.7.1 Cuadro clínico de CH y SUH	43
4.8 Frecuencia, EHEC	44
4.9 Diagnóstico, EHEC	44
4.9.1 Métodos de diagnóstico presuntivos, EHEC	44
4.9.2 Métodos de diagnóstico confirmatorios, EHEC	45
4.10 Tratamiento, EHEC	47
Capítulo 5. <i>E. coli</i> enteroinvasiva (EIEC)	49
5.1 Factores de virulencia, EIEC	50
5.1.1 Mecanismo de patogenicidad, EIEC	50
5.2 Síntomas característicos, EIEC	52
5.3 Modo de transmisión, EIEC	52
5.4 Cuadro clínico, EIEC	52
5.5 Frecuencia, EIEC	52
5.6 Diagnóstico, EIEC	52
5.6.1 Prueba de Sereny	52
5.6.2 Invasión a la línea celular HeLa y Hep-2	53
5.6.3 Captación del colorante rojo Congo	53
5.7 Tratamiento, EIEC	54
Capítulo 6. <i>E. coli</i> enteropatógena (EPEC)	55
6.1 Factores de virulencia, EPEC	55
6.1.1 Patrón de Adherencia Localizada (LA)	57
6.1.2 Isla de patogenicidad ó Locus de Esfacelamiento del Enterocito (LEE)	57
6.1.3 Plásmido EAF	58
6.1.4 Lesión de "Adherencia y Esfacelamiento" (A/E)	59
6.1.4.1 Adherencia inicial (no estrecha) de la bacteria y la célula	59
6.1.4.2 Transducción de señales	61
6.1.4.3 Adherencia bacteriana (estrecha) de íntima con receptor Tir	61
6.1.5 Aparato de trasloción del sistema de secreción tipo III	61
6.1.5.1 Receptor traslocado de la íntima (Tir)	62
6.2 Clasificación de EPEC en presencia o ausencia del plásmido EAF y el patrón de adherencia sobre Hep-2	64
6.3 Modo de transmisión, EPEC	64
6.4 Cuadro clínico, EPEC	64
6.5 Frecuencia, EPEC	64
6.6 Diagnóstico, EPEC	65
6.7 Tratamiento, EPEC	65

Capítulo 7. <i>E. coli</i> enteroagregativa (EAEC)	66
7.1 Factores de virulencia, EAEC	67
7.1.1 Mecanismo de patogenicidad, EAEC	68
7.1.1.1 Sistema de secreción tipo V	68
7.1.1.2 Papel de Pet en la patogénesis de EAEC	69
7.1.1.2.1 Mecanismo de internalización y daño producido por Pet a su blanco, Fodrina	71
7.2 Modo de transmisión, EAEC	72
7.3 Cuadro clínico, EAEC	72
7.4 Frecuencia, EAEC	72
7.5 Diagnóstico, EAEC	72
7.6 Tratamiento, EAEC	72
Capítulo 8. <i>E. coli</i> de adherencia-difusa (ADEC)	73
8.1 Factores de patogenicidad, ADEC	73
8.1.1 Adhesina Afa	73
8.1.2 Adhesina Dr (Hemaglutinina Dr ó adhesina O75X)	74
8.1.3 Adhesina fimbrial F1845	74
8.2 Mecanismo de virulencia de adhesinas Afa/Dr, ADEC	75
8.3 Cepas ADEC típica y ADEC atípica	75
8.4 Principales síntomas, ADEC	77
8.5 Frecuencia, ADEC	77
8.6 Diagnóstico, ADEC	77
II. Justificación	78
III. Objetivos	79
III - A Objetivo general	79
III - B Objetivos particulares	79
IV. Metodología	80
V. Resultados	81
VI. Discusión	100
VII. Conclusiones	106
VIII. Referencias	107

Cuadros

Cuadro 2.1	Identificación Bioquímica de <i>Escherichia coli</i>	10
Cuadro 2.2	Enfermedades y síndromes relacionados con infecciones causadas por <i>E. coli</i>	11
Cuadro 2.3	Serotipos y Serogrupos de <i>Escherichia coli</i> causante de diarrea	13
Cuadro 2.4	Pruebas para evidenciar el mecanismo de patogenicidad de <i>Escherichia coli</i> causante de diarrea	14
Cuadro 2.5	Principales características de las cepas diarreagénicas de <i>Escherichia coli</i>	21
Cuadro 3.1	Características de los factores de colonización de ETEC patógena en humanos	27
Cuadro 5.1	Serotipos "O" de EIEC y otras de <i>Shigella</i>	49

Figuras

Figura 2.1	<i>Escherichia coli</i> en la que se observa su forma de bacilo, con la presencia de fimbrias la cual la hace móvil	9
Figura 2.2	Esquema de <i>Escherichia coli</i> en el que se presentan los principales antígenos de superficie (O, K y H) y algunos factores de virulencia	12
Figura 2.3	Mecanismos de patogénesis de las seis categorías reconocidas de <i>E. coli</i> diarreagénicos	16
Figura 2.4	Diversidad de elementos genéticos móviles de <i>E. coli</i>	19
Figura 3.1	Representación esquemática de la estructura de los factores de colonización (CF) en ETEC	26
Figura 3.2	Genética de fimbrias de <i>E. coli</i> Enterotoxigénica ETEC	28
Figura 3.3	Mecanismos de acción de las toxinas LT y ST de ETEC	31
Figura 4.1	Genes involucrados en la patogénesis de EHEC	36
Figura 4.2	Esquema de la estructura VT-1, VT-2 y Stx con sus diferentes extremos C-terminales (aminoácidos) de la subunidad A ₂	39
Figura 4.3	Mecanismo de acción de VT	41
Figura 5.1	Genes involucrados en la patogénesis de EIEC	51
Figura 6.1	Ilustración de patrones de adherencia de <i>E. coli</i> . (A) patrón de adherencia localizada, en (B) patrón de adherencia difuso y en (C) patrón de adherencia agregativo	56
Figura 6.2	Genes involucrados en la patogénesis de EPEC	58

Figura 6.3	Factor de adherencia de cepas EPEC (EAF)	59
Figura 6.4	Lesión de "Adherencia y Esfacelamiento" (A/E)	60
Figura 6.5	Aparato de trasloción del sistema de secreción tipo III	62
Figura 7.1	Sistema de secreción tipo V	69
Figura 7.2	Mutantes de Pet	71
Figura 8.1	Ensamblaje de adhesinas Afa/Dr	74
Figura 8.2	Organización genética de los operones <i>afa</i> , <i>dra</i> y <i>daa</i>	75
Figura 8.3	Mecanismo de virulencia de adhesinas Afa/Dr, ADEC	76
Figura V-1	Distribución geográfica de <i>Escherichia coli</i> en México, 2001	96

Tablas

Tabla V-1	Etiología de diarrea en una comunidad rural de Cuernavaca, México, con niños que nacieron entre Marzo 1982 a Marzo 1983	81
Tabla V-2	Etiología de diarrea en un hospital del Sur de la ciudad de México en 1985	82
Tabla V-3	Agentes causales de diarrea aguda en niños durante (Diciembre 1988 a Julio 1990)	82
Tabla V-4	Etiología de diarrea en una comunidad de Cuernavaca, Morelos "Lugar sobre la Tierra Blanca" en 1991	83
Tabla V-5	Agentes causales de diarrea aguda líquida en niños menores de dos años en la ciudad de Mérida, Yucatán entre el 1 de Enero al 31 de Octubre de 1991	84
Tabla V-6	<i>E. coli</i> causante de diarrea en diferentes municipios del estado de Veracruz, México, entre Octubre 1995 y Agosto 1996	86
Tabla V-7	Brote causado por <i>Escherichia coli</i> en Chalco, México, 31 de Mayo del 2000	87
Tabla V-8	ETEC y los genes identificados en el brote de Valle de Chalco	87
Tabla V-9	Ingresos hospitalarios diarreogénicos por edad durante (Mar98-Feb99 y Mar00-Feb01)	89
Tabla V-10	Agentes etiológicos en niños con diarrea aguda durante durante (Mar98-Feb99 y Mar00-Feb01)	89
Tabla V-11	GED y los genes identificados en las heces de pacientes hospitalizados por diarrea aguda durante los periodos de (Mar98-Feb99 y Mar00-Feb 01)	91
Tabla V-12	Serotipos del GED identificados en las heces de pacientes hospitalizados por diarrea aguda durante los periodos de (Mar99-Feb99 y Mar00-Feb01)	94
Tabla V-13	<i>Escherichia coli</i> como patógeno en México, 2002	97
Tabla V-14	Agentes etiológicos en niños con diarrea aguda durante (Marzo 2000 a Febrero 2001 y Febrero a Octubre 2004)	98
Tabla V-15	GED y genes identificados en niños con diarrea aguda durante (Marzo 2000 a Febrero 2001 y Febrero a Octubre 2004)	98

Gráficas

Gráfica V.1	Hospitalizaciones por diarrea aguda en niños menores de cinco años, IMSS 1990-1994	85
Gráfica V.2	Ingresos hospitalarios diarreogénicos por mes durante los periodos de (Marzo1998-Febrero 1999 y Marzo 2000-Febrero 2001)	88
Gráfica V.3	Porcentaje de pacientes hospitalizados por diarrea aguda por GED de (Mar98-Feb99 y Mar00-Feb01)	90
Gráfica V.4	Distribución por temporada del número de pacientes que presentan en sus heces algún GED durante (Mar98-Feb99 y Mar00-Feb01)	92
Gráfica V.5	Porcentaje de pacientes con GED con infecciones mixtas o simples durante(Mar98-Feb99 y Mar00-Feb01)	92
Gráfica V.6	Porcentaje de pacientes con diarrea aguda en el que se identificó algún GED como único agente etiológico durante (Mar98-Feb99 y Mar00-Feb01)	93
Gráfica V.7	Serogrupos identificados en las cepas asociadas con GED aisladas de niños durante los periodos de (Mar98-Feb99 y Mar00-Feb 01)	94
Gráfica V.8	<i>E. coli</i> Diarreogénica: aislados por categoría, 2001	95
Gráfica V.9	<i>E. coli</i> Diarreogénica: muestras aisladas 2000-2001	96

Abreviaturas

aa	aminoácidos
AAF	fimbria de adherencia agregativa
ADEC	<i>E. coli</i> de adherencia difusa
ADP	adenosina-difosfato
A/E	lesión de "Adherencia y Borramiento"
AMPc	adenosina-5' - monofosfato cíclico
BFP	(<i>Bundle-Forming Pilus</i>) pili que forma un bucle
bp	pares de bases
cells	células
CFA	antígeno factor de colonización
CHO	células de ovario de hámster chino
Cl ⁻	cloro
col.	colaboradores
CH	colitis hemorrágica
CS	antígeno superficial de coli
CT	colerágeno o toxina del cólera
DA	adherencia difusa
DAF	(<i>decay-accelerating factor</i>) factor de aceleración-decadencia
DNA	ácido desoxiribonucleico
EAEC	<i>E. coli</i> enteroagregativa
EAF	factor entero-adherente
EAST-1	toxina termoestable de EAEC
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EHEC	<i>E. coli</i> enterohemorrágica
EIEC	<i>E. coli</i> enteroinvasiva
ELISA	(<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>) inmunoensayo enzimático
ETEC	<i>E. coli</i> enterotoxigénica
g	gramos
Gb ₃	(<i>globotriaosyl ceramide</i>) globotriaosil - ceramida
Gb ₄	(<i>globotetraosyl ceramide</i>) globotetraosil - ceramida
GED	grupo de <i>E. coli</i> diarreogénica
GM ₁	gangliósido
GMPc	guanosina-5' - monofosfato cíclico
GTP	guanosina-trifosfato
HARM	adhesina resistente a la manosa
HCO ₃	carbonato
HeLa	células de cáncer de cervix
Hep-2	células de cáncer epidermoide de faringe
H-NS	(<i>heat-stable nucleoid- structural</i>) proteína funcionalmente parecida a histona
hrs.	horas
IL-6	interleucina 6
IpaB	proteína responsable de que EIEC escape de los fagosomas
IpaC	proteína adherente que promueve la internalización

Kb	kilobases
Kbp	kilopares de bases
kDa	kilodaltones
L	litros
LA	adherencia localizada
LEE	isla de patogenicidad ó locus de esfacelamiento del entericito
LPS	lipopolisacarido
LT	enterotoxina termolábil
MDa	megadaltones
mg	miligramos
ml	mililitros
mm	milímetros
µm	micrometros
NaCl	cloruro de sodio
NAD	nicotinamida
NC	(<i>needle complex</i>) complejo aguja
ng	nanogramos
nm	nanometros
nM	nanomolar
°C	grados centígrados
O-I	otoño-invierno
OMP	proteína de membrana externa
p ³²	fosforo radioactivo
PCR	(<i>polymerase chain reaction</i>) reacción en cadena de la polimerasa
Pet	(<i>plasmid-encoded toxin</i>) toxina codificada por plásmido
PGE ₁ y PGE ₂	prostaglandinas
Pic	(<i>protein involved in intestinal colonization</i>) proteína implicada en la colonización intestinal
PMN	polimorfonucleares
PMSF	fenil-metilsulfonil fluoruro
pEAF	plásmido denominado factor enteroadherente de EPEC
pO157	plásmido del serotipo O157:H7
PTT	púrpura trombocitopénica trombótica
P-V	primavera-verano
RE	retículo endoplasmico
RIA	radioinmunoensayo
SLT	(<i>Shiga-like toxin</i>) toxina similar a <i>Shiga</i>
SPATE	(<i>Serin Protease Autotransporters of Enterobacteriaceae</i>)
ST	enterotoxina termoestable
Stx	toxina de <i>Shiga</i>
SUH	síndrome urémico hemolítico
Tir	(<i>Translocated intimin receptor</i>) receptor traslocado para intimina
TSEC	<i>E. coli</i> toxina semejante a <i>Shiga</i>
UFC	unidades formadoras de colonias
UPEC	<i>E. coli</i> uropatógena
VERO	células de cáncer de riñón de mono verde africano
VT	verotoxina
VTEC	<i>E. coli</i> productoras de toxina Vero
Y1	células de tumor adrenal

Introducción

Escherichia coli (*E. coli*) se encuentra en el agua y en los alimentos contaminados, se aloja en el intestino delgado, causa deshidratación y diarrea, según la SSA/INEGI cada año mata a cuatro mil niños en México (encuesta epidemiológica 2000).^[132] El reporte de la Secretaría de Salud para el periodo 1995-2000 mostró que las enfermedades intestinales son la cuarta causa de mortalidad infantil en menores de 1 año y la principal causa en niños de 1 a 4 años con una tasa de 4.96 / 100,000 habitantes.^[49]

E. coli es uno de los agentes etiológicos de diarreas que afectan a niños menores de 5 años y adultos, cuando ingieren alimentos o bebidas contaminadas, constituyendo un problema de salud pública en nuestro país.^[48, 107]

E. coli es una de las especies bacterianas más minuciosamente estudiadas, no solamente por sus capacidades patogénicas, sino también como sustrato y modelo de investigaciones metabólicas, genéticas, poblacionales y de diversa índole. Pertenecen a la microflora normal en tracto gastrointestinal, pero puede producir infecciones intestinales o extraintestinales. Se han descrito diferentes grupos o categorías *E. coli* intestinal: enterotoxigénica (ETEC), enterohemolítica también conocidas como productoras de toxina Vero o toxina semejante a *Shiga* (EHEC, VTEC o TSEC), enteroinvasiva (EIEC), enteropatógena (EPEC), enteroagregativa (EAEC) y de adherencia difusa (ADEC).^[13, 17, 34, 64, 74, 80, 94] *E. coli* extraintestinal: uropatógena (UPEC) y bacteriémica o septicémica.^[13]

El mecanismo por el que *E. coli* actúa como agente patógeno es la producción de diversas enterotoxinas como la termolábil (LT) que es semejante a la toxina colérica aunque 100 veces menos potente; la termoestable (ST) que se subdivide en Sta (ST-I) que activa la guanilato-ciclasa de las células intestinales y provoca una reacción secretora y la STb (ST-II) cuyo mecanismo de acción se desconoce. También produce citotoxinas llamadas verotoxinas (VT) sobre todo la cepa de *Escherichia coli* O157:H7. Estas verotoxinas se clasifican en VT-1 y VT-2. Recientemente se ha señalado la existencia de una verotoxina más conocida como VT-2v.^[3, 12, 42, 55, 60, 83]

Las bacterias se pueden aislar e identificar tradicionalmente con base en sus características bioquímicas o serológicas, pero también se puede estudiar sus mecanismos de patogenicidad, mediante ensayos de cultivos celulares o modelos animales y, más recientemente empleando técnicas de biología molecular que evidencian la presencia de genes involucrados en dichos mecanismos.^[47, 48]

En México, después de la llegada del cólera en el verano de 1991, se intensificaron las campañas de salud pública, lo cual provocó un cambio en el patrón de las diarreas, por lo que actualmente se desconoce el impacto de los grupos de *E. coli* diarreogénicos (GED), en niños menores de 5 años.^[107]

En el presente trabajo se realizó una actualización biblio-hemerográfica sobre los GED en México, siendo la segunda causa de enfermedades diarreicas en nuestro país (sólo superada por los Rotavirus),^[44] recopilando información de manera ordenada, lógica y congruente para dar a conocer los más destacados factores de virulencia de GED.

Los GED presentaron mayor estacionalidad en la temporada primavera-verano (P-V),^[117] pero podemos aislar *E. coli* a lo largo de todo el año y se identificaron más frecuentemente en infecciones mixtas, las cuales son más graves que las producidas por infecciones simples debidas a un solo GED.^[22, 117]

Las infecciones por GED son comunes a lo largo del año; durante otoño-invierno (O-I) la mayoría de las infecciones mixtas de GED estuvieron asociadas principalmente con Rotavirus. Sin embargo las infecciones simples por GED se presentan principalmente en P-V, así mismo los niños que habitan en hogares en malas condiciones de higiene tienen mayor riesgo de presentar estas infecciones simples por GED.^[22]

Los factores de riesgo para cursar una infección simple por algún GED son: el no hervir el agua que se utiliza para preparar el biberón y el estatus de desnutrición del niño.^[22]

Por lo que se propone que deben continuar las campañas de salud pública relacionadas con el manejo adecuado del agua y los alimentos que consumen los niños para disminuir la contaminación fecal de los mismos.

I. Marco Teórico

La diarrea es una de las principales causas de muertes en niños menores de 5 años en países en vías de desarrollo y en el mundo.^[48, 104, 124, 128, 138] Una de cada cuatro muertes infantiles se debe a la diarrea, que se lleva la vida de al menos 3 millones de niños y bebés cada año.^[103, 138] En los países en vías de desarrollo de Asia, África y América Latina, los niños menores de 5 años pueden padecer hasta 10 episodios diarreicos por año, con un promedio de 3 ó 4, aunque la mayoría de estos son de corta duración (menos de 7 días), en algunos pacientes se prolongan tanto que constituyen un verdadero riesgo de desnutrición y muerte.^[45, 56] De estas muertes, el 99,6% tienen lugar en el Tercer Mundo, en donde uno de cada diez niños muere por diarrea antes de cumplir cinco años.^[138]

En nuestro país la mortalidad infantil, por su parte, disminuyó un quinto al pasar de 233 decesos de menores de un año por cada diez mil nacimientos en el 2000 a 188 en el transcurso de 2005 (quinto informe de gobierno). Las enfermedades gastrointestinales suelen expresarse con mayor frecuencia como diarrea. En México a pesar de lo extensamente estudiadas continúan siendo una de las principales causas de morbilidad y mortalidad fundamentalmente en los niños. En las dos últimas décadas en nuestro país las diarreas infecciosas han presentado una tendencia hacia la disminución. En México a partir del 2000 a 2005 se registraron los siguiente episodios diarreicos.^[116]

Año	Episodios
2000	6,717,159
2001	6,209,392
2002	6,674,353
2003	5,497,058
2004	5,648,681
2005	5,337,270

Sin embargo, consideramos que estos valores están subestimados, ya que se ha reportado que en nuestro país ocurren anualmente cuatro episodios de diarrea por niño al año. Esto significa que anualmente se presentan entre 30 y 40 millones de episodios diarreicos en esta población.^[22]

Las enfermedades diarreicas no solo pueden producir la muerte, sino que se ha observado que si el niño presenta cinco o más episodios de diarrea aguda al año, no solo disminuye en talla y peso, sino que también disminuye en su desarrollo cognoscitivo.^[91]

En México, los padecimientos intestinales de origen infeccioso representan la segunda causa de enfermedad -superados únicamente por los de las vías respiratorias- y ocupan el catorceavo lugar entre los diversos motivos de defunción. Lo anterior deja clara la importancia de establecer la prevalencia y la identificación de los agentes causales de diarrea en México.

1 Diarrea

La diarrea es una enfermedad intestinal generalmente infecciosa, caracterizada por evacuaciones líquidas o disminuidas de consistencia y frecuentes, casi siempre en número mayor a tres en 24 horas con evolución menor de dos semanas.^[49, 75, 76, 90] El número de las evacuaciones intestinales hechas en un día varía según la dieta y la edad de la persona. Los lactantes alimentados al seno materno tienen evacuaciones blandas o líquidas y más frecuentes y esto no debe confundirse con diarrea.^[124, 128, 141]

La cantidad total de líquidos que ingresa al tubo digestivo es aproximadamente de 9 – 10 L al día, lo que comprende el líquido que se ingiere, saliva, jugo gástrico, bilis, secreciones pancreáticas e intestinales. La mayor parte se absorben en el yeyuno e íleon, del cual aproximadamente 1.5 L son absorbidos por el intestino delgado y sólo 600ml llegan al colon donde se absorben otros 400ml, de ahí que el volumen diario de la materia fecal sea menor de 200 g. Volúmenes mayores que los señalados indican la presencia de diarrea. En lo que respecta a la frecuencia, se considera normal todo aumento en el número de evacuaciones en relación a la habitual para cada paciente.^[31, 76, 104] La diarrea se define como evacuaciones con un peso superior a 250g/24 horas con un contenido de agua del 70% al 95%.^[76, 104]

1.1 Peligros principales de diarrea que pueden llevar a la muerte^[128]

- Deshidratación
- Malnutrición

El cuerpo recibe normalmente el agua y las sales que necesita (ingresos) a través de los líquidos y alimentos. Normalmente, pierde agua y sales (egresos) a través de las heces, la orina y el sudor. Cuando el intestino está sano, el agua y las sales pasan del intestino a la sangre. Cuando hay diarrea, el intestino no trabaja en forma normal. Absorbe menos agua y sales hacia la sangre, y elimina más agua y sales desde la sangre hacia el intestino. Es por esto que se pierden en las heces más agua y sales de lo normal. Esta mayor pérdida de agua y sales del cuerpo resulta en deshidratación.^[128, 133] Esto ocurre cuando el egreso de agua y sales es mayor que el ingreso de las mismas. Mientras más diarrea tenga el niño, mayor es la cantidad de agua y sales que pierde. La deshidratación también puede estar causada por vómitos, los que con frecuencia acompañan la diarrea. La deshidratación sucede más rápidamente en infantes (menores de un año) y niños pequeños, en climas calientes, y cuando hay fiebre.^[128]

Aunque una mala nutrición produce estragos entre la población en general, sus efectos resultan más nocivos cuando se padece en los primeros años de vida. La presencia de desnutrición se relaciona con la ingesta inadecuada de nutrientes, su absorción deficiente, o su pérdida sistemática anormal como consecuencia de episodios de enfermedad (como diarreas o infecciones respiratorias).^[59]

A menudo la diarrea se acompaña con dolor y evacuación de urgencia, malestar perianal e incontinencia, dolor abdominal, náuseas, vómitos, espasmos abdominales, comúnmente conocidos como retorcijones, fiebre, y pérdida del apetito.^[76, 32, 46, 104]

1.2 Clasificación clínica de diarrea

1.- *Diarrea aguda*: Ocurre de repente y tiene poca duración. Persiste menos de tres semanas casi siempre es infecciosa y de carácter autolimitado.^[32, 46, 49, 67, 75, 90, 109, 124, 128, 141]

- Diarrea no inflamatoria – Es diarrea acuosa no sanguinolenta, que se relaciona con cólicos periumbilicales, timpanismo, náuseas o vómito sugiere origen del intestino delgado causada por bacterias productoras de toxinas u otros agentes (virus o parásitos) que perturban la absorción normal y los procesos secretorios del intestino delgado.^[76] El principal peligro en esta patología es la deshidratación y la pérdida de peso que se presenta si no se continúa con la alimentación y rehidratación del paciente.^[22]
- Diarrea inflamatoria – La presencia de fiebre y diarrea sanguinolenta (disentería) indica daño del tejido colónico causado por invasión o una toxina, de tal manera que afecta al colon por lo que el volumen de evacuación es pequeño (<1L/día) y se relaciona con cólicos del cuadrante inferior izquierdo.^[76] Lo que produce una rápida pérdida de peso, anorexia, sepsis y desnutrición, además de otras complicaciones como la deshidratación.^[22]

2.- *Diarrea Persistente*: Es causada presumiblemente por agentes infecciosos y que a pesar de su carácter agudo tiene una duración de 14 días o más.^[46, 49, 56, 143, 128] El principal peligro es la desnutrición, aunque también puede haber deshidratación.^[22]

3.- *Diarrea Crónica*: Ésta se presenta a largo plazo y se agrupa en cuatro categorías fisiopatológicas principales.^[32, 38, 46, 75, 76, 90, 104]

- Diarrea osmótica - Fuerza osmótica excesiva ejercida por solutos intraluminales que disminuye con el ayuno.
- Malabsorción - Emisión de heces voluminosas con una osmolaridad elevada debido a la presencia de nutrientes no absorbidos y de un exceso de grasa (esteatorrea). La diarrea suele ceder con el ayuno.
- Alteración de la motilidad - Patrones muy variables de aumento de la cantidad, el volumen y la consistencia de las heces.
- Diarrea secretora: Secreción neta de un líquido intestinal que es isotónico con el plasma y que persiste incluso en ayunas (lesión vírica o mediada por enterotóxicas).

1.3 Etiología

El consumo de un alimento en mal estado, intoxicaciones, una infección, algunos medicamentos, incluso el estrés psicológico o físico después de grandes esfuerzos puede causar una diarrea.^[32, 38] Finalmente la diarrea aguda puede ser la primera manifestación o el principio de un cuadro de diarrea crónica.^[38]

Las causas de diarrea pueden incluir:^[45, 76, 98, 104, 119]

*Intolerancia a alimentos, tal como la intolerancia a la lactosa

*Medicaciones, incluyendo:

- Antibióticos
- Antiácidos que contengan magnesio
- Medicamentos para presión sanguínea alta
- Quinina
- Quimioterapia para el cáncer
- Laxantes

*Síndrome de intestinos irritables (episodios de diarrea frecuentemente alternados con períodos de estreñimiento)

*Lesión al intestino después de tratamientos de radiación para el cáncer

*Síndromes de malabsorción, tales como:

- Enfermedad celíaca
- Enfermedad tropical
- Síndrome de intestino corto
- Enfermedad de Whipple
- Linfangiectasia intestinal

*Enfermedades del páncreas y/o vesícula

*Enfermedades inflamatorias del intestino (colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn)

*Enfermedades crónicas, tales como:

- Enfermedad hepática
- Diabetes
- Hipertiroidismo
- Enfermedad de Addison
- Pelagra
- Escleroderma
- Amiloidosis
- Sida
- Cáncer de colon

*Cirugía intestinal

*Infecciones, incluyendo intoxicación alimentaria, tales como:

- Bacterianas: *Campylobacter*, *Salmonella*, *Shigella* y *Escherichia coli*.
- Víricas: Rotavirus, virus Norwalk, Cytomegalovirus, virus Herpes simple y Hepatitis vírica.
- Parasitarias: *Giardia lamblia*, *Entamoeba histolytica* y *Cryptosporidium*, *Taenia solium*, *Áscaris lumbricoides* y Trematodos.
- Fúngica: *Candida* (levadura).

El presente trabajo se basa en ***Escherichia coli* (E. coli)**, que es número dos en enfermedades diarreicas en los países en vías de desarrollo (sólo superada por los Rotavirus).^[39]

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

Originalmente descrita y nombrada por Theodore Escherich, bacteriólogo alemán en 1885. Fue el primero en describir y aislar a esta bacteria en heces de un niño sano al cual denominó *Bacterium coli commune*. Sin embargo, desde sus primeras observaciones Escherich propuso la posible participación de esta bacteria como un agente productor de diarrea, lo cual no se aceptó debido a que el microorganismo se aislaba tanto de las heces de niños sanos como de niños con diarrea.^[22, 61] En 1894 demostró su presencia en orina de jóvenes con infecciones del tracto urinario postulándolo como un agente oportunista.^[100] Y luego en 1895, el nombre de *Bacterium coli commune* cambio por *Escherichia coli* (*E. coli*) en honor a Theodore Escherich.^[22, 100]

Durante muchos años se consideró a *E. coli* como un organismo comensal del intestino grueso de humanos y animales, hasta que Massini, 1907; Dulaney y Michelson, 1935 mostraron que podía ser la causa de diarrea en neonatos.^[49]

El primer estudio epidemiológico de *E. coli* como responsable de procesos diarreicos en humanos, fue reportado por Bray y Gyles, (1945) aislaron e identificaron cepas de *E. coli* causantes de un brote de diarrea en donde el 56% de los niños infectados murieron; a esta cepa se le denominó *E. coli* alfa. En estudios posteriores se reconoció una segunda cepa involucrada en un brote de diarrea siendo serológicamente diferente a *E. coli* alfa (*E. coli* beta). Lo anterior fue corroborado mediante la tipificación serológica basada en el esquema de Kauffman y DuPont descrito en 1947 y se llegó a concluir que independientemente del país de origen las cepas asociadas a procesos diarreicos pertenecían a ciertos serogrupos.^[108]

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

2.1 Características generales de *E. coli*

De acuerdo al manual de Bergey's, *E. coli* es un miembro de la familia *Enterobacteriaceae*. Dentro de la tribu *Escherichieae*, la cual incluye a los géneros *Escherichia* y *Shigella*. Estas dos bacterias están relacionadas estrechamente, sin embargo la separación entre los dos géneros se ha mantenido principalmente por razones prácticas.^[22, 100] El género *Escherichia* comprende las especies; *E. adecarboxylata*, *E. blattae*, *E. coli*, *E. furgusonii*, *E. hermanii* y *E. vulneris*.^[22, 61] La especie que mejor se conoce es *Escherichia coli* en relación a su capacidad patógena, aunque las cinco especies restantes están siendo estudiadas para determinar su papel en la generación de enfermedades.^[22]

E. coli es un bacilo corto de 1.1-1.5 x 2.0-5.0 μm , gram negativo, no esporulado, puede ser inmóvil, pero usualmente es motil con flagelos peritricos (Figura 2.1).^[22, 61, 125] Frecuentemente presenta una microcapsula, por lo que algunas cepas producen colonias mucoides, la mayoría son fermentadoras de lactosa y de la glucosa,^[108] con producción de ácido y desprendimiento de gas, dentro de las 48 horas de incubación a 35 ± 2 °C y oxidasa negativa.^[110]

E. coli es un anaerobio facultativo que crece a temperaturas desde 2.5 – 45 °C y puede sobrevivir a temperaturas de refrigeración y congelación. El pH óptimo para su crecimiento es de 7.0 aunque esta especie crece en un intervalo de pH de 4.4 – 9.0 ; ésta bacteria crece en medios de cultivo simples y sintéticos, donde utiliza glicerol o glucosa como única fuente de carbono y energía.^[108]

Figura 2.1
***Escherichia coli* en la que se observa su forma de bacilo.**



Fuente: Toro Carla C. ^[125]

En cuanto a características bioquímicas en el (Cuadro 2.1) se muestra el porcentaje de positividad que presenta *E. coli* con respecto a algunas pruebas bioquímicas de diferenciación o identificación.^[47, 105, 108]

Sobre medios sólidos, las colonias son circulares y lisas, con bordes bien definidos. Algunas cepas al crecer en un medio de gelosa sangre producen α o β hemólisis, relacionadas con la producción de hemolisinas.^[22, 91] En medios sólidos selectivos y diferenciales que contienen carbohidratos, las colonias son lisas, circulares, con borde entero, convexas y brillantes. En medio líquido las cepas lisas producen una turbidez uniforme, mientras que las cepas rugosas se asientan en el fondo formando un depósito granular.^[108]

Genéticamente está constituida por una molécula circular de DNA con un peso molecular de 2×10^9 pb y alrededor de 5×10^6 pares de bases.^[108]

Sus cepas forman la mayor parte de la flora comensal aerobia y anaerobia facultativa del tubo digestivo de animales y humanos, eliminándose por las heces al exterior. Por esto, no es infrecuente que se encuentren en el medio ambiente, donde son capaces de sobrevivir durante cierto tiempo en el agua y los alimentos, de manera que su aislamiento constituye un indicador de contaminación fecal.^[111]

Cuadro 2.1
Identificación Bioquímica de *Escherichia coli*.

Prueba bioquímica	% de positividad
Oxidasa	0
Producción de indol	98
Rojo de metilo	99
Voges-Proskauer	0
Citrato de Simmons	1
H ₂ S (TSI)	1
Hidrólisis de urea	1
Utilización de malonato	0
Ácido de glucosa	100
Gas de glucosa	95
Fenilalanina desaminasa	0
Lisina descarboxilasa	90
Arginina hidrolasa	17
Ornitina descarboxilasa	65
Movilidad a 36 °C	95
Hidrólisis de gelatina a 22 °C	0
KCN crecimiento en	3
Fermentación de lactosa	95
Fermentación de la sacarosa	50
Fermentación de D-manitol	98
Fermentación de D-sorbitol	94
Fermentación de mucato	95
Fermentación de dulcitol	60
Fermentación de salisina	40
Fermentación de adonitol	5
Fermentación de inositol	1
Fermentación de L-arabinosa	99
Fermentación de rafinosa	50
Fermentación de L-ramnosa	80
Fermentación de maltosa	95
Fermentación de D-xilosa	95
Fermentación de trealosa	98
Fermentación de celobiosa	2
Fermentación de α-metil-D glucósido	0
Fermentación de eritritol	0
Fermentación de la esculina	35
Fermentación de melodiosa	75
Fermentación de D-arabitol	5
Fermentación de D-manosa	98
Fermentación de glicerol	75
Nitrato a nitrito	100
Tartrato de Jordán	95
Utilización de Acetato	90
Lipasa	0
DNasa a 25 °C	0
ONPG	95

ONPG: (4-O[β-D-galactopiranosil]-D-glucopiranos)

Modificado de: Farnen JJ.^[47]

Las enfermedades y síndromes causados por *E. coli* se enlistan en el (Cuadro 2.2). Infecciones debidas a *E. coli* patogénica pueden ser limitadas a la superficie de la mucosa o pueden diseminarse a través del cuerpo. Tres síndromes clínicos generales son:^[64]

1. Infecciones del tracto urinario
2. Sepsis / meningitis
3. Enfermedades diarreicas / entéricas

Cuadro 2.2
Enfermedades y síndromes relacionados con infecciones causadas por *E. coli*.

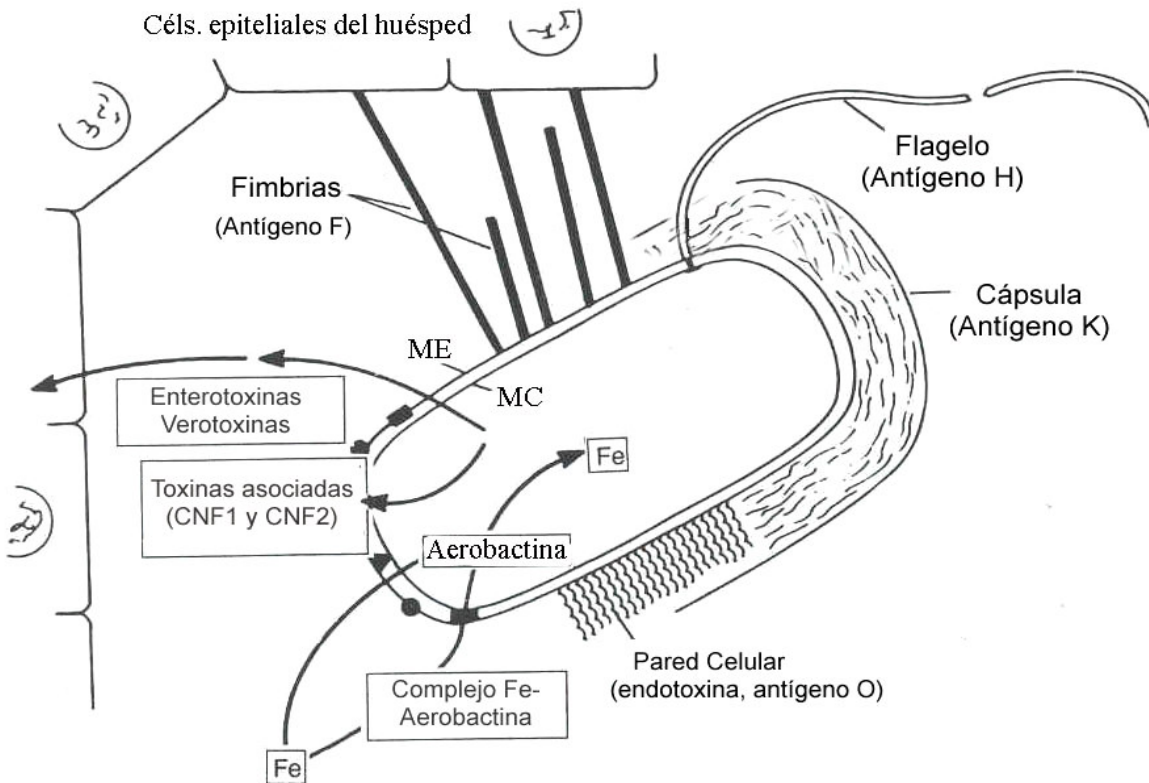
- *Gastroenteritis*
- *Enteritis prolongada*
- *Diarrea en infantes*
- *Diarrea del viajero*
- *Diarrea sanguinolenta*
- *Síndrome disentérico*
- *Infecciones en el aparato urinario y superior*
- *Pielonefritis*
- *Colitis Hemorrágica*
- *Síndrome Urémico Hemolítico*
- *Infecciones en heridas*
- *Septicemias neonatales*
- *Meningitis neonatal*
- *Varias manifestaciones en huésped Inmunocomprometido*

Fuente:Rodríguez CM. ^[108]

2.1.1 Estructura Antigénica, *E. coli*

Para determinar el grupo patógeno al que pertenecen, Kauffman en 1940 desarrolló un esquema de serotipificación que continuamente varía y que actualmente presentan 176 antígenos somáticos O (lipopolisacáridos), 60 capsulares K (polisacáridos) y 112 flagelares H (poseen naturaleza proteica) (Figura 2.2). El antígeno K corresponde al polisacárido capsular que envuelve la pared celular y enmascara el antígeno O inhibiendo su aglutinación. Existen dos grupos de antígenos K (grupos I y II), que corresponden con las variedades K(A) y K(L). Los antígenos K(L) se inactivan calentándose a 100°C/1 h, mientras que exposiciones de 121°C/2 h inactivan la variedad K(A) que se asocia solamente a cepas de los serogrupos O8, O9, O20 y O101. Por último, los antígenos flagelares H son termolábiles, de forma que se inactivan al calentarlos a 100°C/30 min.^[62, 111, 129]

Figura 2.2
Esquema de *Escherichia coli* en el que se presentan los principales antígenos de superficie (O, K, H y F) y algunos factores de superficie.



Fuente: Johnson J.^[62]

El antígeno "O" es el responsable del serogrupo; la determinación del antígeno somático y flagelar (O:H) indica el serotipo, el cual en ocasiones se asocia con un cuadro clínico en particular. El Cuadro 2.3 muestra algunos serotipos más frecuentes asociados con los grupos patógenos.^[42, 47, 61, 91, 105]

Cuadro 2.3
Serotipos y Serogrupos de *Escherichia coli* causante de diarrea.

ETEC	EIEC	EPEC	EAEC	TSEC				
O6:H-	O28ac:H-	O18	O3:H2	O1:MN	O22:H40	O83:H1	O115:H18	O157:H-
O6:H16	O29:H-	O26:H-	O15:H18	O1:H1	O23:H7	O84:H2	O116:H19	O157:H7
O8:H-	O112ac:H-	O26:H11	O44:H18	O1:H2	O23:H16	O85:H10	O117:H-	O161:H-
O11:H27	O124:H-	O55:H-	O77:H18	O1:H20	O25:H-	O85:H23	O117:H7	O163:H19
O15:H11	O124:H7	O55:H6	O86:H-	O1:HNT	O25:H11	O86:H10	O117:H7:K1	O165:H-
O20:H-	O124:H30	O55:H7	O111:H21	O2:H1	O26:H-	O88:H-	O117:H14	O165:H10
O25:H-	O135:H-	O86:H-	127:H2	O2:H2:K2	O26:H2	O91:H-	O117:H19	O165:H19
O27:H-	O143:H-	O86:H34	ONT:H10	O2:H6	O26:H8	O91:H10	O118:H16	O165:H25
O27:H7	O144:H-	O111:H-		O2:H7	O26:H11	O91:H14	O118:H30	O166:H15
O27:H20	O152:H-	O111ab:H2		O2:H27	O26:H21	O91:H21	O119:H-	O166:H28
O80	O167:H5	O119:H6		O4:H40	O26:H32	O98:H-	O119:H5	O168:H-
O85:H7		O125ac:H21		O5:H-	O27:H-	O98:H-	O120:H19	O169:H-
O114:H21		O126:H-		O5:H16	O39:H4	O98:H8	O121:H-	O171:H2
O115:H21		O126:H2		O6:H-	O39:H8	103:H-	O121:H8	O172:H-
O126:H9		O126:H27		O6:H1	O45:H-	O103:H2	O126:H-	OX3:H2
O128ac:H27		O127:H21		O6:H29	O45:H2	O103:H4	O126:H2	ONT:H21
O139		O128ab:H2		O8:H-	O45:H7	O103:H6	O126:H8	ONT:H25
O148:H28		O128:H12		O8:H14	O50:H-	O103:H25	O126:H21	ONT:H28
O149:H4		O142:H6		O8:H21	O55:H-	O104:H7	O126:H27	ONT:H47
O149:H10		O158:H23		O9ab:H-	O55:H6	O109:H2	O128:H12	OR:H-
O153:H45				O11:H49	O55:H7	O110:H-	O137:H41	OR:H20
O159:H-				O14:H-	O55:H10	O110:H19	O141:H-	OR:H21
O159:H4				O15:H-	O55:H7	O111ab:H-	O144:H-	
O159:H20				O15:H27	O60:H-	O111:H2	O145:H-	
O166:H27				O16:H-	O65:H16	O111:H7	O145:H16	
O167:H5				O16:H6	O70:H11	O111ab:H8	O145:H25	
O169:H41				O17:H18	O73:H34	O111:H34	O145:H28	
O173:H-				O18:H-	O75:H-	O111:HNT	O146:H-	
				O18:H?	O75:H5	O112:H21	O146:H21	
				O20:H7	O76:H19	O113:H2	O146:H28	
				O21:H5	O79:H7	O113:H4	O150:H10	
				O22:H-	O80:H-	O113:H53	O153:H2	
				O22:H1	O82:H-	O114:H4	O153:H25	
				O22:H8	O82:H8	O114:H48	O154:H-	

ETEC *E. coli* enterotoxigénica
EIEC *E. coli* enteroinvasiva
EPEC *E. coli* enteropatógena

EAEC *E. coli* enteroagregativa
TSEC *E. coli* productora de toxina Shiga

NT: no tipificable

R: rugosa

Modificado de: Eslava C., Nataro and Kaper y World Health Organization.^[42, 91, 140]

La serotipificación de *E. coli* requiere de un gran número de antisueros. Como hay pocos laboratorios estatales que la realizan, se prefiere identificar las cepas mediante sus factores de virulencia empleando ensayos *in vitro*, por ejemplo; adherencia en células Hep-2 y toxigenicidad en células. También se pueden realizar ensayos *in vivo*, como asa ligada o la prueba de Sereny, así como inmunológicos y pruebas de biología molecular, para poner de manifiesto la presencia de fragmentos de genes involucrados en el mecanismo de patogenicidad y que sirvan de marcadores moleculares. En el (Cuadro 2.4) se muestran algunos métodos de estudio de los diferentes grupos patógenos o patotipos de *E. coli*.^[22, 91, 105]

Cuadro 2.4
Pruebas para evidenciar el mecanismo de patogenicidad de *Escherichia coli* causante de diarrea.

Grupo	Mecanismo de patógeno	Pruebas
ETEC	Enterotoxinas LT y ST	<i>Asa ligada de conejo para LT</i> <i>Efecto citopático en células CHO, Vero y Y1 para LT</i> <i>Ratón lactante para ST</i> <i>ELISA para LT y ST</i> <i>Hibridación en fase sólida "colony blot" con sonda específicas LT y ST</i> <i>PCR (ST y LT)</i>
EHEC	Citotoxinas STX1 y STX2	<i>Serotipificación</i> <i>Efecto citotóxico en células Vero, HeLa causado por STX</i> <i>ELISA</i> <i>Aglutinación en látex</i> <i>Inmunofluorescencia</i> <i>Separación inmunomagnética</i> <i>Extracción de plásmido</i> <i>Hibridación</i> <i>PCR (eae, SLTI, SLTII, plásmido pO157)</i> <i>Campos pulsados</i> <i>Fagotipificación</i>
EIEC	Invasividad	<i>Prueba de Sereny en cobayo</i> <i>Invasividad en células HeLa</i> <i>Captación de rojo congo</i> <i>Extracción del plásmido de 140 MDa</i> <i>ELISA para el gen ipaC necesario para invasión</i> <i>Hibridación con sondas derivadas del plásmido plnv</i> <i>PCR para genes ial, ipaH</i>
EPEC	Adherencia localizada	<i>Adherencia localizada en células Hep-2 y HeLa</i> <i>Prueba de FAS</i> <i>Plásmido EAF</i> <i>Hibridación (EAF, Bfp)</i> <i>PCR (EAF, Bfp)</i>
EAEC	Adherencia agregativa	<i>Adherencia agregativa en células Hep-2 y HeLa</i> <i>Plásmido de 65 MDa</i> <i>Hibridación con sonda obtenida del plásmido 65 MDa</i> <i>PCR (plásmido)</i>
ADEC	Adherencia difusa	<i>Adherencia difusa en células Hep-2 y HeLa</i> <i>Hibridación con sonda para la fimbria F1845</i>

Modificado de: Eslava C. y Nataro and Kaper.^[42, 91]

La adherencia en *E. coli* es debida a la presencia de unos filamentos proteicos (de 100 a 1,000 por célula) que se proyectan a lo largo de toda la superficie de las bacterias que reciben el nombre de fimbrias ó *pili*. Dichos filamentos consisten en estructuras fimbriales rígidas (5 a 7 nm de diámetro) o flexibles (2 a 3 nm) que están constituidas por unas 1,000

subunidades estructurales repetitivas, y unas pocas (menos de 10) subunidades menores funcionales entre las que se encuentran las responsables de la adhesión que se sitúan en la punta de la fimbria. No obstante también se han encontrado adhesinas afimbriales. La mayoría de las adhesinas poseen capacidad de hemaglutinar eritrocitos de diferentes especies animales, dividiéndose en dos categorías: las que tienen hemaglutinación sensible a la manosa (HASM) y resistente a la manosa (HARM). La HASM se asocia con la fimbria tipo 1 que se encuentra en la mayoría (> 75%) de las cepas de *E. coli* (patógenas y no patógenas), mientras que la HARM es expresada por muchas fimbrias específicas de cepas patógenas.^[13]

2.1.2 Mecanismos de patogenicidad, *E. coli*

Las cepas de *E. coli* puede causar diarrea mediante los siguientes cuatro mecanismos de patogenicidad:^[22, 61]

- 1) Propiedades de virulencia que están codificadas en plásmidos.
- 2) Las adherinas permiten que la bacteria pueda adherirse y colonizar el epitelio de ciertas áreas del intestino.
- 3) Producción de enterotoxinas (tiene un efecto en la estimulación de secreción de agua y electrolitos) y/o citotoxinas (destrucción celular).
- 4) La invasión donde la bacteria se introduce al citoplasma de las células epiteliales del intestino para posteriormente dividirse y pasar a las células vecinas, evadiendo así los mecanismos de protección del huésped.

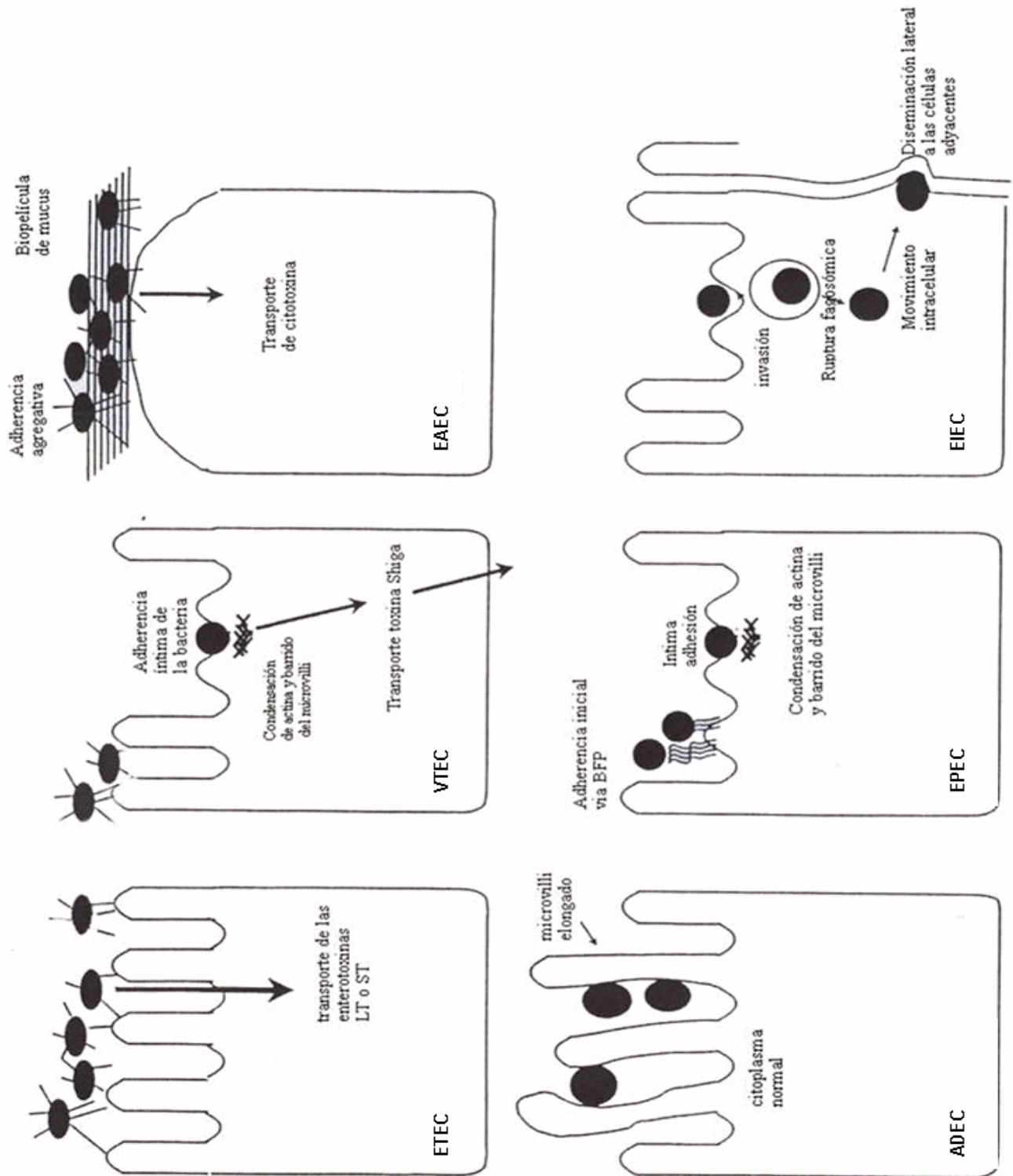
La participación de cada uno de estos eventos celulares conduce al daño de órganos y tejidos del hospedero.^[22, 91] Los diferentes grupos de *E. coli* patógenos para el hombre y los animales se resumen en la Figura 2.3; se han descrito paradigmas generales por los cuales *E. coli* puede causar diarrea.^[64, 91]

- i) Producción de enterotoxinas (ETEC y EAEC)
- ii) Invasión (EIEC)
- iii) Adherencia con mecanismos de señalización de membrana (EHEC, EPEC y ADEC)

2.1.3 Evolución de la patogenicidad en *E. coli*

La cepa de laboratorio K12 de *E. coli* ha sido intensamente utilizada como un organismo modelo en gran cantidad de estudios, y una variante de esta cepa, la MG1655, fue elegida para su secuenciación. Esta cepa contiene 4,639,221 pares de bases de DNA circular de doble cadena. El 87.8% de este genoma codifica para proteínas, el 0.8% codifica para RNAs estables y 0.7% consiste en DNA repetido que no tiene función conocida. Esto nos deja con alrededor del 11% del genoma con funciones de regulación. El contenido

Figura 2.3
Mecanismos de patogénesis de las seis categorías reconocidas de *E. coli* diarreagénicos.



Fuente: Nataro J.^[91]

promedio de GC es del 50.8%. Debido a que un número importante de genes (al menos 755 genes en el cromosoma de la cepa MG1655) contienen diferentes proporciones de

GC y un índice de uso de codones diferente del resto del genoma, se considera que estos genes de *E. coli* han sido adquiridos por transferencia horizontal (Lawrence y Ochman, 1998).^[84]

Entre estos genes con contenido GC diferentes destacan las llamadas "islas de patogenicidad" (regiones donde se encuentran los genes que confieren capacidades patógenas a una bacteria) (Ochman y col., 1999). Se ha sugerido que al menos 17% de los genes de *E. coli* son adquisiciones foráneas relativamente recientes (Lawrence y Ochman, 1998), con una tasa de transferencia horizontal de aproximadamente 16kb cada millón de años (Martin, 1999). Si el genoma de *E. coli* es dinámico, sus elementos extracromosomales (plásmidos) son aún más. Esta bacteria puede sobrevivir sin ningún plásmido o tener un buen porcentaje de su genoma total en plásmidos (Hopwood y Chater, 1989). Se han descrito cerca de 300 plásmidos diferentes en *E. coli* (Boyd y col., 1996). El número y tipo de plásmidos dentro de una célula esta regulado por dos fuerzas: el número de réplicas de un mismo plásmido dentro de una bacteria - fenómeno controlado en parte por el mismo plásmido- y la entrada de nuevos plásmidos por conjugación o transformación. Se ha reportado que los plásmidos pueden transferirse entre células de diferentes orígenes filogenético (géneros e inclusive familias diferentes comparten plásmidos), dándole capacidades nuevas e instántaneas a su receptor (Lewin, 1998). Sin embargo, es interesante señalar que existe incompatibilidad entre plásmidos de un mismo grupo, por lo que no pueden ingresar a una bacteria dada plásmidos nuevos pertenecientes a un grupo ya existente (Madigan y col., 2000).^[84]

2.1.4 Diversidad de elementos móviles de *E. coli*

La variabilidad genética es esencial para el proceso evolutivo. Muchas bacterias se convierten en resistentes por la adquisición de ADN exógeno mediante transformación, transducción (fagos, que son virus de bacterias), conjugación (plásmidos) o transposición (transposones), PAI, que no sólo puede ir a la progenie sino también a otras bacterias (Figura 2.4),^[127] mediante transferencia horizontal, sin embargo, ésta no explica el origen de los genes de resistencia, solo su difusión entre las bacterias.^[84]

De modo que la adquisición de resistencia a los antibióticos se cita generalmente como ejemplo de «cambio evolutivo», y ha llegado a ser un ejemplo popular de lo que se denomina «evolución en una cápsula de Petri». Millerm, (1999) se refiere al desarrollo de la resistencia a los antibióticos como un ejemplo de la «fuerza creadora» de la evolución. Barlow y May, (2002) se refieren a ella como «la singular oportunidad de observar procesos evolutivos a lo largo de unas pocas décadas en lugar de los varios milenios que son generalmente necesarios para estos procesos».^[84]

Bacteriófagos

Los bacteriófagos o fagos son virus que se reproducen en células procariontes. El genoma de los fagos puede ser RNA cadena simple (MS2, QB), RNA cadena doble (phi 6), ADN cadena simple (phi X174, fd, M13) o ADN cadena doble (T3, T7, lambda, T5, Mu, T2, T4). Estos ácidos nucleicos pueden contener bases inusuales que son sintetizadas por proteínas del fago. En los T-pares el genoma no contiene citosina sino 5'-hidroximetilcitosina, mientras que en otros tipos de fago alguna de las bases esta parcialmente sustituida. Las cepas de bacterias portadoras de fagos silenciosos o latentes

son denominadas cepas lisogénicas (el fago se encuentra en forma de un precursor no infeccioso llamado *profago*). La lisis de algunas de estas bacterias lisogénicas ocurre solamente cuando estas células han sido estimuladas para producir fagos. La mayor parte de la progenie de una bacteria lisogénica puede ser inducida a producir el fago por medio de la irradiación con UV o tratamiento con otros factores inductores.^[70]

Plásmidos

Son elementos de ADN circular extracromosómico que existían ya en la era preantibiótica, aunque la presión selectiva ha llevado a su diseminación. Su tamaño es variable (< 10 a 400kb) y puede haber varias copias en una célula, aunque frecuentemente hay incompatibilidad de plásmidos similares.^[127]

Algunos plásmidos se pueden transferir de célula a célula por medio de la conjugación ó tienen la capacidad de integrarse a los cromosomas y se sitúa en medio, con lo cual, automáticamente la maquinaria celular también reproduce el plásmido. Cuando ese plásmido se ha insertado se les da el nombre de episoma;^[7] también llevan genes que controlan los procesos de conjugación: genes que alteran la superficie de las células para permitir el contacto de célula a célula y genes que llevan a cabo la transferencia de ADN de una célula a otra.^[70]

Transposones (Tn)

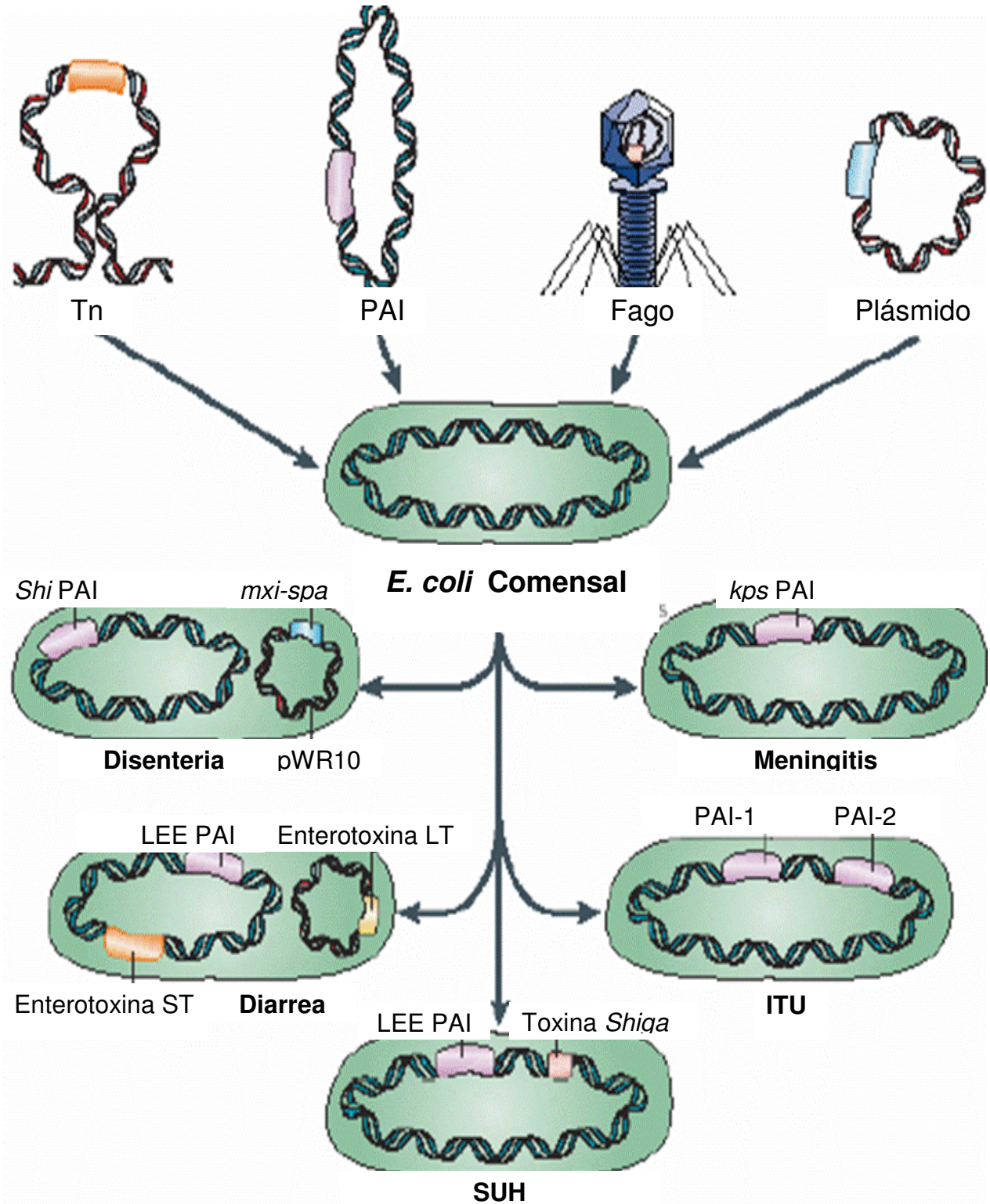
Son elementos con puestos móviles que contienen secuencias de inserción apareadas que colindan con otras regiones genéticas. Los elementos transponibles más sencillos son las secuencias de inserción mismas que parecen no tener otros genes que los capaces de lograr su propia transposición. Transposiciones: proceso mediante el cual se mueve un gen de un lugar a otro en el genoma.^[127]

Secuencias de inserción (IS).- Segmentos cortos de ADN de 1000 nucleótidos. Los transposones y las IS son incapaces de una replicación autónoma necesitando plásmidos, el cromosoma o fagos para ello, aunque recientemente se han descrito los transposones conjugativos que sí podrían hacerlo. Presentan un mecanismo de recombinación altamente especializado independiente del sistema rec A clásico bacteriano que permite la recombinación de ADN de gran homología.^[127]

2.2 Clasificación de cepas de *E. coli* que causan diarrea

E. coli coloniza el intestino del hombre pocas horas después del nacimiento y se considera de flora normal. Sin embargo, existen cepas patógenas causantes de diarrea que en base, a su mecanismo de patogenicidad y cuadro clínico, se clasifican en seis grupos: enterotoxigénica (ETEC), enterohemorrágica también conocidas como productoras de toxina Vero o toxina semejante a *Shiga* (EHEC, VTEC o TSEC), enteroinvasiva (EIEC), enteropatógena (EPEC), enteroagregativa (EAEC) y enteroadherencia-difusa (ADEC), cuyas características principales se describirán en el Cuadro 2.5.^[8, 22, 39, 42, 64, 85, 91, 86, 105, 108, 111]

Figura 2.4
Diversidad de elementos genéticos móviles de *E. coli*.



- ETEC es probablemente el agente etiológico más frecuente de diarreas acuosas de índole bacteriano entre la población infantil en humanos y animales jóvenes, aunque pueden afectar a animales de todas las edades^[141, 144] de los países subdesarrollados y el más destacado responsable de la “diarrea del viajero”.^[8, 39, 86, 111] En países en vías de desarrollo es un importante agente etiológico de diarrea en lactantes.^[96]
- EHEC es agente causal de numerosos brotes epidémicos asociados a la ingesta de agua y alimentos contaminados, a partir de la cual los individuos afectados padecen de diarreas comunes o sanguinolentas, e inclusive, del síndrome urémico hemolítico que implican a diferentes entidades clínicas, en países desarrollados tales como Japón, E.U.A. y el Reino Unido, aunque la presencia de este agente empieza a detectarse en algunos países en vías de desarrollo.^[8, 39, 85, 86, 111]
- EIEC manifiesta menores incidencias que las anteriores, pero se encuentra muy relacionada bioquímica y genéticamente con *Shigella*, al grado de que comparte con este género su especial capacidad para invadir el intestino e inducir cuadros disenteriformes.^[8, 39, 111]
- EPEC es una de las principales causas de diarrea infantil en los países en vías de desarrollo, aunque también provoca brotes localizados en las guarderías de los países desarrollados en donde, adicionalmente, llega a originar epidemias en adultos.^[8, 39, 111]
- EAEC se asocia a diarreas persistentes en los niños que habitan en países subdesarrollados, si bien diversos brotes y estudios recientes realizados en voluntarios humanos sugieren que también afecta a los adultos y que su distribución geográfica es mundial.^[8, 39, 111]
- ADEC corresponde a un grupo heterogéneo de microorganismos y los estudios epidemiológicos efectuados hasta ahora han generado grandes conflictos y polémicas acerca de su verdadero significado clínico.^[8, 39, 111]

2.3 Diagnóstico de los grupos de *E. coli* diarreogénicos (GED)

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 cepas lactosa positivas, que se caracterizan por presentar un color rosa. Las colonias pueden ser redondas, convexas, con bordes definidos.^[22, 55, 105]

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 98% son indol positivo.^[91]

Cuadro 2.5 **Principales características de las cepas diarreagénicas de *Escherichia coli*.**

La identificación de los grupos de *E. coli* diarreogénicos (GED) es muy complicada

Categ.	Adhesinas	Toxinas	Otros	Patología	Observaciones adicionales
ETEC	◆CFAI-IV ◆ CS 1-21	◆ LT ◆ ST		Per. Inc: 14-50 hrs. Diarrea acuosa muy voluminosa, sin sangre, ni moco en niños y turistas. La fiebre es rara.	"Diarrea del turista". Es la categoría de <i>E.coli</i> diarreagénica más frecuente. Su LT es y funciona igual que la toxina del cólera.
EHEC	◆ Intimina	◆Stx1, 2 ◆EAST1 ◆ Hly	◆ EAF ◆ Tir ◆ LEE ◆pO157	Diarrea con sangre, antecede a la CH, al SUH (con anemia hemolítica, trombocitopenia y daño renal) o la PTT.	El serotipo O157:H7 ha causado grandes brotes epidémicos principalmente en países desarrollados. Causa lesión A/E como EPEC.
EIEC	◆ ipaC ◆ ipaB	◆ Sen	◆ pInv	Per. Inc: 48 hrs. Diarrea mucosanguinolenta en niños; fiebre, espasmos en colon.	Inmóvil y Lac – como <i>Shigella</i> ; también su patología y modo de invasión son similares.
EPEC	◆ BFP ◆ Intimina		◆ EAF ◆ Tir ◆ LEE	Per. Inc: 3 - 48 hrs. Diarrea persistente ≥ 14 días en niños; <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> : lesión "adherencia-esfacelamiento" (A/E).	Sigue en frecuencia a ETEC. Lesión A/E en modelo de "adherencia localizada" en células Hep-2.
EAEC	◆AAF I, II	◆EAST1 ◆ Pet	◆ Pic	Per. Inc: 8 - 50 hrs. Diarrea mucopurulenta persistente ≥ 14 días en niños y adultos.	Modelo "adherencia agregativa": las bacterias se aglutinan formando "pilas de ladrillos".
ADEC	◆ F1845			Per. Inc: 48 hrs. Diarrea acuosa sin sangre, ni leucocitos. Etiología cuestionada.	"Adherencia difusa" en células Hep-2; las patologías intestinales serían poco frecuentes.

debido a dos razones:^[22, 105]

1. La utilización de pruebas bioquímicas tradicionales sólo nos permiten 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 cinco colonias por paciente para diferenciar cepas patógenas (Murria y col., 1987). Debido a ello, desde hace varias décadas se han buscado metodologías que nos permitan identificar a los GED.

2.3.1 Serotipificación

Al inicio, la caracterización serológica de *E. coli* tuvo un papel central en el diagnóstico de estos patógenos, ya que permitió identificar serotipos asociados con casos de diarrea, inclusive antes de conocer los factores de patogenicidad presentes en los GED. Kauffman, (1994) propuso un esquema para la clasificación serológica de las cepas *E. coli*, el cual continúa siendo utilizado con algunas modificaciones.^[22, 91]

2.3.2 Asa ligada de conejo

Se ha desarrollado varios métodos para identificar los GED. Tal es el caso del asa ligada de conejo (Evans y col., 1973), que es un método que identifica los factores de patogenicidad *in vivo*. Originalmente fue desarrollado para identificar la toxina de cólera que producía algunas cepas de *Vibrio cholera* este método, entonces, se adaptó para la identificación de la toxina termolábil de ETEC. Consiste en la inoculación de una solución bacteriana en el intestino delgado de un conejo previamente ligado de un extremo, una vez realizada la inoculación, se liga el otro extremo del intestino y se sutura al animal. Al cabo de 6 a 18 horas el animal se sacrifica y se extrae el intestino delgado, el órgano separado se mide y se pesa para determinar la cantidad de líquido acumulado debido a la presencia de la toxina. Esta metodología ha caído en desuso por su elevado costo, además de la falta de estandarización, por la dificultad metodológica para realizarla y por el número de animales que se requieren (5 conejos por paciente).^[22]

2.3.3 Efecto de las toxinas sobre líneas celulares

La utilización de cultivos celulares para evaluar el efecto de las diferentes toxinas permitió la identificación específica de las toxinas producidas por los GED.

Tal es el caso en el que se utiliza la línea celular de ovario de hámster chino (CHO), para identificación de la toxina LT de ETEC, donde dicha toxina causa elongación de las células (Guerrant y col., 1974).^[69, 89] La toxina LT, tiene actividad biológica en células de riñón de mono verde africano (Vero) con un efecto citotónico reversible (alargamiento de las células); y también las células de tumor adrenal (Y1). Las toxinas LT y ST causan un efecto citotónico.^[55, 106]

Por otra parte las células de cáncer de cervix (HeLa), se han utilizado para la identificación de las toxinas de TSEC (Sxt-1 y Sxt-2), las cuales causan un efecto citotóxico en dichas células. Las cepas de EHEC y algunas EPEC, producen citotoxinas Vero (VT) denominadas también toxina semejante a *Shiga* o "*Shiga-like*" (SLT) que tienen la capacidad de redondear las células de manera progresiva e irreversible y destruirlas.^[22, 106]

En las cepas EIEC se observa el efecto de invasividad, en las líneas HeLa o sobre células de cáncer epidermoide de faringe (Hep-2) para observar el efecto de invasividad.^[22, 105]

Otra forma de identificar a varios GED ha sido utilizando el ensayo de adherencia Hep-2 y

HeLa, donde las EPEC se adhieren con un patrón localizado, las cepas ADEC se adhieren con un patrón difuso y las cepas EAEC se adhieren con un patrón agregativo.^[22, 105]

Para la realización de este tipo de pruebas se requiere personal con experiencia e infraestructura adecuada para mantener las líneas celulares.

2.3.4 Inmunoensayos

Los inmunoensayos utilizan anticuerpos para identificar las toxinas producidas por los GED, en el mercado existe una gran variedad de kits comerciales para ello. El uso de anticuerpos monoclonales y policlonales contra las toxinas Stx-1 y Stx-2 de las cepas TSEC (Acheson y col., 1994) y la toxina LT de las cepas ETEC (Honda y col., 1981) ha sido exitoso, pero son caros y requieren de encontrar las condiciones óptimas para que las bacterias produzcan las toxinas.^[22]

2.3.5 Métodos de biología molecular

Los métodos de biología molecular que se han desarrollado son una de las más sensibles herramientas de diagnóstico. Siendo precisamente el diagnóstico de los GED uno de los primeros ejemplos en donde se utilizaron estas técnicas. Entre los métodos de biología molecular utilizados para identificar los GED se encuentran los ensayos de hibridación (*colony blot*) y la reacción en cadena de polimerasa “*polymerase chain reaction*” (PCR).^[22]

2.3.5.1 *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 P³² o biotina (sonda marcada) y que es específica contra los genes de patogenicidad pueden hibridar con los genes del organismo homólogos a la sonda.^[105]

Se han utilizado sondas para identificar la presencia de genes que codifican para las toxinas LT y ST de ETEC (Lanata y col., 1985) y los genes Stx-1 y Stx-2 de TSEC (Newland y col., 1988). Por otra parte, dos sondas han sido utilizadas para la identificación de EIEC, la sonda *pMR17* la cuál es un fragmento de DNA derivado de la digestión del plásmido de *Shigella flexneri*, y la sonda *ial*, la cual se obtiene de la digestión del plásmido de invasividad (*pInv*) de EIEC (Gómez y col., 1987). Cualquiera de estas sondas es 100 % sensible y específica para la identificación de cepas EIEC. Para la detección de EPEC, se han utilizado sondas derivadas del plásmido EAF (Nataro y col., 1985).^[22, 105]

En los métodos de hibridación se necesita una sonda para la detección de cada gen. Así si quisiéramos caracterizar solamente las cepas de EHEC se necesita el uso de cuatro

sondas (Stx-1, Stx-2, *eaeA*, *hlyA*). A pesar de su sensibilidad, el *colony blot* es una metodología larga y costosa.^[22, 105]

2.3.5.2 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La PCR vino a revolucionar el diagnóstico de los GED. La PCR se ha utilizado exitosamente en la identificación de genes de patogenia de los GED. Esta metodología nos permite analizar un mayor número de cepas en un menor tiempo.

PCR se define como la reacción cíclica enzimática en la que se sintetiza DNA “*in vitro*”, mediante la cual las cadenas individuales de DNA blanco son duplicadas por la DNA polimerasa en cada uno de los ciclos (generalmente entre 30 y 40) que integran la reacción. Al final de cada ciclo, las nuevas cadenas se vuelven a duplicar por la enzima, lograndose una producción exponencial de millones de copias del gen o segmento de DNA sometido al proceso.^[22, 21, 137]

Cada ciclo de PCR consta de tres pasos, los cuales están determinados por temperaturas y tiempos específicos, que son:

1. Desnaturalización: proceso en el cual se separan las dos cadenas complementarias de DNA blanco.
2. Alineamiento de los iniciadores: en este paso se realiza el acoplamiento específico entre los iniciadores y las cadenas sencillas del DNA blanco.
3. Extensión: donde la DNA polimerasa sintetiza la cadena complementaria al DNA blanco a partir de los iniciadores.

Los componentes requeridos para la PCR son: el DNA (gen o fragmento a amplificar), los iniciadores (oligonucleotidos) específicos que flanquean el gen, la mezcla de desoxinucleotidos (dNTP's), la solución amortiguadora, el cloruro de magnesio y la DNA polimerasa.^[21, 137]

Se han desarrollado varias PCR utilizando solo un par de iniciadores (PCR simple) o más de un par de iniciadores (PCR multiplex) para identificar genes específicos para los GED.

Entre los trabajos publicados se encuentran varios PCR simples que nos permiten identificar al gen Stx-1 de TSEC (Karch y col., 1989), el gen *eaeA*, de TSEC y EPEC (Gannon y col., 1993), el gen *hlyA* (Schmidt y col., 1995), el gen *bfpA* de EPEC (Tornieporth y col., 1995) y el fragmento *ial* de EIEC (Frankel y col., 1990).^[22, 105]

Por otro lado, se han desarrollado varias PCR multiplex entre las que se destacan tres, la primera amplifica los genes que codifican para las toxinas LT y ST de ETEC (DuToit y col., 1993); la segunda amplifica los genes Stx-1, Stx-2, *eaeA*, y *hlyA* de EHEC (Paton, 1998); y la tercera amplifica los genes *aap*, *aggR* y *aatA* de EAEC (Cerna y col., 2003).^[44]

3 *E. coli* enterotoxigénica (ETEC)

Este grupo fue descrito a partir de los estudios de De y col., (1956) en los que se observaron la distensión por edema de asas ligadas de intestino de conejos con ultrafiltrados de cultivos de ciertas cepas *E. coli*, se demostró su capacidad para producir exotoxinas que al interactuar con las células epiteliales de la mucosa intestinal del hospedero, inducían aumento en la secreción de agua y electrolitos.^[42] Taylor y col., (1961) reconocieron que las cepas ETEC podían producir la secreción de fluidos en el intestino, lo cual se observó en el asa ligada de conejo. Posteriormente se demostró que las cepas ETEC eran capaces de causar diarrea en voluntarios adultos según DuPont y col., (1971).^[22]

3.1 Factores de virulencia de ETEC

ETEC elabora diversos factores de virulencia, entre los que destacan sus adhesinas y enterotoxinas, codificadas todas ellas por uno o más plásmidos no conjugativos.^[52]

- *Adhesinas* - Antes de ocasionar diarrea, ETEC debe adherirse a la mucosa del intestino delgado, concretamente a los enterocitos, a través de sus numerosas fimbrias (*pili*) superficiales; de esta manera, evita ser eliminada por el moco y los movimientos peristálticos.
- *Toxina termolábil (LT)* - Manifiesta una muy estrecha relación con el colerágeno (toxina del cólera o CT), desde la perspectiva de su estructura y función; ambas presentan una secuencia de aminoácidos 80 % idéntica, comparten a su receptor primario en las células del hospedero y sus actividades enzimáticas son prácticamente iguales, si bien la CT resulta aún más virulenta.
- *Toxina termoestable (ST)* – Es de origen plasmídico y eventualmente transposónico, pequeñas, no inmunogénicas y monoméricas; a la fecha sólo se han detectado dos clases de ellas: STa y STb, que difieren en cuanto a estructura y mecanismo de acción.

3.1.1 Adhesinas

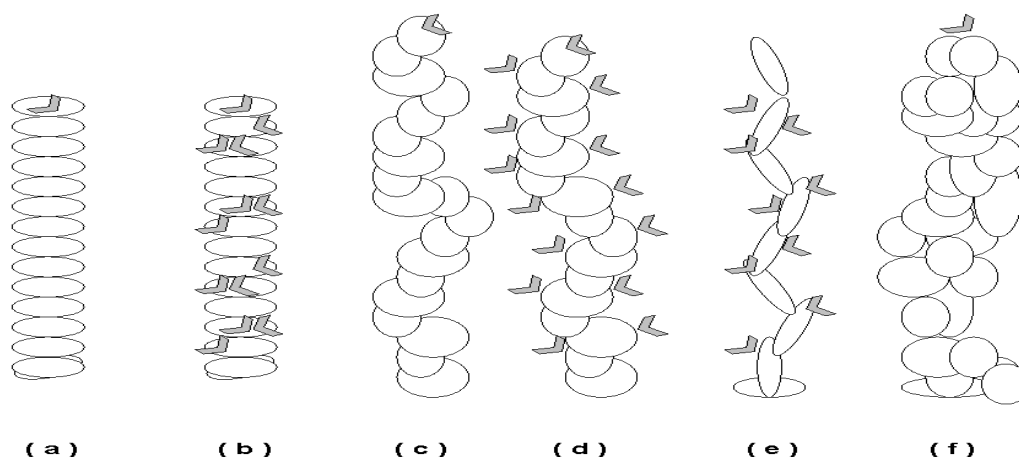
Algunas fimbrias de este microorganismo evidencian cierta especificidad hacia su especie hospedera. Así como cepas que expresan *pili* K99 suelen ser patógenas para vacunos, corderos y cerdos; K88 sólo lo son para los cerdos; cepas de origen humano presentan su propio arreglo fimbrial, conocido como antígeno factor de colonización (CFA) por “*colonization factor antigen*”, y conformado -a su vez- por distintos componentes antigénicos denominados antígenos superficiales de *E. coli* (CS) por “*E. coli type 1* o *Coli surface*”.^[51, 61, 103]

Con base en sus características morfológicas, los CFAs se subdividen de la siguiente manera.^[50, 51, 103]

- Fimbrias o filamentos rígidos (Figura 3.1), tales como el CFA/I, CS1, CS2, CS4, CS14, CS17 y CS19, que se integran por una proteína única, ensamblada en forma helicoidal.
- Fibrillas o paquetes de hilos flexibles.
- Filamentos individuales finos y flexibles.
- Proteínas superficiales no fimbriales.

A la fecha se han descrito más de 20 diferentes factores de colonización (Cuadro 3.1), siendo los mejor caracterizados el factor antigénico de colonización 1 (CFA/I).^[51]

Figura 3.1
Representación esquemática de la estructura de los factores de colonización (CF) en ETEC.



- (a) Fimbria CFA/I
 (b) Fimbria rígida enrollada
 (c) Modelo de fibrilla de CF donde el sitio de unión se encuentra en el extremo terminal
 (d) Modelo de fibrilla de CF todas las subunidades tienen sitio de unión a receptor
 (e) Modelo de fibrilla de K99
 (f) Modelo de fimbrias CS5 y CS7 en forma de doble hélice

Fuente: Gastra W.^[51]

Es importante destacar que los estudios epidemiológicos sugieren que, a nivel mundial, el 75 % de las cepas ETEC de origen humano expresa CFA/I, CFA/II o CFA/IV.^[103]

La genética de los CFAs ha sido estudiada extensivamente y esos estudios han servido para esclarecer modelos para expresión de proteínas secretadas de fimbrias, traslocación y ensamble de organelos de bacterias (Figura 3.2).^[91]

En población mexicana existen trabajos que señalan que la prevalencia de factores de colonización en cepas de ETEC aisladas de casos de diarrea son CFA/II seguido de CFA/I y CFA/IV. Una parte relevante de estos trabajos es el perfil toxigénico de la cepa de ETEC, reportándose, que las cepas ETEC aisladas poseen predominantemente un perfil toxigénico ST/LT seguidas de aquellas productoras de LT y por último las que solamente expresan ST.^[78, 118]

Cuadro 3.1
Características de los factores de colonización de ETEC patógena en humanos.

CF	CS	Morfología (nm)		Tamaño (kDa)	Toxinas	Serogrupos
Familia CFA/I						
CFA/I	CFA/I	F	7	15.0	ST+LT, LT	O4, O7, O15, O20, O25, O63, O78, O110
CS1	CS1	F	7	16.5	ST+LT	O126, O128, O136, O153, O159
CS2	CS2	F	6	15.3	ST+LT	O6, O139
CS4	CS4	F	7	17.0	ST+LT	O6
PCFO166	CS14	F	7	15.5	ST	O25
CS17	CS17	F	7	17.5	LT	O20, O71, O98, O166
CS19	CS19	F	7	16.0	ST+LT	O8, O15, O48, O114, O146
Grupo CS5						
CS5	CS5	H	5	21.0	ST	O6, O29, O92, O114, O118
CS7	CS7	H	3 - 6	21.5	ST+LT	O167
PCF09	CS13	F		27.0	LT	O15, O103, O114
CS20	CS20	F	7	20.8	ST+LT	O9, O143
PCF020	CS18	F	7	25.0	ST+LT	O17
Tipo IV						
CFA/III	CS8	F	7	18.0	LT	O25
Longus	CS21	F	7	22.0	ST+LT, ST, LT	O2, O6, O8, O20, O25, O49, O128, O139,
8786	CS15	NF	2 - 3	16.3	ST	O148, O117
Diferentes						
CS3	CS3	f	2 - 3	15.1	ST+LT	O8, O9, O78, O80, O115, O128, O139
CS6	CS6	NF		14.5	ST+LT, ST, LT	O168
PCF0148	CS11	f	3		ST+LT	O25, O27, O92, O148, O153, O159
PCF0159	CS12	F	7	19.0	ST+LT	O148
2230	CS10	NF		16.9	ST	O159
						O25

F = fimbria

f = fimbrilla

NF = No fimbrial

H = helicoidal o dos fimbrillas formando una hélice

CF = factor de colonización

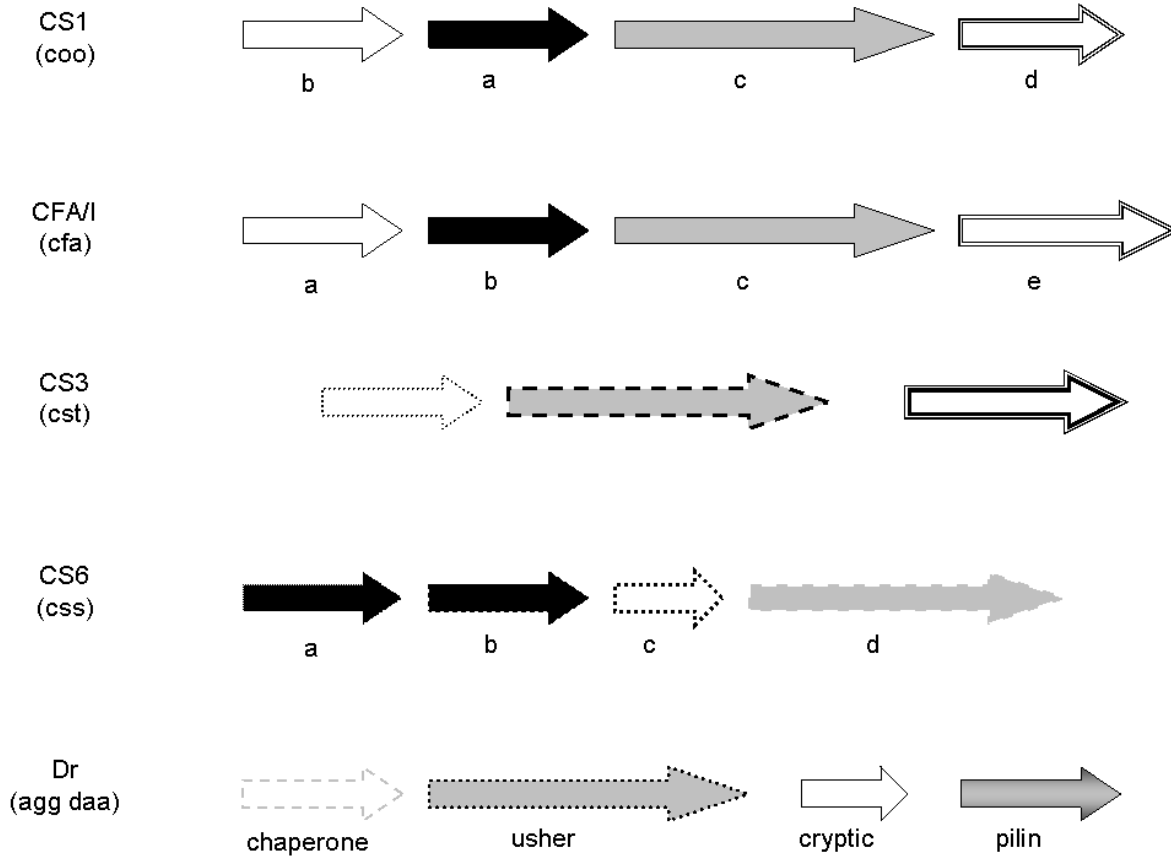
CS = antígenos de superficie de *E. coli*

PCF = factor putativo de colonización

Fuente: Gaastra W.^[51]

Figura 3.2

Genética de fimbrias de *E. coli* Enterotoxigénica ETEC.



Fuente: Nataro P.^[93]

Pili CS1, se encuentra codificado en un plásmido *pCoo* de 98,396 bp. En el plásmido *pCoo* se localizan los genes *coo*. Algunas cepas productoras de CS1, el plásmido *pCoo* codifica LT, ST y CS3.^[50]

3.1.2 Enterotoxina termolábil (LT)

La toxina LT es codificada por el gen *lt*, es una proteína hexamérica de 84 kDa que consiste en una subunidad A separada del plano de un anillo formado por cinco pequeñas e idénticas subunidades B.^[22, 28] LT es codificada en un plásmido de virulencia de 60 kb llamado *Ent*. Los genes *eltA* y *eltB* codifican las subunidades A y B respectivamente. En contraste, poco se sabe del operon *eltAB*. Sin embargo, se ha reportado que el mecanismo molecular de la proteína funcionalmente parecida a histona (H-NS) por “*heat-stable nucleoid-structural*”, regula la expresión del operon *eltAB*. H-NS es una pequeña proteína de 137 aa, pero abundante (de $\sim 2 \times 10^4$ moléculas / cell).^[28]

Se han descrito dos enterotoxinas termolábiles patógenas (LTI y TLII) de las cuales sólo la primera predomina en los humanos y la segunda se aísla con mayor frecuencia de

cepas obtenidas de cerdos, se destruyen parcialmente de 60 – 80 °C durante 30 minutos y totalmente a 100 °C durante 2 – 10 minutos.^[22, 42, 61, 100, 103]

La LTI es una proteína de alto peso molecular de 86 kDa, se localiza en el espacio periplásmico y solamente una pequeña cantidad se libera al medio de cultivo, tiene carácter inmunogénico y es no dializable, igual que la toxina colérica; se inactiva por calentamiento a 100 °C por 10 minutos.^[10, 22, 106]

LTII muestra una semejanza entre un 55% a 57 % a LTI y CT en la subunidad A, pero inicialmente no homóloga para LTI o CT en la subunidad B.^[5] Las dos variantes antigénicas LT-IIa y LT-IIb comparten una similitud de 71 y 66% en las subunidades A y B respectivamente. LTII incrementa intracelularmente los niveles de AMPc por mecanismos similares para LTI, pero LTII utiliza GD1 como receptor tal como GM1 (Fukuta, 1988 y Guth, 1997).^[5]

3.1.2.1 Mecanismo de acción de LT

La LT está constituida por una subunidad A (28 kDa) y cinco subunidades idénticas B (11.5 kDa), pentámero capaz de enlazarse firmemente al gangliósido GM₁ (receptor primario) y débilmente al GD1 y a otras glicoproteínas intestinales (Tenerberg y col., 1994). Después de que la toxina se une a la membrana de la célula huésped por medio de la subunidad B, la subunidad A es endocitada y traslocada a través de la célula, y se transporta al aparato de Golgi a través de una vesícula^[5, 22, 91] y es escindida proteolíticamente en los péptidos A₁ y A₂, el primero provoca la activación permanente de el adenilato-ciclasa, localizada en la membrana basolateral de las células del epitelio intestinal polarizado. 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 Adenosina-5'-monofosfato cíclico (AMPc). El AMPc dependiente de cinasa se activa, permitiendo la fosforilación de los canales de cloro ubicados en las membranas apicales de las células epiteliales. El principal canal de cloro que es activado por la toxina LT es el CFTR. El resultado es una hipersecreción del ion Cl⁻ de las células de las criptas hacia el lumen intestinal y la inhibición en la absorción de NaCl por las células de la punta de las vellosidades intestinales, fenómenos que generan la pérdida de agua por parte de las células intestinales. 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 una diarrea osmótica (Figura 3.3-A).^[22, 28, 87, 91, 103, 115, 144, 145, 146]

Aunque el incremento en los niveles intracelulares de AMPc y la consecuente pérdida de Cl⁻ representan los dos eventos que explican el clásico mecanismo de acción de la LT y la CT, la respuesta secretoria del hospedero también se debe a procesos tales como los siguientes:^[103, 115]

- * La promoción del transporte electrolítico y la movilidad intestinal, como resultado de la liberación de prostaglandinas PGE₁ y PGE₂ (productos procedentes de la inflamación) por parte de las células cebadas.
- * La desregulación de la movilidad intestinal y de la secreción iónica.
- * La liberación de interleucina 6 (IL-6), ante una eventual respuesta inflamatoria disparada por la LT.

* La disminución en la absorción de fluidos y electrolitos a partir del lumen intestinal, por influencia de la LT.

3.1.3 Enterotoxina termoestable (ST)

La ST es codificada por el gen *st*, es una toxina pequeña, monomérica, que contiene múltiples residuos de cisteína, algunos de los cuales se encuentran formando enlaces disulfuros haciendo a la toxina estable a temperaturas altas.^[100, 106]

ST es un péptido de bajo peso molecular de 1 – 6 kDa, no se inactivan por calentamiento, no son inmunogénicas en estado natural, no dializables, son de respuesta rápida y de corta duración. No son neutralizables por antitoxinas del cólera o LT, conservan su actividad cuando son tratadas por calor a 65 °C durante 30 minutos, a 80 °C por 20 minutos o a 100 °C por 15 minutos; pero son destruidos al tratarse a 121 °C / 15 minutos, no se desnaturalizan con solventes orgánicos, detergentes a pH 1, pero son inactivadas a pH 12, son resistentes a pronasa, lipasa y amilasa.^[100]

La toxina ST se ha dividido en dos grupos dependiendo de sus propiedades biológicas y fisiológicas tal como: enterotoxinas termoestables I y II no patógenas (STa activa en ratón lactante y cerdos recién nacidos y STb sólo es activa en cerdos lactantes y asa ligada en conejo).^[61, 87, 100, 106, 145, 146]

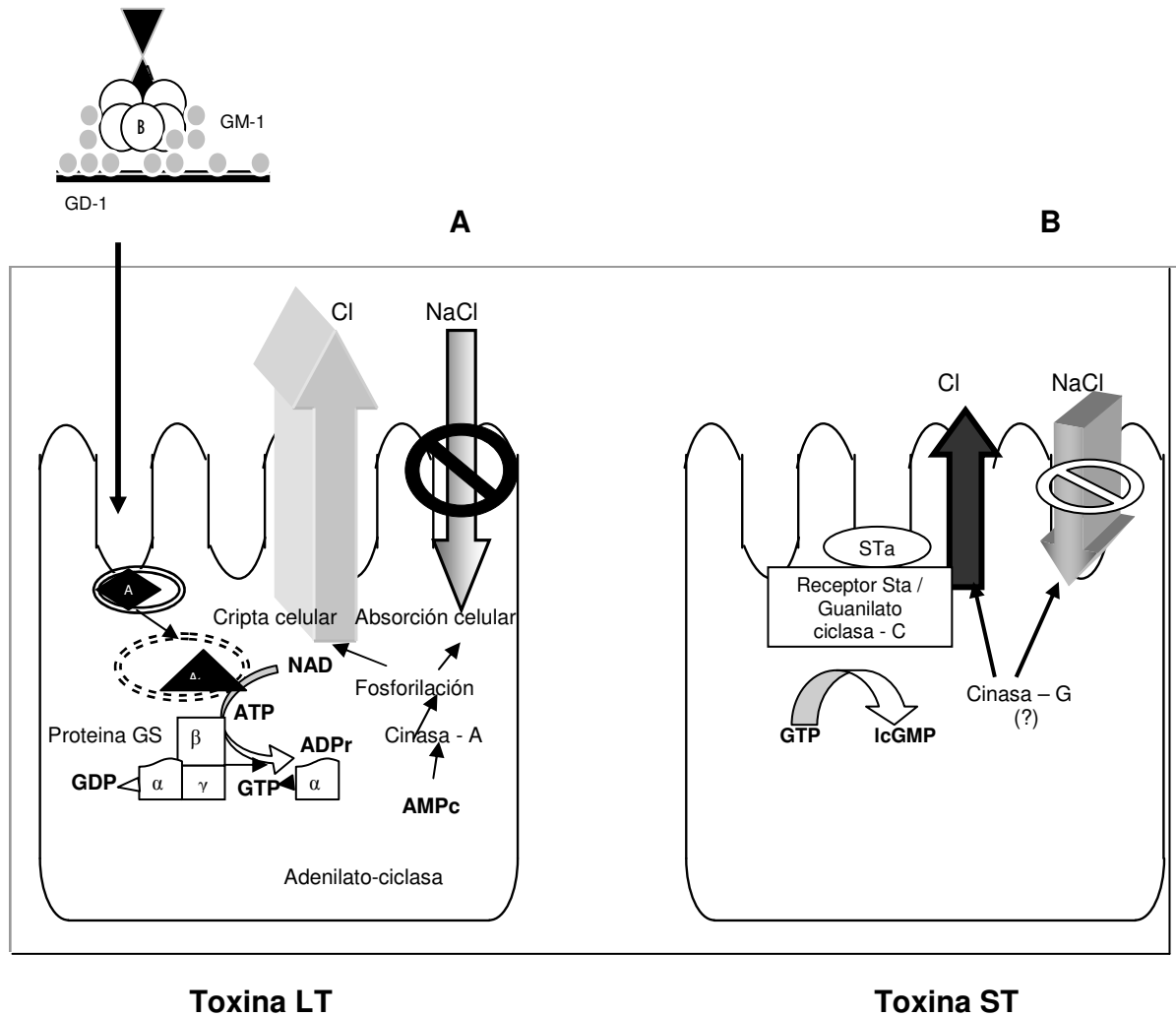
STa o STI es un oligopéptido de 18 – 19 aminoácidos con tres enlaces disulfuro con un peso molecular de 1.5 – 2 kDa, parcialmente estable al calor, soluble en metanol, no inmunogénica en estado natural, positiva en ratón lactante y lechones neonatos.^[61, 100]

La STb o STII es un péptido de 48 aminoácidos con dos enlaces disulfuro con un peso molecular de ~ 5 kDa, es estable al calor, insoluble en metanol y activa en intestinos ligados de lechones y asa en conejo. Esta toxina induce la secreción por un medio diferente al de las toxinas STa y CT, en este caso parece ser que se encuentra involucrada la prostaglandina PGE₂ secretada por la célula eucariote.^[61, 100]

3.1.3.1 Mecanismo de acción de ST

El receptor natural de ST es guanilato-ciclasa C, localizadas en la membrana apical de las células epiteliales del intestino, y la unión con su receptor da lugar a que se eleven los niveles de Guanosina-5'-monofosfato cíclico (GMPC). Tanto las cinasas dependientes de CMPC como el AMPc, activan los canales de cloro y la inhibición de absorción del NaCl. El incremento de éstos iones en el lumen conlleva a la salida pasiva de agua de las células a través de la vía paracelular, lo que clínicamente se manifiesta como diarrea acuosa (Figura 3.3-B).^[17, 22, 87, 103, 145, 146] Cabe destacar que, contra lo que generalmente se piensa, los cuadros entéricos debidos a ETEC incluyen mayoritariamente cepas productoras de ST (éstos llegan a alcanzar el 30 % del total); además, la STa actúa mucho más rápido que la LT, ya que ésta requiere de hasta 60 minutos para traslocarse y activar a la adenilato-ciclasa.^[103]

Figura 3.3
Mecanismos de acción de las toxinas LT y ST de ETEC.



Fuente: Nataro y Kaper.^[91]

3.2 Modo de transmisión, ETEC

Diversas investigaciones epidemiológicas han mostrado que la contaminación fecal de alimentos y agua son los vehículos más comunes de infección por ETEC. Sin embargo también se transmite de manera directa de persona a persona fecal y oral.^[103,108]

Estudios en voluntarios adultos a los cuales se les neutralizó el ácido del estomago mostraron que la dosis infectiva fue de 10^8 UFC (DuPont y col., 1971).^[22, 103]

3.3 Cuadro Clínico, ETEC

Diarrea aguda, dolor abdominal, retorcijones, de muy corta evolución (3-4 días), generalmente sin sangre, sin mucus, sin pus, en pocos casos se presenta fiebre y vómito, muy ocasionalmente se manifiesta como un cuadro semejante al cólera.^[86]

La diarrea producida por ETEC puede ser leve, breve y autolimitada pero también puede ser grave.^[103]

3.4 Frecuencia, ETEC

ETEC es importante en lactantes, principalmente en niños menores de dos años, y en particular durante los primeros seis meses de vida. La frecuencia de aislamiento de éste grupo patógeno de *E. coli* en niños con diarrea es de 10 – 30 %. En niños en edad escolar y en adultos puede ser asintomática y poco frecuente o producir la diarrea del viajero.^[103]

3.5 Diagnóstico de laboratorio, ETEC^[42, 103, 106]

- ▣ Asa ligada de conejo para toxina LT.
- ▣ Efecto citopático (citotónico) en células CHO, VERO y Y1 para LT.
- ▣ Ratón lactante para ST.
- ▣ RIA para ST.
- ▣ ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) inmunoensayo enzimático para LT y ST.
- ▣ Hibridación en fase sólida “*colony blot*” con sondas específicas LT y ST.
- ▣ PCR (ST y LT).

En el Cuadro 2.4 se muestran los métodos de diagnóstico.

3.6 Tratamiento, ETEC

- Rehidratación oral
- Cloranfenicol
- Oxalato de Bismuto
- Cotrimexazol

Científicos mexicanos desarrollan la primera vacuna comestible del mundo contra la diarrea del turista causada por ETEC mediante la introducción de un gen en las verduras

(lechuga, zanahoria y amaranto), al ser consumidas por el hombre inhibirán la enfermedad. La investigación está en la última fase que es probar la eficacia de las vacunas comestibles en roedores. Este proyecto está a cargo de Sergio Rosales Mendoza, quien encabeza los trabajos en el Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica (Ipicyt).^[132]

4 *E. coli* enterohemorrágica, productora de toxina Vero ó toxina semejante a Shiga (EHEC, VTEC ó TSEC)

En 1983 se presentaron dos brotes de importantes hallazgos; el primero fue realizado por Riley y col., reportaron 2 brotes de Colitis Hemorrágica (CH) en los estados de Oregon y Michigan en los Estados Unidos, los cuales estuvieron asociados a la ingestión de hamburguesas mal cocidas en una cadena de restaurantes de comida rápida. Los coprocultivos practicados a los pacientes redituaron el aislamiento de una –hasta entonces- rara cepa de *E. coli* perteneciente al serotipo O157:H7 no fermentadora de sorbitol.^[17, 55, 61, 105] La segunda observación "clave" fue efectuada por Karmali y col., en ese mismo año, en Ottawa y Canadá, encontraron el serotipo O157:H7 y a otros 3 serotipos (O26, O111 y O113) quienes reportaron casos esporádicos de Síndrome Urémico Hemolítico (SUH) en los que se detectaba la presencia de *E. coli* productora de citotoxina en la materia fecal de los enfermos. Condujeron al reconocimiento de un nuevo y creciente agente patógeno causante de un padecimiento renal e intestinal.^[22, 61, 146]

Konowalchuk y col, (1977) describieron filtrados de cultivos líquidos de ciertas cepas de *E. coli* que provocaban un sorpresivo e irreversible efecto citopático (efecto citotóxico) sobre las células Vero, por lo que se le llama verotoxina (VT), y a las cepas capaces de producirla se les determinó *E. coli verotoxigénicas* (VTEC).^[22, 61, 65, 77, 105]

Paralelamente O'brien y col., (1982) publicaron que en los extractos de ciertas cepas de *E. coli* resultaban citotóxicos para las células de cancer de cervix (HeLa) y que tal actividad podía ser neutralizada por anticuerpos dirigidos contra la toxina de *Shiga* (Stx), sintetizada por *Shigella dysenteriae* tipo 1; subsecuentemente, el mismo autor informó que varias cepas productoras de cuadros diarreicos liberaban una citotoxina muy similar a la Stx (SLT, de *Shiga-like toxin* ó toxina semejante a *Shiga*) y que, inclusive, una de dichas cepas coincidía plenamente con la reportada por Konowalchuk, la cual sintetizaba toxina Vero.^[14, 61, 103]

En 1987 O'brien y Colmes hicieron notar que la SLT y VT eran en realidad una misma, que la nomenclatura de VT1 es equivalente a SLT-I y VT2 es sinónimo con SLT-II.^[21] Posteriormente se propuso el término de *E. coli enterohemorrágica* (ECEH) por Levine en éste mismo año.^[22, 42]

Finalmente, Karmali y col., concretaron una publicación anual muy memorable, en la cual subrayaron que la SLT/VT eran el factor de virulencia común entre CH y el SUH, responsable del daño, tanto del tejido renal como del intestinal.^[12, 39]

Después de reconocerse que el serotipo O157:H7 era la causa de CH, los Centros de Control y Prevención de Enfermedades (CDC) de E.U.A. revisaron más de 3,000 cepas de *E. coli* entre 1973 y 1983 y sólo encontraron un aislamiento de dicho microorganismo.^[39]

Algo similar ocurrió de 1978 a 1982 en el Reino Unido y en Canadá. En consecuencia, parece ser que la actual presencia del serotipo O157:H7 obedeció a un genuino incremento de su incidencia y no a una simple omisión anterior a 1982. Sin embargo, el SUH ya era una entidad clínica conocida antes de ese año; de hecho, desde su descripción inicial en 1955, en los numerosos brotes se había propuesto la hipótesis de que su origen era viral o bacteriano; más tarde, aunque las cepas de *Shigella dysenteriae*

tipo 1 productoras de Stx se habían asociado al padecimiento, lo cierto es que en muchos brotes epidémicos, los coprocultivos no revelaban su presencia sino la de *E. coli*, de la cual sólo se consideraba que desempeñaba el papel benéfico que se le reconoce en la flora intestinal. El total desconocimiento de la realidad duró hasta que Kibel y Barnard, (1968) sugirieron que una cepa mutante de *E. coli*, infectada por un bacteriófago, podría ser la responsable de la enfermedad en África. Posteriormente, en la década de los 80's, se demostró que la Stx era codificada por un bacteriófago de *E. coli* y que más de 100 diferentes serotipos de esta especie podían sintetizarla.^[39]

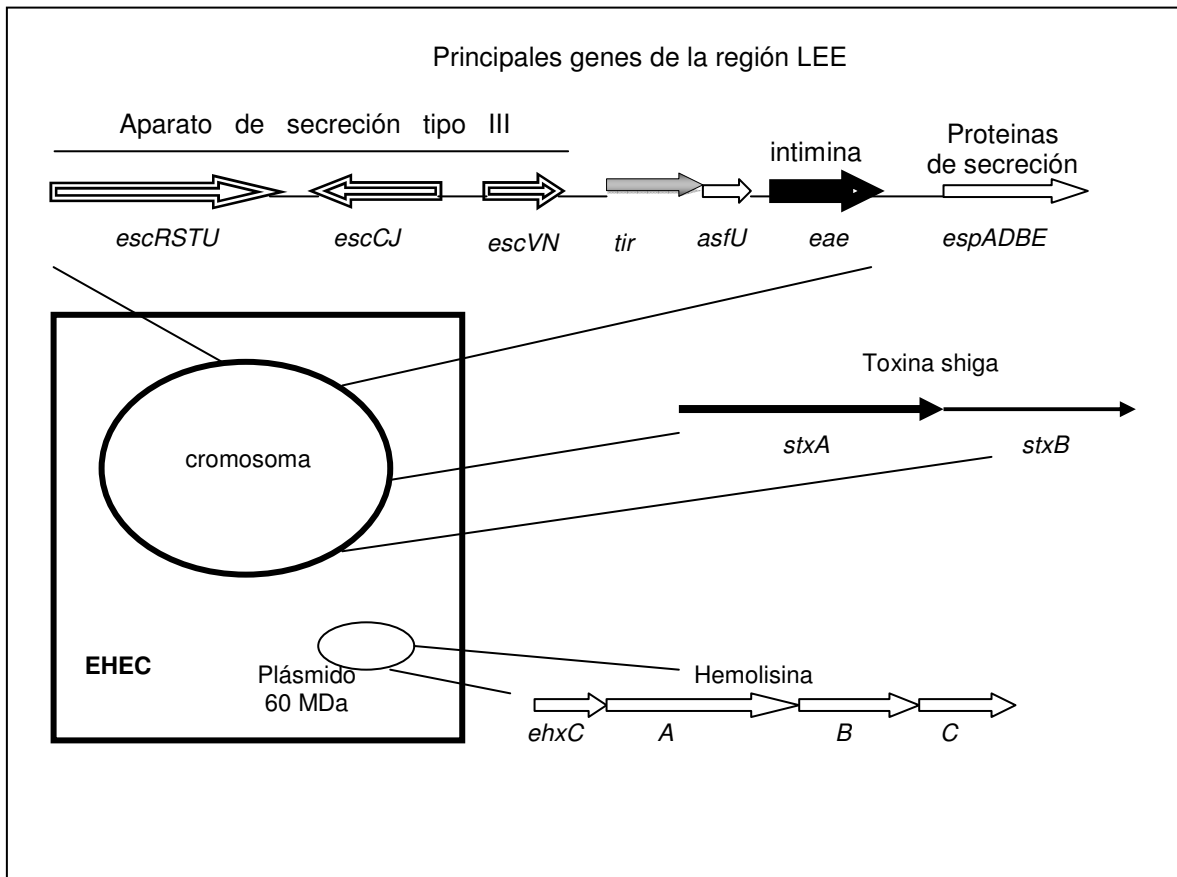
4.1 Factores de virulencia, (EHEC, TSEC ó VTEC)

- El gen *eaeA* cromosomal – Codifica la proteína *intimina*_{O157} que corresponde a una proteína de membrana externa (OMP) de 97 kDa, que al unirse a sus receptores en la superficie de las células eucariotes, funge como soporte de los filamentos de actina. Es la única adhesina de *E. coli* O157:H7 cuyo papel *in vivo* se ha comprobado plenamente en modelos animales.^[12, 36, 108] Causando la lesión “Adherencia y Esfacelamiento” (A/E) codificada en un cromosoma de 35,480-bp que se localizan en el locus de esfacelamiento del enterocito (LEE), el cual está en una isla de patogenicidad homóloga a EPEC (Figura 4.1).^[12, 36, 37, 67, 57, 73, 83]
- *Iha* - Es una proteína involucrada en la adherencia y está codificada dentro de una isla cromosómica adquirida por *E. coli* O157:H7.^[36]
- *Enterohemolisina* ó *hemolisina* (*Hly*) – Es una toxina citolítica, se expresa en casi todas las cepas O157:H7 y está ampliamente distribuida entre las cepas de EHEC no-O157.^[12, 83, 102, 108]
- *pO157* - Es una proteína perteneciente a citolisinas formadoras de poros codificada en un plásmido de 60 MDa. Su rol en la patogénesis del SUH no está claro pero en los pacientes que lo padecen se encuentran anticuerpos para esta proteína,^[10, 90] los *LPS* de las cepas O157 mejoran la citotoxicidad de la Stx sobre las células endoteliales de los vasos humanos.^[12, 108]
- *SLT* o *VT* – Están relacionadas estructural e inmunológicamente con Stx producida por *Shigella dysenteriae* tipo 1 “Toxina similar a la de Shiga” (Shiga-like-toxin ó SLT). Han sido caracterizados 3 tipos de verotoxinas, antigénicamente distintas VT1 (o SLT-I), VT2 (o SLT-II) y varias variantes de VT2, tales como VT2vha, VT2vhb, VT2vp1 y VT2vp2.^[14, 26, 83] Las verotoxinas son producidas por cepas humanas y bovinas asociadas con CH y SUH en humanos, mientras que VT2v es responsable de la enfermedad edematosa en cerdos.^[14, 60, 83, 102, 111]

Se han descrito otros dos factores (Figura 4.1) que contribuyen a la patogenicidad de este grupo.^[22, 37, 42, 83]

1. El gen *hlyA*, presente en un plásmido de 60 MDa, el cual codifica para hemolisinas.
2. Consiste en tres dominios que se encuentran en la isla de patogenicidad LEE homologos a EPEC:
 - (i) Codifica para la intimina_{O127} y el receptor Tir (es homóloga Hp90 para EHEC).
 - (ii) Codifica para sistema de secreción III.
 - (iii) Corresponde a las proteínas de secreción polipéptidas EspA (25 kDa), EspB (37 kDa), EspD (39.5 kDa) y EspE.

Figura 4.1
Genes involucrados en la patogénesis de EHEC.



Fuente: Nataro y Kaper.^[91]

La proteína intimina_{O157} (gen *eaeA*) forma parte de OMP, su receptor Tir (Hp90), el sistema de secreción de tipo III y las proteínas de secreción EspA (importante para el

contacto inicial con la célula blanco), EspB y EspD, inician la traducción de señales intracelulares con liberación de inositol trifosfato y fosforilación de cadenas semejantes a miosina. La fosforilación de tirosina de ciertas proteínas de la membrana celular que se ha estudiado en EPEC no se ha comprobado en EHEC. Existe una heterogeneidad en la secuencia de intimina entre EPEC y EHEC y aún dentro de las EHEC, que difieren en su extremo C-terminal. Dado que esta proteína determina un estrecho contacto con las células epiteliales, esas diversidades podrían ser responsables de las diferencias en severidad de los síntomas que cada cepa ocasiona. Esta proteína no sería esencial para la virulencia ya que existen cepas aisladas de pacientes que no contienen *eaeA*, pero que mantienen un alto nivel de adherencia, y que probablemente contarían con factores de patogenicidad adicionales.^[36]

EspE presenta homología con la proteína Tir, descrita para EPEC, que una vez traslocada al citoplasma de la célula epitelial es fosforilada en tirosina e incorporada en la membrana citoplásmica, dando origen a la proteína inicialmente descrita como proteína celular Hp90, que corresponde a Tir.^[36, 86] Esto implica que la bacteria inserta su propio receptor en la superficie de la célula epitelial, a la cual se adhiere para disparar los eventos que finalmente conducen a la destrucción de las microvellosidades.

EspP es una proteína que puede ser agrupada dentro de la familia de autotransportadores tipo V, es una serina proteasa extracelular, también codificada en pO157, que podría ser otro factor de virulencia. Es capaz de clivar pepsina y factor V de coagulación y es citotóxica para células Vero. Se ha sugerido que podría exacerbar el proceso hemorrágico pero no es considerada un factor de virulencia universal de TSEC.^[36, 134]

La enterotoxina EAST1 podría contribuir a la patogénesis de la diarrea acuosa de los estudios tempranos de la infección por TSEC. El conjunto de estos factores de virulencia le permiten a EHEC colonizar el intestino humano y adherirse firmemente a la mucosa intestinal, dañar las microvellosidades y liberar las citotoxinas.^[36]

4.1.1 Características generales y biología molecular de SLT-I (VT-1) y SLT-II (VT-2)

Las VT-1/STL-I están constituidas por un monómero de subunidad-A de ~ 32 kDa, es una fracción de actividad enzimática y se encuentra unida no covalentemente con un pentámero de subunidades-B cada una de ~ 7.7 kDa. Análisis cristalográficos de rayos-X y estudios de resolución magnética nuclear demuestran la forma de pentámero con cadenas terminales carboxilo, subunidad-A insertada dentro del poro central de la subunidades-B. Inmunológicamente es neutralizada por anticuerpos anti-*shiga*.^[83, 101, 108, 111]

VT-2/STL-II están compuestas por una subunidad A y cinco B, con un peso molecular de 35 y 10.7 kDa respectivamente.^[108]

4.1.1.1 Similitud entre VT-1 y VT-2

Éstas VTs provocan actividades biológicas muy semejantes como:^[83, 108]

- a) Acumulación de fluidos en asa de conejo y cuando son administradas por vía intraperitoneal a ratones provocan parálisis de miembros inferiores y en ocasiones la muerte.
- b) Codificadas a nivel de bacteriofagos (H19A y H19B).
- c) Enterotóxicas en asa ligada de conejo.
- d) Neurotóxicas en rata.
- e) Citotóxicas en cultivo celular.
- f) Tienen como receptor celular glicolípidos “*globotriaosyl-ceramide*” globotriaosil ceramida (Gb₃) y “*globotetraosyl-ceramide*” globotetraosil ceramida (Gb₄) .

4.1.1.2 Diferencias entre la actividad biológica de VT-1 y VT-2^[83, 100, 08]

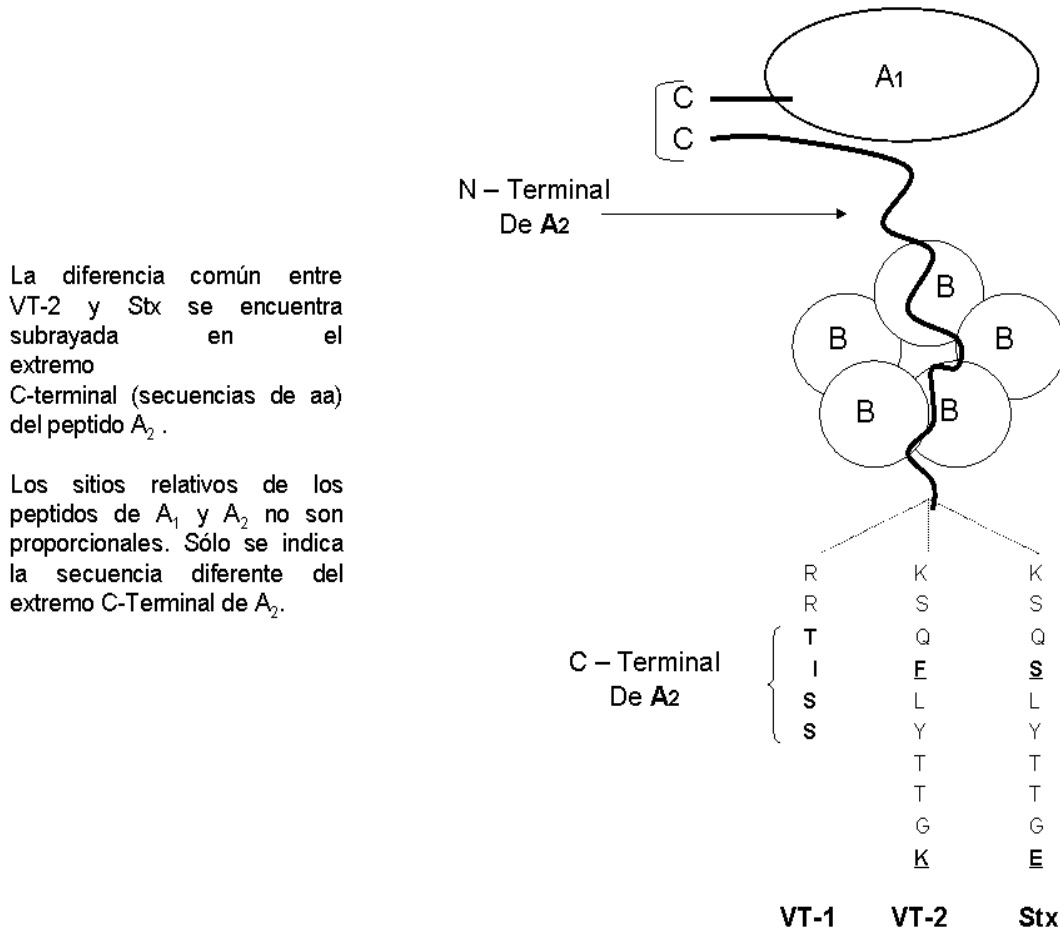
- ☼ VT-1 (1×10^9 cells/mg) es mil veces más activa que VT-2 ($0.75\text{-}5 \times 10^9$ cells/mg) sobre células vero.
- ☼ La DL₅₀ de VT-2 (0.5-2 ng) en ratones adultos CD-1 por inoculación parenteral es mil veces más tóxica que la VT-1 de (~ 400 ng).
- ☼ La DL₅₀ de VT-2 en conejos es 100 veces mayor que la de VT-1.
- ☼ La diferencia más importante se establece en la respuesta a la inyección de las toxinas en el modelo de asa ligada de intestino de conejos. VT-2 produce una hemorragia franca y VT-1 ocasiona una diarrea moderada sin sangre.
- ☼ Estas diferencias de toxigenicidad también evidencian células renales humanas que son tratadas con VT-1 y VT-2 purificadas; en la que VT-2 es más tóxica.^[83]

Una posible explicación es que los receptores Gb₃ de VT-2 son más viables que VT-1 para poder llevar a cabo la endocitosis.^[83] Debido a que VT-1 en su extremo C-terminal de la subunidad A₂ tiene sólo 4 aminoácidos; en VT-2 y Stx tienen diferente secuencia de aa en el péptido A₂ de la toxina (Figura 4.2). Tal diferencia en A₂ afecta al pentamero-B en la interacción con el receptor y la eficiencia de traslocación de proteínas.^[83]

- ☼ El punto isoeléctrico de VT-1 es de 7.2 mientras que para VT-2 tiene valores que van de 4.1 a 6.5
- ☼ Al comparar VT-1 y VT-2 en sus fracciones A y B se observó una homología del 57% y 60% en sus secuencias de nucleótidos y un 55% y 57% en secuencias de aminoácidos respectivamente.
- ☼ VT-1 requiere de medios deficientes de hierro y se obtiene del sonicado de la masa bacteriana a partir de un cultivo de fase estacionaria, para VT-2 no son adecuados los medios de cultivo que contengan hierro y la aparición de la toxina se da en la fase logarítmica.
- ☼ Diversas VT-2 tales como VT2vha, VT2vhb, VT2vp1 y VT2vp2,^[14, 26] son responsables de la enfermedad edematosa en cerdos.^[12, 60, 102, 111]
- ☼ VT-2v es neutralizada con antisuero contra STL-II, pero no para STL-I.
- ☼ La VT-2v es más citotóxica en células Vero que en HeLa.

- ☼ La VT-2v con estas características se le ha denominado *toxina shiga – like* variante (STLv).

Figura 4.2
Esquema de la estructura VT-1, VT-2 y Stx con sus diferentes extremos C-terminales (aminoácidos) de la subunidad A₂.



Fuente : Melton C.^[83]

4.1.1.3 Mecanismo de acción de VT

Las subunidades-B se unen a receptores específicos tal como (Gb₃ o CD77);^[48, 83] en animales la VT2v tiene como receptor a Gb₄. El receptor Gb₃ ó Gb₄ es expresado en dominios de membranas enriquecidas con glicolípidos, expresado en diferentes células epiteliales y endoteliales de humanos y animales.^[83, 111]

Se sugiere un sinergismo entre la subunidad-A y subunidad-B en el efecto citotóxico en las células diana. No obstante estudios recientes muestran que la subunidad-B tiene

efectos biológicos en células diana mediante un mecanismo de señales intracelulares sobre la unión de Gb₃ que conduce a apoptosis.^[60, 83, 111]

Una vez unida la VT a sus receptores es internalizada a la célula por la vía de endocitosis mediada por receptor a través de vesículas cubiertas por clatrina, segundos más tarde de ser formadas se despojan de su cubierta siendo así capaz de fusionarse con endosomas tempranos ó endosomas tardíos, dirigiendolos a la red de *trans*-Golgi del aparato de Golgi y de ahí al retículo endoplasmico (RE).^[3, 71, 79, 83, 101] Cabe mencionar que se ha observado que la VT también puede ser transportada al aparato de Golgi mediante rutas independientes de clatrina.^[71, 79, 83, 111]

Durante su transporte la subunidad-A es cortada por el recubrimiento de serina-proteasas, localizadas en el complejo de Golgi. El resultado de la fragmentación de la subunidad-A da origen a dos fragmentos A₁ de (~28 kDa) + A₂ de (~ 4 kDa), que permanecen asociados por puentes disulfuro. Una vez en RE el puente disulfuro es reducido, y el fragmento A₁ es traslocado a través de la membrana del RE hacia el citoplasma mediante mecanismos que aún no han sido descritos.^[83, 101, 111]

El fragmento A₁ posee actividad N-glicosidasa y actúa como catalizador cortando un residuo de adenina del RNA ribosómico 28S, componente de la subunidad 60S del ribosoma, que inhibe el paso de elongación peptídica dependiente del factor-1 aminoacyl-RNAt.^[12, 60, 101, 111] Así la citotoxicidad se debe a la inhibición de síntesis proteica por la subunidad-A (Figura 4.3). También se ha reportado que existen señales intracelulares generadas por las VT, que inducen remodelación del citoesqueleto.^[60, 71, 83] El citoesqueleto depende de tres tipos de filamentos proteicos: filamentos de actina (microfilamentos), microtúbulos y filamentos intermedios.^[3]

Este mecanismo se ha observado con células del endotelio renal, líneas celulares Vero, HeLa y sobre células que posean los receptores Gb₃ y Gb₄.^[22, 83]

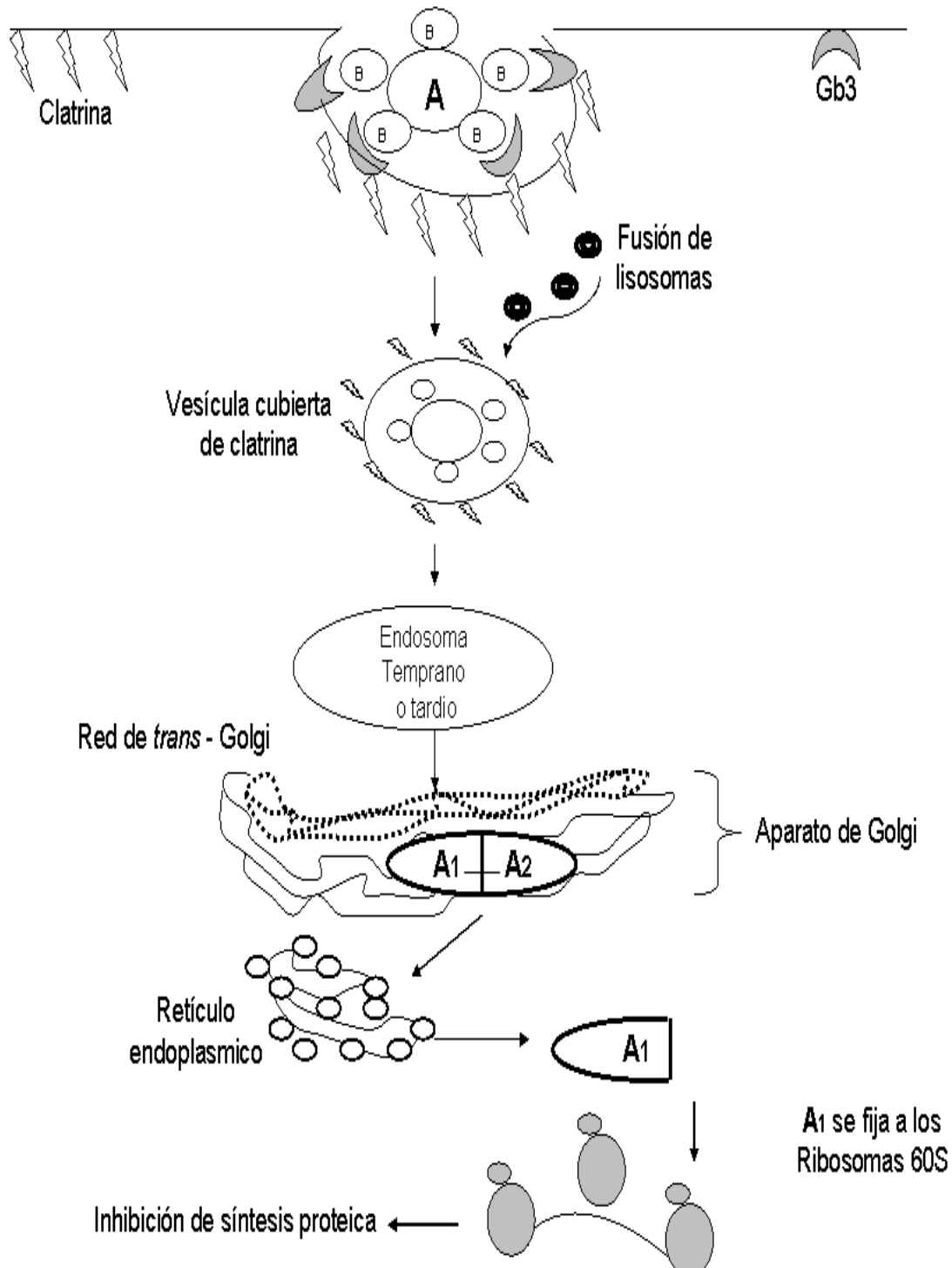
4.2 Clasificación de EHEC en función de sus factores de patogenicidad

Actualmente hay al menos dos clasificaciones del grupo EHEC.^[105]

♦ *Cepas típicas* cuando tienen el fago, el plásmido de 60 MDa y presentan el fenómeno de la lesión A/E.

♦ *Cepas atípicas* cuando no se produce la lesión A/E y pueden presentar o no el plásmido de 60 MDa.

Figura 4.3
Mecanismo de acción de VT.



Modificado de: Kirsén S y Stephen J.^[71, 119]

4.3 Clasificación de EHEC en función del serotipo^[105]

- a) Cepas *E. coli* O157:H7. Este serotipo no fermenta el D-sorbitol ni la ramnosa y no produce β -glucuronidasa.
- b) Cepas *no-O157:H7*. Pueden ser sorbitol positivo, y sus serotipos son diferentes del O157:H7. Actualmente hay más de 200 serotipos, como se muestra en (Cuadro 2.3).

4.4 Signos y síntomas, EHEC

Desde el punto de vista histopatológico, la infección incluye hemorragia y edema en la lámina propia; sin embargo, estos mismos signos también aparecen en el colon ascendente y transversal, originando una imagen específica en las radiografías obtenidas a partir de los enemas con bario; además, las biopsias colónicas de numerosos pacientes muestran necrosis focal e infiltración de polimorfonucleares (PMNs).^[103]

Una vez que ha atravesado el estómago, EHEC coloniza las regiones terminales del intestino en donde permanece limitada a la superficie de la mucosa (sin invadir de forma sistémica). Dentro del colon, los microorganismos se adhieren a las células epiteliales y se multiplican localmente, causando una clásica lesión estructural en la membrana de las células epiteliales superficiales que consiste en la ocurrencia del fenotipo “adherencia-esfacelamiento” (A/E) que EHEC evidencia sobre la membrana celular del epitelio implicado, involucrando cambios que incluyen la acumulación de actina polimerizada, actinina y miosina, por debajo de las bacterias adheridas. La producción de las citotoxinas Stx promueven la inflamación de la mucosa colónica, dando como resultado los exudados purulentos y la presencia de sangre en las heces fecales.^[103]

El período de incubación de las diarreas fluctúa entre 3 y 4 días, aunque existen reportes aislados que citan 1 a 8 días.

El síntoma inicial es la diarrea no sanguinolenta, si bien ésta puede ser precedida de dolores y calambres abdominales, así como de una fiebre de corta duración acompañada por vómito. Uno o dos días después, el paciente suele experimentar la aparición de sangre en las evacuaciones y un dolor abdominal más intenso; a partir de esa etapa, la patología llega a prolongarse hasta por 4 a 10 días.^[111]

Es importante comentar que la histopatología A/E asociada a EHEC sólo se ha observado en cerdos gnotobióticos, en conejos infantiles y en cultivos de células epiteliales, infectados experimentalmente con *E. coli* O157:H7; es decir, aún no se ha comprobado la aparición de dicho fenotipo en especímenes clínicos humanos relacionados con EHEC, debido probablemente a que las biopsias del colon se obtienen en la fase tardía del padecimiento y, de acuerdo con lo que se conoce, las lesiones A/E sólo tienen lugar durante las fases tempranas, antes de que ocurran los daños asociados a la Stx.^[103]

4.5 Modo de transmisión, EHEC

- Zoonosis (de los animales infectados al ser humano).
- Por ingestión de alimentos o bebidas contaminados (carne cruda o mal cocida; leche bronca o agua).
- De persona a persona (por vía oral-fecal) debido a los manipuladores de alimentos, ya que diversos brotes de diarrea se han originado en guarderías, escuelas, asilos de ancianos, etc.

4.6 Reservorio, EHEC

EHEC es un agente zoonótico, que tiene un reservorio animal amplio, entre ellos ganado vacuno, borregos, caballos, perros, carne de puerco, carnero (Nataro), venado (Keene, W.), pollo, mariscos; constituyendo el ganado bovino el reservorio de mayor impacto epidemiológico, habita en el intestino de estos animales, sin ocasionarles trastorno alguno. Por esta razón la mayoría de los brotes están asociados al consumo de productos cárnicos contaminados e insuficientemente cocidos. Además de agua contaminada, leche bronca, lechuga (Ackers, M-L), mayonesa (Griffin), jugo de manzana no pasteurizado (McCarthy) y salami fermentado (CDC), vegetales fertilizados con material orgánico puede ser fuentes de la infección entre otros (Nataro).^[103]

4.7 Cuadro clínico, EHEC

Varía desde diarrea leve (asintomática, sin sangrado), CH con dolor abdominal intenso, púrpura trombocitopénica trombótica (PTT), diarrea sanguinolenta y fiebre escasa o nula, vómitos. Periodo de incubación de 3 a 4 días, el cuadro se puede prolongar por 4 a 10 días. El SUH se asocia a este microorganismo, esta enfermedad puede producir insuficiencia renal aguda.^[14, 61, 102]

El cuadro clínico causado por las cepas no-O157 se caracteriza por diarrea acuosa con dolor abdominal y CH.^[105]

4.7.1 Cuadro clínico de CH y SUH

La enfermedad de Colitis Hemorrágica se caracterizaba por severos dolores y calambres abdominales, acompañados por diarrea acuosa y seguidos por evacuaciones muy sanguinolentas y una fiebre ligera o inexistente.^[22, 61, 103, 105, 146]

Síndrome Urémico Hemolítico es caracterizado por daño renal agudo que puede requerirse diálisis e incluso trasplante, trombocitopenia, anemia hemolítica microangiopática y predecida por diarrea con sangre.^[22, 61] Estas alteraciones se presentan debido a la afección que sufren las células endoteliales a través de la coagulación intracelular, depósitos de fibrina y disminución de la velocidad del flujo del riñón.^[108]

4.8 Frecuencia, EHEC

Historicamente O157:H7 es un serotipo raramente aislado de humanos y animales. Datos de un estudio multicéntrico nacional de 2 años de duración realizado en Estados Unidos, reveló que cuando se busca de rutina *E. coli* O157:H7 en coprocultivos, éste se asocia más frecuentemente que *Shigella*. En este estudio se observó una frecuencia del 7.8%. Cuando se aísla *E. coli* O157:H7 en carne de bovino su frecuencia de aislamiento no es mayor del 2%.^[108]

Las cepas no-O157:H7 tienen una frecuencia de aislamiento cuatro veces más que las O157:H7. Estas son capaces de causar brotes o casos aislados de diarrea y en ocasiones no se logra establecer la fuente de contaminación.^[105]

En CH se diferencia de la clásica disentería en que generalmente cursa en ausencia de fiebre y puede producirse grandes complicaciones ya que aproximadamente el 10% de los pacientes terminan desarrollando SUH.^[120]

El SUH es la más seria complicación causada por infección de VTEC, es asociado significativamente con un largo periodo de morbilidad, con una disfunción renal en los pacientes de 40% y una mortalidad estimada de 3 a 5 %. Este síndrome se presenta con mayor frecuencia en niños, con una incidencia en Norte-América de 2 a 3 casos por 100,000 niños menores de 5 años.^[120]

Pero lo anterior entra en contraste por los casos reportados en Argentina. Aquí hubo una incidencia de 1 a 2 diagnósticos por cada 100,000 por año, en un bajo riesgo de un grupo de 20-49 años de edad. Con una incidencia de 8.3 / 100,000 niños entre 1-9 años de edad.^[120]

4.9 Diagnóstico, EHEC

El diagnóstico debe estar dirigido a la detección de todas las *E. coli* productoras de citotoxinas, ver el (Cuadro 2.4). Los métodos actualmente disponibles y utilizados para detectar este patógeno en muestras clínicas son: presuntivos y confirmativos.^[36, 105]

1.4.9.1 Métodos de diagnóstico presuntivos, EHEC^[36, 105]

a) Aislamiento de EHEC en deposiciones utilizando el medio de cultivo selectivo MacConkey Sorbitol (SMAC), el cual no fermenta sorbitol. Este análisis bioquímico presuntivo es recomendado para aislar *E. coli* O157:H7. La sensibilidad del cultivo está limitada por la capacidad del microbiólogo para reconocer las colonias, lo que puede resultar difícil si las cepas enterohemorrágicas representan menos del 1% del total de la flora. Para el diagnóstico definitivo de EHEC, debe confirmarse la producción de citotoxina ya que no todas las *E. coli* O157 la producen.

b) Está disponible un agar para detectar cepas que expresan la enterohemolisina, que logra detectar hasta un 90% de cepas de *E. coli* productoras de citotoxinas (Stxs). Las colonias sospechosas deben ser confirmadas por métodos bioquímicos convencionales, estudiadas para la producción de Stxs y luego serotipificadas.

c) La técnica de cultivo utilizando separación inmunomagnética para *E. coli* O157 ha demostrado ser altamente sensible, aún mejor que técnicas moleculares. Su costo es mayor que los cultivos tradicionales. Para la serotipificación de los aislamientos, existen numerosos reactivos comerciales que identifican los antígenos O y H a partir de las colonias aisladas y entre ellos los equipos con técnicas de látex han tenido buena correlación con el método estándar del CDC.

4.9.2 Métodos de diagnóstico confirmativos, EHEC

a) Identificación de genes de virulencia.^[36]

- *Hibridación con sondas genéticas* - Técnicas que identifican los genes de virulencia descritos para EHEC, su sensibilidad y especificidad no es adecuada si se trabaja directamente con deposiciones. Las sondas genéticas son para la investigación e involucra el uso de una sofisticada tecnología de DNA recombinante.

Sondas EHEC

Sonda para el gen *hly*
 Sonda para *stx1* y *stx2*
 Sonda *eae*
 Sonda *pO157*

- *Reacción de polimerasa en cadena (PCR)* - Orientada a la amplificación de genes de virulencia de EHEC también a partir de colonias.

- *PCR múltiples* - Es una modificación de la técnica básica. Fue desarrollada para la detección rápida de genes que codifican *stx1*, *stx2*, *eae* y *pO157*. Las técnicas de PCR son altamente sensibles y específicas cuando se usan sobre colonias, pero el análisis directo de la muestra de heces tiene los mismos problemas de fondo y factores inhibitorios vistos para otras aplicaciones de la PCR en este material. La interpretación de la información es complicada por la posibilidad de que el perfil genotípico resulte de la suma de genotipos de más de un organismo presente en las heces.

b) Identificación de citotoxinas (Stxs).^[36]

Existen diversas posibilidades para identificar presencia de citotoxinas ya sea directamente en la muestra de heces o en colonias, con excelentes sensibilidad y especificidad.

(i) *Ensayo de citotoxicidad en cultivo de tejidos* - Es una técnica laboriosa y que requiere tiempo e infraestructura que no es accesible a la mayoría de los laboratorios de microbiología, pero se considera el estándar de oro para la detección de Stx. Se utilizan las líneas celulares Vero y HeLa, y es de sensibilidad elevada. La especificidad se logra aplicando la neutralización con antisueros policlonales o anticuerpos monoclonales. Tiene el inconveniente de ser lenta, cara y poco práctica para “screening”. Es útil para especímenes clínicos pero no para alimentos.

(ii) *Técnica inmunoenzimática (ELISA/EIA) (PREMIER EHEC)* - Es un método para detección de cepas de *E. coli* que están expresando la producción de las citotoxinas, usando anticuerpos específicos y un sistema de detección. A pesar de las recomendaciones del fabricante, sólo debe utilizarse en colonias aisladas de *E. coli* o bien en un arrastrado del cultivo primario en agar MacConkey. Sus resultados no son confiables cuando se trabaja directamente con deposiciones, con un porcentaje no aceptable de falsos positivos. El ensayo tiene buena especificidad y sensibilidad, aunque menor que los cultivos celulares. Es rápido y simple, pero costoso. Es útil para especímenes clínicos y para alimentos después de una etapa de enriquecimiento.

(iii) *Detección de anticuerpos* - La detección de la respuesta inmune provee una valiosa información para determinar la etiología de la infección especialmente cuando el paciente acude tardíamente a la consulta. A menos que se cuente con la información sobre los valores de anticuerpos en la población sana, los resultados obtenidos sobre una única muestra del paciente deben ser interpretados con precaución. Idealmente deben ser obtenidas dos muestras de suero, una en fase aguda y otra en fase convaleciente.

Detección de genes stx.

- PCR: es rápido, sensible y específico. Por su sensibilidad es una de las técnicas recomendadas para tamizaje, pero requiere el procesamiento, en general, de todo tipo de muestras, por la presencia de inhibidores.

- Hibridación con sondas genéticas: es lenta, sensible y específica.

c) Entre los métodos de subtipificación para *E. coli* O157:H7 y no-O157 se pueden citar los siguientes:^[36]

1. Análisis del perfil plasmídico: Se basa en la extracción del DNA plasmídico y la separación en base a su tamaño, por electroforesis en gel de agarosa. Otra modalidad es realizar los perfiles de los fragmentos de restricción obtenidos por digestión enzimática de los plásmidos. Fue una de las primeras técnicas de subtipificación aplicadas al estudio de brotes por *E. coli* O157:H7. Publicaciones recientes han demostrado que esta metodología no provee una adecuada discriminación entre cepas STEC que pueda ser aplicada con fines epidemiológicos.

2. Bacteriófago ÷ - RFLP (análisis del polimorfismo de los fragmentos de restricción): Se basa en la hibridación por "Southern blot" del DNA bacteriano digerido con enzimas de restricción y la sonda conteniendo el DNA del fago ÷ marcada con P³². Esta técnica ha demostrado ser útil, con gran poder discriminatorio, pero tiene la desventaja de ser muy laboriosa y utilizar reactivos marcados radioactivamente.

3. Ribotipificación: Es una técnica de RFLP que se basa en la hibridación por "Southern blot" del DNA bacteriano digerido con enzimas de restricción y la sonda para rRNA 16S y 23S marcada con dUTPdioxigenina. Esta técnica es laboriosa y no posee poder discriminatorio entre los aislamientos de *E. coli* O157:H7.

4. Electroforesis en campo pulsado (PFGE): Es una técnica de RFLP que se basa en el uso de enzimas de restricción de corte poco frecuente que generan un número

relativamente pequeño de fragmentos grandes de DNA. La separación de grandes fragmentos de DNA se logra por la reorientación molecular inducida por cambios periódicos en el campo eléctrico. La duración del campo eléctrico alternado determina el rango de tamaño del DNA que puede ser separado en el gel de agarosa. Es aplicada con fines epidemiológicos por su sensibilidad, ya que estudia el genoma en su totalidad, por su reproducibilidad y por su alto índice discriminatorio cercano al valor ideal de 1.

5. Tipificación de stx: Se realiza por PCR para la detección de los genes que codifican para los distintos tipos de toxina y por PCR- RFLP para la identificación de variantes. El número limitado de tipos de toxina *Shiga*, combinado con la prevalencia de un determinado tipo de Stx según el área geográfica, limita la utilidad de este método por sí solo. Sin embargo, en combinación con otras técnicas de subtipificación, puede constituir un marcador importante.

6. Fagotipificación: Se basa en la aplicación de un panel de fagos líticos al aislamiento bacteriano. Cada patrón de lisis obtenido determinará el fagotipo de la cepa. Esta técnica, anterior a los métodos moleculares de subtipificación, es fácil de realizar y permite procesar un gran número de aislamientos en un tiempo corto. Esto hace que se utilice como técnica de subtipificación inicial seguida por métodos más sensibles que aporten mayor poder discriminatorio.

4.10 Tratamiento, EHEC

Corrección del trastorno hidroeléctrico y manejo de las complicaciones. El uso de los antibióticos es controvertido. Pero se sugiere educar a la población, en cuanto a reservorio y a los problemas de contaminación cruzada.^[86, 120]

De hecho, se ha publicado que los antibióticos pueden empeorar el curso clínico de la enfermedad a través de dos mecanismos:^[86, 120]

- La eliminación de la flora intestinal que conduciría a una sobrepoblación por parte del agente causal.
- La destrucción o el daño sub-letal de los microorganismos infectantes, con la subsecuente liberación de las toxinas Stx.

Sin embargo, continúa pensándose que, en realidad, aún no se cuenta con un tratamiento específico para combatir las infecciones causadas por *E. coli* O157:H7, salvo la terapia de soporte (restitución del agua y los electrolitos perdidos) y el control de las complicaciones tales como la anemia y el daño renal.^[103]

Estudios de naturaleza e incidencia de protección inmunitaria a través de infecciones por VTEC son vitales para la sustitución de modelos por enfermedad endémica y epidémica asociado con los organismos por la identificación de riesgo y beneficio de inmunización. El tiempo limita los procesos que tienden a desarrollar los ensayos de sueros con anticuerpos de VTs, antígeno LPS y factores de colonización (vacunas).^[65]

Se ha demostrado que la mayor parte de los aislamientos de *E. coli* O157:H7 son uniformemente susceptibles *in vitro* a la ampicilina, carbenicilina, cefalotina, cloranfenicol, gentamicina, kanamicina, ácido nalidíxico, norfloxacin, sulfisoxazol, tetraciclina,

ticarcilina, tobramicina, trimetoprim y trimetoprim-sulfametoxazol (TMP-SMX). Por el contrario, las mismas cepas han resultado resistentes a eritromicina, metronidazol, vancomicina y, ocasionalmente, a tetraciclina.^[103]

5 *E. coli* enteroinvasiva (EIEC)

DuPont y col., (1971) describieron algunas cepas *E. coli* enteroinvasivas^[37, 68, 108] que causan disentería en forma de enfermedad diarreica en voluntarios adultos. Estas cepas son serológicamente distintas a ETEC y EPEC (Cuadro 2.3). Formal y col., (1978) describieron la relación estrecha entre EIEC y *Shigella* no se limita a su comportamiento bioquímico, sino que también se manifiesta en cuanto a sus características antigénicas y genéticas (Cuadro 5.1), ya que son descarboxilasas negativas, no móviles y lactosa negativas. Tienen la capacidad de invadir y proliferar dentro de las células epiteliales y causar la muerte celular.^[22, 42, 61, 100, 108]

Cuadro 5.1
Serotipos "O" de EIEC y otras de *Shigella*.

Serogrupos	Reacción antigénica	
	Idéntica	Reacción cruzada*
O28		<i>S. boydii</i>
O29		
O42		
O29		
O112		<i>S. dysenteriae</i> <i>S. boydii</i>
O124**	<i>S. dysenteriae</i>	
O136***		<i>S. dysenteriae</i>
O143	<i>S. boydii</i>	
O144		<i>S. dysenteriae</i>
O152	<i>S. dysenteriae</i>	
O164		<i>S. dysenteriae</i>
O167		<i>S. boydii</i>

- * Indica reactividad cruzada señalando que sólo es absorbible.
 ** Serogrupos de ECEI más comúnmente aislados.
 *** Éste serogrupo también da reacción cruzada con *S. boydii* (anti O136 aglutina *S. boydii* no aglutina O136).

Fuente: Eslava C.^[42]

Sansonetti y col., (1986) demostraron la presencia de genes necesarios para invadir a los enterocitos, en un plásmido de 140 MDa llamado *pInV*, que codifica genes: *lpa*, *mxi*, *spa* y otros que están involucradas en el proceso de patogénesis.^[22, 61, 105]

En *Shigella spp.*, cuatro distintos elementos semejantes a islas de patogenicidad ("pathogenicity islands-like", PAI-like) han sido identificados. Esos incluyen el grupo de genes de naturaleza plasmídica *mxi-spa*, la recientemente descrita isla de patogenicidad SHI-2 (SHI-2, PAI), que codifica para el sistema aerobactina de captación de hierro, un elemento semejante a isla de patogenicidad (PAI-like), que codifica múltiple resistencia a antibióticos en *Shigella flexneri* 2^a y la isla de patogenicidad *she* (*she* PAI) de *S. flexneri* 2^a. A semejanza de otras islas de patogenicidad, *she* PAI es un locus cromosomal inestable, que se deleta espontáneamente a una frecuencia de 10⁻⁵-10⁻⁶. Esta isla lleva un número de genes con funciones establecidas (putativos) en virulencia bacteriana. El gen *she* o *pic* ("protein involved in intestinal colonization", de origen plasmídico en *E. coli*

enteroagregativa) codifica para una proteasa autotransportadora tipo V, de la subfamilia SPATE “*Serin Protease Autotransporters of Enterobacteriaceae*”, con actividad de mucinasa y hemaglutinina; los genes *set1A* y *set1B* que se encuentran sobrelapados sobre el gene *she* o *pic*, codifican las dos subunidades de la enterotoxina ShET1; el gen *sigA* codifica para otra proteasa, la cual presenta alta homología con el gen *pet* (“*plasmid-encoded toxin*”, de origen plasmídico en *E. coli* enteroagregativa), también de la subfamilia SPATE.^[134]

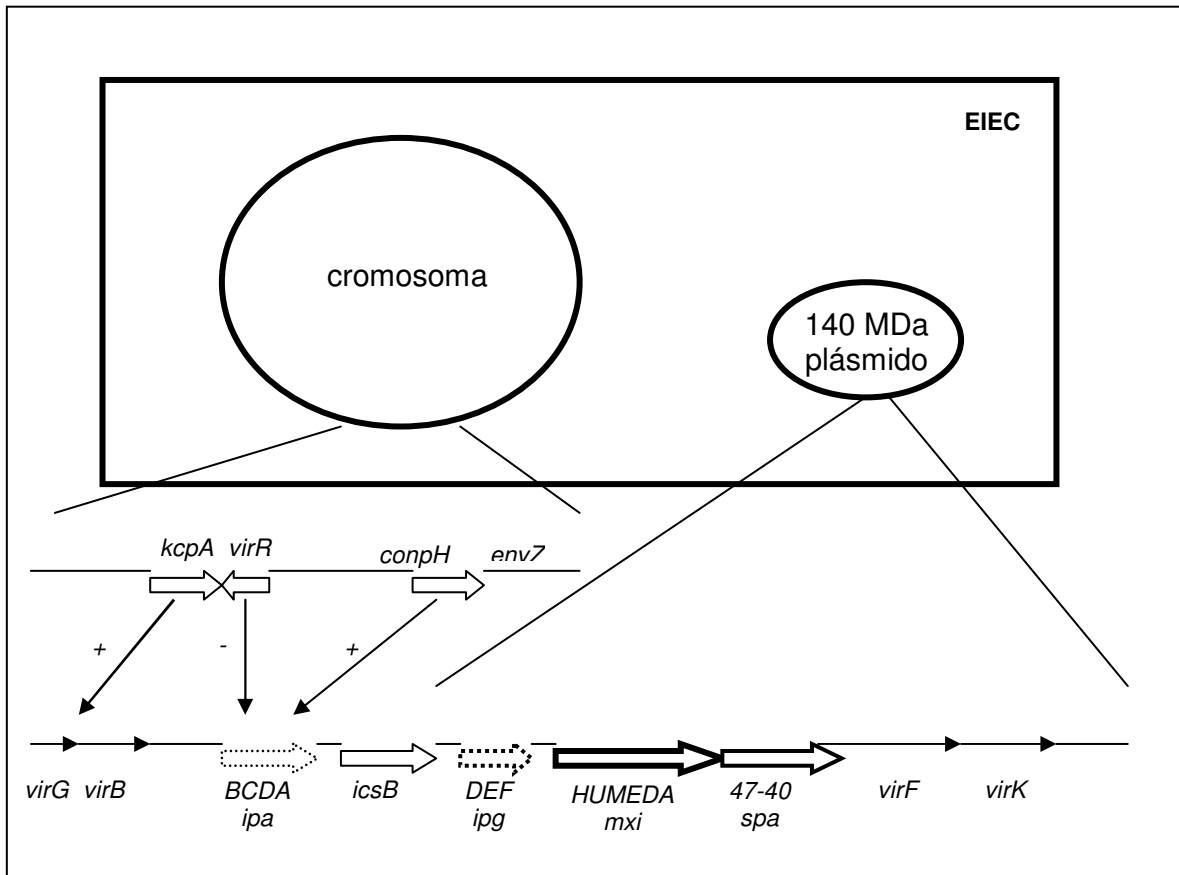
5.1 Factores de virulencia, EIEC

- *pInV* plásmido de ~ 140 MDa o 230 Kb que codifica para los genes: *mxi*, *spa*, *lpa* y otros (Figura 5.1).^[13, 22, 27] Se cree que *lpaC* funciona como proteína adherente que promueve la internalización; *lpaB* participa en la lisis de la vacuola fagocítica y en la inducción de apoptosis en macrófagos (Zychlinsky y col., 1994).^[13]
- Los genes *mxi* y *spa*, codifican para el sistema de secreción tipo III (Allaoui y col., 1995), y este sistema se requiere para la secreción de múltiples proteínas que son necesarias para la patogenicidad de las cepas EIEC.^[13, 22, 51]
- Las proteínas *lpaA*, *lpaB*, *lpaC* e *lpaD* (Figura 5.1), son efectores del fenotipo de invasividad.^[13, 22]
- *VirG* (*IcsA*) es una proteína de superficie que es esencial para que se produzca la condensación de actina que facilita el movimiento de la bacteria a través del citoplasma.^[13]
- El gen *sen* del plásmido de EIEC que codifica para una enterotoxina de ~ 63 MDa (ShET2). El papel de la enterotoxina no se conoce, pero su presencia puede explicar la diarrea acuosa (Nataro y col., 1995).^[13, 22]

5.1.1 Mecanismo de patogenicidad, EIEC

Se ha demostrado que cepas EIEC invaden el epitelio del colon; para ello el primer paso es la adherencia de la bacteria a las microvellosidades de la mucosa requiriendo de mucinasa y adhesinas (*lpaC*).^[105] La internalización de EIEC se caracteriza por la acumulación de actina-F en el citoplasma de la célula epitelial. Ésta entrada se debe principalmente a la proteína *lpaB*, que probablemente se une a la subunidad β_1 del receptor de la célula epitelial, para después entrar por endocitosis a la célula. Cuando se encuentra dentro de los macrófagos produce la enzima superóxidasa dismutasa que le permite sobrevivir en la vacuola para después romperla, y posterior multiplicación de EIEC en la célula y diseminación a células sanas adyacentes.^[61, 105]

Figura 5.1
Genes involucrados en la patogénesis de EIEC.



Fuente: Nataro y Kaper.^[91]

El modelo de patogénesis propuesto por Goldberg y col., (1993) 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
- 5.- Desplazamiento hacia las células epiteliales adyacentes

El movimiento de *Shigella* dentro del citoplasma (se cree que es similar a EIEC), parece estar mediado por la agregación de la actina celular en una estructura llamada tallo, la cual se extiende desde un polo de la bacteria. Debido a que la actina adicional se va agregando a esta estructura, la bacteria es impulsada a través del citoplasma generalmente lateral dirigiéndose a células vecinas.^[22, 61] También se ha descrito otro movimiento hacia el núcleo a lo largo de las fibras de estrés en la célula, éste movimiento se ha denominado "Movimiento parecido a un organelo" (Olm, Organelle-like movement).^[61]

5.2 Síntomas característicos, EIEC

En personas infectadas por EIEC se presenta diarrea acuosa, con sangre y moco, pero en muchos casos sólo presentan diarrea, ésta en ocasiones es indistinguible de la que produce ETEC. Cuando la infección es grave, se presenta una fuerte reacción inflamatoria la cual se manifiesta por la producción de úlceras.^[22]

5.3 Modo de transmisión, EIEC

- Persona a persona.
- Ingestión de alimentos y agua contaminada.

Convirtiéndose en un patógeno importante en niños mayores de seis meses.^[105, 108] La dosis infectiva es de 10^5 UFC.^[22]

5.4 Cuadro clínico, EIEC

La enfermedad se manifiesta por fiebre ligera o síndrome febril, calambres, dolor abdominal severo, toxemia, inflamación local con hiperemia, diarrea acuosa seguida por disentería, consistente de escasas heces con sangre y moco de color sanguinolento-verdoso y consistencia viscosa, mostrando leucocitos polimorfonucleares.^[100, 108]

5.5 Frecuencia, EIEC

La incidencia de EIEC en países industrializados es bajo, sin embargo pueden presentarse brotes, porque no es común casos aislados.^[22]

5.6 Diagnóstico, EIEC

El diagnóstico de este grupo a nivel de investigación se hace por prueba *in vivo* como la Sereny (se observa la producción de queratoconjuntivitis en conejos, cerdos o cobayos) y por pruebas en cultivo celular utilizando líneas HeLa o Hep-2 para observar el efecto de invasividad. También hay métodos inmunológicos y moleculares, tal como serotipificación, prueba de ELISA, hibridación de DNA, etc. (Cuadro 2.4)^[100, 105, 108]

5.6.1 Prueba de Sereny

El modelo experimental clásico para el análisis de la invasividad es la prueba de Sereny, porque evalúa la capacidad de la bacteria para penetrar a la célula (Okamura y col., 1983).^[27]

Yamagata, (1986) propuso el uso de ratones en sustitución de cobayos para la prueba de Sereny, particularmente cuando el número de muestras a examinar es muy grande,

además observaron que había una buena correlación con los resultados obtenidos en cobayos y ratones.^[27]

5.6.2 Invasión a la línea celular HeLa y Hep-2

La invasividad en cultivo celular se considera como modelo independiente para medir el mismo fenómeno, porque mide la penetración y multiplicación (Okamura, 1977), de EIEC con la subsecuente reinfección a las células vecinas.^[27]

La invasión de EIEC en células HeLa se describió por Melhman, (1977) mencionando que las células hospederas deberán internalizar por lo menos 5 bacterias (Lawson, 1985; Small, 1987). Estos valores se basan en el análisis microscópico cuidadoso que permite decidir si una bacteria es invasiva o no, pero existe el riesgo de confundir la invasividad con la adherencia que pueda exhibir el microorganismo y que ésta pudiera ser considerada como una prueba positiva.^[27]

Donenberg, (1989) diseñó un método para evaluar invasividad en células Hep-2 agregando ampicilina y gentamicina al medio de cultivo después del periodo de incubación de la bacteria con la célula, con el fin de eliminar todos los microorganismos que no fueron capaces de penetrar la monocapa celular. Así se eliminaría cualquier bacteria que se haya adherido a la célula. Se rompen las células con tritón x 100 al 1% al final de la prueba, liberando así a las bacterias intracelulares. El criterio invasivo es cuantitativo ya que las bacterias intracelulares se cuantifican por cuentas viables hechas por el método de Miles y Mishra en forma comparativa con testigos negativos y positivos.^[27]

5.6.3 Captación del colorante rojo Congo

Sasakawa, (1986) utilizó la prueba de captación del colorante rojo Congo como un marcador de hidrofobicidad y observó que había relación con la captación del hierro del medio, ya que se ha encontrado que las cepas virulentas son más hidrófobas que las avirulentas. Así, las cepas virulentas que unen el colorante desde un medio sólido, van a producir colonias pigmentadas de color rojo (Crb+) y las avirulentas de color blanco (Crb-). Además, las cepas capaces de dar la prueba de rojo Congo presentan un aumento en la capacidad de *E. coli*, *Salmonella* y *S. Flexneri* de adherirse a las células intestinales en animales experimentales (Quadri, 1988).^[27]

La captación del rojo Congo se ha asociado también en la adquisición del hierro ya que el rojo Congo se une al hierro del medio. *Shigella* y EIEC lo necesitan para realizar sus funciones metabólicas y lo obtienen del hospedero por la producción de sistemas quelantes de “alta afinidad” a los que se les denomina sideróforos (Otto, 1992).^[27]

Spears, (1992) encontró baja correlación entre la captación del rojo Congo y el ensayo de letalidad en embrión de pollo y concluye en que no es una buena prueba para medir virulencia.^[27]

5.7 Tratamiento, EIEC

Dado que la EIEC no causa perforación del intestino y que la enfermedad es moderada, los antibióticos raramente se indican, solamente en casos graves se recomienda el uso de Trimetoprim-Sulfametoxazol.^[44, 108]

6 *E. coli* enteropatógena (EPEC)

EPEC fue reconocida durante la década de 1940 y 1950 por Neter y col., porque causaba diarrea infantil en casos esporádicos y brotes en guarderías.^[61, 100, 108] Quienes confirmaron la presencia de ciertos grupos serológicos, al demostrar los serotipos O:26, O:55, O:111, O:119, O:125, O:126, O:127, O:128 y O:142. El término EPEC fue propuesto en 1955, agrupando a los serotipos de *E. coli* involucrados epidemiológicamente en estudios de diversos países y que fueron aislados con frecuencia significativa en niños con diarrea.^[108]

Aunque fue la primera categoría de *E. coli* descrita como causante de diarrea, su estudio fue abandonado por el hallazgo de las cepas enterotoxigénicas y no fue hasta que Levine y col., (1978) demostraron que las cepas EPEC causan diarrea en voluntarios y restablecieron los estudios sobre la virulencia de este grupo de microorganismos.^[65]

Cravioto y col., (1979) describieron por primera vez la adherencia de cepas EPEC a células Hep-2.^[108] Baldini y col., (1983) mostraron que la adherencia a células Hep-2 en cultivo, se debe a una adhesina que está relacionada con un plásmido de 55 – 70 MDa llamado factor de adherencia de cepas EPEC (EAF).^[22, 108]

Antes de que se describiera la adherencia como característica de cepas EPEC. Stanley, (1969) y posteriormente Moon, (1983) observaron que bacterias de serotipo EPEC se adherían a las microvellosidades del epitelio intestinal en animales y las destruían, ellos nombraron a este fenómeno como lesión de “*Attaching and Effacing*” (A/E, adherencia y esfacelamiento).^[61]

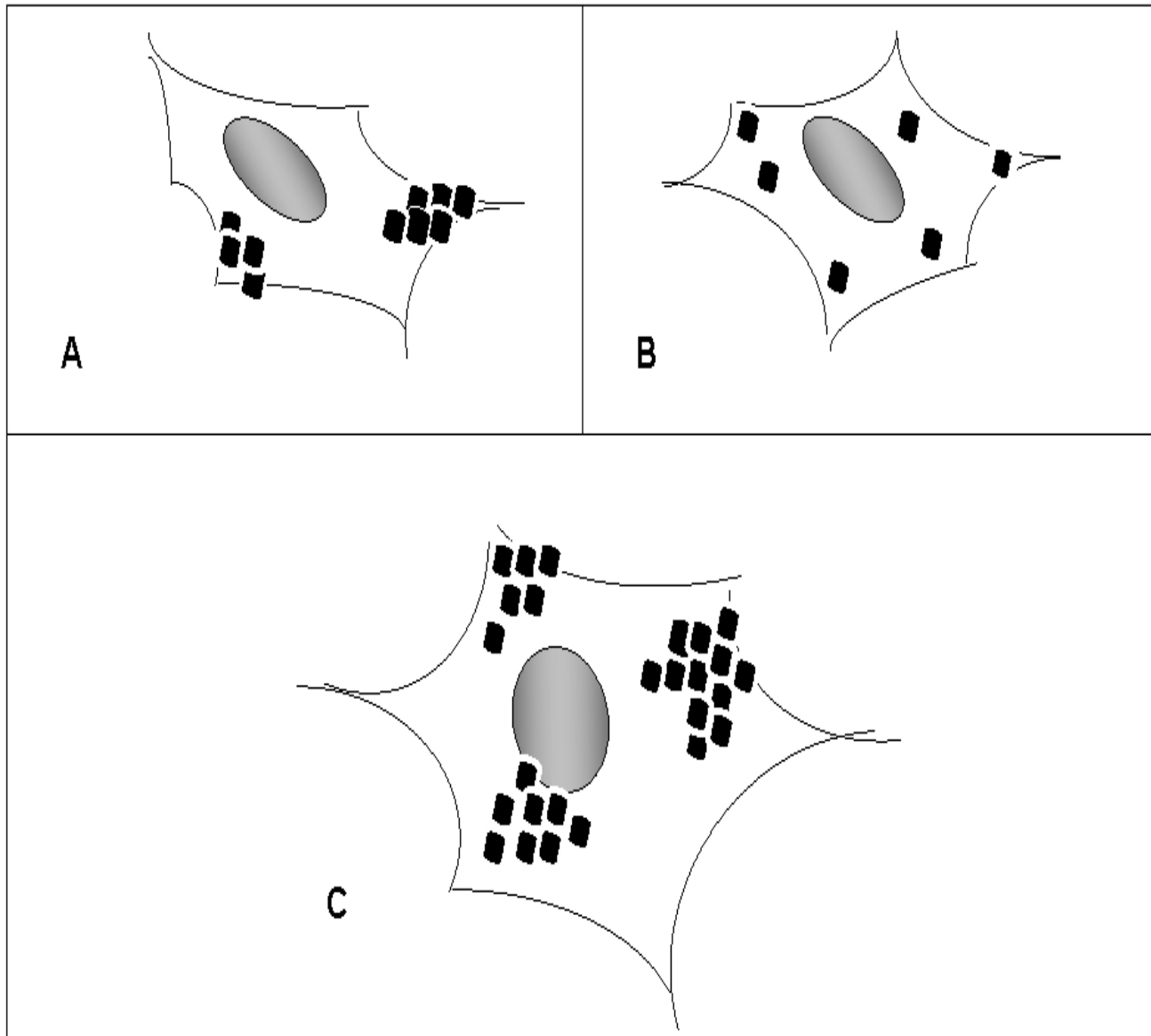
Posteriormente (Scaletsky y col., 1984; Nataro y col., 1985), reportaron tres diferentes patrones de adherencia sobre células Hep-2 definidos como: 1) adherencia localizada (LA) porque las bacteria se adhieren en forma de racimos en sitios localizados de la célula eucariote, 2) adherencia difusa (DA) porque las bacterias se adhieren sobre toda la superficie celular y 3) adherencia agregativa (Agg) ó patrón intermedio entre el localizado y el difuso (LA/DA) (Figura 6.1), posteriormente estos mismos investigadores encontraron que la adherencia localizada es mucho más común entre los serotipos clásicos de EPEC que causan diarrea.^[22, 61]

Girón y col., (1991) describieron en EPEC un pili al que llamaron *bundle-forming pilus* BFP (pili que forma un bucle) que está codificado en el plásmido EAF. 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.^[53, 54]

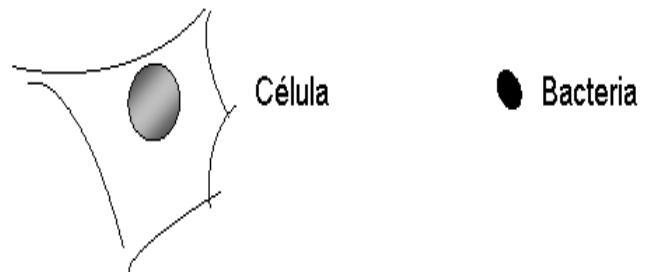
6.1 Factores de virulencia, EPEC

Los genes responsables de los factores de virulencia son los que causan la lesión A/E que se localizan en el locus de esfacelamiento del enterocito (LEE), el cual está en una isla de patogenicidad. Este locus contiene, entre otros, a los genes que codifican para la intimina, el sistema de secreción III, las proteínas Esp, las proteínas Sec y el receptor traslocado de la intimina (Tir) (Figura 6.2).^[22, 37, 105]

Figura 6.1
Ilustración de patrones de adherencia de *E. coli*.



- (A) Patrón de adherencia localizada.
- (B) Patrón de adherencia difuso.
- (C) Patrón de adherencia agregativo.



Fuente: Ibarra G J.^[61]

6.1.1 Patrón de Adherencia Localizada (LA)

Baldini y col., (1983) reportaron que la adherencia localizada (LA) en la cepa EPEC E2348, serotipo O127:H6, está asociada con la presencia de un plásmido de 60 MDa al cual nombraron pMAR-2. Se sugirió que dentro de este plásmido se encontraba una región que codificaba para la adhesina responsable de la adherencia localizada a cultivos celulares y la denominaron EAF. El patrón de LA se observa cuando las bacterias se adhieren en forma de racimos en sitios localizados de la célula eucariote (Figura 6.1-A).^[9] Girón, (1991) identificó y caracterizó un apéndice único en la superficie de la cepa EPEC B171 (serotipo O111:NM) que parecía estar asociado con la formación de LA; este pili denominado como “pilus formador de haces” (BFP = *Bundle-Forming Pilus*).^[54, 61]

6.1.2 Isla de patogenicidad ó Locus de Esfacelamiento del Enterocito (LEE)

Los genes responsables de la lesión A/E se encuentran en un segmento cromosomal de 35 Kb localizado en el locus de esfacelamiento del enterocito, el cual está en una isla de patogenicidad (LEE) “*locus for enterocyte effacement*” (Figura 6.2) que puede ser dividida en al menos tres dominios funcionales.^[35, 37, 67, 69, 72, 73, 80, 121, 122]

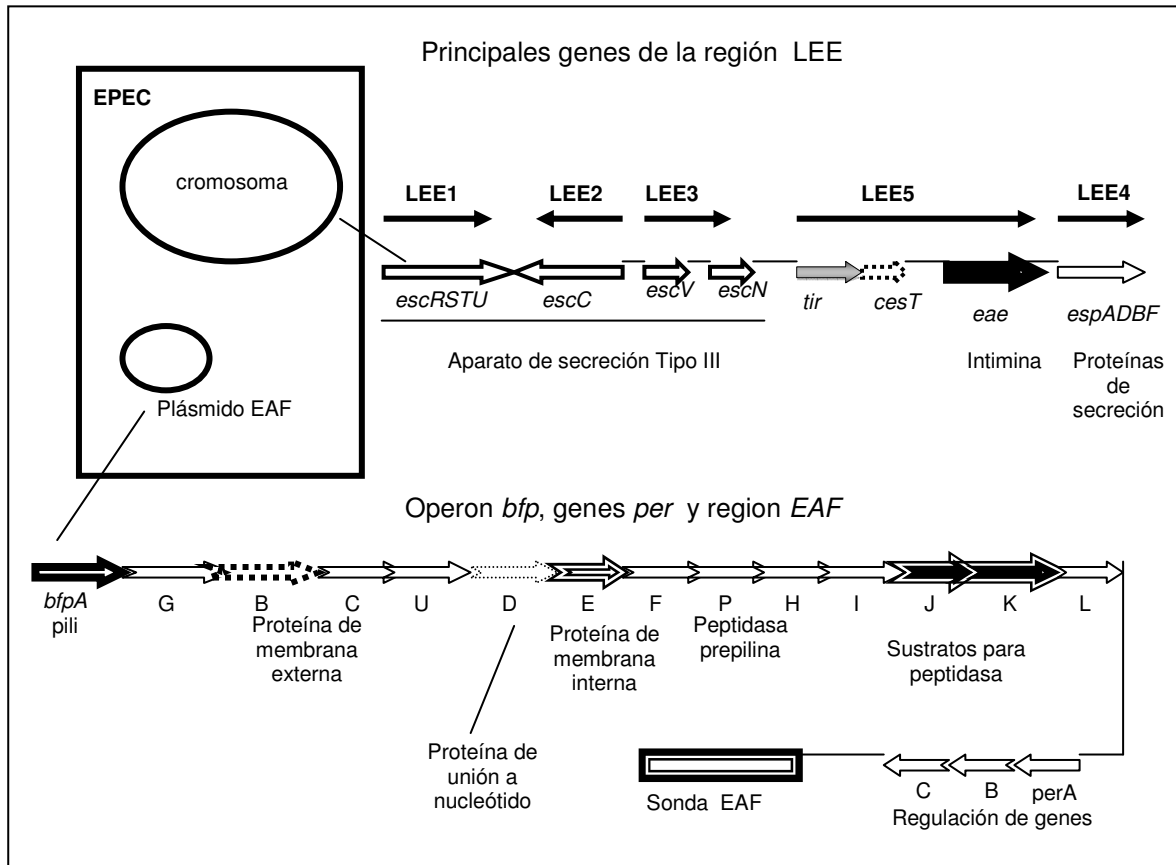
- Los genes *sep* “*secretion of EPEC proteins*” que incluye a *sepA* y *sepB* los cuales codifican proteínas que forman parte del aparato de secreción tipo III.
- Los genes *esp* “*EPEC secreted proteins*” incluye a *Tir*, *EspA*, *EspB*, *EspD*, *EspE*, *EspF* y *EspG*, las cuales pueden tener papeles duales como la formación del propio sistema de secreción tipo III y de ser factores de virulencia.
- El gen *eae* que codifica a la proteína íntima de la membrana externa bacteriana de ~ 94 kDa el cual es responsable de la adherencia íntima entre la bacteria y el enterocito.

La isla de patogenicidad LEE contiene 41 marcos de lectura abiertos (ORF'S), arreglados en al menos cinco operones policistrónicos denominados LEE1 hasta LEE5. Los genes que codifican para la vía de secreción tipo III se encuentra en los operones LEE1 a LEE3;^[37] las proteínas efectoras, en su mayoría, están codificadas en el operon LEE4;^[81] y las proteínas necesarias para la adherencia íntima A/E están codificadas en el operon LEE5 (Figura 6.2).^[112]

Mellies, Navarro y col., (2001) determinan la isla de patogenicidad *espC* como una segunda isla descrita en algunas cepas de EPEC. *EspC*, que consiste en 1,306 aa (110 kDa) comparte homología con miembros de la familia de autotransportadoras, entre los cuales se encuentra la proteasa de IgA de *Neisseria gonorrhoeae*, *Hap* de *Haemophilus influenzae*, *Tsh* de APEC (“*avian pathogenic E. coli*”), *SepA* y *ShMu* de *Shigella flexneri*, *Pic* y *Pet* de EAEC, y *EspP* de EHEC.^[82] Vidal, Navarro y col., (2006) describen *EspC* (70% de similitud) con la proteína *Pet* de EAEC, la cual tiene actividad enterotóxica, rompe con las subunidades α y β de la espectrina,^[79] a la pepsina, y el factor de coagulación V. Interesantemente, no contribuye con la lesión A/E, ni con la mediación de la transducción de señales inducida por EPEC y no juega un papel en la invasión o

adherencia.^[82, 133] Navarro y col., (2004) reportaron que Esp C produce efectos citopáticos en células epiteliales parecidos a los reportados para Pet.^[95] Navarro y Canizalez, (2001 y 2003) describieron la internalización de Pet a las células epiteliales, mediante un transporte retrogrado, produciendo efecto citotóxico.^[18, 19, 43, 133]

Figura 6.2
Genes involucrados en la patogénesis de EPEC.

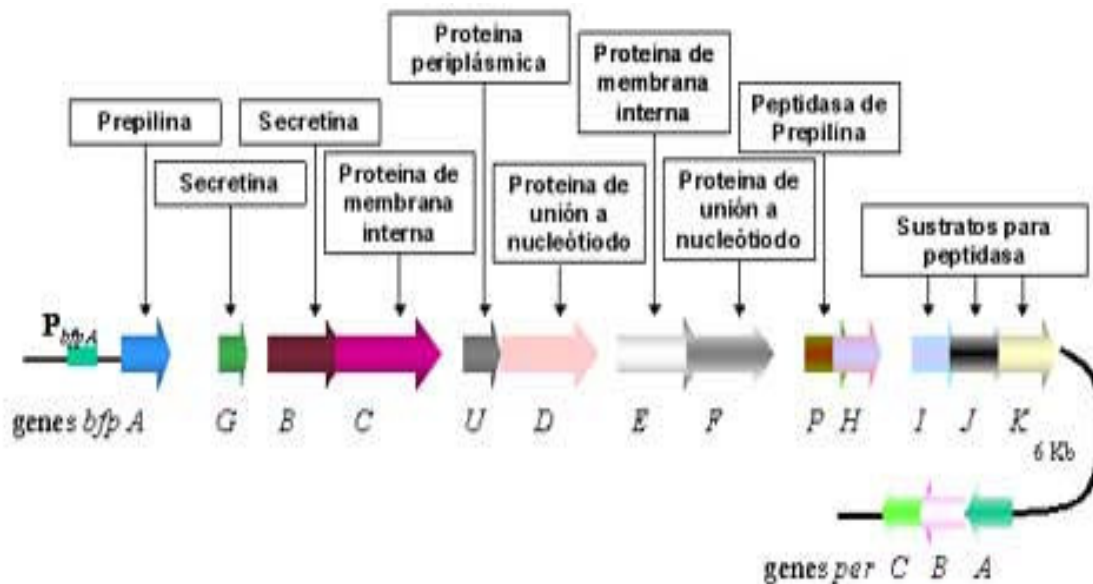


Modificado de: Elliott S., Melies L., Nataro J., Sánchez S. y Villaneca F.^[37, 81, 91, 112, 134]

6.1.3 Plásmido EAF

El plásmido de virulencia de EPEC (pEAF) tiene un peso molecular de ~ 92 Kb ó 60 MDa (Figura 6.3), que codifica para el regulador PerA y para las proteínas involucradas en la formación del pilus BFP, ambos necesarios para la virulencia en humanos.^[13] BFP es un factor de virulencia de EPEC, son 14 genes *bfp* y abarca 11.5 Kb del pEAF involucrados en su expresión y se sabe que los cinco primeros genes del locus *bfp* tienen un patrón de expresión diferencial, y que el gen *bfpA* que codifica para la subunidad estructural principal es el que se expresa en un nivel mayor.^[15]

Figura 6.3
Factor de adherencia de cepas EPEC (EAF).



Modificado de: Bustamante VH.^[15]

6.1.4 Lesión de "Adherencia y Esfacelamiento" (A/E)

La lesión A/E (Figura 6.4) se encuentra codificada en un gen cromosomal al que llamaron *eae* por "*E. coli Attaching and Effacing*" y que codifica para una proteína de 102 kDa. Aunque el locus *eae* es necesario para producir la lesión A/E, no es suficiente para reproducirla en su totalidad, es decir que hay otros *loci* involucrados.^[34, 35, 61]

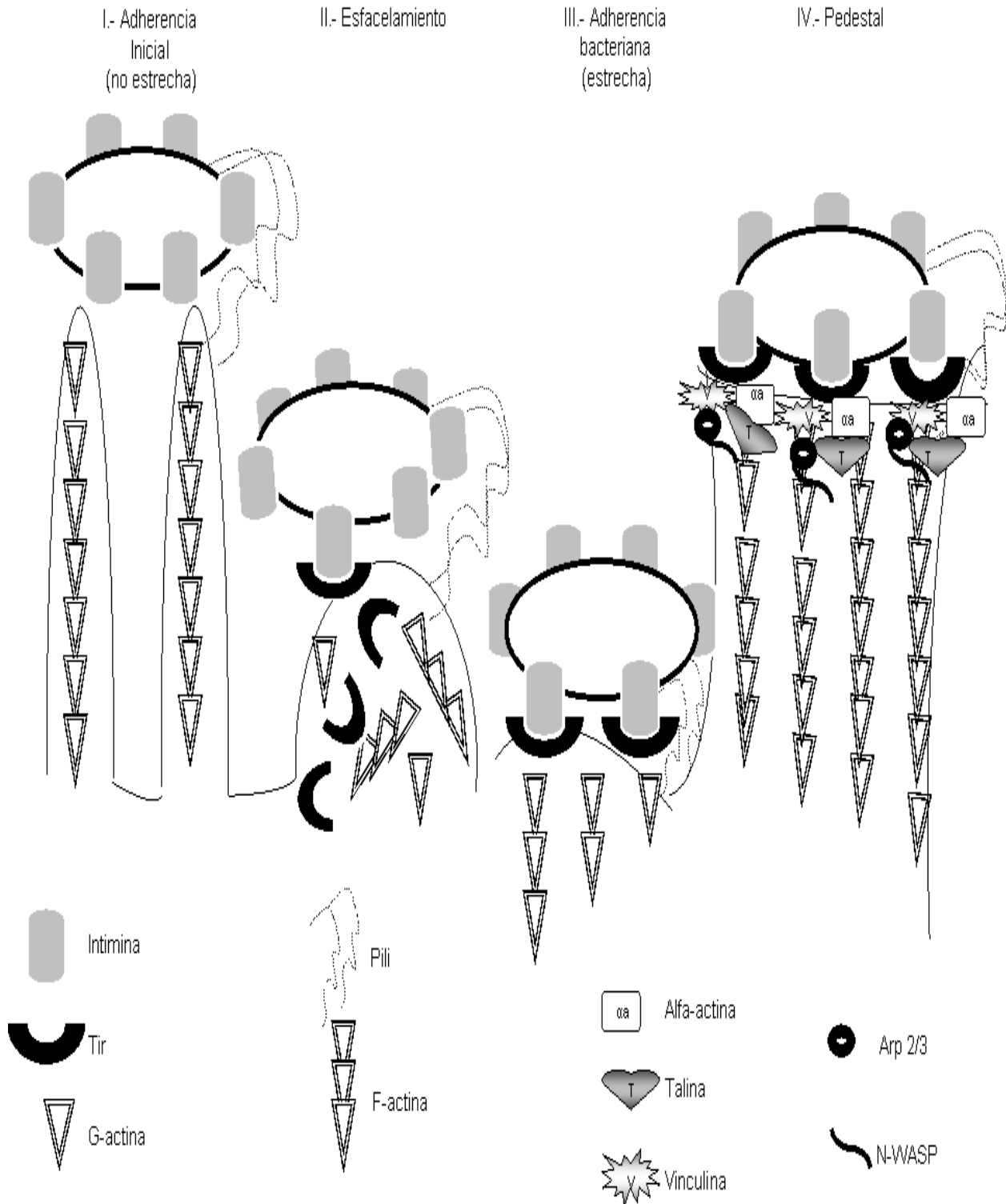
La lesión A/E se presenta en tres formas consecutivas:^[64, 35]

- (i) Adherencia inicial (no estrecha) de la bacteria y la célula hospedera.
- (ii) Transducción de señal y rearrreglos de citoesqueleto en la célula hospedera.
- (iii) Adherencia bacteriana (estrecha) de intima con receptores Tir de la célula hospedera, con acumulación de actina y formación de pedestales .

6.1.4.1 Adherencia inicial (no estrecha) de la bacteria y la célula

La primera etapa involucra la adherencia inicial de la bacteria al epitelio intestinal del hospedero. En esta etapa, EPEC forma microcolonias densas que se adhieren a las células epiteliales en un patrón denominado adherencia localizada LA, que depende de la presencia del plásmido EAF.^[9] La identidad del factor que media LA fue reportada por (Girón y col., 1991), quienes describieron una fimbria de 7 nm de diámetro que tiende a agregarse y a formar haces, por lo que sugirieron el nombre de BFP (Figura 6.4-I).^[54]

Figura 6.4
Lesión de "Adherencia y Esfacelamiento" (A/E)



Fuente: Nancy L.^[89]

6.1.4.2 Transducción de señales

Después del primer contacto con la célula hospedera, EPEC se une a la superficie de la célula y le inyecta directamente factores de virulencia a través de un sistema de secreción tipo III, cuyos componentes principales se encuentran las proteínas EspA (25kDa), EspB (38 kDa) y EspD (40 kDa) que conforman la traslocación.^[130] La cuarta proteína llamada EspC (110 kDa) muestra homología con otras proteínas secretadas del grupo de autotransportadoras, de tipo V, de la subfamilia SPAGE (serine protease autotransportes of *Enterobacteriaceae*),^[134] recientemente Navarro y col., (2004) reportaron que EspC produce efectos citopáticos en células epiteliales parecidos a los reportados para Pet.^[95] EspA forma un filamento en la superficie bacteriana, mientras que EspB y EspD forman un poro en la membrana celular de la célula hospedera. Estas proteínas conforman una jeringa molecular a través de la cual son liberadas diversas moléculas efectoras al citoplasma,^[16] entre las cuales se encuentran EspG, EspF, EspH, Map “*mitochondria-associated protein*” y Tir (Figura 6.5-A).^[24] Estas moléculas efectoras activan vías de señalización celulares causando alteraciones en la arquitectura del citoesqueleto, lo que resulta en la pérdida de las microvellosidades y la despolimerización de actina (Figura 6.4-II).^[89]

6.1.4.3 Adherencia bacteriana (estrecha) de intimina con receptor Tir

Una vez traslocada, Tir es modificada por fosforilación de residuos de treonina y serina, pero principalmente es fosforilada en un residuo de tirosina, Tyr474, localizado en la región C-terminal citoplasmática. Posteriormente, Tir se inserta en la membrana de la célula hospedera donde adopta una estructura de “pasador”, mostrando un dominio extracelular central que se une a una proteína de membrana externa de la bacteria OMP llamada intimina que actúa como adhesina (Figura 6.4-III). Los dominios amino y carboxilo de Tir residen en el citoplasma de la célula hospedera, donde son capaces de interactuar con componentes del citoesqueleto (Figura 6.5-B). Recientemente se ha demostrado que péptidos de Tir que contienen el residuo Tyr474 fosforilado se unen de manera directa a la proteína adaptadora Nck *in vitro*, pero no ocurre esta unión cuando el residuo de tirosina no está fosforilado.^[16, 66] Nck recluta al dominio amino terminal de N-WASP “*neuronal Wiskott Aldrich syndrome protein*”, al complejo de proteínas relacionadas a actina 2/3 (Arp2/3). El reclutamiento de Arp 2/3 resulta en la nucleación de filamentos de actina y el inicio de la formación del pedestal (Figura 6.4-IV). Por lo tanto, se ha propuesto que este residuo de tirosina fosforilado es crítico para la señalización de actina y la formación del pedestal (Figura 6.5-C), el cual destruye a las microvellosidades.^[4, 16, 63]

6.1.5 Aparato de traslocación del sistema de secreción tipo III

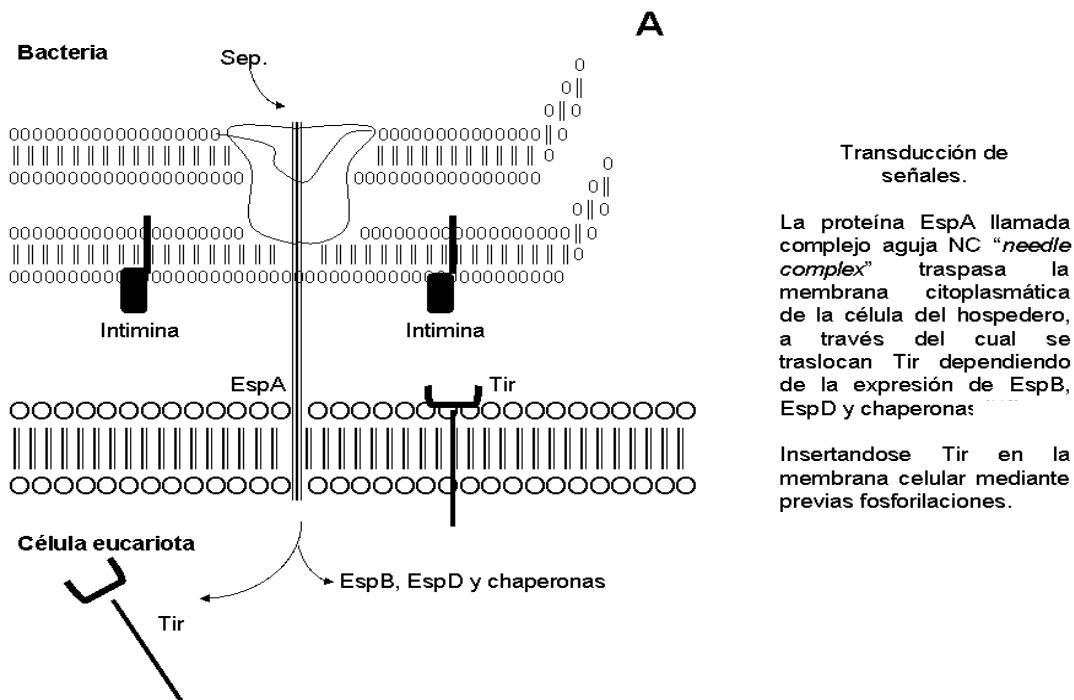
En el sistema de secreción tipo III, la proteína EspA forma una estructura supramolecular llamada complejo aguja NC “*needle complex*”, el cual es un complejo polipeptídico que traspasa la membrana interna, el espacio periplasmático y la membrana externa de la bacteria, que tiene una estructura larga y hueca de ~ 120 nm de largo, compuesta de dos

dominios: la porción que se proyecta fuera de la superficie que tiene forma de filamento y una base cilíndrica que ancla al filamento a las membranas interna y externa, que recuerda al cuerpo basal flagelar. Por medio de unos filamentos que se arreglan a manera de un tubo o aguja de jeringa traspasa la membrana citoplasmática de la célula del hospedero, a través del cual se traslocan las proteínas EspB, EspD y Tir al citosol de la célula hospedera (Figura 6.5).^[37, 69, 72, 73, 122, 139]

6.1.5.1 Receptor traslocado de la intimina (Tir)

La proteína Tir "*Translocated intimin receptor*" sirve como receptor para intimina. Inicialmente se pensó que Tir era producida por la célula hospedera, pero después se demostró que es sintetizada por EPEC e inyectada a la célula por medio del sistema de secreción tipo III.^[69] La traslocación de Tir depende de la expresión de EspB, EspD y chaperonas.^[1, 37, 121, 122, 136] Después de liberarse Tir en citosol, sufre una serie de modificaciones por fosforilaciones que son esenciales, activando la nucleación de actina para formar pedestales.^[67, 68, 69] EspB puede actuar como toxina del citoesqueleto destruyendo los filamentos de actina, cambiando su distribución y su función.^[121, 136, 139] Con estudios en voluntarios humanos sobre EPEC según Ticket y col., (2000) se ha encontrado que la proteína intimina y EspB son requeridas para la formación de pedestales; las cepas mutadas de estas dos proteínas son incapaces de producir la enfermedad en humanos.^[121]

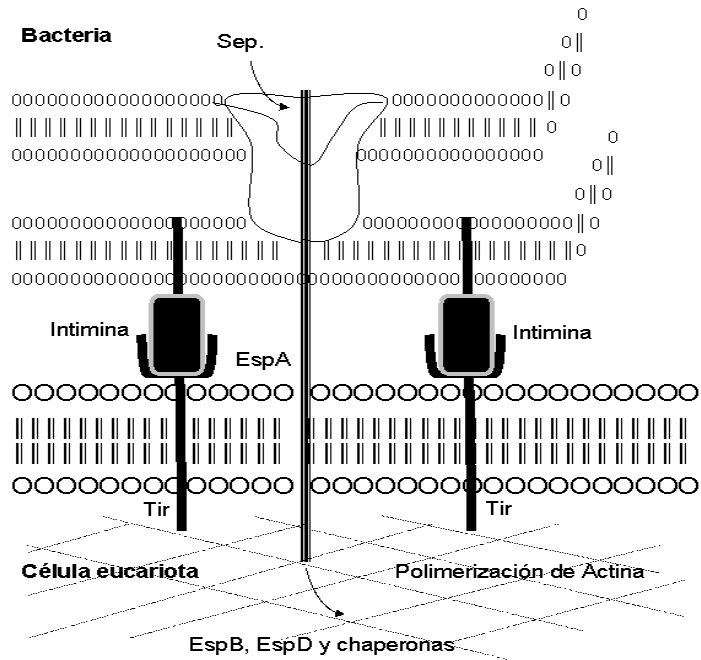
Figura 6.5
Aparato de traslocación del sistema de secreción tipo III.



Fuente : Kurt S.^[74]

B

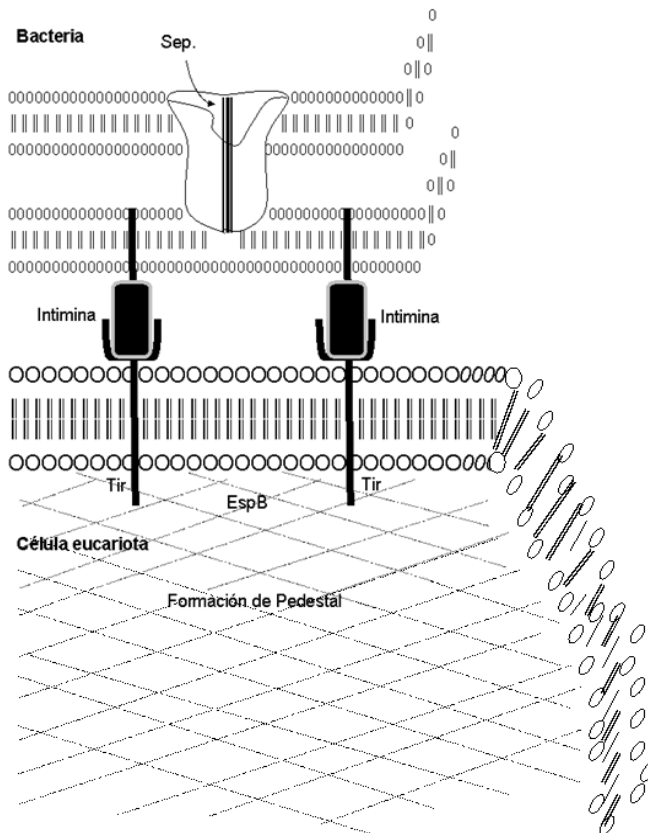
Rearreglos de citoesqueleto (nucleación de actina) en la célula hospedera.



C

Adherencia bacteriana (estrecha) de intimina con receptores Tir de la célula hospedera, con acumulación de actina y formación de pedestales.

EspB puede actuar como toxina del citoesqueleto destruyendo los filamentos de actina, cambiando su distribución y su función.



Fuente : Kurt S.^[47]

6.2 Clasificación de EPEC en presencia o ausencia del plásmido EAF y el patrón de adherencia sobre Hep-2

Con base en la presencia o en ausencia del plásmido EAF y en el patrón de adherencia sobre Hep-2, las cepas EPEC se clasifican en: EPEC típicas y EPEC atípicas. Las cepas EPEC típicas son de origen humano y poseen el plásmido EAF y además presentan al patrón de adherencia localizada LA, mientras que las cepas EPEC atípicas no contienen el plásmido ni presentan el patrón de LA.^[22, 105]

♦ Cepas EPEC atípicas (EPECa) , a su vez, pueden ser clasificadas en dos grupos: aquellas que expresan únicamente los genes de patogenicidad codificados en la región LEE (gen *eae*) y aquellas que expresan tanto a los genes de patogenicidad codificados como los no codificados en la región LEE, tales como enterohemolisina de EHEC (*E-hlyA*), una adhesina fimbrial (Afa), así como la enterotoxina 1 termoestable de EAEC (EAST-1).

♦ Cepas EPEC típicas son homogéneas en sus características de patogenicidad, expresa únicamente los genes de patogenicidad codificados en la región LEE y el plásmido EAF que codifica para *bfp*, con excepción de todas las cepas del serotipo O86:H34 que además producen la toxina “*cytolethal distending*”, y de algunas cepas de los serotipos O55:H6 y O127:H6 que producen la toxina EAST-1. Ambas toxinas son factores potenciales de patogenicidad.

6.3 Modo de transmisión, EPEC

- Fecal – oral por manos contaminadas de manipuladores de alimentos.

EPEC típica sola 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 10^9 UFC. La dosis infectiva en niños no se ha determinado, pero se cree que es mucho menor.^[22]

6.4 Cuadro clínico, EPEC

Se manifiesta con diarrea aguda, la cual puede ser leve, puede ir acompañada de vómito, dolor abdominal, fiebre baja y mala absorción.^[22, 105]

6.5 Frecuencia, EPEC

EPEC típica puede ocasionar brotes o casos aislados de diarrea. Este grupo es causa de diarrea infantil en países en vías de desarrollo, mientras que en países industrializados la frecuencia de este grupo patógeno ha disminuido pero continúa siendo una causa importante de diarrea.^[22]

Las infecciones por EPEC típicas se presentan principalmente en niños menores de dos años, especialmente en el grupo de niños menores de seis meses. Se estima que EPEC produce anualmente más de un millón de muertes de niños en el mundo.^[22]

6.6 Diagnóstico, EPEC

El diagnóstico de EPEC incluye *in vitro* en cultivos celulares y métodos moleculares como se observa en el Cuadro 4.^[105]

6.7 Tratamiento, EPEC

En cuanto al tratamiento se ha observado que infantes intratables pueden responder a clotrimoxazol, sin embargo en algunos pacientes se pueden presentar recaídas después de la utilización de este antibiótico, por lo que se considera que una terapia antimicrobiana no parece ser representativa en el tratamiento de las infecciones causada por EPEC. Lo más recomendable es la rehidratación.^[108] En adición, EPEC atípica se recomienda utilizar Trimetropin-Sulfametoxazol y Ampicilina.^[44]

7 *E. coli* enteroagregativa (EAEC)

Sacaletsky y col., (1984); Nataro y col., (1985) encontraron cepas aisladas de pacientes con diarrea, las cuales por serología no correspondían al grupo EPEC pero si presentaban un patrón característico de adherencia diferente a EPEC y que además eran negativas a la prueba de EAF.^[61]

Vial y col., (1988) nombraron a *E. coli* *enteroadherente-agregativa*, y encontraron que no estaba relacionada con algún serotipo O:H dado que la característica de agregarse interfería con la determinación serológica, además encontraron que causaba lesiones características en conejos, daño en el que podría estar involucrada una toxina aún no caracterizada. También describieron que la propiedad de producir adherencia agregativa en forma de ladrillos apilados “*stacked brick*” en la superficie de células Hep-2, que se observan tanto en el citoplasma de las células como en la superficie de vidrio de la preparación ver (Figura 6.1-C), codificada por un plásmido de ~ 60 MDa.^[61]

Savarino y col., (1991-1993) demostraron la producción de una enterotoxina termoestable muy parecida en su acción a la STa de ETEC, ya que actúa a nivel de la enzima guanilato ciclasa. Esta toxina se encuentra codificada en un gen plasmídico *astA* (Navarro y col., 1998).^[94] fue denominada como EAST-1 (*Enteroadgregative E. coli Stable Toxin*). Anteriormente Baldwin y col., reportaron una toxina termoestable que eleva los niveles de calcio intracelular de células eucariotes al activar a la proteína-quinasa, lo que haría pensar en dos toxinas diferentes en las cepas con adherencia agregativa (Agg).^[6, 61, 91, 94]

Nataro y col., (1995) centraron su atención en la fimbria que hace haces y la denominaron AAF/I (Fimbria de Adherencia Agregativa I), codificada por el gen *aggR*^[23] que se encuentra en un plásmido de 60 MDa y que aglutina eritrocitos de ratón y humano, además de estar ampliamente distribuida en cepas que hacen adherencia del tipo Agg (Nataro y col., 1992). También se ha descrito la fimbria AAF/II inmunológicamente diferente a AAF/I y que está codificada en el gen *aafA*; sin embargo, no todas las EAEC presentan fimbrias (Czeczulin y col., 1997).^[61, 105]

Eslava, Navarro y col., (1998) identificaron a una enterotoxina autotransportadora llamada Pet (*plasmad-encoded toxin*) codificada por plásmido de 104 kDa. Henderson, Navarro y col., (1999) describieron a la proteína Pic que está codificada en el genoma y que tiene actividad de proteasa.^[6, 17, 105]

Varios factores de virulencia de EAEC se localizan en un plásmido de adherencia agregativa (pAA) de 60 – 65 kDa, dentro de los cuales se incluyen, la adhesina AAF (Nataro y col., 1993), las toxinas Pet y EAST-1,^[43, 94] el activador transcripcional *AggR*^[92] y una proteína de antiagregación (14 kDa) codificada por el gen *aap*, anteriormente llamada *aspU*^[23, 114]. Además, en el mismo plásmido se han identificado otros genes que parecen ser específicos para EAEC, aunque estos todavía no han sido relacionados con la patogénesis.^[17]

7.1 Factores de virulencia, EAEC

⊙ AAF/I (Fimbria de Adherencia Agregativa I). En la cepa EAEC 17–2 se encontró una estructura flexible en forma de rollo de 2 a 3 nm de diámetro que media la adherencia a Hep-2 y hemaglutinación con eritrocitos humanos. Esta fimbria es codificada por el gen *aggR*^[23], que se encuentra en el *pAA* de 60 MDa.^[6, 17, 93, 105]

⊙ AAF/II en la cepa O42 (O44:H18) la cual es distinta morfológicamente y genéticamente a AAF/I, mide 5 nm de diámetro y le confiere la adherencia agregativa a la bacteria. Esta fimbria es codificada por el gen *aata* (*pAA* ~ 60 MDa); sin embargo no todas las EAEC presentan estas fimbrias.^[6, 17, 93, 94, 105]

⊙ EAST-1 (*Enteraggretive E. coli Stable Toxin*) toxina termoestable 1 de EAEC, codificada por el gen *astA* en el plásmido bacteriano, esta toxina produce un incremento en la secreción de iones por segmentos intestinales montados en cámara Ussing (incremento de corriente de corto circuito y diferencia de potencial), sin embargo este gen también es expresado por otras categorías de *E. coli* y su papel en infección no ha sido determinado.^[94]

⊙ Pic (Proteína implicada en colonización intestinal). Es una toxina de 116 kDa codificada en el cromosoma de EAEC O42 y de *Shigella flexneri* 2457T, ha sido demostrada una alta homología en la secuencia amino terminal con la mucinasa de *Shigella* codificada en el gen *she* que exhibe una alta similitud con otras SPATE.^[58, 94] El gen *pic* tiene una característica única entre las proteínas autotransportadoras, dentro de este GEN se encuentran dos genes completos que codifican para las subunidades *set1B* (7kDa) y *set1A* (20 kDa) de la proteína ShET1 (55kDa), pero estos genes se encuentran orientados en sentido opuesto del marco de lectura abierto (Noriega y col., 1995). Las secuencias que flanquean a *pic* difieren entre EAEC y *S. flexneri*, sugiere que este gen ha sido adquirido por transferencia horizontal. Por otro lado la secuencia del gen *pic* de *S. flexneri* conforma la isla de patogenicidad *she*, en la que están contenidas otras SPATE, como SigA, la cual es similar a Pet.^[6] Recientemente se ha descrito que Pic tiene un motivo serina–proteasa y que degrada gelatina, la cual puede ser inhibida por ruptura del sitio activo. Análisis funcionales de la proteína Pic revelan que tiene actividad de mucinasa, resistencia al suero y hemaglutinación.^[58] Pero no tiene efecto citotóxico en células epiteliales y no produce aumento en la secreción de iones en cámaras de Ussing.^[17, 43, 57, 93, 94]

⊙ Pet (*plasmid–encoded toxin*) toxina codificada por plásmido de 104 kDa codificada por el gen *pet* en el plásmido de virulencia de 65 MDa (*pAA*). Esta toxina es miembro de la familia de proteínas autotransportadoras (sistema de secreción tipo V) la cual tiene efecto citopático en células Hep-2, caracterizado por redondeamiento y desprendimiento de las células así como contracción del citoesqueleto y pérdida de fibras de actina.^[6, 17, 43, 57, 58, 93, 105] El análisis de la secuencia de aa deducida de Pet (GeneBank) muestra (83% de similitud) con la proteína EspP de EHEC, 70% al producto del gen *espC* de EPEC y 60% con SepA (proteína secretada de *Shigella flexneri*).^[81]

7.1.1 Mecanismo de patogenicidad, EAEC

Poco se conoce en cuanto a la patogénesis de la infección por EAEC, sin embargo se ha propuesto un modelo que comprende tres etapas.^[17, 22, 91, 93]

1.- Adherencia inicial de la bacteria a la mucosa intestinal y/o capa de moco, a través de las fimbrias AAF/I y AAF/II y quizá otros factores.

2.- Formación de una biopelícula bacteria–moco en la superficie del intestino. EAEC característicamente aumenta la secreción de moco por la mucosa, el cual lleva a su atrapamiento para formar una biopelícula de moco (producción y secreción de moco atrapa a las bacterias que se autoaglutinan). La colonización de EAEC podría ser aumentada por la interacción entre el moco y el patrón hidrofóbico de la adhesina AAF y tal vez por la elaboración de toxinas que pueden aumentar la elaboración de moco (Nataro y col., 1992; Nataro y col., 1998).^[93]

3.- Elaboración de toxinas y/o inflamación (esto se ha sugerido con base en las evidencias histológicas y moleculares), lo cual conduce al daño de la mucosa y a la secreción intestinal. Se han identificado tres toxinas secretadas por EAEC: EAST-1,^[93] Pic y la toxina Pet.^[43]

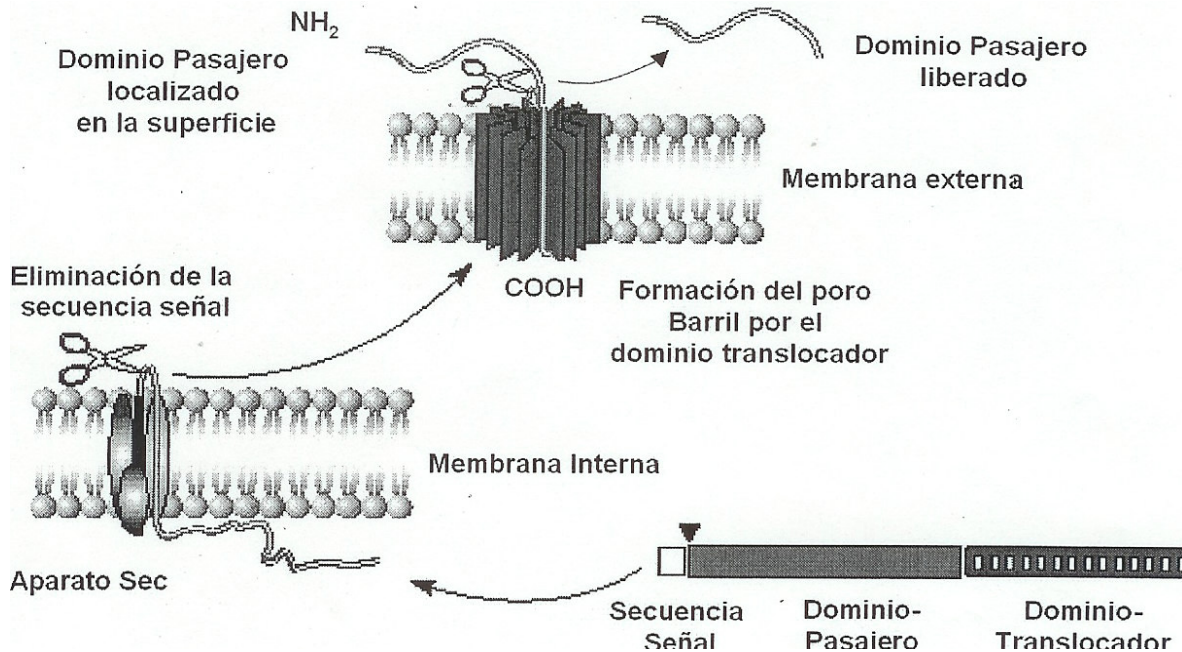
El sitio blanco de daño de EAEC puede ser la mucosa del intestino grueso y delgado, con un periodo de incubación de menos de ocho horas y puede durar hasta 18 o 20 días.

7.1.1.1 Sistema de secreción tipo V

El sistema de secreción V, originalmente descrito para la proteasa de IgA, actualmente es característica de una creciente familia de factores, la cual incluye proteínas secretadas en *Neisseria*, *Haemophilus*, *Bordeella* y *Helicobacter*, así como varios miembros de las *Enterobacteriaceae* incluyendo *Shigella* y *E. coli*.^[17, 57]

Este sistema es un mecanismo de secreción altamente eficiente, la toxina tiene tres dominios principales relacionados con su secreción: una secuencia señal, un dominio pasajero y un dominio β (dominio translocador). La proteína de 140 kDa atraviesa la membrana interna a través del aparato general de secreción, llamado *sec*, con ayuda de la secuencia señal; una vez en el periplasma, el extremo carboxi-terminal (dominio β) de la proteína se ensambla como un poro barril- β dentro de la membrana externa. La porción N-terminal de la molécula se cree que se inserta y mueve a través del poro barril- β de la membrana externa (Figura 7.1) para ser secretada, esta forma de secreción da lugar al original nombre de proteínas autotransportadoras.^[17, 57, 58]

Figura 7.1
Sistema de secreción tipo V.



Topología de una proteína autotransportadora. Los precursores de las proproteínas autotransportadoras comparten algunas similitudes. En la mayoría de los casos, la proproteína posee una secuencia señal, un dominio pasajero que posee un motivo serina-proteasa y el dominio translocador (dominio β) que posee una estructura anfipática β -plegada. Secreción de las autotransportadoras. La poliproteína autotransportadora es sintetizada y exportada a través de la vía membranaral citoplasmica que se piensa que es por un mecanismo dependiente de Sec. La secuencia señal es cortada en la membrana por una peptidasa señal, liberando la proproteína madura al periplasma, una vez en el periplasma el dominio translocador se inserta en la membrana externa formando un poro barril- β por el cual el dominio pasajero es traslocado hacia la superficie celular, donde es cortado y liberado al entorno.

Fuente: Henderson I.^[57]

7.1.1.2 Papel de Pet en la patogénesis de EAEC

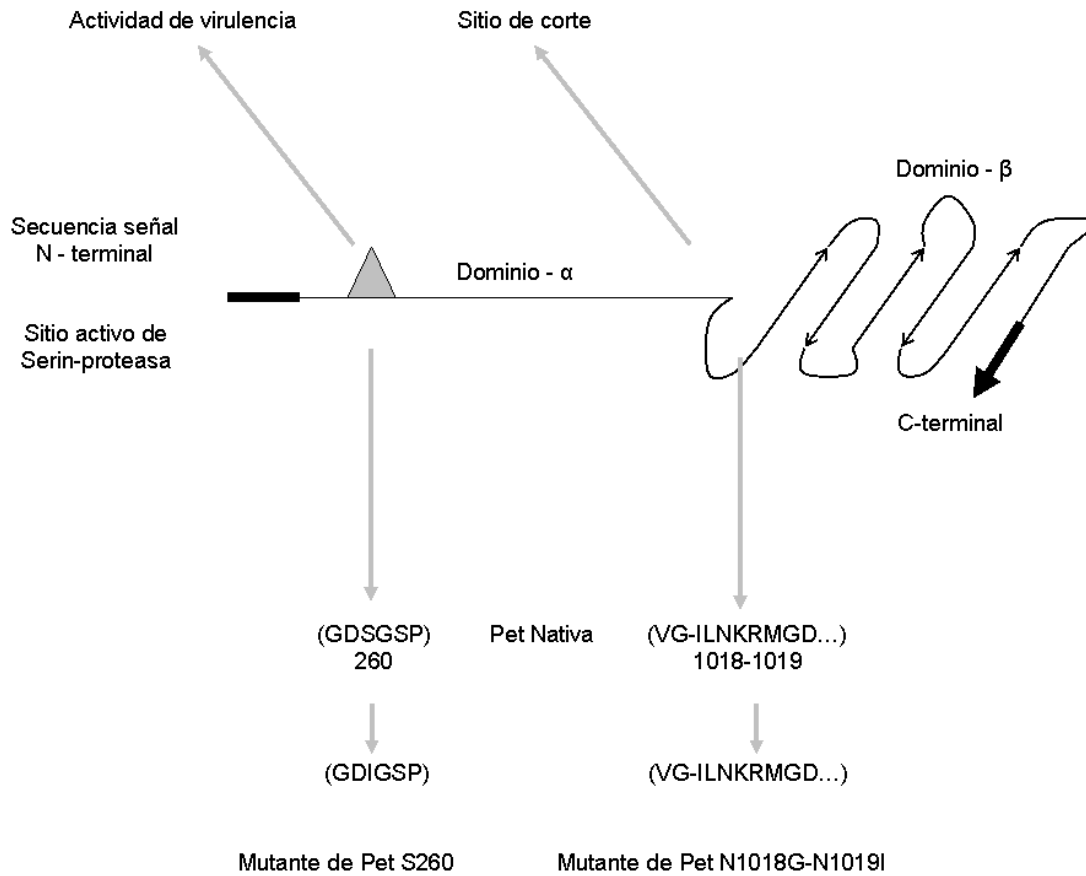
♣ *Efecto enterotóxico inducido por Pet.* Preparaciones de yeyuno de rata montadas en cámaras de Ussing tratadas con la toxina Pet mostraron un incremento en la secreción de iones por las células epiteliales, determinado por un incremento de corriente de corto circuito y de la diferencia de potencial. El tejido intestinal expuesto a Pet exhibe los cambios patológicos caracterizados por incremento en la liberación de moco, exfoliación de células, desarrollo de abscesos de las criptas y acortamientos de las vellosidades (Navarro y col., 1998).^[6, 17, 94]

♣ *Efecto citotóxico inducido por Pet.* Se ha demostrado que los efectos producidos por Pet sobre las células epiteliales son caracterizados por liberación de los contactos focales

celulares del sustrato seguido por redondeamiento de las células. Células Hep-2 teñidas con faloidina marcada con fluoresceína, revelan contracción del citoesqueleto y pérdida de las fibras de estrés; estos efectos son dosis y tiempo dependiente en células Hep-2 (Navarro y col., 1999).^[6, 17, 97] Los efectos citopáticos que produce Pet son debido al motivo serina-proteasa, ya que la proteína Pet induce proteólisis en geles de sustrato, y la preincubación con inhibidor (PMSF) de serina-proteasa resulta en la completa anulación de los efectos citopáticos. Para determinar el papel de la actividad de proteasa Pet, una mutación sitio-dirigido fue introducida en el residuo catalítico de serina S260, convirtiendo este aminoácido a isoleucina (Figura 7.2). Pet S260I fue secretado y procesado en sobrenadantes, en la *E. coli* HB101. Pet S260I fue deficiente en actividad de proteasa y no produce efectos citopáticos, daño al citoesqueleto ó efectos enterotóxicos en cámaras de Ussing (Canizalez y Navarro, 2003).^[6, 17, 19, 59] Esta y otra mutante de Pet en el sitio de corte entre el dominio pasajero y el dominio β (durante la secreción de la proteína predicha entre N¹⁰¹⁸ y N¹⁰¹⁹, en la cual se cambio ambas asparaginas convirtiéndolas en glicina e isoleucina respectivamente, Figura 7.2), la hemos usado para determinar su papel en el daño celular. Recientemente se ha encontrado que Pet, no produce degradación de la actina de las células epiteliales en cultivo, el efecto de Pet no es inhibido por drogas que estabilizan o desestabilizan el citoesqueleto, como taxol que estabiliza y colchicina que desestabiliza microtubulos; cytochalasina D que inhibe la polimerización de los filamentos de actina y faloidina que estabilizan los filamentos de actina.^[6, 96] Pet no produce daños a proteínas involucradas en el contacto focal de las células al sustrato como son: caderinas, cateinas, β 1 integrina, vinculina, desmogleina, VASP, paxilina, L1, FAK y pp120, no afecta la estructura o conformación de las proteínas que recientemente han sido involucradas en la regulación del citoesqueleto, principalmente en la regulación de fibras de estrés, como son: RhoA, Rac y Cdc42HS (datos no publicados).^[17]

♣ *Efecto de Pet sobre fodrina (espectrina no eritroide)*. La toxina Pet produce daño a las células epiteliales a través de un nuevo mecanismo, su sitio blanco de acción es fodrina un análogo de espectrina, la cual es parte del esqueleto de la membrana y permite la unión del citoesqueleto a la membrana citoplasmática. Fodrina es una heterodímero formado por dos grandes polipéptidos, una cadena α de 2429 aminoácidos (240 kDa) y de una cadena β de 2137 aminoácidos (220 kDa), compuestas de unidades homólogas repetidas de 106 aminoácidos (Didier Dhermy, 1991; Bennett y Gilligan, 1993).^[6, 17] Fodrina mantiene la conexión de la membrana plasmática con la red de actina citoplasmática como un mecanismo para la generación de la forma celular y estabilidad mecánica. La demolición proteolítica de fodrina dentro de las células, podría inducir una disgregación del esqueleto de la membrana y la disgregación de la conexión con la red de actina citoplasmática, conduciendo esto a alteraciones de la membrana y finalmente a muerte celular (Didier Dhermy, 1991). Se ha determinado que Pet purificado produce degradación de α y β -espectrina en membranas de eritrocitos y en α y β -fodrina en células Hep-2. La degradación de espectrina de eritrocitos genera un producto de degradación de 120 kDa, y la secuencia N-terminal de este subproducto en membranas de eritrocitos fue idéntica a la de espectrina- α madura, indicando que el sitio de corte ocurre en el C-terminal (Villaseca y col., 2000),^[17, 81] sin embargo por tanto no se sabe cuál es la secuencia de la fodrina donde ocurre el corte principal. Se ha demostrado que el efecto de la degradación de fodrina producido por Pet es debido al motivo serina-proteasa. Ya que la mutante Pet S260I no tiene efecto sobre la degradación de fodrina y espectrina no eritroide (Villaseca y col., 2000).^[17, 135] Fodrina es una proteína intracelular, lo que sugiere que la toxina puede (o debe) ser internalizada.^[17]

Figura 7.2
Mutantes de Pet.



Mutación sitio-dirigido introducida en el residuo catalítico de serina S260, convirtiendo este aminoácido a isoleucina, mutante de Pet en el sitio de corte entre el dominio pasajero y el dominio β durante la secreción de la proteína predicha entre N¹⁰¹⁸ y N¹⁰¹⁹; en la cual se cambió ambas asparaginas convirtiéndolas en glicina e isoleucina respectivamente.

Fuente : Canizalez R.^[17, 18]

7.1.1.2.1 Mecanismo de internalización y daño producido por Pet a su blanco, Fodrina

Canizalez y Navarro, (2003) encontraron que Pet se une a la superficie celular alcanzando su saturación con 100 nM y esta unión depende de un posible receptor de 35 kDa. Pet es endocitada por vía dependiente de clatrina, puesto que monodansil cadaverina y sacarosa inhiben la internalización de Pet, pero no filipina, la cual interfiere con la vía de entrada a través de caveola. Pet es subsecuentemente transferido a un compartimento endosomal y en este proceso están implicados eventos de fosforilación. Pet sigue un transporte retrógrado intracelular; experimentos de microscopia confocal mostraron colocalización secuencial entre Pet y el aparato de Golgi o con el retículo endoplasmico.^[19]

Finalmente, en el citosol, Pet tiene afinidad por fodrina- α . Todos estos datos indican que el mecanismo de daño de Pet en las células implica una serie de pasos:^[18, 19]

- i) Unión e internalización de la toxina Pet a las células
- ii) Transporte intracelular de la toxina para alcanzar el citosol
- iii) Interacción y degradación de su molécula blanco, fodrina- α
- iv) Alteración del citoesqueleto y muerte celular

7.2 Modo de transmisión, EAEC

■ Alimentos y bebidas contaminados.

En estudios de voluntarios adultos, la cepa EAEC O42 (O44:H18) provocó diarrea con moco, sin sangre, utilizando una dosis infectiva de 10^{10} UFC, después de haber neutralizado el pH estomacal con bicarbonato. En este mismo estudio se observó que todos los voluntarios permanecieron sin fiebre, determinándose además que el periodo de incubación fue de 8 a 18 hrs (Nataro y col., 1995).^[22]

7.3 Cuadro clínico, EAEC

En niños puede manifestarse con diarrea líquida, de color verde, con moco, sin sangre, y en ocasiones puede llegar a ser severa. Algunas veces el cuadro clínico se presenta como diarrea con moco con/sin sangre, vómito y sin/con poca fiebre.^[22, 93, 105]

7.4 Frecuencia, EAEC

Esta bacteria puede causar brotes o casos aislados de diarrea persistente.^[105]

7.5 Diagnóstico, EAEC

La prueba de referencia en el diagnóstico de EAEC es la observación de la adherencia agregativa en células Hep-2 de cultivos bacterianos, previamente inoculados en medio Luria e incubados en condiciones estacionarias y a 37 °C. Otras pruebas de diagnóstico se indican en el (Cuadro 4); Cerna y col., (2003) diseñaron una PCR multiplex que identifica genes (*aap*, *aggR* y *aatR*) enteroagregativos.^[23]

7.6 Tratamiento, EAEC^[105]

- ◇ Rehidratación oral.
- ◇ Rehidratación intravenosa en una infección severa.

8 *E. coli* e adherencia-difusa (ADEC)

Las cepas de *E. coli* de adherencia-difusa, no forman microcolonias cuando se adhieren a células Hep-2 o HeLa.^[42]

Nataro y col., (1985) describieron que las características de hacer adherencia difusa (DA) (Figura 6.1-B), se encuentra codificada en genes plasmídicos aunque en algunos casos encontraron que dichos genes eran cromosomales, además menciona que la fimbria encargada de hacer esta adherencia no confiere patrones característicos de hemaglutinación como lo hacen las cepas ETEC.^[105]

Bilge y col., (1989) caracterizaron una fimbria de superficie, conocida como F1845, involucrada en el fenómeno de adherencia difusa.^[105, 113]

Benz y Schmidt, (1992) trabajando con la cepa EPEC 2787 (O126:H27) que produce adherencia difusa, describieron que una proteína de 100 kDa^[105] es la responsable de ésta propiedad y la denominaron AIDA-I (Adhesina involucrada en DA), dicha proteína se encuentra codificada en un plásmido de 100 kbp.^[113] Aún existe controversia en cuanto a que papel pueden tener éstas cepas como agentes causales de diarrea; un estudio realizado por Ticket demuestra que al administrar a voluntarios cepas de *E. coli* que se adherían en forma difusa no presentaron diarrea, en cambio, en un estudio realizado por Girón, (1991), en niños mexicanos con diarrea se encontró un 58.3% de aislamiento de cepas DA positivas.^[61, 113]

Nowick y col., (2001) Clasificaron cepas de ADEC relacionadas con las adhesinas Afa/Dr (Afa/Dr, ADEC). Cepas ADEC tienden a asociarse con infecciones del tracto urinario (ITU) pielonefritis, cistitis, bacteriuria asintomática y varias infecciones entéricas.^[113]

8.1 Factores de patogenicidad, ADEC

♪ F1845 – Fimbria de superficie, codificada por el operon *daa* (Figura 8.2), involucrada en el fenómeno de DA.^[113]

♪ AIDA-I (Adhesina involucrada en DA) – Proteína de membrana externa de 100 kDa, en una cepa del serotipo O126:H27, cuyos genes se han secuenciado pero sólo se ha encontrado en una minoría de las cepas aisladas.^[105, 113]

Se sabe poco de su mecanismo de patogenicidad.

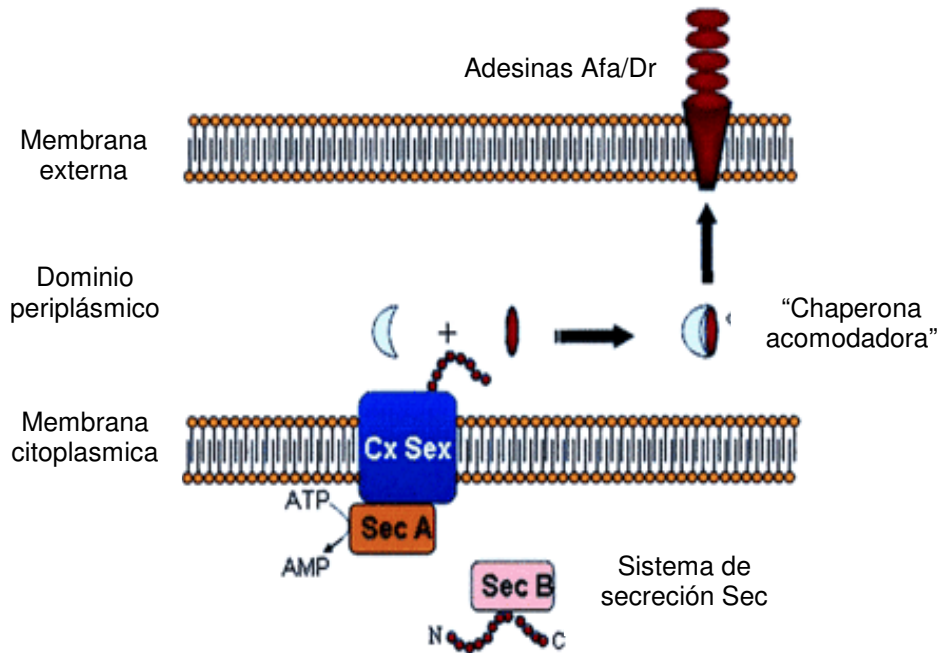
8.1.1 Adhesina Afa

(Afa) Adhesina afimbrial, codificada por el operon *afa* (Figura 8.2), asociada a UPEC y ADEC.^[113]

AfaE produce la estructura de la adhesina; AfaE-I requiere a los genes *afaB*, *afaC* y *afaE* que causan hemaglutinación resistente a la manosa (HARM), expresada en UPEC KS52. AfaE-I es 32% idéntica a Dr. La secuencia de aa de AfaE-III es 98% idéntica a Dr. El gen *afa-3* se relaciona estrechamente con el operon *daa*, que codifica para la fimbria F1845.^[113]

AfaB y AfaC promueven a las proteínas chaperonas en el periplasma y otras proteínas ancladoras de membrana (Figura 8.1).^[113]

Figura 8.1
Ensamblaje de adhesinas Afa/Dr.



Fuente: Servin A.^[113]

AfaA y AfaF muestran homología con proteínas regulatorías-transcripcionales PapI-PapB.^[113]

8.1.2 Adhesina Dr (Hemaglutinina Dr ó adhesina O75X)

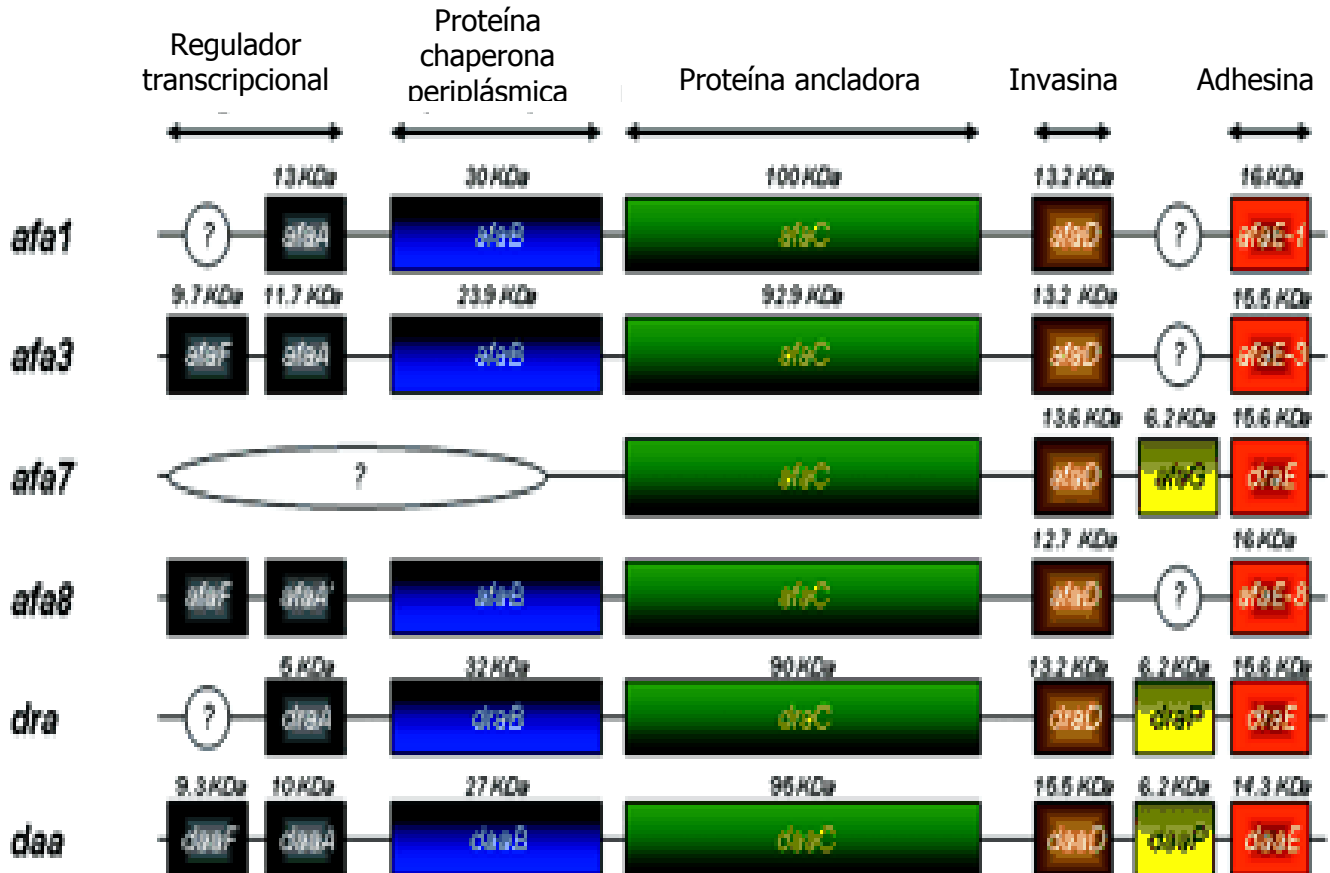
Adhesina (Dr) requiere cuatro genes *draA*, *draC*, *draD* y *draE* para que ocacione HARM, expresada en la cepa UPEC IH11128 (O75:K5:H), codificada por el operon *dra* (Figura 8.2).^[113]

8.1.3 Adhesina fimbrial F1845

Una adhesina fimbrial, designada F1845, involucrada en el fenómeno de adherencia difusa, es codificada por el operon *daa* (Figura 8.2).^[113]

El gen *daaE* toma parte en la secuencia de señales, homólogo a AfaE-I, pero no codifica en la región de la proteína madura; F1845 es 57% idéntica a Dr.^[113]

Figura 8.2
Organización genética de los operones *afa*, *dra* y *daa*.



Fuente: Servin A.^[113]

8.2 Mecanismo de virulencia de adhesinas Afa/Dr, ADEC

Observando datos experimentales con cultivos de líneas celulares, revelan lesiones estructurales en el microvilli intestinal, en la barrera epitelial, caracterizados por enterocitos del intestino delgado o el colon (Figura 8.3).

8.3 Cepas ADEC típica y ADEC atípica

Servin, (2005) propuso dos clasificaciones de cepas: ADEC típica y ADEC atípica, con una subclase en cada cepa.^[113]

◆ ADEC típica, contiene adhesinas Afa/Dr.

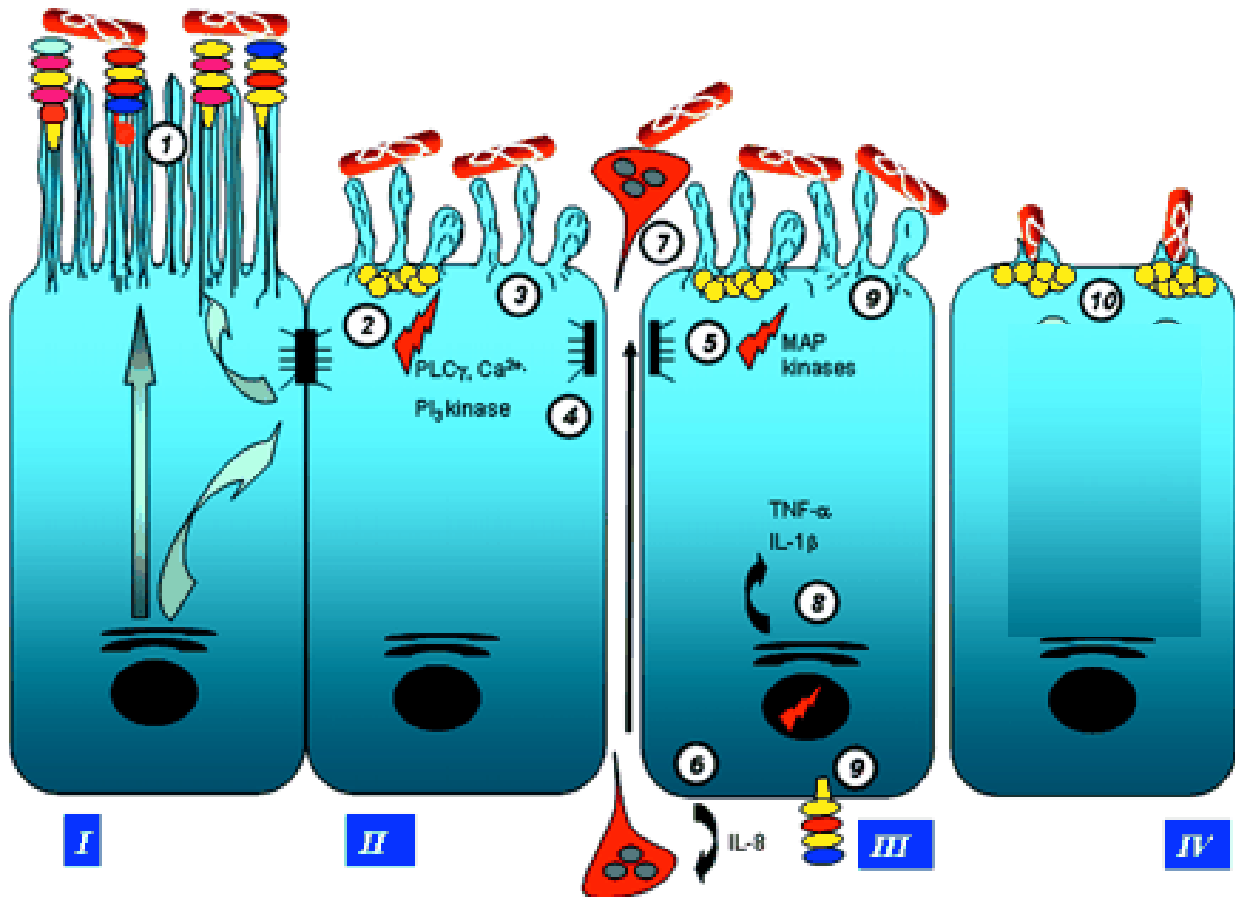
- 1.- Teniendo una organización genética idéntica.
- 2.- Permitiendo la unión sobre el receptor celular (DAF, CD55).

3.- Fomentando la agrupación de DAF.

ADEC típica (Afa/Dr_{DAF}), incluye cepas que expresan adhesinas: AfaE-I, AfaE-II, AfaE-III, AfaE-V, Dr, Dr-II, F1845 y NFA-I. Estas clases de cepas incluyen dos subclases:^[113]

- Adhesinas AfaE-III, Dr y F1845 se unen a receptor CEA (Afa/Dr_{CEA}).
- Adhesinas AfaE-I y Dr-II que no se unen a CEA.

Figura 8.3
Mecanismo de virulencia de adhesinas Afa/Dr, ADEC.



- 1) Las células epiteliales tienen receptores de membranas DAF [CD55] para adhesina Afa/Dr_{DAF} ; CEACAM1, CEA y CEACAM6 que interactúan con adhesina Afa/Dr_{CEA}, AfaE-III, Dr y F1845.
- 2) Se activan señalizaciones de proteínas, que involucra a fosfolipasa γ , fosfatidilinositol 3-Kinasa y un incremento en la concentración de Ca^{+2} .
- 3) Lesión estructural en el microvilli (elongación).
- 4) Incremento de permeabilidad paracelular.
- 5) Mecanismo de señalización dependiente-MAPK.
- 6) Producción de IL-8.
- 7) Afa/Dr, ADEC interactúa con PMN.
- 8) Producción de TNF- α e IL-1 β .
- 9) Expresión de DAF en el dominio basolateral.
- 10) Hay modificación de célula huésped, la que rodea a la bacteria pero no la internaliza.

Fuente: Servin A.^[113]

◆ ADEC atípica está dividida en dos subclases, el cual contiene adhesinas Afa/Dr u otras.

1.- Teniendo una organización genética idéntica

2.- No se une al receptor DAF

ADEC atípica subclase 1, incluye cepas que expresan adhesinas: AfaE-VII, AfaE-VIII, AAF-I y AAF-II.

ADEC atípica subclase 2, la cual contiene adhesinas Afa/Dr u otras. Incluye cepas EPEC-DA (tienen adhesina AIDA-I y LEE).^[113]

8.4 Principales síntomas, ADEC

- Diarrea acuosa sin sangre y sin leucocitos.^[105]

8.5 Frecuencia, ADEC

El grupo de ADEC se puede aislar tanto de personas sanas como de personas con diarrea, siendo más importante en niños de 4 a 5 años.^[105]

8.6 Diagnóstico, ADEC

En el (Cuadro 2.4) se indican los métodos de diagnóstico. La hibridación con sondas derivadas de un fragmento del gen *daaC*, que codifica para la fimbria F-1845, también se ha empleado para el diagnóstico, pero puede presentar falsos positivos, y el diagnóstico empleando PCR aún no se ha desarrollado.^[105]

II. Justificación

Hasta el momento, se ha registrado un descenso de morbilidad por diarrea durante la temporada primavera-verano y un aumento paulatino durante otoño-invierno. Se considera, en general, que las diarreas durante la temporada de primavera-verano son debidas principalmente a bacterias, mientras que durante otoño-invierno están asociadas a virus.

La diarrea es una de las principales causas de muertes en niños menores de 5 años en países en vías de desarrollo y en el mundo.^[48, 104, 124, 128, 138] La SSA/INEGI en el año 2002, mostró que las enfermedades intestinales infecciosas son la cuarta causa de mortalidad infantil en menores de 1 año y la principal causa en niños de 1 a 4 años con una tasa de 4.96 / 100,000 habitantes; la deshidratación y diarrea, cada año causa la muerte a cuatro mil niños.^[30, 49, 132]

En México no se han realizado estudios epidemiológicos para establecer la importancia e identificación de las bacterias de los grupos de *E. coli* diarreogénicos (GED) en particular, por lo que es necesario realizar una investigación que permita determinar su importancia.

Diversos estudios han mostrado que los GED en su conjunto son importantes agentes etiológicos causantes de diarrea aguda en niños en el mundo. En nuestro país no existen estudios epidemiológicos que incluyan a los 6 GED, ya que no hay pruebas bioquímicas para su detección, por lo que estos microorganismos no son identificados de manera cotidiana por los laboratorios clínicos. Hasta el momento se identifican mediante productos de los genes que confieren las características de patogenicidad (en los que están bien establecidos) o en la identificación de estos genes por *colony blot* y PCR.

Por medio de ésta revisión se pretende dar a conocer diferentes áreas de investigación y desarrollo, para determinar los diferentes patotipos de *Escherichia coli*.

III. Objetivos

III – A) Objetivo general

Realizar una actualización biblio-hemerográfica sobre infecciones gastrointestinales causadas por diferentes patotipos de *Escherichia coli* en México, haciendo énfasis en ETEC y EHEC; recopilando información de manera ordenada, lógica y congruente para ampliar el conocimiento en el área de investigación y desarrollo para el Q.F.B., Q.B.P., Biólogos, Médicos, etc.

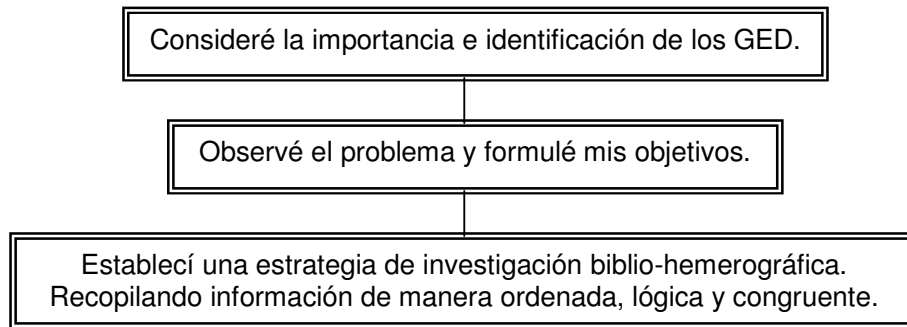
III – B) Objetivos particulares

Identificar el patrón epidemiológico de diarrea en la población mexicana, mediante las actuales notificaciones, para determinar su incidencia.

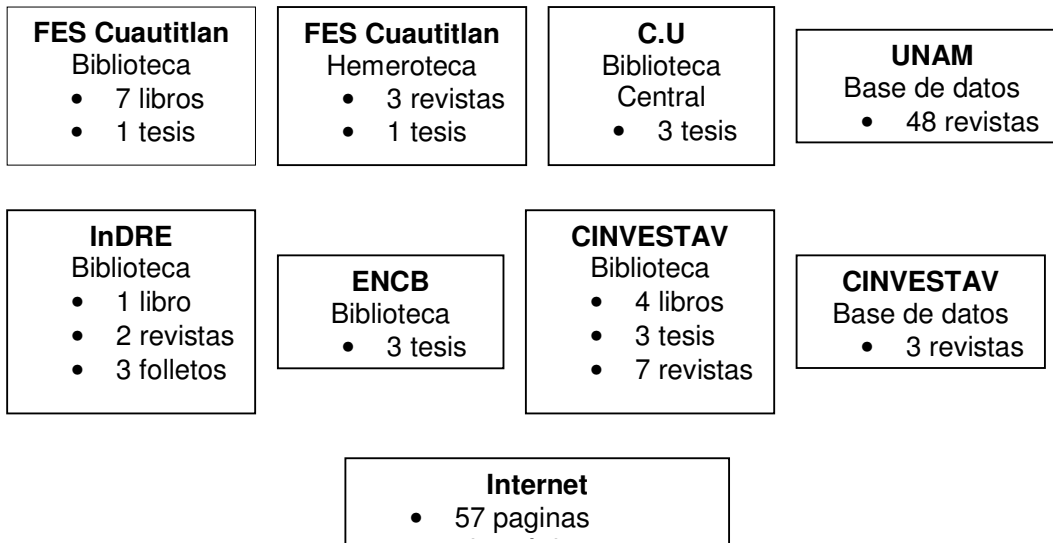
Documentar la prevalencia de los grupos *E. coli* diarreogénicos (GED), adquiriendo información desde los primeros hallazgos hasta la fecha, para determinar la importancia de ETEC y EHEC.

Proponer medidas de prevención contra ETEC y EHEC, implementando estrategias específicas y normas sanitarias, para tratar de evitar infecciones gastrointestinales.

IV. Metodología



Utilicé las siguientes fuentes de información:



Los resultados son tablas y gráficas de diversos estudios de investigación de infecciones gastrointestinales en población mexicana hasta los años más recientes, relacionados con los GED.

V. Resultados

Existen pocos estudios en los que se haya realizado la búsqueda de agentes etiológicos productores de diarrea en niños menores de cinco años y los que existen fueron realizados antes de la llegada de la epidemia del cólera a nuestro país en 1991. Referente a la etiología de las diarreas en México se han publicado diversos trabajos.

Cravioto y col., (1985) 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 niños que nacieron entre Marzo 1982 a Marzo 1983. De los 372 episodios, el 27% de los casos no fue posible identificar agente etiológico, pero si en el 73% (270/372) restantes (Tabla V-1). En el 13% de los episodios existieron infecciones mixtas.^[29]

Tabla V-1
Etiología de diarrea en una comunidad rural de Cuernavaca, México
con niños que nacieron entre Marzo 1982 a Marzo 1983.

Agentes identificados	% Casos
ETEC	34
Rotavirus	10
EPEC	8
<i>Salmonella y Campylobacter jejuni</i>	6
<i>Giardia lamblia y Entamoeba histolytica</i>	5
<i>Shigella</i>	4

Fuente: Cravioto A.^[29]

Durante el año de 1985, en un hospital del Sur de la ciudad de México Sepúlveda-Amor (1990), reportó los agentes etiológicos causantes de diarrea en 125 niños que llegaron al servicio de urgencias médicas (Tabla V-2).^[22]

Tabla V-2
Etiología de diarrea en un hospital del Sur de la
ciudad de México en 1985.

Agentes identificados	% Casos
EPEC	28
<i>Campylobacter</i>	15
ETEC	13
<i>Shigella</i>	9
<i>Giardia lamblia</i>	8
Rotavirus	6
<i>Entamoeba histolytica</i>	1.6
<i>Salmonella</i>	0.8

Fuente: Cerna C.^[22]

Morayta y col., (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 1988 a Julio 1990. No fue posible identificar agente patógeno en el 33% (57/121) de los casos. Se identificaron 81 agentes etiológicos diferentes en el 53% (64/121) de los niños. En el mayor número de ellos se encontró en menores de doce meses. En la Tabla V-3 se presentan los agentes identificados.^[22]

Tabla V-3
Agentes causales de diarrea aguda en niños durante
(Diciembre 1988 a Julio 1990).

Agentes identificados	% Casos
Rotavirus	23
EPEC	17
<i>Salmonella</i>	10
<i>Campylobacter jejuni</i>	9
<i>Shigella</i>	7
<i>Clostridium difficile</i>	1
<i>Cryptosporidium</i>	1

Fuente: Cerna C.^[22]

Guerrant y col., (1990) encontraron que ETEC es endémica en nuestro medio y que causa la diarrea del turista en todo el mundo.^[52, 132]

Benítez y col., (1991) realizaron la búsqueda de agentes etiológicos que causaban 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 casos de diarrea, en el que el 11% (71/636) de los episodios hubo presencia de sangre en heces, aislándose por lo menos un patógeno en el 83% (59/71) (Tabla V-4). Se identificaron infecciones mixtas en el 17%; estas infecciones mixtas fueron principalmente entre *Campylobacter jejuni* con EAEC y entre ETEC con EAEC.^[10]

Tabla V-4
Etiología de diarrea en una comunidad de Cuernavaca, Morelos
“Lugar sobre la Tierra Blanca” en 1991.

Agentes identificados	% Casos
EAEC	35
EHEC	17
<i>Shigella</i>	14
<i>Campylobacter jejuni</i>	7
ETEC	7
EPEC	4
EIEC	4
<i>Salmonella sp.</i>	4
<i>Giardia lamblia</i>	4
<i>Hymenolepis nana</i>	4

Fuente: Benítez O.^[10]

Estudios epidemiológicos, realizados en México por (Cravioto y col., 1990 y 1998), mostraron que las cepas de EIEC se aíslan con poca frecuencia de pacientes con diarrea y en general cuando se aíslan están asociadas con niños mayores de 6 meses.^[22, 42]

Flores-Abuxapqui y col., (1993) evaluaron los agentes productores de diarrea líquida en 148 niños menores de dos años que ingresaron al hospital O'Horán, de la ciudad de Mérida Yucatán, con diagnóstico de diarrea aguda, durante el periodo comprendido entre el 1 de Enero al 31 de Octubre 1991 (Tabla V-5). El 70.9% (105/148) de las muestras fueron líquidas. Del total de las muestras líquidas, en el 61.9% (65/105) se aisló al menos un agente patógeno entérico, en el 35.2% (37/105) se aisló un solo agente etiológico.^[22]

Tabla V-5
Agentes causales de diarrea aguda líquida en niños menores de dos años en la ciudad de Mérida, Yucatán entre el 1 de Enero al 31 de Octubre 1991.

Agentes identificados	% Casos
ETEC	17.1
Rotavirus	14.3
<i>Shigella</i>	5.7
<i>Salmonella</i>	5.7
<i>Giardia lamblia</i>	4.8
<i>Campylobacter</i>	3.8
EIEC	2.8
<i>Entamoeba histolytica</i>	2.8
Adenovirus	1.9

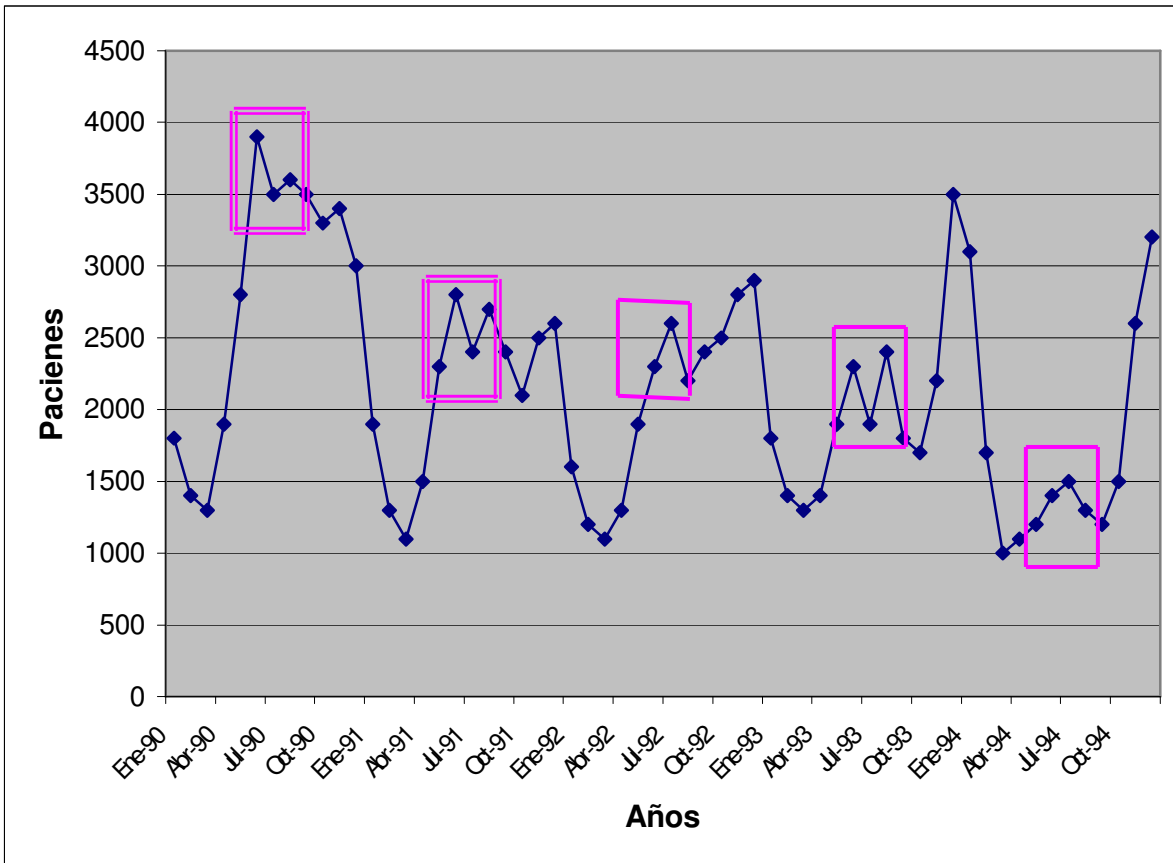
Fuente: Cerna C.^[22]

Los trabajos anteriores fueron realizados antes de la llegada del cólera a nuestro país, por lo que es necesario contar con reportes recientes que nos indiquen la importancia actual de los GED.

Después de la llegada de la epidemia de cólera a nuestro país, en el verano de 1991, se presentó una disminución de aproximadamente el 15% en la notificación de casos de diarrea (Velásquez y col., 2001). La información obtenida del Sistema Nacional de Registro del IMSS durante el período de 1990-1994, que incluyó datos de 259 hospitales de todo el país, mostró un descenso de hospitalizaciones del 8% por diarrea en niños menores de cinco años. Esta disminución se observó sobre todo, en el grupo de niños menores de un año y durante la temporada P-V, mientras que en O-I, se observó un incremento paulatino en el número de hospitalizaciones (Gráfica V.1).^[22]

En 1990-1991 se observaron 2 brotes de diarrea. El brote en los meses húmedos y calurosos (P-V) fue mayor que en O-I; a partir de 1992-1994 la frecuencia observada en P-V se redujo paulatinamente, mientras que en O-I los brotes anuales permanecieron (Gráfica V.1).^[22]

Gráfica V.1
Hospitalizaciones por diarrea aguda en niños menores de cinco años,
IMSS 1990-1994.



P-V > O-I

P-V

Aumento de hospitalizaciones
Disminución de hospitalizaciones

(1990-1991)
(1992-1994)

Fuente: Cerna C.^[22]

Lo anterior significa que en los últimos años se ha observado un claro cambio en el patrón de las enfermedades diarreicas en México. Este cambio puede deberse a las campañas de salud pública implementadas debido a la epidemia del cólera, tales como: mejor higiene personal, cloración del agua, mayor letrinización, entre otras, que parecen haber tenido un efecto favorable sobre la distribución en el número de casos diarreicos.

En el InDRE (Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos), desde 1993 se empezó la estandarización de métodos de biología molecular como “*colony blot*” y PCR, desde 1996 se emplean con fines diagnósticos y como apoyo a la vigilancia epidemiológica para la caracterización de *E. coli* patógena aislada de casos diarreicos y cuyos resultados han sido presentados en diversas reuniones científicas.^[105]

Giono y col., (1994) investigaron la capacidad de 104 cepas de *E. coli* para producir toxinas LT y VT en cultivos de células Vero y su correlación con la expresión fenotípica (bioquímica y serología) y genotípica (presencia del gen que codifica para producción de toxina) "colony blot"; 40 cepas fueron aisladas de alimentos y 64 aisladas de heces obtenidas durante un brote de diarrea. No se encontró el serotipo O157:H7. En células Vero se encontraron 3 (2.8%) cepas productoras de VT (1 aislada de alimento y 2 de heces diarreicas) que serológicamente no corresponden al grupo EHEC, 77 (74%) productoras únicamente de LT y 19 (18.2%) que producen LT y VT. Una cepa de *E. coli* de un infante con diarrea fue sorbitol negativo con efecto citotóxico y aglutino con suero O55. El 93.75% de las cepas de *E. coli* pertenecieron al grupo ETEC.^[55]

Entre Octubre 1995 y Agosto 1996 (Betancourt y col., 1999), estudiaron 533 niños de cinco años de edad o menos, de diferentes municipios del estado de Veracruz con diagnóstico clínico de diarrea infecciosa aguda definida como un incremento en el número de evacuaciones al día con una disminución variable de su consistencia habitual. Se realizó coprocultivos positivos para *Escherichia coli*, posteriormente las muestras se enviaron al InDRE. De los cinco serotipos de *E. coli*, 71.49% correspondieron a estirpes patógenas (381 de 533) y el 28.5% no patógenas (Tabla V-6).^[11]

Tabla V-6
***E. coli* causante de diarrea en diferentes municipios del estado de Veracruz, México, entre Octubre 1995 y Agosto 1996.**

GED	% Casos
EIEC	55.4
ETEC	25.2
EPEC	16.0
VTEC	3.4

Fuente: Betancourt S.^[11]

El 31 de Mayo del 2000 se presentó un brote causado por *Escherichia coli* en Chalco, México, provocando diarrea y vómito asociado con un desbordamiento de un canal de aguas negras. El estudio se efectuó en el InDRE, de la Secretaría de Salud (Cortés y col., 2002), con 1,550 hisopos rectales para el aislamiento e identificación bioquímica de *V. cholerae* y enterobacterias, obtenidos de la población del Valle de Chalco. Las cepas de *E. coli* se hibridaron por "colony blot" para los grupos ETEC, EIEC, EPEC y EHEC (Tabla V-7). El 0.45% correspondió a *Salmonella sp*, 0.06% a *Shigella flexneri*, y 76.6% a *E. coli*. El 22.9% restante fueron bacterias sin importancia médica. No se encontró asociación entre *E. coli* patógena con la edad y género de los pacientes.^[28]

Tabla V-7
Brote causado por *Escherichia coli* en Chalco, México,
el 31 de Mayo del 2000.

GED	% Casos
ETEC	62.20
EIEC	0.84
EPEC	0.84
EHEC / no O157:H7	0.08
No hibridó*	36.02

* Las cepas que no hibridaron con ninguna de las sondas empleadas se consideraron *E. coli* no agrupadas, ya que dentro de ellas pudieron encontrarse *E. coli* enteroagregativas y *E. coli* de adherencia difusa que puedan estar involucradas en la producción de diarrea.

Fuente: Cortes O. [28]

En las 1,188 cepas de *E. coli* aisladas, 62.2% correspondió a ETEC (739/1 188), de las que 44.6% hibridó con la sonda para la enterotoxina LT, 11.2% con la enterotoxina ST, y 44.1% lo hizo con ambas sondas (Tabla V-8). El 0.84% de EIEC (10/1188) lo logró usando la sonda que detecta el locus asociado con la invasividad, *ial*; 0.84% a EPEC (10/1 188) con la sonda para la subunidad A del pili BFP, 0.08% a *E. coli* enterohemorrágica no O157:H7 (1/1 188) con la sonda para la enterohemolisina pCVD419, y 36.02% (428/1 188) no hibridó con ninguna de las sondas empleadas. Sin embargo, la única cepa que hibridó con la sonda pCVD419 no aglutinó con el antisuero O:157, por lo tanto, no se consideró en el grupo EHEC. [28]

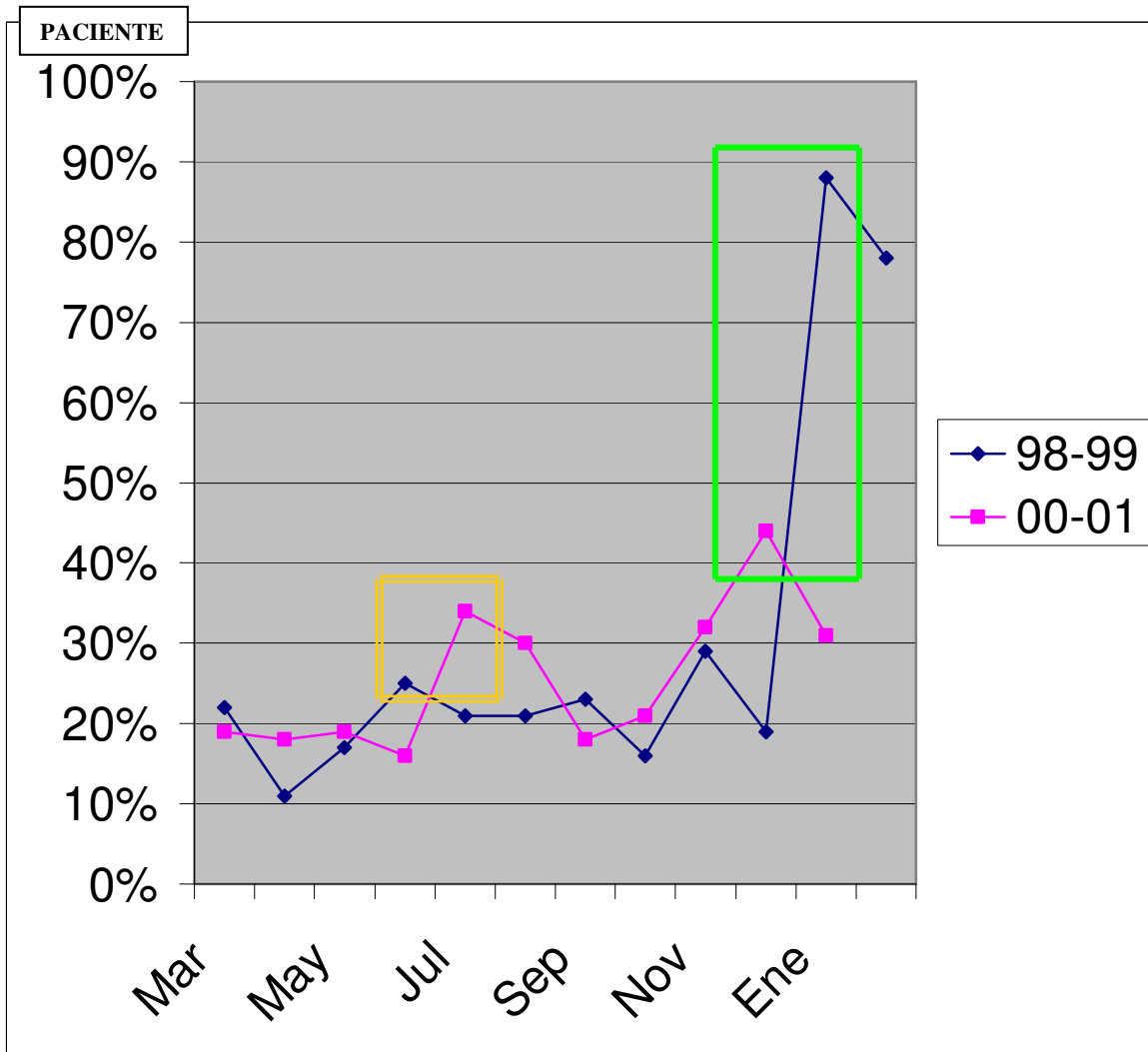
Tabla V-8
ETEC y los genes identificados en el brote de Valle de Chalco.

GED	Gen (es) o fragmento Identificado (s)	% Casos
ETEC	<i>lt</i>	44.6
ETEC	<i>st</i>	11.2
ETEC	<i>lt y st</i>	44.1

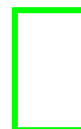
Fuente: Cortés O. [28]

Cerna Cortés J., (2003) estableció un patrón epidemiológico de la diarrea aguda, en niños menores de 5 años, ingresados en tres hospitales de segundo nivel del IMSS, D.F. Durante los periodos de Marzo 1998 a Febrero 1999 y Marzo 2000 a Febrero 2001. En los ingresos hospitalarios por mes observamos claramente dos picos para los dos años, el primero se presenta durante P-V y el segundo en la temporada O-I (Gráfica V.2).^[22]

Gráfica V.2
Ingresos hospitalarios diarreogénicos por MES durante los periodos de
(Marzo 1998 –Febrero 1999 y Marzo 2000-Febrero 2001).



P-V
 Infección
 bacteriana



O-I
 Infección
 viral

Fuente: Cerna C.^[22]

En los tres hospitales, los pacientes hospitalizados fueron en su mayoría niños menores de 12 meses de edad con 50%. Seguidos por el grupo de niños de 13 a 24 meses; siendo el grupo de niños menos hospitalizados por diarrea aguda el de 4 a 5 años de edad (Tabla V-9).^[22]

Tabla V-9
Ingresos hospitalarios diarreogénicos por EDAD durante
(Mar98-Feb99 y Mar00-Feb01).

Edad en meses	% Hospitalizaciones
0-12	50
13-24	25
25-36	13
37-48	8
49-60	4

Fuente: Cerna C.^[22]

El análisis de las muestras de los niños con diarrea aguda para la búsqueda de virus, bacterias y parásitos, se realizó en la sección de virología, bacteriología y parasitología de la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Infecciosas y Parasitarias, del Centro Medico Nacional, Siglo XXI, con la excepción de los GED identificados en el CINVESTAV (Tabla V-10).^[22]

Tabla V-10
Agentes etiológicos en niños con diarrea aguda durante
(Mar98-Feb99 y Mar00-Feb01).

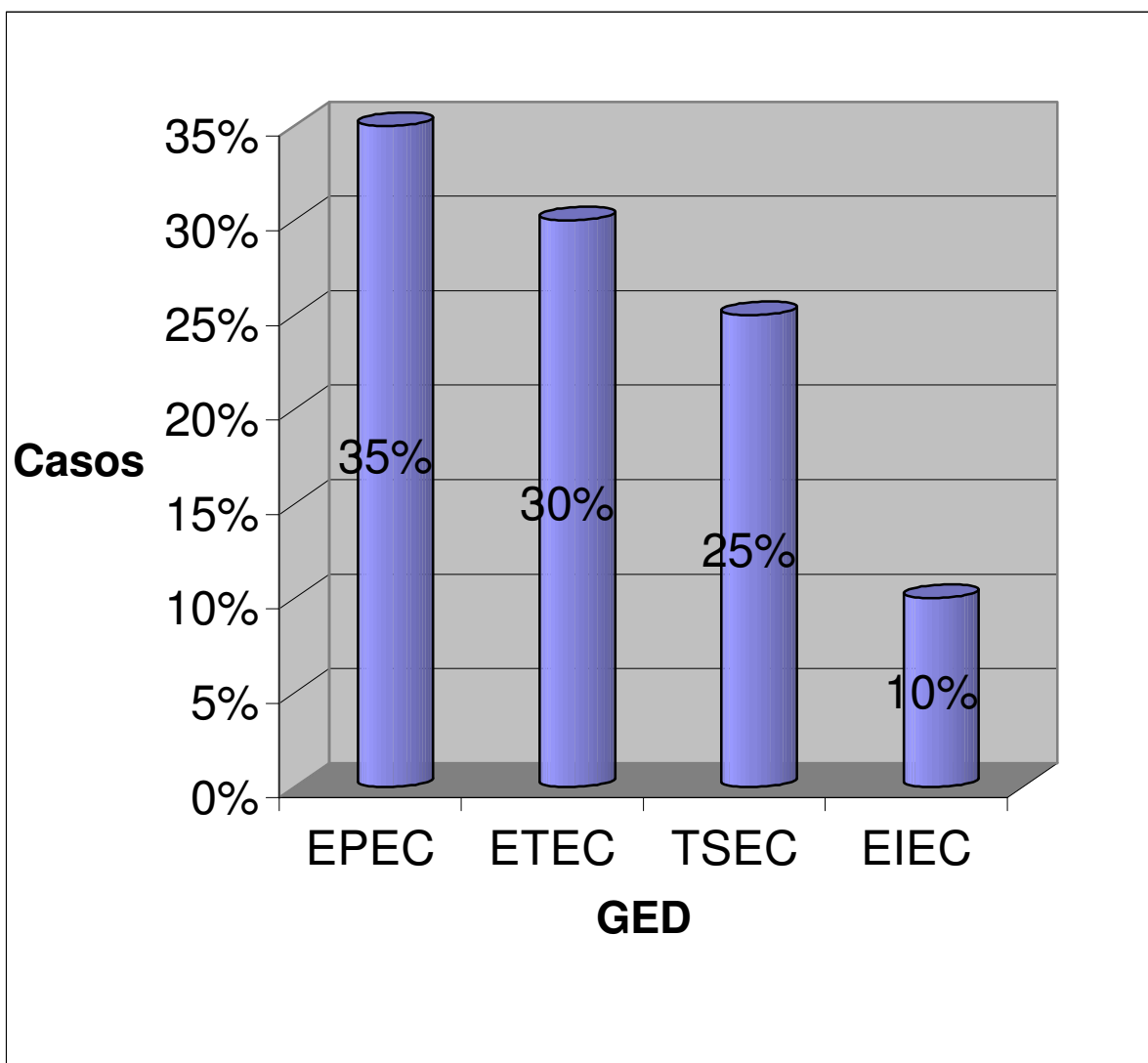
Agente infeccioso	% Casos n=699 pacientes
Rotavirus	42
<i>Shigella sp.</i>	13
GED	9
<i>Salmonella sp.</i>	5
Adenovirus	4
<i>Campylobacter sp.</i>	3
Astrovirus	2
<i>Cryptosporidium sp.</i>	1
<i>Aeromonas sp., Giardia sp. y Vibrio cholerae</i>	< 1
Sin aislamiento	20.5

Fuente: Cerna C.^[22]

De los 699 pacientes que ingresaron a los hospitales con diagnóstico de diarrea aguda, se aislaron cepas de *E. coli* en el 9% de los pacientes. Considerando que se pican 5 colonias por paciente (631) se obtuvieron un total de 3,155 cepas, las cuales fueron caracterizadas bioquímicamente. También determinó la prevalencia de los GED en niños menores de 5 años hospitalizados por diarrea aguda, mediante PCR multiplex desarrollada.^[22]

La PCR multiplex desarrollada, les permitió identificar a los GED en el 9% de los pacientes, siendo el grupo más frecuentemente aislado EPEC, el cual se identificó con el 35% de los pacientes, en el 30% de los pacientes se identificaron cepas ETEC, en cepas de TSEC en el 25% de los pacientes y finalmente EIEC fue identificada en el 10% de los pacientes (Gráfica V.3).^[22]

Gráfica V.3
Porcentaje de pacientes hospitalizados por diarrea aguda por GED de (Mar98-Feb99 y Mar00-Feb01).



Fuente: Cerna C.^[22]

Cabe mencionar que en EPEC en 25% de los pacientes de las cepas fueron de las denominadas EPEC atípicas (EPECa), es decir que sólo contienen el gen *eaeA*, mientras que sólo el 10% restante fueron cepas EPEC típicas, que presentan además del gen *eaeA*, el gen *bfpA*. En ETEC el 22% presentó el gen *Lt*, el 5% el gen *st* y el 3% contenían ambos genes. En las cepas TSEC el 5% presentaron el gen *stx-1*, el 13% el gen *stx-2* y el 8% presentaron el gen *stx-1*, como el gen *eaeA*. Finalmente EIEC presentó el gen *ial* 10% (Tabla V-11).^[22]

Tabla V-11
GED y genes identificados en heces de pacientes hospitalizados por diarrea aguda durante (Mar98-Feb99 y Mar00-Feb 01).

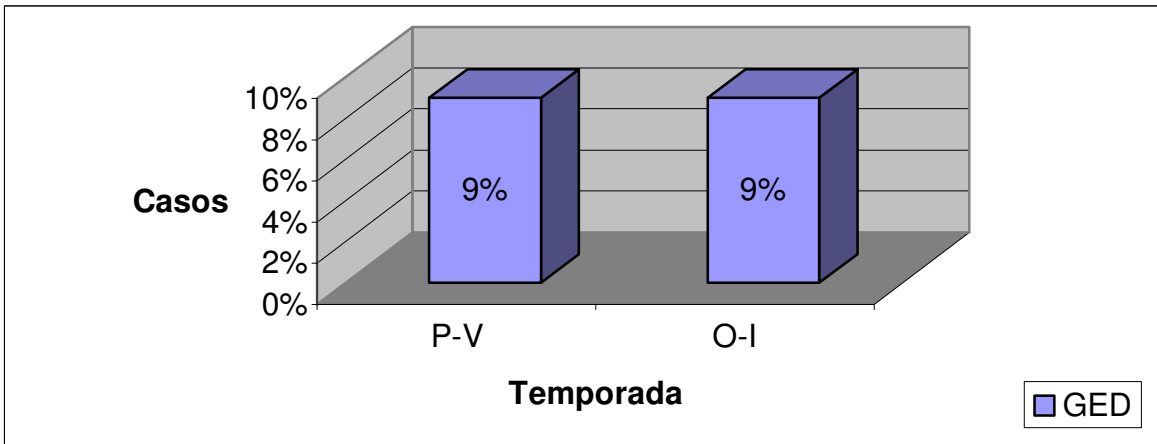
GED	Gen (es) o fragmento identificado (s)	% Casos
EPEC	<i>bfpA, eaeA</i>	10
EPECa	<i>Egea</i>	25
ETEC	<i>Lt</i>	22
ETEC	<i>st</i>	5
ETEC	<i>Lt, st</i>	3
TSEC	<i>stx-1</i>	5
TSEC	<i>stx-2</i>	13
TSEC	<i>stx-1, eaeA</i>	8
EIEC	<i>ial</i>	10

Fuente: Cerna C.^[22]

Para el estudio de la distribución de pacientes por temporada que presentan GED en sus heces se consideró el periodo de P-V, del primero de Marzo al 31 de Agosto y O-I del primero de Septiembre al 28 de Febrero. Se aislaron GED en 9% de los pacientes durante P-V y 9% durante O-I. Podemos aislar a los GED a lo largo de todo el año (Gráfica V.4).^[22]

Del total de 45 pacientes hospitalizados que presentaron infecciones mixtas, 73% ocurrió durante O-I, mientras que de las infecciones simples 78% se presentan en P-V. En la temporada O-I la mayoría de las infecciones mixtas de GED estuvieron asociadas principalmente con Rotavirus 82%, mientras que en P-V estuvieron asociadas primordialmente con bacterias 67%.^[22]

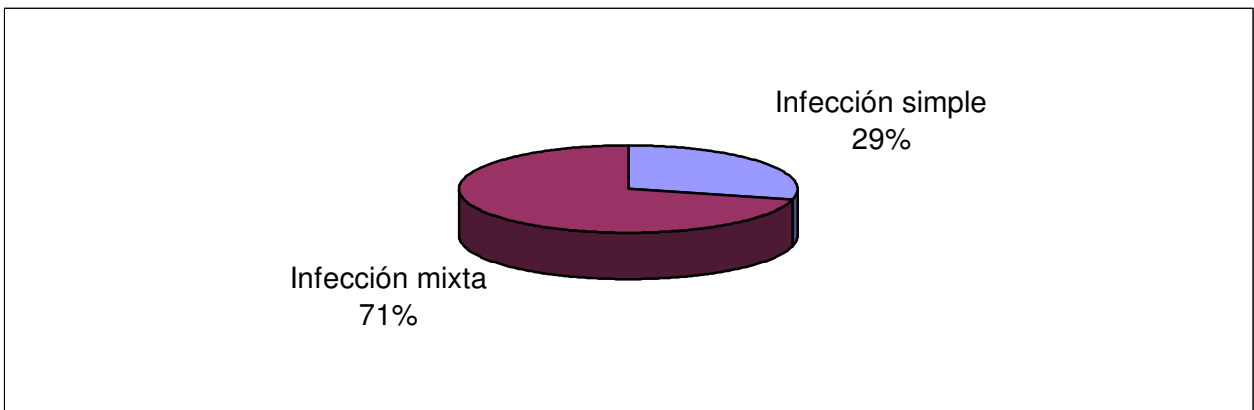
Gráfica V.4
Distribución por temporada del número de pacientes que
presentan en sus heces algún GED durante (Mar98-Feb99 y Mar00-Feb01).



Fuente: Cerna C.^[22]

De los 63 pacientes de los que se aisló algún GED, el 71% presentó infecciones mixtas, es decir que además del GED se aisló otro agente patógeno (Gráfica V.5). Esto tiene gran relevancia si consideramos que el ingreso de un niño al hospital puede deberse a varios factores, y una podría ser que el niño esté infectado por más de un agente etiológico. En infecciones mixtas se obtuvo un 67% de (EPEC, ETEC, TSEC y Rotavirus) y 24% de (EPEC, ETEC, EIEC y *Shigella*), por lo que es importante conocer si los pacientes que presentan GED en sus heces, están infectados con otros patógenos.^[22]

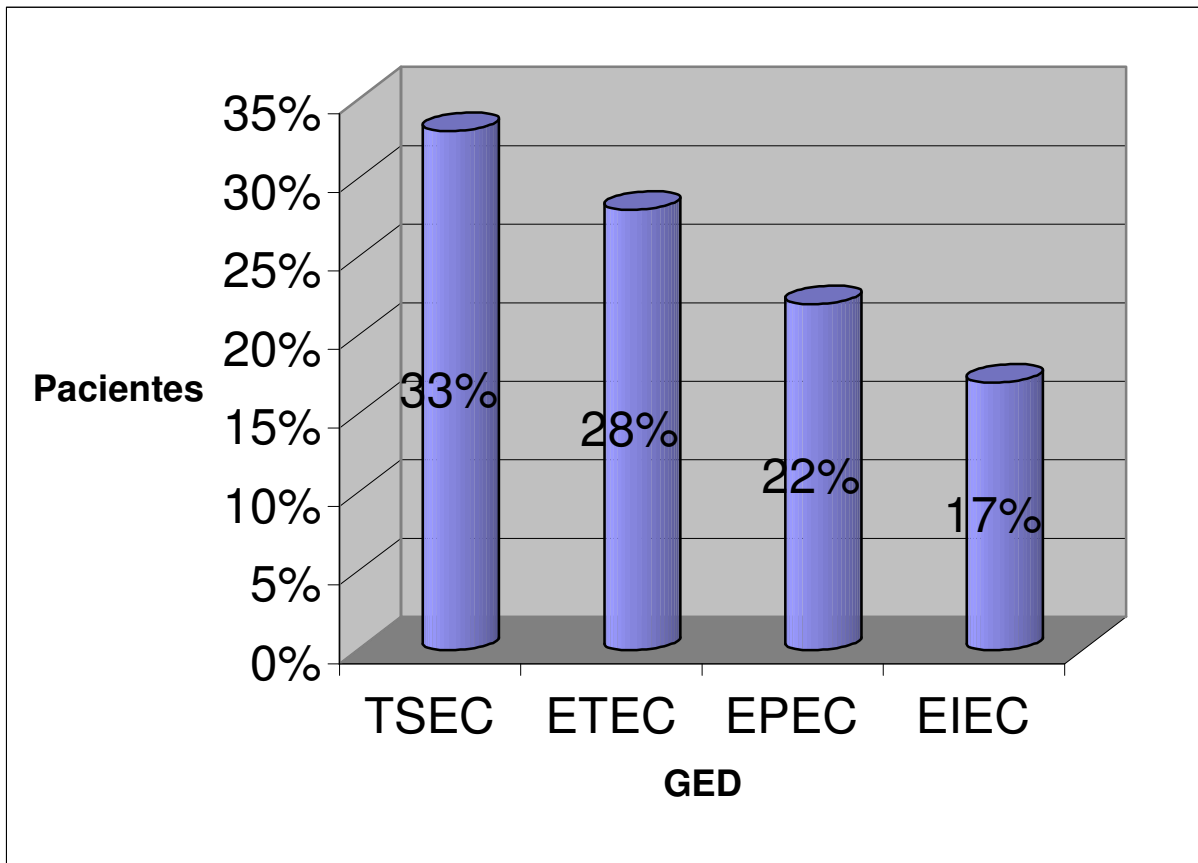
Gráfica V.5
Porcentaje de pacientes con GED con infecciones mixtas o simples
durante (Mar98-Feb99 y Mar00-Feb01).



Fuente: Cerna C.^[22]

Del total de los 63 pacientes en los que se identificó algún GED, observamos que en el 29% de los pacientes, los GED fueron el único agente etiológico. Encontrando en estos pacientes en mayor proporción al grupo TSEC en un 33%, continuando con ETEC en un 28%, EPEC en el 22% y finalmente EIEC en un 17% (Gráfica V.6).^[22]

Gráfica V.6
Porcentaje de pacientes con diarrea aguda en el que se identificó algún GED como único agente etiológico en (Mar98-Feb99 y Mar00-Feb01).



Fuente: Cerna C.^[22]

Se realizaron ensayos de expresión de genes en el que mostraron que existe una alta correlación entre la presencia del gen identificado por PCR y su expresión en métodos *in vivo*. Las cepas EPEC típicas se adhirieron con un patrón localizado sobre las células Hep-2; las cepas EIEC lograron invadir células Hep-2; las cepas TSEC provocaron un efecto citotóxico sobre células Vero, mientras que las cepas ETEC en un 81% provocaron efecto citotónico sobre células Vero.^[22]

Se realizó una tipificación por serología a 75 cepas patógenas aisladas de 26 pacientes en el que se identificó (antígeno somático: O y flagelar: H) en el 72% de las cepas. El 30% de los serotipos identificados en las cepas GED de los pacientes correlacionan con serotipos característicos de algunos GED, para el grupo de ETEC se identificaron los serotipos O8:H9, O78:H10, O153:H45, para el grupo EPEC O119:H6 y para el grupo TSEC O:111:H- y O18:H- (Tabla V-12).^[22]

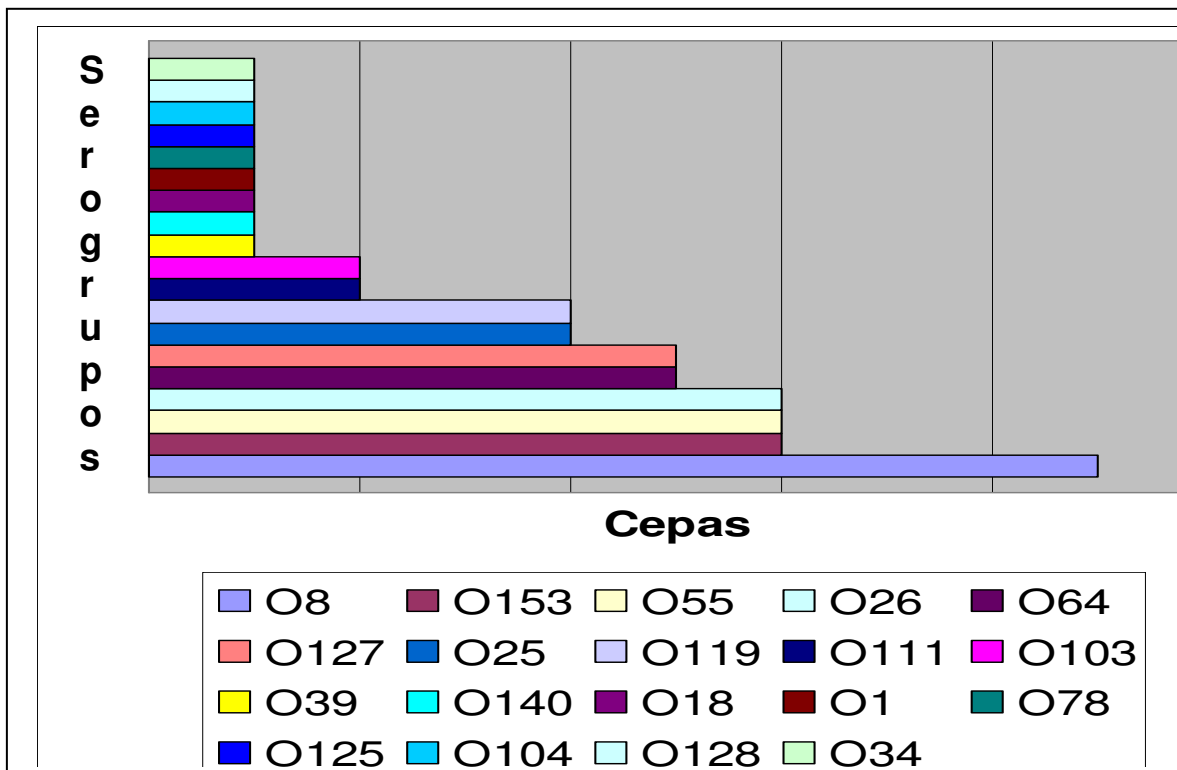
Tabla V-12
Serotipos del GED identificados en las heces de pacientes hospitalizados por diarrea aguda durante los periodos de (Mar98-Feb99 y Mar00-Feb 01).

Serotipo identificado	GED
O8:H9, O78:H10, O153:H45	ETEC
O119:H6	EPEC
O:111:H-, O18:H-	TSEC

Fuente: Cerna C. [22]

En el 77% de las cepas fue posible caracterizar el serogrupo (antígeno O) (Gráfica V.7). Se identificaron 13 serogrupos diferentes, de los cuales el 68% son considerados como patógenos, para ECET: O8, O78, O153, para ECEP: O26, O55, O119, O127. Mientras que para ECTS: O1, O18, O25, O55, O11 y O103. Se identificaron serogrupos que no están asociados con cepas patógenas ni con cepas no patógenas, como es el caso de O34 y O104.^[22]

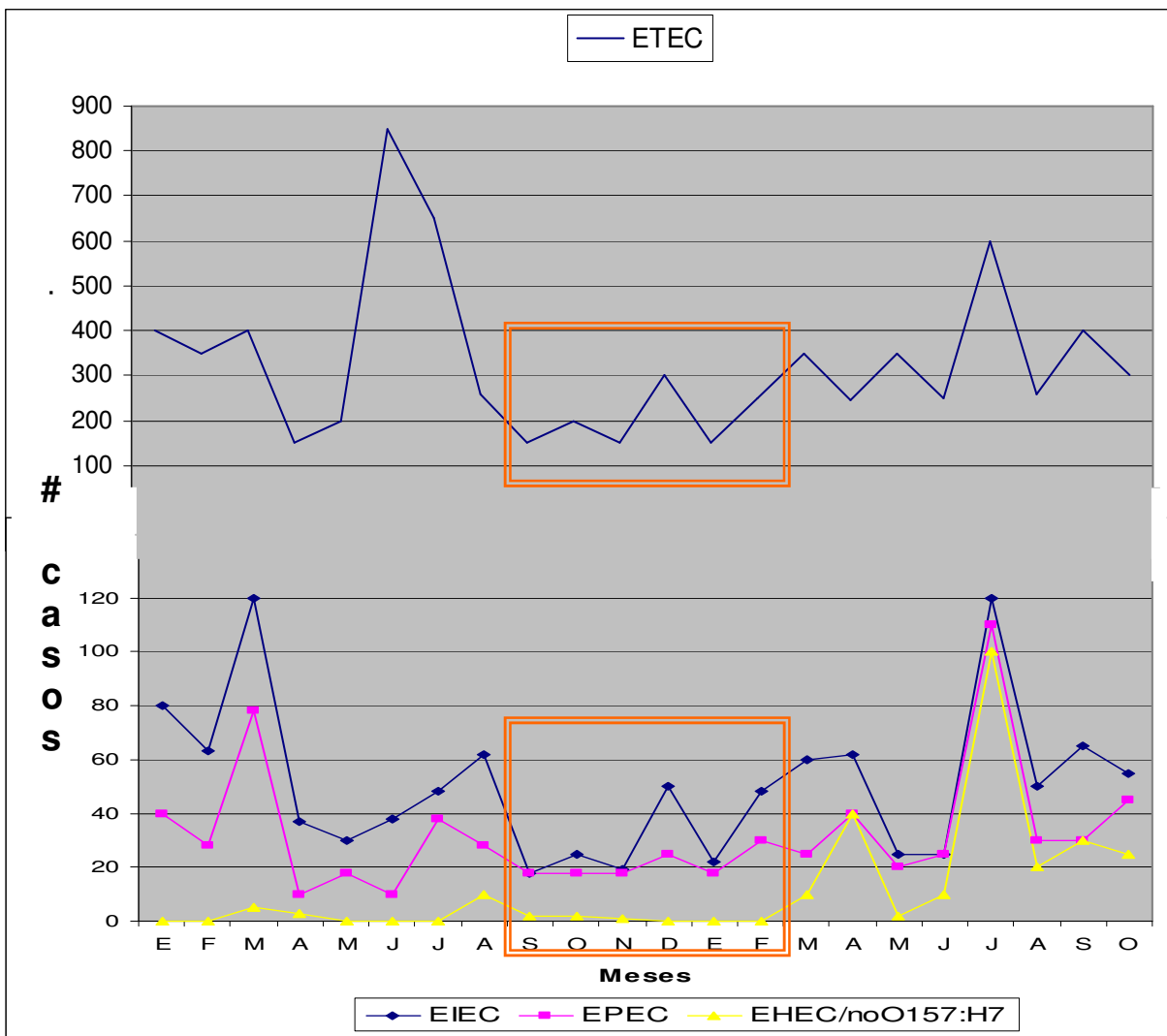
Gráfica V.7
Serogrupos identificados en las cepas asociadas con GED aisladas de niños durante los periodos de (Mar98-Feb99 y Mar00-Feb 01).



Fuente: Cerna C. [22]

El Laboratorio Nacional de Referencia (LNR) para la vigilancia de la resistencia a los antibióticos en relación con cólera y diarrea, es el InDRE, Secretaría de la Salud. En la red participan 31 Laboratorios Estatales de Salud Pública (uno por cada estado de la República Mexicana) que actúan como referencia para los 99 laboratorios periféricos en cada estado. Estos 99 laboratorios realizan la toma de muestra, cultivo y aislamiento y las envían a los laboratorios estatales. La información obtenida del Sistema Nacional de Vigilancia 2001, reporta la incidencia de los GED, con una elevada frecuencia de infección durante la temporada P-V, sin embargo los episodios de diarrea fueron bajos en O-I (Gráfica V.8).^[117]

Gráfica V.8
***E. coli* Diarreogénica: aislados por categoría, 2001.**



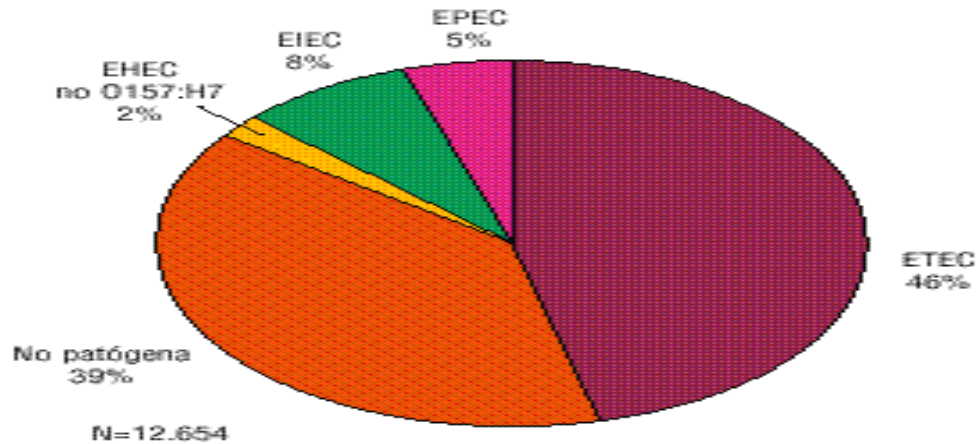
O-I (Incidencia baja de GED)

N = 7,719

Fuente: Sistema Nacional de Vigilancia.^[99]

A partir de 12,654 muestras aisladas, de diferentes estados de la republica mexicana se reportó 46% de ETEC, 39% no patógenas, 8% de EIEC, 5% de EPEC y 2% de EHEC no O157:H7 (Gráfica V.9).^[99]

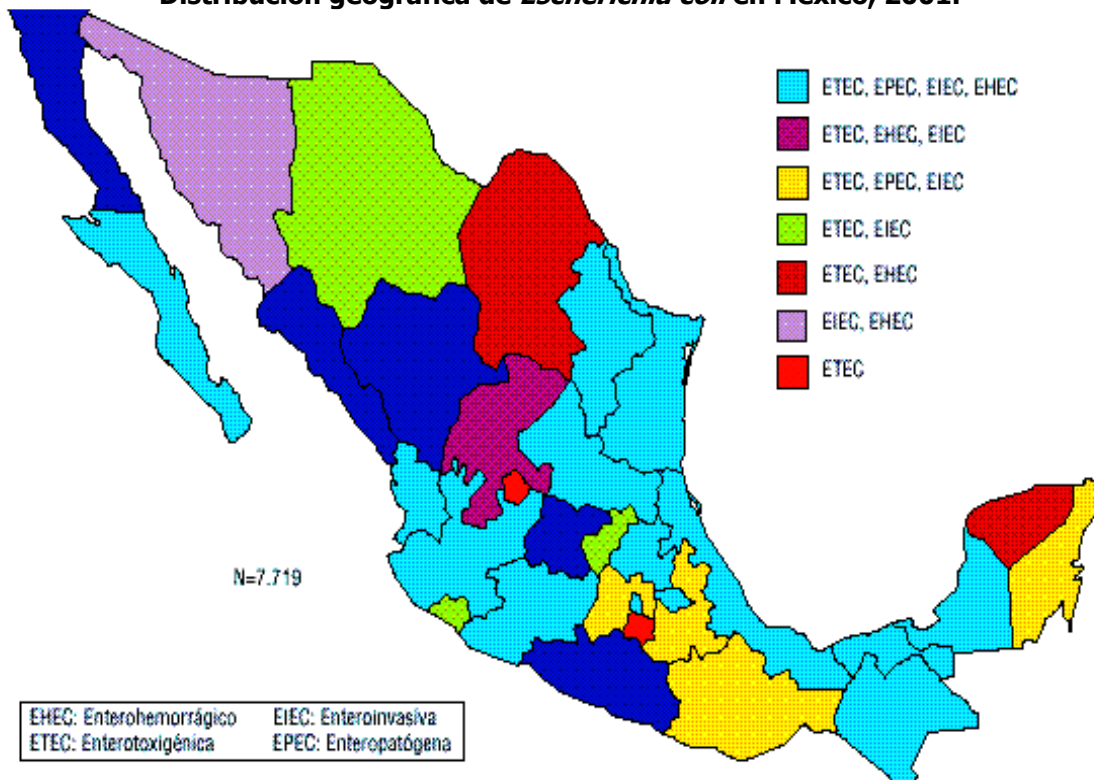
Gráfica V.9
***E. coli* Diarreogénica: muestras aisladas 2000-2001.**



Fuente: Sistema Nacional de Vigilancia.^[117]

Es importante mencionar que la prevalencia de los GED en pacientes con diarrea difiere entre las regiones geográficas en México (Figura V-1).^[117]

Figura V-1
Distribución geográfica de *Escherichia coli* en México, 2001.



Fuente: Sistema Nacional de Vigilancia.^[117]

En la revista salud pública de México en un artículo de revisión (Rodríguez-Angeles., 2002), resalta la importancia de *E. coli* (Tabla V-13) como patógeno capaz de causar casos aislados o brotes de diarrea, SUH, CH y cuadros de disentería, principalmente en niños. Además, se encontró que la presencia de *E. coli* es mayor durante los meses húmedos y calurosos, afecta principalmente a niños menores de cinco años. Actualmente se realiza la estandarización del método para identificar a EAEC.^[123]

Tabla V-13
***Escherichia coli* como patógeno en México, 2002**

Serotipo	% Casos
ETEC	48
EIEC	9
EPEC	4
EHEC / no O157H7	1
No hibridó*	32

* Las cepas que no hibridaron con ninguna de las sondas empleadas se consideraron *E. coli* no agrupadas, ya que dentro de ellas pudieron encontrarse *E. coli* enteroagregativas y *E. coli* de adherencia difusa que puedan estar involucradas en la producción de diarrea.

Fuente: Rodríguez A.^[123]

Estrada García y col., (2005) estudiaron dos grupos de niños menores de 5 años hospitalizados por diarrea aguda (<14 días): I) 285 niños hospitalizados en tres diferentes instituciones del IMSS, en la ciudad de México a partir de Marzo 2000 a Febrero 2001; II) 145 niños atendidos en el Hospital del Niño, Secretaría de Salud en Villahermosa, Tabasco, México, entre Febrero a Octubre 2004.^[56]

El análisis de las muestras de los niños con diarrea aguda para la búsqueda de virus, bacterias y parásitos, se realizó en laboratorios estandarizados. Mediante aislamiento, crecimiento e identificación de *Salmonella spp.*, *Shigella spp.*, *Vibrio cholerae* y *Campylobacter spp.*; aplicando pruebas de ELISA o aglutinación latex para rotavirus; microscopia para *Entamoeba histolytica*, *Cryptosporidium parvum*, *Cyclospora cayetanensis*, *Isoospora spp.* y *Giardia lamblia*. De 430 pacientes se identificaron 62 (14%) GED. (Tabla V-14).^[56]

Tabla V-14
Agentes etiológicos en niños con diarrea aguda durante
(Marzo 2000 a Febrero 2001 y Febrero a Octubre 2004).

Agente infeccioso	% Casos n= 430 pacientes
Rotavirus	41
GED	14
<i>Shigella sp.</i>	9
<i>Salmonella sp.</i>	3
<i>Campylobacter sp.</i>	0.7
<i>Cryptosporidium sp.</i>	0.9

Fuente: Estrada G.^[56]

De un total de 430 pacientes se aislaron 2,010 cepas de *E. coli*, las cuales fueron analizadas mediante sus genes de patogenicidad por PCR multiplex, el 8% es positivo por lo menos para 1 gen de GED: ETEC (*st*) y (*lt*), EPEC (*eaeA*) y (*bfp*), TSEC (*stx1*, *stx2*) y (*eaeA*), y EIEC (*ial*). Pacientes con características de TSEC, que expresaron antígeno lipopolisacárido O157 y el gen (*hlyA*), se utilizó un kit de aglutinación de partículas latex y PCR respectivamente. Se aplicó una segunda PCR multiplex en el análisis de Villahermosa, determinando 3 genes de virulencia para EAEC (*aap*, *aggR* y *aatA*). Ambas PCR se desarrollaron en el Departamento de Biomedicina Molecular del CINVESTAV (Tabla V-15).^[56]

Tabla V-15
GED y genes identificados en niños con diarrea aguda
durante (Marzo 2000 a Febrero 2001 y Febrero a Octubre 2004)

GED	Patotipo % n = 62 pacientes	Gen o fragmento identificado %
ETEC	27	<i>lt</i> = 29 <i>st</i> = 17 <i>lt, st</i> = 4
EAEC	26	<i>aap, aggR, aatA</i> = 56
EPECa	21	<i>eaeA</i> = 31
TSEC	18	<i>stx-2</i> = 9 <i>stx-1, eaeA</i> = 9 <i>stx-1</i> = 3 <i>stx-1, eaeA, HlyA</i> = 1
EPEC	5	<i>bfpA, eaeA</i> = 7
EIEC	3	<i>ial</i> = 4

Fuente: Estrada G.^[56]

No obstante, GED presenta resistencia antimicrobiana: 82% tetraciclina (Tet), 73% ampicilina (Amp), 65% trimetoprim-sulfametoxazol (TMP-SMX), 19% cloranfenicol (Chlor), 2% gentamicina , y ninguna a ciprofloxacina.^[56]

Los niños menores de 5 años hospitalizados con diagnóstico GED, son resistentes a TMP-SMX y Amp, estos antibióticos no son eficientes para diarrea pediátrica. GED son sensibles a ciprofloxacina; pero esta y otras quinolonas no son aprobadas clínicamente, porque causan daños prematuros.^[56]

Las muestras o cepas enviadas a un laboratorio de vigilancia epidemiológica deben remitirse con la siguiente información: fuente de aislamiento (humano o tipo alimento), en caso de ser de origen humano indicar la edad y sexo del paciente, la localidad, si se trata de un caso o contacto, qué alimentos ingirió tres días previos al inicio de la diarrea, si viajó o asistió a un evento social, el tipo de diarrea (acuosa, con moco, con sangre), número de evacuaciones y durante cuántos días, si hubo deshidratación, si se dio tratamiento y cuál fue; todo esto con fines epidemiológicos y poder detectar oportunamente la presencia de un brote o de cepas de *E. coli* del serotipo O157:H7 para las cuales la vigilancia epidemiológica debe ser permanente, sobre todo en las regiones fronterizas y turísticas.^[123]

VI. Discusión

La diarrea es una de las causas principales de morbilidad y mortalidad en países en desarrollo. El interés mostrado por la Organización Mundial de la Salud (OMS), así como las diferentes medidas tomadas para su manejo ha favorecido una reducción importante en la tasa de mortalidad en niños menores de cinco años; a pesar de este descenso, las infecciones intestinales no han dejado de ser un problema importante para los niños. La hipótesis postulada sobre la reducción de las complicaciones de las infecciones intestinales se basa en el Programa Nacional de Rehidratación Oral que se implantó en 1984; recomendaciones sobre la alimentación, promoción de la lactancia materna, mejores prácticas de destete, disponibilidad de agua potable, saneamiento del medio, higiene personal y ambiental, inmunizaciones contra enfermedades virales; pero se ve obstaculizada por las características culturales y creencias folklóricas propias de nuestros países en desarrollo.

Cravioto y col., (1985) reportaron solo dos GED en un estudio de un año, como principal agente diarreico ETEC (34%) y EPEC (8%).^[26] Sepúlveda y col., (1990) reportaron 28% de aislamiento para EPEC y 13% ETEC, en un estudio de casos y controles en 1985, en el sur de la Ciudad de México.^[19] Morayta y col., (1993) determinaron 17% de EPEC como la segunda causa de diarrea durante 1988 a 1990.^[22]

Para 1988 este problema ocupaba el duodécimo lugar en tasa de mortalidad: 83 defunciones por cada 1,000 casos.^[123] Guerrant y col., (1990) encontraron que ETEC es endémica en nuestro medio y que causa la diarrea del turista en todo el mundo.^[52, 132]

Benítez y col., (1991) identificaron GED: EAEC (35%), EHEC (17%), ETEC (7%), EPEC (4%) y EIEC (4%) de una cohorte de niños que vivían en una comunidad rural.^[10] Cravioto y col., (1990-1998) mostraron que cepas EIEC se aíslan con poca frecuencia de pacientes con diarrea y en general cuando se aíslan están asociadas con niños mayores de 6 meses.^[52, 132] Flores-Abuxapqui y col., (1993) evaluaron niños menores de dos años con diarrea líquida en 1991, obteniendo 17.1% de ETEC y 2.8% de EIEC.^[22]

Estos estudios fueron realizados antes de la llegada de la epidemia del cólera a nuestro país en 1991. La información obtenida del Sistema Nacional de Registro del IMSS (1990-1994), incluyó hospitales de todo el país, mostró un descenso de hospitalizaciones del 8% por diarrea en niños menores de cinco años. En la Gráfica 1 podemos observar que los picos señalados por cuadros corresponden a los meses húmedos y calurosos. Esta disminución se observó sobre todo, en el grupo de niños

menores de un año en P-V, mientras que en O-I se observó un incremento paulatino en el número de hospitalizaciones.^[22]

Lo anterior significa que en los últimos años se ha observado un claro cambio en el patrón de las enfermedades diarreicas en México. Este cambio puede deberse a las campañas de salud pública implementadas debido a la epidemia del cólera, tales como: mejor higiene personal, cloración del agua, mayor letrización, entre otras, que parecen haber tenido un efecto favorable sobre la distribución en el número de casos diarreicos.

Giono y col., (1994) aislaron y caracterizaron GED. Obteniendo 93.75% ETEC, 2.8% VTEC que serológicamente no corresponden a EHEC; en cuanto a sus genes *lt* (74%), *lt* y *vt* (18.2%). Una cepa de *E. coli* fue sorbitol negativo con efecto citotóxico, aglutino con suero O55.^[55] Es recomendable establecer estricta vigilancia en el control sanitario de alimentos elaborados con carne de bovino a fin de evitar brotes diarreicos esporádicos asociados al consumo de alimentos.

Con estos estudios se corrobora la importancia de los GED como productores de diarrea; de 1990 a 1995 la morbilidad por diarrea grave disminuyó 70% en niños menores de 1 año de edad.^[131]

En el InDRE a partir de 1996 métodos de biología molecular como “*colony blot*” y PCR se emplean con fines diagnósticos, para la caracterización de GED y cuyos resultados han sido presentados en diversas reuniones científicas.^[105]

Betancourt y col., (1999) estudiaron GED en niños veracruzanos, revelando como principal agente diarreico EIEC (55.4%), seguido por ETEC (25.2%), EPEC (16%) y finalmente VTEC (3.4%).^[11]

En el 2000 se presentó un brote por GED en el Valle de Chalco. Cortés y col., (2002) reportaron 62.2% de ETEC, 0.84% EIEC, 0.84% EPEC y 0.08 EHEC/noO157:H7. Las cepas que no hibridaron con ninguna de las sondas empleadas se consideraron *E. coli* no agrupadas 36.02%, ya que dentro de ellas pudiera encontrarse EAEC y ADEC que puedan estar involucradas en la producción de diarrea.^[55]

Cerna Cortés J., (2003) estableció un patrón epidemiológico de la diarrea aguda, en niños menores de 5 años hospitalizados de 1998 a 2001. En la Gráfica 2 se observa por mes claramente dos picos para los dos años de investigación; el primer par de picos marcados con un cuadro amarillo representan los meses húmedos y calurosos (P-V), el siguiente par señalado por un cuadro verde representa O-I.^[22]

De 1996 a 2001, los episodios de diarrea grave que ocurrieron en O-I fueron positivos a Rotavirus (62-68%), comparado con 6-12% durante P-V. De 1990 a 2001 la mortalidad por diarrea disminuyó 85%. La mayor mortalidad por diarrea en niños menores de 1 año de edad coincidió anualmente en O-I. Los episodios de diarrea grave y las muertes por diarrea mostraron un patrón estacional cambiante. En 1990-1991 se observaron 2 brotes de diarrea en los meses calurosos y húmedos; el brote en P-V fue mayor que en O-I. De 1992 a 1995 para diarrea grave y de 1993 a 2001 para las defunciones por diarrea, la frecuencia observada en P-V se redujo paulatinamente, mientras que en O-I los brotes anuales permanecieron.^[131]

En el periodo de 1998 a 2001 los pacientes hospitalizados por diarrea aguda fueron en su mayoría niños menores de 12 meses de edad, seguidos por niños de 1 a 2 años; siendo el grupo de niños menos hospitalizados el de 4 a 5 años de edad.^[22] Se

aislaron GED en 9% de los pacientes, a lo largo de todo el año (Gráfica 4), ocupando el tercer lugar de agentes infecciosos. El grupo más frecuentemente aislado fue EPEC (35%), ETEC (30%), TSEC (25%) y finalmente EIEC (10%).^[22] El 71% de los pacientes presentó infecciones mixtas, no obstante, se obtuvo un 67% de (EPEC, ETEC, TSEC y Rotavirus) y 24% (EPEC, ETEC, EIEC y *Shigella*), por lo que es importante conocer si los pacientes que presentan GED en sus heces, están infectados con otros patógenos. En infecciones simples el 29% de los pacientes los GED fueron el único agente etiológico. Encontrando en estos pacientes en mayor proporción al grupo TSEC (33%), seguido de ETEC (28%), EPEC (22%) y finalmente EIEC (17%).^[22]

Se realizó una tipificación por serología, se identificó en el 72% de las cepas. El 30% de los serotipos, para el grupo de ETEC O8:H9, O78:H10, O153:H45, para EPEC O119:H6 y TSEC O:111:H- y O18:H-. En el 77% de las cepas fue posible caracterizar el serogrupo, de los cuales el 68% son considerados como patógenos, para ETEC: O8, O78, O153 y EPEC: O26, O55, O119, O127. Mientras que para TSEC: O1, O18, O25, O55, O11 y O103.^[22]

La información obtenida del Sistema Nacional de Vigilancia 2001, reportó la incidencia de GED a lo largo de un año, con una elevada frecuencia de infección en P-V, en la Gráfica 8 se observan los episodios de diarrea bajos en O-I marcados con un cuadro. A partir de diferentes estados de la republica mexicana se reportó 46% de ETEC, 39% no patogenas, 8% EIEC, 5% EPEC y 2% EHEC no O157:H7. Es importante mencionar que la prevalencia de GED en pacientes con diarrea difiere entre las regiones geográficas en México (Figura 22).^[117]

Rodríguez-Angeles, (2002) Resalta la importancia de GED como patógenos capaces de causar casos aislados o brotes de diarrea, SUH, CH y cuadros de disentería, principalmente en niños. En el que se observó 48% de ETEC, 9% EIEC, 4% EPEC y 1% EHEC/noO157:H7 .^[105]

Estrada-García y col., (2005) aislaron un 14% de GED, el cual es la segunda causa de infección diarreaica en niños menores de 5 años (solo superada por Rotavirus). Cepas de *E. coli*, fueron analizadas mediante sus genes de patogenicidad por PCR multiplex, en la tabla 15 se observó que el 8% es positivo por lo menos para 1 gen de GED: 27% ETEC (*st*, *lt*), 26% EAEC (*aap*, *aggR*, *aatA*), 21% EPECa (*eaeA*) y 5% EPEC (*eaeA*, *bfp*), TSEC 18% (*stx1*, *stx2*, *eaeA*) y 4% EIEC (*ial*).^[44]

El patotipo de *E. coli* más aislado es ETEC, en México es la principal causa de diarrea acuosa en niños hospitalizados,^[34] es endémico y causa la diarrea del turista en todo el mundo,^[52, 132] existen trabajos que señalan que la prevalencia de factores de colonización en ETEC de casos diarreicos son CFA/II seguido de CFA/I y CFA/IV.^[78, 118] Una parte relevante de estos trabajos es el perfil toxigénico de ETEC, reportando que poseen predominancia en LT, seguida ST y por último ST/LT.^[22, 44] LT es codificada en un plásmido de virulencia de 60 kb llamado *Ent*. Los genes *eltA* y *eltB* codifican las subunidades A y B respectivamente. Sin embargo, se ha reportado que el mecanismo

molecular de la proteína funcionalmente parecida a histona (H-NS) regula la expresión del operon *eltAB*. En contraste, poco se sabe del operon *eltAB*.^[142]

EAEC causan diarrea persistente, solo se estudió muestras del hospital del Niño de Villahermosa, con una prevalencia casi parecida a ETEC (Estrada-García y col., 2005).^[44] En Estados Unidos es muy semejante la prevalencia de hospitalizaciones de niños con diarrea causada por EAEC (Cohen y col., 2005).^[25] Los factores de virulencia de EAEC son: fimbrias de adherencia agregativa AAF/I codificada por el gen (*aggR*) y AAF/II (*aatA*),^[23] una proteína de antiagregación (14 kDa) codificada por el gen (*aap*), anteriormente llamada *aspU*,^[20, 96] enterotoxina termolabile EAST-1 (*astA*),^[94] este gen también es expresado por otras categorías de *E. coli* y su papel en la infección no ha sido determinado;^[6, 17] la proteína Pic tiene actividad de mucinasa, resistencia al suero y hemaglutinación,^[58] pero no tiene efecto citotóxico en células epiteliales y no produce aumento en la secreción de iones en cámaras de Ussing (Navarro y col., 1999, 2001 y 2004; Arciniega y Navarro, 2002),^[6, 61, 96, 97] el gen *pic* tiene una alta homología en la secuencia amino terminal con la mucinasa de *Shigella* codificada por el gen *she* que exhibe una alta similitud con otras SPATE,^[58, 94] dentro de este GEN se encuentran dos genes completos que codifican para las subunidades *set1B* (7kDa) y *set1A* (20 kDa) de la proteína ShET1 (55kDa), pero estos genes se encuentran orientados en sentido opuesto del marco de lectura abierto (Noriega y col., 1995); la proteína Pet es miembro de SPATE (sistema de secreción tipo V) la cual tiene efecto citopático en células Hep-2, caracterizado por redondeamiento y desprendimiento de las células así como contracción del citoesqueleto y pérdida de fibras de actina (Eslava y col., 1998; Henderson y col., 1999; Navarro y col., 1999, 2001 y 2004; Canizalez y Navarro, 2003 y 2004).^[6, 18, 19, 43, 57, 58] Navarro y Canizalez, (2001 y 2003) describieron la internalización de Pet a las células epiteliales, mediante un transporte retrogrado, produciendo efecto citotóxico.^[18, 19, 43, 133] El análisis de la secuencia de aa deducida de Pet (GeneBank) muestra (83% de similitud) con la proteína EspP de EHEC, 70% al producto del gen *espC* de EPEC y 60% con SepA (proteína secretada de *Shigella flexneri*).^[135]

Inesperadamente Estrada-García y col., (2005) reportan 21% de pacientes con EPECa (gen *eaeA* +);^[44] el papel de este grupo *E. coli* patogénico emergente es silenciosamente confuso, pero está asociada con diarrea aguda (Trabulsi y col., 2002)^[126] y persistente (Afset y col., 2004).^[2] En adición, EPECa muestra significativamente menor resistencia ($p < 0.05$, prueba χ^2) a TMP-SMX y Amp.^[44] El gen *eae* codifica a la proteína intimina de la membrana externa bacteriana de ~ 94 kDa, el cual es responsable de la adherencia íntima entre la bacteria y el enterocito. Los genes responsables de la lesión A/E “Adherencia y Esfacelamiento” se encuentran en un segmento cromosomal de 35 Kb localizado en el locus de esfacelamiento del enterocito, el cual está en una isla de patogenicidad (LEE) “*locus for enterocyte effacement*”, que puede ser dividida en al menos tres dominios funcionales: gen *sep* “*secretion of EPEC proteins*” (*sepA* y *sepB* codifican proteínas que forman parte del aparato de secreción tipo III); *esp* “*EPEC secreted proteins*” (Tir, EspA, EspB, EspD, EspE, EspF y EspG); y el gen *eae*.^[35, 37, 67, 69, 72, 73, 80, 121, 122] Mellies, Navarro y col., (2001) determinan la isla de patogenicidad *espC* como una segunda isla descrita en algunas cepas de EPEC. EspC consiste en 1,306 aa (110 kDa) comparte homología con miembros de la familia de autotransportadoras, entre los cuales se encuentra la proteasa de IgA de *Neisseria gonorrhoeae*, Hap de *Haemophilus influenzae*, Tsh de APEC (“*avian pathogenic E. coli*”), SepA y ShMu de *Shigella flexneri*, Pic y Pet de EAEC, y EspP de EHEC.^[82] Vidal, Navarro y col., (2006) describen EspC (70% de similitud) con la proteína Pet de EAEC, la cual tiene actividad enterotóxica, rompe con las subunidades α y β de la espectrina, a la pepsina, y el factor de

coagulación V.^[95] Interesantemente, no contribuye con la lesión A/E, ni con la mediación de la transducción de señales inducida por EPEC y no juega un papel en la invasión o adherencia.^[82, 133] Navarro y col., (2004) Reportaron que EspC produce efectos citopáticos en células epiteliales parecidos a los reportados para Pet.^[95]

TSEC / no-O157 se aisló en 18%, siendo la cuarta causa de diarrea aguda que requiere hospitalización en México; se reportó una prevalencia del 9% de los genes (*stx-2*) y (*stx-1*, *eaeA*), 3% (*stx-1*) y 1% (*stx-1*, *eaeA*, *HlyA*).^[44] La mayor expresión es la toxina Stx-2 según lo reportado por Melton y col., (1998).^[83] Las VT-1/STL-I (70.5 kDa) y VT-2/STL-II (45.7 kDa) son neutralizadas por anticuerpos anti-*shiga*,^[83, 101, 108, 111] *HlyA* se presenta en un plásmido de 60 MDa.^[12, 83, 102, 108] El plásmido pO157 codifica una proteína perteneciente a citolisinas formadoras de poros (codificada en un plásmido de 60 MDa).^[12, 108] Se ha hallado que el plásmido pO157 está presente prácticamente en todas las cepas O157:H7 y en otras de *E. coli* productoras de verotoxinas. Nataro y Kaper, (1988) informaron que la *E. coli* no O157:H7 de los aislados no se encuentra implicada en brotes, ya que la expresión por estas cepas de las toxinas Stx es aparentemente insuficiente para conferirles virulencia. Margall y col., (1997) reportaron que los serotipos no O157:H7, además de producir toxina en menor cantidad, carecen de algún factor de patogenicidad como el gen (*eae*) que participa en la adherencia y pueden producir sólo enteritis y complicaciones menores.^[28] El gen *eaeA* codifica la proteína intimina_{O157}, es la única adhesina de *E. coli* O157:H7 cuyo papel *in vivo* se ha comprobado plenamente en modelos animales.^[12, 36, 108] Causando lesión (A/E) codificada en un cromosoma de 35,480-bp que se localizan en el locus de esfacelamiento del entericito (LEE) codificado en ~ 35 Kb, el cual está en una isla de patogenicidad homóloga a EPEC.^[12, 36, 37, 67, 69, 73, 83] EspE presenta homología con la proteína Tir, descrita para EPEC, que una vez traslocada al citoplasma de la célula epitelial es fosforilada en tirosina e incorporada en la membrana citoplásmica, dando origen a la proteína inicialmente descrita como proteína celular Hp90 (Tir).^[36, 86] EspP es una proteína que puede ser agrupada dentro de la familia de autotransportadores tipo V, es una serina- proteasa extracelular, también codificada en pO157, que podría ser otro factor de virulencia. Es capaz de clivar pepsina y factor V de coagulación y es citotóxica para células Vero. Se ha sugerido que podría exacerbar el proceso hemorrágico pero no es considerada un factor de virulencia universal de TSEC.^[36, 134]

EPEC típica con una prevalencia de 5% ocupa el penúltimo lugar de aislamiento, se identificó mediante los genes (*bfpA* +, *eaeA* +) y se asoció con casos de diarrea en infantes.^[44] BFP es un factor de virulencia de EPEC, son 14 genes *bfp* y abarca 11.5 Kb del pEAF involucrados en su expresión y se sabe que los cinco primeros genes del locus *bfp* tienen un patrón de expresión diferencial, y que el gen *bfpA* que codifica para la subunidad estructural principal es el que se expresa en un nivel mayor.^[15] Girón y col., (1991) describieron en EPEC un pili al que llamaron *bundle-forming pilus* BFP (pili que forma un bucle) que está codificado en el plásmido EAF, el gen *bfpA* se ha asociado con la adherencia localizada.^[53, 54]

Finalmente en 4% de los pacientes hospitalizados se presentó EIEC. Cravioto y col., (1990 y 1998) mostraron que las cepas de EIEC se aíslan con poca frecuencia de pacientes con diarrea y en general cuando se aíslan están asociadas en niños mayores de 6 meses.^[22, 42] Dado que EIEC no causa perforación del intestino y que la enfermedad es moderada, los antibióticos raramente se indican, solamente en casos graves se recomienda el uso de TMP-SMX.^[44, 108]

El patotipo ADEC se puede aislar de personas sanas como de personas con diarrea, siendo más importantes en niños de 4 a 5 años. Se ha empleado para el diagnóstico la hibridación con sondas derivadas del fragmento del gen *daaC*, que codifica para la fimbria F-1845, pero puede presentar falsos positivos, y el diagnóstico empleando PCR aún no se ha desarrollado.^[105] Nowick y col., (2001) clasificaron cepas de ADEC relacionadas con las adhesinas Afa/Dr (Afa/Dr, ADEC). Cepas ADEC tienden a asociarse con infecciones del tracto urinario (ITU) pielonefritis, cistitis, bacteriuria asintomática y varias infecciones entéricas.^[113]

Los niños menores de 5 años hospitalizados con diagnóstico de algún GED, son resistentes a TMP-SMX y Amp, por lo tanto, estos antibióticos no son eficientes para diarrea. Los GED son sensibles a Chlor y gentamicina.^[44]

Los evolucionistas presentan con frecuencia la adquisición por parte de las bacterias de resistencia a los antibióticos como una demostración de cambio evolutivo. Sin embargo, el análisis molecular de los mecanismos genéticos que llevan a la resistencia a los antibióticos no da soporte a esta suposición tan extendida. Muchas bacterias se convierten en resistentes por la adquisición de genes procedentes de fagos, PAI, plásmidos o de transposones mediante transferencia horizontal. Sin embargo, este mecanismo no explica el origen de los genes de resistencia, solo su difusión entre las bacterias.^[70]

VII. Conclusiones

☉ Se logró realizar un estudio biblio-hemerográfico sobre diferentes patotipos de *Escherichia coli* en México, haciendo énfasis en ETEC y EHEC; recopilando información de manera ordenada, lógica y congruente de los aspectos más recientes para ampliar el conocimiento en el área de investigación y desarrollo para el Q.F.B., Q.B.P., Biólogos, Médicos, etc.

☉ A partir de 1990 a la fecha se identificó un claro cambio en el patrón epidemiológico de las enfermedades diarreicas. En 1990-1991 se presentaron 2 brotes de diarrea en los meses calurosos y húmedos (P-V); el brote en P-V fue mayor que en O-I. De 1992 a 2001 la frecuencia observada en P-V se redujo paulatinamente, mientras que en O-I los brotes anuales permanecieron.

☉ El patotipo con más frecuencia de diarrea es ETEC, quizá sea más resistente al medio ambiente y se encuentre en mayor proporción o que su capacidad para colonizar sea más efectiva. EAEC causan diarrea persistente, con una prevalencia casi parecida a ETEC. EPECa es un patógeno emergente silenciosamente confuso, pero está asociada con diarrea aguda y persistente. TSEC / EHEC no-O157 es la cuarta causa de diarrea aguda, de los casos aislados no se encuentra implicada en brotes. EPEC típica ocupa el penúltimo lugar. Finalmente EIEC tiene poca frecuencia de pacientes con diarrea y en general cuando se detecta está asociada con niños mayores de 6 meses.

☉ La prevención como objetivo fundamental en nuestro medio continúa siendo una meta difícil de alcanzar, debido a múltiples y complejos motivos relacionados con el subdesarrollo económico y social.

➤ ETEC

Las estrategias específicas incluyen las medidas de intervención (rehidratación oral, uso de antibióticos) y de promoción de la higiene (agua y alimentos limpios, manejo adecuado de excretas). Científicos mexicanos desarrollan la primera vacuna comestible del mundo contra la diarrea del turista causada por ETEC mediante la introducción de un gen en las verduras (lechuga, zanahoria y amaranto), al ser consumidas por el hombre inhibirán la enfermedad. La investigación está en la última fase que es probar la eficacia de las vacunas comestibles en roedores.

➤ EHEC

Es recomendable establecer estricta vigilancia en el control sanitario de alimentos elaborados con carne de bovino a fin de evitar brotes diarreicos esporádicos asociados al consumo de estos alimentos. Hasta el momento no se han diseñado vacunas eficaces que protejan contra EHEC. El inmunógeno ideal sería aquél que indujera inmunidad sistémica contra la Stx e inmunidad local contra la intimina y otros factores de colonización.

VIII. Referencias

- 1.- Abe Akio, Myriam de Grado, Richard A., Pfuetzner, Claudia Sánchez-SanMartín, Rebekah DeVinney, José Luis Puente, Natalie C.J. Strynadka and Brett Finlay B. (1999) **"Enteropathogenic *Escherichia coli* translocated intimin receptor, Tir, requires a specific chaperone for stable secretion"**. *Molecular Microbiology*, 33, pp.1162-1175.
- 2.- Afset J.E., Bevanger L, Romundstand P, and Bergh K. (2004) **"Association of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) with prolonged diarrhea"**. *Journal Medical Microbiology*, 53, pp.1137-1144.
- 3.- Albert Bruce, Bray Dennis, Lewis Julian, Raff Martin, Robert Keith y James D, Watson. (2002) **"Biología Molecular de la célula."** 3º ed. México, OMEGA, pp. 641-645.
- 4.- Alissa M., Weaver, John E. Heuser, Andrel V. Karginov, Wei-lih Lee, Thomas Parsons and John A. Cooper. (2002) **"Interaction of cortactin and N-WASP with Arp2/3 complex"**. *Current Biology*, 12, pp.1270-1278.
- 5.- Amayo León, María Guadalupe. (1999) **"Detección de la toxina LT de *Escherichia coli* en queso fresco"**, México, 85 p. Tesis (Maestra en Ciencias), UNAM, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlan Campo 1.
- 6.- Arciniega Martínez, Ivonne Maciel. (2002) **"Efecto de Pic, proteína involucrada en la colonización intestinal de *Escherichia coli* enteroagregativa, sobre células epiteliales"**, México, 63 p. Tesis (Bióloga), UNAM, Facultad de Ciencias.
- 7.- **"Bacteriofagos"**. [En línea] <<http://www.qb.fcen.uba.ar/microinmuno/SeminarioBacteriofagos.htm>>
- 8.- **"Bacteriología"**. [En línea] < <http://depa.pquim.unam.mx/bacteriologia/pdfs/ART%20CDC-ECEH.pdf>>
- 9.- Baldini M.M., Koper J.B., Levine M.M. and Moon H.W. (1983) **"Molecular nature of adhesión in enteropathogenic *Escherichia coli*"**. *Lancet*, 2, pp. 210-218.
- 10.- Benítez O., Fernando Uribe, Adrian Navarro, David Hernández, y Alejandro Cravioto. (1991) **"Etiología de diarrea con sangre en niños de una comunidad rural"**. *Boletín Médico del Hospital Infantil de México*, 48, pp. 65-70.
- 11.- Betancourt S., Miguel J. y Beatriz Pérez Méndez. (1999) **"Estudio de serotipos de *Escherichia coli* en niños Veracruzanos con diarrea aguda"**. Unidad de Terapia Intensiva Pediátrica. IMSS, Veracruz. *Acta Pediatría*, 2, 20v. [En línea] <<http://www.actapediatrmex.entornomedico.org/archivo/1999/no2vol20.html>>
- 12.- Bettelheim K.A. and Beutin L. (2003) **"Rapid laboratory identification and characterization of verocytotoxigenic (*Shiga* toxin producing), VTEC/STEC"**. *Journal of Applied Microbiology*, 95, pp.205-217.
- 13.- Blanco Jorge, Miguel Blanco, Jesús E. Blanco, Azucena Mora, María Pilar Alonso, Enrique A. González y María Isabel Fernández Hermida. **"*Escherichia coli* patógenos para seres humanos y animales"**. [En línea] <<http://www.lugo.usc.es/ecoli/E.coli2.html>>

- 14.- Blanco Miguel, Jesús E. Blanco, Azucena Mora, María Pilar Alonso, Enrique A. González y Jorge Blanco. **"*Escherichia coli*, verotoxigénicos (ECVT) en España ECVT O157:H7 y no-O157:H7 en humanos y alimentos, en ganado bovino y ovino como reservorio. Técnicas para la detección de ECVT."**
[En línea] <<http://secuslugo.lugo.usc.es/ecoli/vtese.html>>
- 15.- Bustamante V.H., Santana F.J., Calva E., and Puente J.L. (2001) **"Transcriptional regulation of type III secretion genes in enteropathogenic *Escherichia coli*: Ler antagonizes H-NS-dependent repression"**. *Molecular Microbiology*, 39 (39), pp. 664-678.
- 16.- Campellone K.G. and leona J.M. (2003) **"Tails of two: actin pedestal formation by enteropathogenic *E. coli* and enterohemorrhagic *E. coli* O157:H7"**. *Current of Microbiology*, 6, pp. 82-90.
- 17.- Canizalez Roman, Vicente Adrian. (2000) **"Caracterización del proceso de internalización de la toxina Pet de *Escherichia coli* enteroagregativa en cultivo y su unión a la proteína blanco, fodrina"**, México, 60 p. Tesis (Maestro en Ciencias), IPN, Centro de Investigación y Estudios Avanzados, Departamento de Biología Celular.
- 18.- Canizalez Roman, Vicente Adrian. (2004) **"Caracterización del mecanismo de acción de la toxina Pet sobre células epiteliales: internalización y daño a la célula blanco"**, México, 48 p. Tesis (Doctor en Ciencias), IPN, Centro de Investigación y Estudios Avanzados, Departamento de Biología Celular.
- 19.- Canizalez Roman, Vicente A. and Fernando Navarro García. (2003) **"Fodrin CaM-binding domain cleavage by Pet from enteroaggregative *Escherichia coli* leads to actin cytoskeletal disruption"**. *Molecular Microbiology*, 48 (4), pp. 947-958.
- 20.- Castillo Ruiz, Octalina, Francisco Javier Sierra Martínez y Pedro César Cantú Martínez. (2000) **"Incidencia de diarreas en menores de 5 años y su relación con la calidad y disponibilidad del agua para uso y consumo humano en Sabinas Hidalgo, Nuevo León (México)"**. *Revista FASPYN, Salud Pública y nutrición*, 1, 3v. [En línea] <<http://www.respyn.uanl.mx/3/articulos/diarreas.html>>
- 21.- Cebrián, Gil J., Rosety R. Díaz-Alersi, M^a. Jesús Coma y Bello D. Gil. **"Gastroenteritis aguda"**. [En línea] <<http://www.bioq.unizar.com.hsa/servicios/ap/biomol>>
- 22.- Cerna Cortés, Jorge Francisco. (2003) **"Prevalencia y caracterización molecular de los principales grupos de *Escherichia coli* diarregénicas en niños menores de 5 años hospitalizados por diarrea aguda, en la ciudad de México"**, México, 98 p. Tesis (Doctor en Ciencias), IPN, Centro de Investigación y Estudios Avanzados, Departamento de Biomedicina Molecular.
- 23.- Cerna Cortés, Jorge Francisco, Nataro J.P., and Estrada-García T. (2003) **"Multiplex PCR for detection of three plasmid-borne genes of enteroaggregative *Escherichia coli* strains"**. *Journal Clinical of Microbiology*, 41, pp. 2138-2140. [En línea] <<http://jcm.asm.org/cgi/reprint/41/5/2138>>
- 24.- Clarke J.K., Haigh R.D., Freestone P.P.E and Williams P.H. (2003) **"Virulence of enteropathogenic *Escherichia coli*, a global pathogen"**. *Clinical Microbiology*, 16 (3), pp. 365-378.
- 25.- Clarke M.B., Nataro J.P., Bernstein D.I., Hawkins J., Roberts N., Staat M.A. (2005) **"Prevalence of diarrheagenic *Escherichia coli* in acute childhood enteritis: a prospective controlled study"**. *Journal Pediatrics*, 146, pp. 54-61.

- 26.- Cordero Alaiz Patricia, De Almeida Rodrigues Jorge, Fontes Costa Maria Daniela, Curado Quintas Dinis Poeta y Suárez Ramos Susana. **"Papel del ganado porcino en la transmisión de *Escherichia coli* O157:H7"**. [En línea] <<http://www.exopol.com/general/circulares/100circ.html>>
- 27.- Cortés Ortiz, Iliana Alejandra. (2002) **"Caracterización de capas de *Escherichia coli* enteroinvasivas aisladas en la ciudad de México, por invasividad en células Hep-2 captación del colorante rojo congo. Prueba de Sereny. Patrón de hemaglutinación y perfil de plásmidos"**, México 57 p. Tesis (Química Farmacéutica Bióloga), UNAM Facultad de Estudios Superiores Cuautitlan Campo 1.
- 28.- Cortés Ortiz, Iliana Alejandra, Guadalupe Rodríguez Angeles , E.A. Moreno Escobar, J.M. Tenorio Lara, B.P. Torres Mazadiego, E. Montiel Vázquez. (2002) **"Brote causado por *Escherichia coli* en Chalco, México"**. Salud Pública de México, 44, pp. 297-302.
- 29.- Cravioto Alejandro, R. Ortega, P. Rodríguez, R. Reyes , D. López, G. Fernández. (1985) **"Estudio longitudinal de colonización intestinal en una cohorte de niños rurales mexicanos. I. Diseño del estudio y hallazgos iniciales durante el periodo neonatal"**. Boletín Médico del Hospital Infantil México, 42, pp. 287-296.
- 30.- Datos elaborados a partir de Datos de Defunciones INEGI/Secretaría de Salud. (2002) Dirección General de Información en Salud. CONAPO.
- 31.- Dehesa Violante Margarita. Fisiopatología de la diarrea. (1994) En: **"Diagnóstico de laboratorio de Infecciones Gastrointestinales"**. Giono S, Escobar A, Valdespino JL. Secretaria de Salud. México, p. 51.
- 32.- **"Diarrea"** [En línea], 08 oct 2003 <<http://www.ondasalud.com/edicion/noticia/0,2458,5346,00.html>>
- 33.- **"Diarreas"**. [En línea] INBURSA <<http://www.inbursa.com/PrSeSa/GDiarrea.pdf>>
- 34.- Donnenberg, M.S., J.B. Kaper and B.B. Finlay. (1997) **" Interactions between Enteropathogenic *Escherichia coli* and host epithelial cells"**. Trends Microbiology, 5, pp. 109-114.
- 35.- Donnenberg M S, J Yu and J B Kaper. (1997) **"A second chromosomal gene necessary for intimate attachment of Enteropathogenic *Escherichia coli* to epithelial cells"**. Journal of Bacteriology, 175, pp. 4670-4680.
- 36.- **"El Síndrome Urémico Hemolítico (SUH) y la *Escherichia coli* enterohemorrágica (ECEH)"**. [En línea] <<http://www.paho.org/Spanish/ad/dpc/cd/paraguay-red-junio-2001-5-suh.pdf>>
- 37.- Elliott S.J., Wainwright L.A., McDaniel T.K., Jarvis K.G., Deng Y.K., Lai L.C. (1998) **"The complete sequence of the locus of enterocyte effacement (LEE) from Enteropathogenic *Escherichia coli* E2348/69"**. Molecular Microbiology, 28, pp.1-4.
- 38.- Enciclopedia médica en español. **"Diarrea"**. [En línea] 28 may 2004 <<http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/ency/article/003126.htm>>
- 39.- **"Enterobacterias y *P. aeruginosa*"**. [En línea] <<http://depa.pquim.unam.mx/bacteriologia/pdfs/APUN-EnterobPseud.pdf>>
- 40.- **"Epidemiología y frecuencia"**. [En línea] <<http://www.drscope.com/privados/pac/pediatria/pbl4/epi.html>>

- 41.- Eslava Campos Carlos A. **Contaminación del agua y efectos en la salud/La Salud del Niño y el Ambiente**. En: **"Enterobacterias causantes de enfermedad intestinal en niños"**. [En línea] <<http://www.cofepris.gob.mx/bv/libros/Cap02.pdf>>
- 42.- Eslava, Carlos, Jorge Mateo Villaseca y Alejandro Cravioto. (1994) **"Cepas de *Escherichia coli* relacionadas con la diarrea**. En: **"Diagnóstico de laboratorio de Infecciones Gastrointestinales"**. Giono S., Escobar A., Valdespino J.L. Secretaria de Salud de México, p. 251.
- 43.- Eslava, Carlos, Navarro García J.R, Czczulin I.R, Henderson I.R, Cravioto A. and Nataro J.P. (1998) **"Pet, an autotransporter enterotoxin from enteroaggregative *Escherichia coli*"**. *Infection and Immunity*, 66, pp. 3155-3163.
- 44.- Estrada García, Teresa, Jorge F Cerna, Gil Leova Paheco, Raúl F Velázquez, Theresa Ochoa, Torres Javier and DuPont Herbert L. (2005) **"Drug-resistant Diarrheogenic *Escherichia coli*, Mexico"**. *Emerging Infectious Diseases*, 8, 11v. [En línea] <<http://www.cdc.gov/ncidod/eid/vol11no08/05-0192.htm#table1>>
- 45.- **"Etiopatogenia"**. [En línea] <http://www.drscope.com/privados/pac/pediatrica/pbl4/etio.html>
- 46.- **"Evaluación y diagnóstico del tipo de diarrea"**. [En línea] <<http://www.drscope.com/privados/pac/pediatrica/pbl4/eva.html#1>>
- 47.- Farnen J.J. III and Kelly M.T. (1995) **"Enterobacteriaceae: En: "Manual of Clinical Microbiology"**. 6° ed. Washington, D.C ASM Press. p. 440.
- 48.- Fernández García, Mercedes, Celia Fernández Rodríguez, Gilda Martínez Furé, Elvira Pérez Ramos, Celia Cuza Arribas. (2004) **"Etiología de la diarrea con sangre en menores de 5 años"**. Hospital Pediátrico Universitario "Marfán". Servicio de Gastroenterología. La Habana, Cuba. [En línea] <http://www.bvs.sld.cu/revistas/ped/vol76_4_04/ped06404.htm>
- 49.- Frenk Mora, Julio, Enrique Ruelas Barajas, Roberto Tapia, Roberto Castañón Romo, De Eugenia León-May María y Guido Belsasso. (2002) **"Programa Nacional de Salud 2001-2006. Estrategia 2. Reducir los rezagos en salud que afectan a los pobres"**. 1° ed. Secretaría de Salud. ISBN 970-721-029-X.
- 50.- Froehlich, Barbara, Julian Parkhill, Mandy Sanders, A Quail, and R Scout June. (2005) **"The pCooPlasmid of Enterotoxigenic *Escherichia coli* Is a Mosaic Cointegrate"**. *Journal of Bacteriology*, 187 (18), pp. 6509-6516.
- 51.- Gaastra W., Svennerholm A.M. (1996) **"Colonization factors of human enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC)"**. *Trends in Microbiol*, 4 (11), pp. 444-452.
- 52.- Garza Velasco, Raúl y Ma. Begoña Guzmán Solano. **"La patogenia involucrada en las enfermedades diarreicas ocasionadas por ECET y ECEP"**. [En línea] <<http://depa.pquim.unam.mx/bacteriologia/pdfs/ART%20CDC-ECETyECEP.pdf>>
- 53.- Giron J.A, Jones T., F. Millan-Velasco, E. Castro-Muñoz , L. Zarate , Fry J., Frankel G., Moseley S.L., and Kaper J.B. (1991) **"Diffuse-dhering *Escherichia coli* (DAEC) as a putative cause of diarrhea in Mayan children in Mexico"**. *Journal Infection Diseases*, 163, pp. 507-513.
- 54.- Giron J.A, and Schoolnik G.K. (1991) **"An inducible bundle-forming pilus of enteropathogenic *Escherichia coli*"**. *Science*, 254 (5032), pp. 710-713.

-
- 55.- Giono Cerezo, Silvia, Guadalupe Rodríguez Angeles, Ma. de Jesús Rodríguez Cadena y José Luis Valdespino Gómez. (1994) **"Identificación de Enterotoxinas y Citotoxinas de *Escherichia coli* por Cultivo de Células Vero e Hibridción en Fase Sólida (Colony Blot)"**. Revista Latino-Americana de Microbiología, 36, pp. 231-241.
- 56.- González Corona, Enrique y Susana Cunil Romero. (2002) **"Diagnóstico y tratamiento de la diarrea persistente en un servicio de enfermedades diarreicas agudas"**. MEDISAN, 6, 2v.
- 57.- Henderson I.R., Navarro García F., and Nataro J.P. (1998) **"The great escape: structure and funtion of the autotransporter proteins"**. Trends Microbiology, 6, pp. 370-378.
- 58.- Henderson I.R., Susan H., Navarro G., Waldir P. and Nataro J.P. (1999) **"Involvement of Pet in human intestinal toxicity induced by Enteroaggregative *Escherichia coli*"**. Infection and Immunity, 67, pp. 5338-5344.
- 59.- Hernández Franco, Daniel, Cristina Barberena Rioseco, José Ángel Camacho Prudente y Hadid Vera Llamas. **"Desnutrición infantil y pobreza en México"**. Publicaciones SEDESOL. [En línea]
<<http://www.sedesol.gob.mx/publicaciones/CuadernosyDoctos/PDFs%20SEDESOL/PDFs%20Cuadernos/12%20Cuad.pdf>>
- 60.- Hisami, Takenouchi, Nobutaka Kiyokawa, Tomoko Taguchi, Jun Matsui, Yohko U Katagiri, Hajime Okita, Kenji Okuda and Junichiro Fujimoto. (2004) **"Shiga toxin binding to globotriaosyl ceramide induces intracellular signals that mediate cytoskeleton remodeling in human renal carcinoma-derived cells"**. Journal of Cell Science, 117, pp. 3911-3922.
- 61.- Ibarra García, José Antonio. (1994) **"Uso de las técnicas de FAS (fluorescent-actin staining) y anaranjado de acridina para visualizar la patogénesis de *Escherichia coli* causantes de diarrea"** México 47 p. Tesis (Químico Bacteriólogo Parasitólogo), IPN, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas.
- 62.- Johnson J.R. (1991) **"Virulence factors in *Escherichia coli* urinary tract infection"**. Clinical Microbiology Reviews, 4, pp. 80-128.
- 63.- Kalman D., Weiner O.D., Goosney D.L., Sedat J.W., Finlay B.B., Abo A. and Bishop. (1999) **"Enteropathogenic *Escherichia coli* acts through WASP and Arp2/3 complex to form actin pedestals"**. Nature Cell Biology, 1, pp. 389-391.
- 64.- Kaper J.B., Nataro J.P., and Mobley H.L. (2004) **"Pathogenic *Escherichia coli*"**. Nature Reviews Microbiology, 2, pp. 123-140.
- 65.- Karmali Mohamed A. (2005) **Human immune response and immunity to *Shiga* (verocytotoxin)-producing *Escherichia coli* infection**. En: **"*Escherichia coli* O157:H7 and Other *Shiga* Toxin – Producing *E. coli* Strains"**. James B. Kaper and Alison DO'Brien. 1998 American Society for Microbiology 1325 Massachusetts Ave. N.W Washington, 23, pp. 216-243.
- 66.- Kenny Brendan. (1999) **"Phosphorylation of tyrosine 474 of the enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) Tir receptor molecule is essential for actin nucleating activity and is preceded by additional host modifications"**. Molecular Microbiology, 31, pp. 1229-1241.

- 67.- Kenny Brendan and B. Brett Finlay. (1997) **"Intimin-dependent binding of Enteropathogenic *Escherichia coli* to host cells triggers novel signaling events, including Tyrosine Phosphorylation of Phospholipase C- γ 1"**. American Society for Microbiology, 65, pp. 2528-2536.
- 68.- Kenny Brendan and Jonathan Warawa. (2001) **"Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) Tir receptor molecule does not undergo full modification when introduced into host cells by EPEC-independent mechanisms"**. American Society for Microbiology, 69, pp. 1444-1453.
- 69.- Kenny Brendan, Lai L.C. and Finlay B.B. and Donnenberg M.S. (1996) **"EspA, a protein secreted by Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC), is required to induce signals in epithelial cells"**. Molecular Microbiology, 20, pp. 313-323.
- 70.- Kevin L. Anderson. (2005) **La resistencia de las bacterias a los antibióticos —¿un ejemplo apropiado de cambio evolutivo?** Creation Research Society Quarterly, 41 (4), PP. 318-326. [En línea] <<http://www.sedin.org/ID/resistencia.html>>
- 71.- Kirsén Sandvig and Bo van Deus. (2002) Minireview: **"Transport of protein toxins into cells: pathways used by ricin, cholera toxin and Shiga toxin"**. Federation of the Societies of Biochemistry and Molecular Biology Letters 529, pp. 49-53.
- 72.- Knutton S.I., Rosenshine M.J., Pallen I. Nisan, Neves B.C., Bain C., Wolff C., Dougan G. and Frankel G. (1998) **"A novel EspA-associated surface organelle of Enteropathogenic *Escherichia coli* involved in protein translocation into epithelial cells"**. European Molecular Biology Organization, 17, pp. 2166-2176.
- 73.- Kresse A.U., Rohde M. and Guzman C.A. (1998) **"The EspD protein Enteropathogenic *Escherichia coli* is required for the formation of bacterial surface appendages and is incorporated in the cytoplasmic membranes of target cells"**. Infection and Immunity, 27, pp. 1247-1260.
- 74.- Kurt Schesser, Matthew S Francis, Ake Forsberg and Hans Wolf-Watz. (1994) The Cell. **"Type III Secretion Systems in Animal- and Plant-Interacting Bacteria"**.
- 75.- **"La diarrea infantil"**. [En línea] Hospital de NENS en Barcelona <<http://www.hospitaldenens.com/cat/guieinfo/p040314.htm>>
- 76.- Lawrence M. Tierney, Jr., MD Stephen J. McPhee, MD Maxine A. Papadakis. (2003) **"Diagnóstico Clínico y Tratamiento"**. 83° ed. Editorial El Manual Moderno.
- 77.- López Eduardo L, Marta Contrini María and Fabiana De Rosa María. (2005) **Epidemiology of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in south America**. En: **"*Escherichia coli* O157:H7 and Other Shiga Toxin – Producing *E. coli* Strains"**. James B Kaper and Alison DO'Brien. 1998 American Society for Microbiology 1325 Massachusetts Ave. N.W Washington, 4, pp. 30-36.
- 78.- López Vidal Y., Calva J.J., Trujillo A., Ponce de León A., Ramos A. Svennerholm A.M., Ruiz P. **Enterotoxins and adhesins of enterotoxigenic *Escherichia coli* are they a risk factor for acute diarrhea in the community?**
- 79.- Ludger Johannes. (2002) **"The Epithelial Cell Cytoskeleton and Intracellular Trafficking; Shiga toxin B-subunit system: retrograde transport, intracellular vectorization, and more"**. American Journal Physiological Society, 283, pp. G1-G7.

- 80.- McNamara B P, Koutsouris A, O'Connell C B, Nougayrede J P, Donnenberg M S and Hecht G. (2001) **"Traslocated EspF protein from Enteropathogenic *Escherichia coli* disrupts host intestinal barrier function"**. Journal Clinical Investig, 107, pp. 621-629.
- 81.- Mellies Laguna, Elliot V., Sperndio V., Donnenberg M.S. and Kaper J.B. (1999) **"the Per regulon of enteropathogenic *Escherichia coli*: identification of a regulatory cascade and novel transcripcional activator, the locus of entrocYTE effacement (LEE)-encoded regulator (Ler)"**. Molecular Microbiology, 33 (2), pp. 296-306.
- 82.- Mellies L., Navarro G., Okeke I., Frederickson J., Nataro J.P., and Kaper J.B. (2001) **"espC pathogenic island of enteropathogenic *Escherichia coli* encodes an enterotoxin"**. Infection and Immunity, 69, pp. 315-324.
- 83.- Melton-Celsa, Angela R. and O'Brien Alison D. (2005) **Structure, biology, and relative toxicity of *Shiga* toxin family members for cells and animals**. En: **"*Escherichia coli* O157:H7 and Other *Shiga* Toxin – Producing *E. coli* Strains"**. James B Kaper and Alison DO'Brien. 1998 American Society for Microbiology 1325 Massachusetts Ave. N.W Washington, 13, pp. 121-125.
- 84.- **"Microbiología"**. [En línea] <<http://biblioweb.unam.mx/libros/microbios/Cap5/>>
- 85.- Miranda López, Alejandro. (2003) **"Food Microbiology"**. 20, pp. 159-168. [En línea] <http://www.cdc.gov/ncidod/dbmd/diseaseinfo/escherichiacoli_a.htm>
- 86.- Moraga M. Rubén. (2005) **"Microbiología Médica – Enfermería"**. [En línea] <<http://www.unap.cl/csmar/Micromed7.pdf>>
- 87.- Moredó F., Vigo G., Sanz M., Aguirre J., Armocida A. y Perfumo C. (1998) **"Caracterización enterotoxigénica y estudio de sensibilidad antimicrobiana in vitro de cepas de *Escherichia coli* aisladas de cerdos con cuadros clínicos de diarrea pre y posdestete."** ISSN 0365-5148 Analecta Veterinaria, 18 (1/2), pp. 29-33. [En línea] <http://www.fcv.unlp.edu.ar/analecta/vol18n1-2/VE18_moredó.pdf>
- 88.- Mota Hernández, Felipe, Worona Dibner Liliana Beatriz, José de Jesús Coria Lorenzo, Consuelo Sánchez Alejandra, Luz Elena Espinosa de los Monteros y Edgar Bustos Cordova. (2001) **"Enfermedad Diarreica (ED) en niños"**. Centro de Información para Decisiones en Salud (CENIDS) Instituto Nacional de Salud Pública, 6, 3v. [En línea] <<http://bvs.insp.mx/articulos/1/17/v3n6.pdf>>
- 89.- Nancy L Freeman, Daniel V Zarawski, Prokash Chowrashi, Joseph C Ayoob, Lily Huango, Balraj Mittal and Joseph W Sanger. (2000) **"Interation of the Enteropathogenic *Escherichia coli* Protein, translocated Intimin Receptor (Tir), with Focal Adhesion Proteins"**. Cell Motility and the Cytoskeleton, 47, pp. 307-318.
- 90.- National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases (Instituto Nacional de la Diabetes y Enfermedades Digestivas y Renales). (2000) **"Primary Care Medicine"**. 4º ed. Lippincott Williams & Wilkins. [En línea] <<http://healthlibrary.epnet.com/print.aspx?token=af362d97-4f80-4453-a175-02cc6220a387&chunkiid=23702>>
- 91.- Nataro J.P., and Kaper J.B. (1998) **"Diarrheagenic *Escherichia coli*"**. Reviews Clinical Microbiology, 11 pp. 142-201.
- 92.- Nataro J.P., D. Yikang, D. Yingkang, and K. Walter. (1994) **"AggR a transcriptional activator of aggregative adherence fimbria I expression in enteroaggregative *Escherichia coli*"**. Journal of Bacteriology, 176, pp. 4691-4699.

-
- 93.- Nataro J.P., Steiner T., and Guerrant R.L. (1998) "**Enteroaggregative *Escherichia coli***". *Emerging Infections Diseases*, 4, pp. 251-261.
- 94.- Navarro García, Fernando, Eslava C., Villaseca J.M., López Revilla R., Czczulin J.R., Srinivas S., Nataro J., and Braviota A. (1998) "**In vitro effects of a high-molecular weight heat-labile enterotoxin from enteroaggregative *Escherichia coli***". *Infection and Immunity*, 66, pp. 3149-3154.
- 95.- Navarro García, Fernando, Canizalez Román F.A., Sui B.O., Nataro J.P. and Azamar Y. (2004) "**The serine protease motif of EspC from enteropathogenic *Escherichia coli* produces epithelial damage by a mechanism different from that of Pet toxin from enteroaggregative *E. coli***". *Infection and Immunity*, 72 (6), pp. 3609-3621.
- 96.- Navarro García, Fernando, Canizalez Román F.A., Luna J, Seas C., and Nataro J.P. (2001) "**Plasmid-encoded toxin of enteroaggregative *Escherichia coli* is internalized by epithelial cells**". *Infection and Immunity*, 69 (2), pp. 1053-1060.
- 97.- Navarro García, Fernando, Sears C., Eslava C., Cravioto A., and Nataro J. (1999) "**Cytoskeletal effects induced by Pet, the serine protease enterotoxin of enteroaggregative *Escherichia coli***". *Infection and Immunity*, 67, pp. 2184-2192.
- 98.- Principios de urgencia, emergencia y cuidados críticos "**Gastroenteritis aguda**" <<http://tratado.uninet.edu/c030305.html>>
- 99.- Programa anual 2001-2002 de formación continuada para médicos de atención primaria. "**Principios básicos de antibioterapia**". [En línea] <<http://www.medynet.com/elmedico/aula2001/tema10/bioterapia1.htm>>
- 100.- Quiroz Sánchez, José Armando. (1992) "**Aislamiento de cepas de *Escherichia coli* productoras de enterotoxinas termoestable B a partir de lechones con y sin diarrea**", México, 32p. Tesis (Químico Bacteriólogo Parasitólogo), IPN, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas.
- 101.- Rama P., Cherla, Sang Yun and Vernon L. Tesh. (2003) "**Shiga toxins and apoptosis**" Federation of European Microbiological Societies. *Microbiology Letters*, 228, pp. 159-166.
- 102.- Ramírez Margarita, Morier Luis, Alonso Janette, Bravo Laura, Cabrera Roberto y Anabel Fernández. (1999) "**Determinación de verotoxinas en cepas de *Escherichia coli* O157:H7.**" *Revista Cubana Médica Tropical*, 51 (3), pp. 152-155. [En línea] <http://www.bvs.sld.cu/revistas/mtr/vol51_3_99/mtr02399.htm>
- 103.- Raúl Garza Velasco y Ma. Begoña Guzmán Solano. "**La patogenia involucrada en las enfermedades diarreicas ocasionadas por ECET y ECEP**". [En línea] <<http://depa.pquim.unam.mx/bacteriologia/pdfs/ART%20CDC-ECETyECEP.pdf>>
- 104.- Robbins. (2004) "**Patología Humana**". 7º ed. Elsevier Science.
- 105.- Rodríguez Angeles, Guadalupe. (2002) "**Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli***." *Salud Pública de México*, 44, pp. 464-475. [En línea] <http://www.scielosp.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S003636342002000500011&lng=es&nrm=iso&tIng=es>
- 106.- Rodríguez Angeles, Guadalupe, Silvia Giono Cerezo y José Luis Valdespino Gómez. (1994) "**Efecto Citotóxico y Citotóxico de la Toxina Colérica en Células Vero y su Relación con PCR**". *Revista Latino-Americana de Microbiología*, 36, pp. 263-271.

- 107.- Rodríguez Angeles, Guadalupe. (1998) "**Estudio de cepas de Escherichia coli asiladas en México**". Memorias IV Jornadas científico culturales de Químicos Clínicos. Instituto Mexicano del Seguro Social, México D.F.
- 108.- Rodríguez Cadena, María de Jesús. (1994) "**Aislamiento e identificación de Escherichia coli productora de citotoxinas a partir de carne molida cruda, hamburguesas y de un brote de diarrea del viajero**", México, 112 p. Tesis (Química Farmacéutica Bióloga), UNAM, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlan Campo 1.
- 109.- Román Riechmann, Enriqueta y Josefa Barrio Torres. (2001) "**Diarrea Aguda**". Protocolos diagnósticos y terapéuticos en pediatría. Gastroenterología. [En línea] <<http://www.aeped.es/protocolos/gastroentero/2.pdf>>
- 110.- Ruiz Aguilar, Marco Antonio. (1997) "**Viabilidad y aislamiento de Vibrio cholerae y detección de Escherichia coli O157:H7 en Perejil (Petroselinum sativum)**", México, 42 p. Tesis (Químico Bacteriologo Parasitologo), IPN, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas.
- 111.- Salim Máttar, Jorge Visbal S. y German Arrieta. (2001) "**E.coli O157:H7 enterohemorrágico: un agente etiológico de diarrea y zoonosis en colombia subestimado. Parte I**". Médico Veterinario Zootecnista - CÓRDOBA, 6 (1), pp. 15-23.
- 112.- Sánchez San Martín C., Bustamante V.H., Calva E. and Puente J.L. (2001) "**Transcriptional regulation of the orf19 gene and the tir-cesT-eae operon of enteropathogenic Escherichia coli**". Journal of Bacteriology, 183 (9), pp. 2823-2833.
- 113.- Servin Alain L. (2005) "**Pathogenesis of Afa/Dr diffusely adhering Escherichia coli**". American Society for Microbiology, 18 (2), pp. 264-292.
- 114.- Sheikh J., J.R. Czczulin, S. Harrington, S. Hicks, I.R. Henderson, C. Le Bougue´ nec, P. Guonon, A. Phillips, and J.P. Nataro. (2002) "**A novel dispersin in enteroaggregative Escherichia coli**". Journal Clinical Investig, 110, pp. 1329-1337.
- 115.- Sierra Pérez, Eduardo y Javier Álvarez-Coca González. (2001) "**Diarrea Crónica**". Protocolos diagnósticos y terapéuticos en pediatría. Gastroenterología. [En línea] <<http://www.aeped.es/protocolos/gastroentero/3.pdf>>
- 116.- Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica. (2000-2005) "**Epidemiología**". Dirección General de Epidemiología, ISSN 1405-2636. 52:18:52; 53:50:53; 49:22:49.
- 117.- Sistema Nacional de Vigilancia. (2001) "**Informe anual regional de los países participantes en la red de monitoreo/vigilancia de la resistencia a los antibióticos**". México.
- 118.- Steinsland H., Valentiner-Brantha P., Gjessing H.K., Aaby P., Molbak K., Sommerfelt H. (2003) "**Protetion from natural infections with enterotoxigenic Escherichia coli: Longitudinal study**". Lancet, 362, pp. 286-291.
- 119.- Stephen J. McPhee, Vishwanath R. Lingappa y William F. Ganong. (2003) "**Fisiopatología médica: Una introducción a la medicina clínica**". 4º ed. Editorial El Manual Moderno, S.A de C.V., pp. 97-90.
- 120.- Tauxe Robert V. (2005) "**Public health perspective on immunoprophylactic strategies for Escherichia coli O157:H7: who or what would we immunize?**" En: "**Escherichia coli O157:H7 and Other Shiga Toxin – Producing E. coli Strains**". James B Kaper and Alison DO'Brien. 1998 American Society for Microbiology 1325 Massachusetts Ave. N.W Washington, 45, pp. 445-451.

- 121.- Taylor Kathleen A., Paul W. Luther and Michael S. Donnenberg. (1999) "**Expression of the EspB protein of Enteropathogenic *Escherichia coli* within HeLa cells affects stress fibers and cellular morphology**". *Infection and Immunity*, 67, pp. 120-125.
- 122.- Taylor K.A., O'Connell C.B., Luther P.W. and Donnenberg M.S. (1998) "**The EspB protein of Enteropathogenic *Escherichia coli* is targeted to the cytoplasm of infected HeLa cells**". *Infection and Immunity*, 66, pp. 5501-5507.
- 123.- Tomé P., Reyes H., Rodríguez L., Guiscafré H., Gutiérrez G. (1996) "**Muerte por diarrea aguda en niños: un estudio de factores pronósticos**". *Salud Pública México*, 38, pp. 227-235. [En línea] <<http://www.insp.mx/salud/38/384-1.html>>
- 124.- Torales Sicardo, Felipe M. y Maite Vallejo. (2000) "**Enfermedad Diarreica Aguda en los Niños menores de 5 años (EDA)**". Centro Nacional de Información y Documentación sobre Salud (CENIDS-SSA), 2, 4v. [En línea] <<http://bvs2.insp.mx/componen/svirtual/boprime/pdf/v2n4abr2000.pdf>>
- 125.- Toro Colón, Carla C. (2004) "**Respuesta inmunológica en cerditos recién nacidos de madres vacunadas con las cepas K88, K99, F41 y 987P de *Escherichia coli***", Puerto Rico, 64 p. Tesis (Maestra en Ciencias en la Industria Pecuaria), Universidad de Puerto Rico. [En línea] <<http://grad.uprm.edu/tesis/torocolon.pdf>>
- 126.- Trabulsi L.R., Keller R., Tardelli, Gomes T.A. (2002) "**Typical and atypical enteropathogenic *Escherichia coli***". *Emerging Infections Diseases*, 8, pp. 508-513.
- 127.- "**Transferencia y manipulación de genes**". [En línea] <http://www.geocities.com/roberto_raul/trans.htm>
- 128.- Unidos para el Desarrollo Internacional (USAID). (2005) "**Lineamientos para el Tratamiento de la Diarrea, incluyendo las nuevas recomendaciones para el uso de las Sales de Rehidratación Oral (SRO) y la Suplementación con Zinc para trabajadores de salud en postas médicas**". [En línea], Arlington, ene 2005 <http://www.mostproject.org/ZINC/Zinc_Updates_Apr05/guidelinesespanol.pdf>
- 129.- Valeria Souza, Martha Rocha, Luisa Sander y Luis E. Eguiarte. "**Historia natural, ecología y evolución de la patogenicidad en *Escherichia coli***". Departamento de Ecología Evolutiva, Instituto de Ecología, UNAM. [En línea] <http://www.microbiologia.org.mx/microbiosenlinea/CAPITULO_08/Capitulo08.pdf>
- 130.- Vallance B.A., and Finlay B.B. (2000) "**Exploitation of host cells by enteropathogenic *Escherichia coli***". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 97 (16), pp. 8799-8806.
- 131.- Velásquez F. Raúl, García Lozano Herlinda, Rodríguez Esteban, Gómez Delgado Alejandro, Melo Martín, Anaya Luis, Torres Javier. (2004) "**Enfermedad y muerte por diarrea grave en niños mexicanos: ¿es necesaria una vacuna contra rotavirus?** Boletín Médico del Hospital Infantil de México, 61 (6), pp. 465-474. [En línea] <http://www.imbiomed.com/1/1/articulos.php?method=showDetail&id_articulo=28932&id_seccion=981&id_ejemplar=2968&id_revista=20>
- 132.- Viayra Ramírez, Mariana y Sandra Arcos Reyes. (2004) "**Científicos mexicanos desarrollan una "vacuna comestible" contra la diarrea**". [En línea] *La Crónica de hoy*, 8 dic. 2004 <http://cquick.conacyt.mx/QuickPlace/direccion_de_comunicacion_social/Main.nsf/2a1fb3846ca143220525670800167222/7ea775d9557ce4cb86256f64004d229f?OpenDocument>

- 133.- Vidal E., Jorge and Navarro García F. (2006) "**Efficient translocation of EspC into epithelial cells depends on enteropathogenic *Escherichia coli* and host cell contact**". *Infection and Immunity*, 74 (4), pp. 2293-2303.
- 134.- Villansecas Flores, Jorge Mateo. (2002) "**Efecto de la toxina Pet de *Escherichia coli* enteroagregativa (EAggEC) sobre el esqueleto membranal de diferentes células**", México, 76 p. Tesis (Doctor en Ciencias Biológicas), UNAM, Facultad de Ciencias.
- 135.- Villansecas Flores, Jorge Mateo, Navarro G., Mendoza H., Nataro J.P., Cravioto A., and Eslava C. (2000) "**Pet toxin from enteroaggregative *Escherichia coli* produces cellular damage associated with fodrin disruption**". *Infection and Immunity*, 68 (10), pp. 5920-5927.
- 136.- Wainwright L.A. and Kaper J.B. (1998) "**EspB and EspD require a specific chaperone for proper secretion from Enteropathogenic *Escherichia coli***". *Molecular Microbiology*, 27, pp. 1247-1260.
- 137.- Walter J.M. y Gingol E.B. (1997) "**Biología molecular y biotecnología**". 2º ed. Editorial Acribia S.A., España.
- 138.- Werner David, Sanders David, Weston Jason, Babb Steve y Rodríguez Bill. (2000) "**La Diarrea: Uno de los grandes Asesinos de Niños**". [En línea] <<http://www.healthwrights.org/static/cuestionando/cap6.htm>>
- 139.- Wolff C., Nisan I., Hanski E., Frankel G. and Rosenshine I. (1998) "**Protein translocation into host epithelial cells by infecting Enteropathogenic *Escherichia coli***". *Molecular Microbiol.*, 28, pp. 143-155.
- 140.- World Health Organization. (1998) "**Zoonotic non-O157 shiga toxin producing *Escherichia coli* (STEC)**". Report of a WHO scientific working group meeting.
- 141.- World Health Organization. (1990) "**Diarrea aguda**". [En línea] CDD/SER <<http://www.drscope.com/privados/pac/pediatrica/pbl4/def.html>>
- 142.- Yang Ji, Tauschek Marija, Strugnel Richard and Robins-Browne Roy M. (2005) "**The H-NS protein represses transcription of the *eltAB* operon, which encodes heat-labile enterotoxin in enterotoxigenic *Escherichia coli*, by binding to regions downstream of the promoter**". *Microbiology*, 151, pp. 1199-1208.
- 143.- Yoycet Ruiz de Villa Martínez, Cecilia Guerrero Soler, Frank E. Medina Alí, José Álvarez Curtis. (2004) "**Diarrea persistente. Principales causas y factores asociados en nuestro medio**". *Acta Pediátrica de México*, 25, (2), pp. 81-84. [En línea] <<http://bvs.insp.mx/articulos/5/31/092005.pdf>>
- 144.- Zamora J., Reinhardt G., Polette M. y Macias P. (1999) "**Diarrea neonatal porcina. Aislamiento de cepas de *Escherichia coli* toxigénicas productoras de STa, LT y VT**". *Archivo Médico Veterinario*, 31, pp. 237-242. [En línea] <http://mingaonline.uach.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0301732X1999000200012&lng=es&nrm=iso>
- 145.- Zamora J., Reinhardt G., Polette M. y Macias P. (2000) "**Detección rápida en el diagnóstico de *Escherichia coli* toxigénica productora de LT y VT**". *Archivo Médico Veterinario*, 32, p. 1.
- 146.- Zinsser. (1998) "**Microbiología**". 4º Reimpresión de la 20º ed., Panamericana. Pp. 39, 746-747, 774-776.

