



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

**IDENTIFICACIÓN DE *Escherichia coli*
MEDIANTE PCR MULTIPLEX EN MATERIA
FECAL.**

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

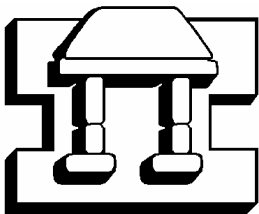
PRESENTA:

GUSTAVO FERREIRA RUIZ

DIRECTORA DE TESIS:

M. en C. GLORIA LUZ PANIAGUA CONTRERAS

**PROYECTO FINANCIADO POR LA DGAPA, UNAM,
PAPIME PE200705**



IZTACALA

Los reyes Iztacala, Marzo del 2009



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.

...Cierta noche aciaga, cuando, con la mente cansada, meditaba sobre varios libracos de sabiduría ancestral y asentía, adormecido, de pronto se oyó un rasgido, como si alguien muy suavemente llamara a mi portal. Es un visitante –me dije–, que está llamando al portal; sólo eso y nada más...

...Más cuando abrí la persiana se coló por la ventana, agitando el plumaje, un cuervo muy solemne y ancestral. Sin cumplido o miramiento, sin detenerse un momento, con aire envarado y grave fue a posarse en mi portal, en un pálido busto de palas que hay encima del umbral; Fue, se posó y nada más...

...Y el impávido cuervo osado aun sigue, sigue posado, en el pálido busto de palas que hay encima del portal; y su mirada aguileña es la de un demonio que sueña, cuya sombra el candil en el suelo proyecta fantasmal; y mi alma, de esa sombra que allí flota fantasmal, no se alzaré... ¡nunca más!...

Edgar Allan Poe

DEDICATORIA

A mis padres:

Juana Ruiz Pérez y **J. Ventura Ferreira Hernández** por el apoyo que siempre me han brindado aun es esos momentos en los que les hacia pasar corajes, y aun así me siguieron apoyando para lograr ser la persona que soy hasta este momento y que seré a lo largo de mi vida.

A mis hermanas:

Fabiola Ferreira Ruiz que me apoyo con algunos gastos de las escuela como por ejemplo la impresión de esta tesis; y a **Nayeli Ferreira Ruiz** que también de vez en cuando me apoyaba con algunas cosas de la escuela; y no solo por el apoyo económico que me brindaron si no que también que crecieron conmigo y me apoyaron en esos momentos difíciles de la infancia.

Y a toda mi familia que me apoyo y que creyó en mi, gracias por estar en esos momentos de diversión y reflexión conmigo

AGRADECIMIENTOS

A la M. en C Gloria Luz Paniagua Contreras y al M. en C Eric Monroy Pérez,
por el apoyo y aportación de sus conocimientos para la realización de este
trabajo.

A los profesores:

Dr. Sergio Vaca Pacheco

Dr. Elías Piedra Ibarra

Biol. Susana Esther González Almazán

Por las sugerencias y correcciones que contribuyeron a la elaboración de este
trabajo.

A mis compañeras de laboratorio:

Lizbeth (Licifer), Marisol y Rocío

Por haberme apoyado con su compañía y amistad durante la elaboración de
esta tesis.

A mis amigos de la FESI:

Paco (Bon), Oscar (Mamer), David (Poodle), Axel (Bronx), Ezel, Alejandro
(Mich), Gabriel (Graby), Rolando (Clonador), Sergio (Pin Pon), Ivan (Cabra),
Mauricio (Steven), Edson (Montañas), Paco (Cobra), Bernardo (Bernas),
Leonardo (Profe Rural), Alejandro (Aldana), Rodrigo (Pos) y a los demás que
aunque no conviví mucho con ellos, gracias por aquellos momentos de
diversión y sufrimiento que compartimos en la escuela.

A mis amigas de la FESI: Marianita, Gaby, Rox, Vicky, Paulina, Natalia (Natanas), Tania (Satania), Lorena y Brenda (Ruda y Cursi), Nadia, Fátima (Wuasima) y a las demás que aunque no conviví mucho con ellas, gracias por aquellos momentos de diversión y sufrimiento que compartimos en la escuela. A Carlos (Charls) una disculpa, que por causas de fuerza mayor no pude llegar a tiempo a su examen profesional.

Al equipo de Futbol:

Por haberme enseñado que a veces y solo a veces la derrota puede ser divertida.

A la Universidad de los Guapos:

En la cual aprendí a comprender mejor a las mujeres.

Y por ultimo a la UNAM:

que me dio la posibilidad de desarrollarme en una de las mejores universidades a nivel mundial.

ÍNDICE

I.- Resumen	6
II.- Introducción	7
• Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETAs).	
• Grupos patógenos de <i>E. coli</i> .	
• Reacción en cadena de la polimerasa (PCR multiplex).	
II.- Antecedentes	11
III.- Objetivo general y particulares	13
IV.- Metodología	14
V.- Resultados	18
VI.- Discusión	26
VII.- Conclusiones	34
VIII.- Referencias	35

RESUMEN

Las enfermedades diarreicas representan un serio problema de salud mundial, principalmente en los países en vías de desarrollo, en donde las tasas de mortalidad y morbilidad son realmente elevadas. Entre las bacterias causales de diarrea se encuentra *Escherichia coli*. Las cepas de *E. coli* que ocasionan gastroenteritis se han clasificado en 5 grupos: *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* verotoxigénica (VTEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* enteropatógena (EPEC) y *E. coli* enteroagregativa (AggEC). El propósito de este estudio fue estimar la prevalencia de los distintos patotipos de *Escherichia coli* mediante PCR multiplex en las muestras de materia fecal de 108 pacientes. El 22.2% de las muestra analizadas (n = 24) por PCR multiplex fueron positivas para algún patotipo de *E. coli*. A partir de las 24 muestras PCR positivas, el patotipo ETEC se identificó en el 54.1% (n = 13) (*estA* en el 16.7%, *eltB* en el 25% y *estA* + *eltB* en el 12.5%) de las heces de los pacientes. El grupo patógeno EPEC se detectó en el 37.5% (n = 9) (*eaeA* en el 29.1% y *eaeA* + *bfpA* en el 8.3%) y el grupo EIEC en el 8.3% (n = 2) (*ial* en el 8.3%). El 99 % (n = 107) del total de las muestras analizadas (n = 108) resultó positiva para algún parásito. El parásito identificado con mayor frecuencia fue *Entamoeba histolytica/Entamoeba dispar* con un 95.3% (n = 103), seguida de *Giardia lamblia* con un 37.9% (n = 41). Los porcentajes de asociación de EIEC, ETEC y EPEC con *Entamoeba histolytica/Entamoeba dispar* fueron del 100%, 80% y 75%, respectivamente, mientras que la asociación del protozoario *Giardia lamblia* con ETEC y EPEC fue del 20% y 25% correspondientemente. El 65% de las cepas patógenas de *E. coli* identificadas por PCR multiplex fueron resistentes a Carbenicilina (CB), el 51% a Cefalotina (CF), el 48% a Ampicilina (AM), el 38% a Trimetoprim con sulfametoxazol (SXT), el 24% a Nitrofurantoina (NF), el 22% a Cefotaxima (CTX), el 17% a Cloranfenicol (CL), el 15% a Netilmicina (NET), el 14% a pefloxacina (PEF), el 6% a Amikacina (AK) y el 5% a Ceftriaxona (CRO). La elevada presencia de ETEC en este estudio con respecto a los otros patotipos de *E. coli*, es similar a la identificada en otras partes del mundo. La asociación de ETEC, EPEC y EIEC con *Entamoeba histolytica/Entamoeba dispar* y *Giardia lamblia*, demostró lo agudo de las infecciones intestinales. La elevada resistencia de las cepas patógenas de *E. coli* a los antibióticos evidencio la importancia de determinar la susceptibilidad a los antimicrobianos en las cepas patógenas. En este estudio la identificación de los distintos grupos diarreogénicos de *E. coli* mediante PCR multiplex, resultó ser un método eficaz, debido a su alta sensibilidad y especificidad en la identificación de microorganismos.

INTRODUCCIÓN

Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETAs).

Las Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETAs) son ocasionadas por la ingesta de agua o comida contaminada con microorganismos patógenos (bacterias, parásitos y virus) o por la producción de sus toxinas (Parilla CMC *et al*, 1993). Se ha descrito que los manipuladores de alimentos (personas que intervienen en el proceso de producción y preparación para el consumo de alimentos) pueden ser la fuente principal de contaminación y adulteración de éstos, y como consecuencia los responsables de la transmisión de enfermedades (Secretaría de Salud, 1994). Generalmente los microorganismos contaminan los alimentos en pequeñas cantidades, en donde se reproducen hasta alcanzar los niveles necesarios para ser infectantes o producir la suficiente toxina para causar enfermedad (International Comisión on Microbiological Specifications for Foods, 1980).

Se ha descrito que las manifestaciones de las infecciones alimentarias pueden ser de tipo gastrointestinal (amibiasis, salmonelosis, shigelosis, teniasis, giardiasis, ascariasis, cólera, e intoxicaciones alimentarias) o de tipo extraintestinal (brucelosis, cisticercosis, fiebre tifoidea, hepatitis, botulismo etc.) (Parilla CMC *et al*, 1993). También se ha reportado que la transmisión de organismos patógenos puede ocasionar síndromes tóxicos, respiratorios y enfermedades crónicas (Riley LW *et al*, 1983).

Los Microorganismos que causan las infecciones alimentarias intestinales como extraintestinales tienen en común que su entrada al organismo es por la vía oral y que su hábitat en alguno de sus estadios es el intestino, por lo tanto, se eliminan con las evacuaciones; de este modo, la transmisión de microorganismos de un individuo a otro se efectúa por medio de las heces, ya sea en forma directa de persona a persona o por medio de los alimentos y el agua contaminada (Dirección General de Epidemiología, 1990).

La diarrea es la principal consecuencia de las infecciones gastrointestinales, siendo la causa más frecuente de muertes en los países en desarrollo, sobre todo en infantes (Guerrant RL *et al*, 1990). Sin embargo los países desarrollados también se ven afectados, por ejemplo, se ha reportado que una tercera parte de los viajeros de los países industrializados desarrollan diarrea (Black R, 1990).

En el mundo las enfermedades diarreicas representan un grave problema de salud, principalmente en países subdesarrollados, en donde las tasas de mortalidad y

morbilidad son realmente elevadas (Trung Vu Nguyen *et al*, 2005). La organización mundial de la salud (OMS) ha estimado que alrededor de dos millones de niños mueren anualmente de enfermedades diarreicas en países en vía de desarrollo y producen además la muerte de un menor cada 15 segundos alrededor del mundo (Alper, J, 2003). Se ha estimado que en Asia, África y Latino América mueren anualmente 12,600 niños menores de 5 años de edad como consecuencia de diarrea (Guerrant RL *et al*, 1990). La contaminación de los alimentos en México constituye un problema de salud pública que afecta significativamente a sus habitantes, la cual se ve reflejada en las elevadas cifras reportadas en los casos de gastroenteritis y otras enfermedades diarreicas en el país (Secretaría de Salubridad y Asistencia, 1987). En México la Dirección General de Estadística e Informática de la Secretaría de Salud, registró en el año 2003 un total de 2,221 defunciones ocasionadas por enfermedades infecciosas intestinales (Dirección General de servicios de la Salud Pública, 2005). Dentro de las bacterias que contaminan los alimentos y que ocasionan enfermedades gastrointestinales se encuentra a *Escherichia coli* (Levine, M. M, 1987).

Grupos patógenos de *E. coli*.

Las cepas de *E. coli* que ocasionan gastroenteritis se han clasificado en seis grupos: *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* verotoxigénica, enterohemorrágica ó shiga toxigénica (VTEC, EHEC ó STEC), *E. coli* enteroagregativa (EaggEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* enteropatógena (EPEC) y *E. coli* de adherencia difusa (DAEC) (Nataro JP and Kaper J, 1998)

Escherichia coli enterotoxigénica, al igual que los otros grupos, se adquiere por la ingestión de agua y alimentos contaminados. Las cepas de ETEC producen dos toxinas: LT (toxina termolábil, codificada por *eltB*) y ST (toxina termoestable, codificada por *estA*), que actúan incrementando los niveles de Adenosina-5´-(AMPc) y Guanosina-5´- monofosfato cíclico (GMPc), respectivamente; esto provoca que las células de las criptas intestinales aumenten la secreción de agua y electrolitos, con la consecuente disminución en la absorción de las vellosidades, lo que clínicamente se manifiesta como diarrea acuosa (Eslava C *et al*, 1993).

EPEC ocasiona una lesión histológica llamada adherencia y esfacelamiento (A/E), la cual se caracteriza por la adherencia íntima de la bacteria al entericito, seguida por la destrucción de la microvellosidades con polimerización de actina, posteriormente existe alteración del citoesqueleto en el sitio de unión de la bacteria, debido al aumento de los niveles de calcio intracelular y de proteína C Kinasa que inducen

probablemente la secreción de agua y electrolitos al espacio intraluminal, produciendo diarrea aguda (Levine MM and Edelman R, 1984 & Girón JA *et al*, 1993).

En la adherencia al enterocito se encuentran involucradas fimbrias denominadas Bfp (bundle-forming pilus) que son codificadas por el gen *BfpA* contenido en un plásmido de 50-70 MDa denominado EAF, así como también una proteína de membrana externa de 94 kDa llamada intimina, codificada por el gen cromosomal *eaeA* y que participan en A/E (Nataro JP and Kaper J, 1998).

Las cepas de EPEC se han clasificado en dos tipos de acuerdo a la presencia o ausencia de los genes *eaeA* y *BfpA*; se consideran típicas cuando contienen los genes *eaeA* para la intimina (participa en el A/E) y el gene *BfpA* contenido en el plásmido EAF y atípicas cuando solo presentan *eaeA* (Nataro JP and Kaper J, 1998).

En EIEC, el mecanismo de patogenicidad es la invasividad que se inicia con la adherencia de la bacteria a las microvellosidades de la mucosa del intestino grueso, seguida por la entrada a la célula a través de una fagocitosis “no profesional,” lo que afecta el borde de cepillo del enterocito. Ya libre en el citoplasma, se multiplica e invade a las células vecinas; la destrucción de las células, junto con la movilización de polimorfonucleares y macrófagos, desencadenan el proceso de inflamación y la aparición de diarrea con moco y sangre (disentería), muy similar a la producida por *Shigella* (Rico-Martínez MG, 1995). El gen *ial* que media la invasión se encuentra en un plásmido de 140 MDa llamado pInV (Buysse DM *et al*, 1987).

En EHEC también se producen lesiones del tipo de “adherencia y esfacelación” (codificado por *eaeA*) como en EPEC, y además sintetiza dos citotoxinas, Toxina Shiga-like I y II (STX I y II), que producen la lisis en cultivo de la línea celular VERO. Se ha reportado que la estructura de estas toxinas es similar a la LT de las cepas ETEC y su mecanismo de acción es en el nivel de la síntesis de proteínas. Además, poseen un plásmido de 90 Kb que codifica para la enterohemolisina. Este plásmido se encuentra presente en todos los aislamientos clínicos de O157:H7 asociados con colitis hemorrágica y síndrome urémico hemolítico (Levine MM *et al*, 1987). La producción de diarrea aguda y crónica en niños se debe a la acción de las toxinas y a la adherencia al enterocito (Fukushima H *et al*, 2000).

El grupo EaggEC presenta un patrón de adherencia agregativa en cultivo celular (Eslava C *et al*, 1998). Este grupo está fuertemente asociado con diarrea persistente en niños (Henry FJ *et al*, 1996). La patogénesis de EaggEC está en estudio, aunque se han involucrado dos proteínas de alto peso molecular, Proteína codificada por un plásmido (Pet) y Proteína codificada en el genoma con actividad de proteasa (Pic), que producen acortamiento de las vellosidades, hemorragia, ulceración y necrosis en asa

ligada de rata, además de la toxina ST de *E. coli* enteroagregativa diferente de la que produce ETEC (Eslava C *et al*, 1998 & Villaseca JM *et al*, 2000).

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR multiplex).

El tratamiento médico de las infecciones diarreicas ocasionadas por los patotipos de *E. coli* ha cambiado en los últimos años, debido a que las bacterias se han seleccionado como resistentes a los antibióticos que en el pasado eran considerados de primera elección, como la tetraciclina, estreptomina, amoxicilina, cefalotina, ticarcilina y al trimetoprim con sulfametoxazol. De esta manera el éxito del tratamiento médico adecuado de las infecciones ocasionadas por los grupos diarreogénicos de *E. coli* va a depender de la identificación precisa del agente causal. Entre los métodos de diagnóstico clínico utilizados para la identificación de los patotipos de *E. coli*, se encuentra la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la cual es una técnica que nos ofrece resultados rápidos, confiables y con una elevada especificidad y sensibilidad.

Debido a que en nuestro país las infecciones diarreicas en infantes continúan siendo un problema de consideración, el propósito de este estudio clínico fue determinar la resistencia a antibióticos en cepas pertenecientes a distintos grupos de *E. coli* detectadas en diarrea de infantes por el método de PCR multiplex.

ANTECEDENTES.

Barreto *et al* (1999-2000), realizaron un trabajo en el cual establecieron la presencia de categorías enteropatógenas de *E. coli* a partir de 145 muestras de alimentos (46 productos lácteos; 45 derivados cárnicos y 54 clasificados como “otros alimentos”). Los alimentos analizados mostraron una deficiente calidad higiénico-sanitaria ya que el 49.1% fueron positivos a *E. coli*. Donde las categorías enteropatógenas investigadas por alimento fue: ECEH (8,57%) fundamentalmente en productos cárnicos y lácteos; ECEI (4,76%) y ECET (1,9%) predominaron en “otros alimentos”.

Cortez-Ortíz *et al* (2002), realizaron un estudio para identificar el agente causal del brote de diarrea asociado al desbordamiento del canal de aguas en el municipio del Valle de Chalco, Estado de México. De las 1550 muestras tomadas con hisopos rectales, se encontró a *E. coli* con una incidencia del 76.6%; del total de las cepas aisladas, 63.96% fueron patógenas (ETEC, EIEC, EPEC y *E. coli* no. O157:H7). El alto porcentaje de aislamiento de *E. coli* patógena en este estudio, muestra claramente la importancia de *E. coli* como agente productor de gastroenteritis.

Mendez *et al* (2004), resaltan en su trabajo el uso de métodos de biología molecular (PCR multiplex), en los laboratorios de microbiología clínica suponiendo un gran apoyo a la hora de obtener diagnósticos sensibles y específicos en el menor espacio de tiempo posible.

Svenungsson *et al* (2000), realizaron un estudio clínico en Suiza, para la identificación de enteropatógenos en adultos con diarrea, el factor virulento de los genes de *E. coli* fue detectado por la reacción en cadena de polimerasa (PCR). Fueron identificados enteropatógenos en 56% de los pacientes, los más frecuentes fueron *Campylobacter* (13% de los pacientes), *E. coli* enterotoxigénica (8%), *Salmonella* (7%), *Shigella* (4%), *Blastocystis hominis* (4%), calcivirus (3%), rotavirus (3%), *E. coli* enteroagregativa (2%), *Aeromonas* (2%), *Giardia intestinales* (2%), *Cryptosporidium* (2%) y astrovirus (2%). Los menos frecuentes fueron *E.coli* enteropatógena, *E. coli* enteroinvasiva, *Entamoeba histolytica*, microsporidia y adenovirus.

Thompson (2001), realizó un estudio que consistió en determinar en alimentos vendidos en vía pública, la prevalencia de *E. Coli*, como indicador de contaminación fecal y de *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), como indicador de un patógeno humano, debido a su gran importancia en salud pública. La determinación de ETEC se realizó a través de la utilización y comparación de dos técnicas de biología molecular; la

hibridización en fase sólida y la reacción en cadena de polimerasa (PCR), con el fin de determinar cual era más sensible y rápida. Además también se realizó un estudio observacional para determinar las condiciones higiénicas de los puestos y de los manipuladores de alimentos.

OBJETIVO GENERAL

- Identificar por PCR multiplex los diferentes grupos de *Escherichia coli* en materia fecal.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Establecer la frecuencia de ETEC, EPEC, EIEC y VTEC en las muestras analizadas.
- Identificar los principales grupos de parásitos en las muestras.
- Determinar la resistencia a los antibióticos en las cepas patógenas de *E. coli* identificadas.

MATERIALES Y MÉTODOS.

Obtención de las muestras.

Para el desarrollo de este estudio se analizaron las muestras de materia fecal de un grupo de pacientes de Los Reyes Iztacala que acudieron al Laboratorio de Análisis Clínicos de la CUSI, FES Iztacala, UNAM, para solicitar estudios de coprocultivo y coproparasitológico.

Siembra de las muestras de materia fecal.

Las muestras fueron inspeccionadas visualmente, con la finalidad de detectar sangre oculta, consistencia sólida o líquida, color, etc. Posteriormente por medio de asas estériles calibradas (1/100) se tomó una muestra de la materia fecal, se sembró por el método de estría cruzada en el medio de agar MacConkey y se incubó a 37°C por 24 horas. Adicionalmente las muestras se sembraron en los medios selectivos y específicos: SS, verde brillante y eosina azul de metileno (EMB).

Obtención del DNA Bacteriano.

Después de la incubación de las muestras en agar MacConkey a 37° C/24 h. las bacterias del cultivo primario fueron colectadas y suspendidas en 5 ml de PBS (pH, 7.2) a una densidad aproximada de 10⁹ bacterias. El DNA templado fue preparado por ebullición por 20 minutos, seguido por centrifugación por 10 minutos a 12,000 rpm. El sobrenadante fue utilizado para PCR.

Identificación de los diferentes grupos de *E. coli* mediante PCR multiplex.

Para diferenciar los diferentes grupos de *E. coli* en las muestras, se utilizaron 9 pares de oligonucleótidos (primers), complementarios a distintas secuencias de DNA específicas para la detección de *E. coli* enterotoxigénica (ETEC: ST/LT), *E. coli* enteropatógena (EPEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC) y *E. coli* verotoxigénica (VTEC) (Cuadro 1).

PRIMER	GENE	Secuencia del primer (5' a 3')	Tamaño de la amplificación (pb)
VT1	<i>vt1</i>	GAAGAGTCCGTGGGATTACG AGCGATGCAGCTATTAATAA	130

VT2	<i>Vt2</i>	ACCGTTTTTCAGATTTTGACACATA TACACAGGAGCAGTTTCAGACAGT	298
VTEC/EPEC	<i>eaeA</i>	CACACGAATAAACTGACTAAAATG AAAAACGCTGACCCGCACCTAAAT	376
EPEC	<i>bfpA</i>	TTCTTGGTGCTTGCGTGTCTTTT TTTTGTTTGTTGTATCTTTGTAA	367
ETEC-LT	<i>eltB</i>	TCTCTATGTGCATACGGAGC CCATACTGATTGCCGCAAT	322
ETEC-ST	<i>estA</i>	GCTAAACCAGTAGAGGTCTTCAAAA CCCGGTACAGAGCAGGATTACAACA	147
EIEC/ <i>Shigella</i>	<i>ial</i>	CTGGTAGGTATGGTGAGG CCAGGCCAACAATTATTTC	320
FLICH7	<i>fliC</i>	GCGCTGTCGAGTTCTATCGAGC CAACGGTGACTTTATCGCCATTCC	625
O157	-	GTTACATTTGCTCCTGGGGCTAA CATACCGAYKACGCCGATCTGTT	500

Cuadro 1. Oligonucleótidos utilizados en la detección de *E. coli* por PCR multiplex.

Preparación de la mezcla reactiva.

El volumen final para cada mezcla de reacción fue de 23 µl, para lo cual se tomó 1 µl (10 pmol) de cada uno los 18 primers (todos los primers fueron de la marca comercial Sigma-Genosys, cuadro 1), y se depositó en un tubo eppendorff nuevo y estéril. Al término se adicionaron 4 µl de agua estéril libre de nucleasas.

Amplificación de DNA por PCR multiplex.

Posteriormente se tomaron 23 µl de la mezcla reactiva y se adicionaron a tubos de la marca puretaq (PuRetaq™ Ready-To-Go™ PCR beads) que contenían 1.5 mmol de MgCl₂, 0.5 U de Ampli Taq polimerasa y 100 mmol de dNTPs. Finalmente se agregaron 3 µl de DNA templado. La amplificación del DNA se realizó en un Termociclador modelo CGI-96, bajo las siguientes condiciones: desnaturalización inicial a 96°C por 4 minutos; seguido de 30 ciclos de 20 segundos a 94°C, posteriormente 20 segundos a 55°C y 10 segundos a 70°C. Por último una extensión final por 7 minutos a 72° C.

Análisis de los amplicones por electroforesis en geles de agarosa.

Después de la amplificación, los amplicones obtenidos fueron analizados por electroforesis en geles de agarosa al 3 % (TBE 1X), bajo las siguientes condiciones:

120 volts, 94 miniampers en un tiempo de 60-120 minutos. Los tamaños de los fragmentos fueron determinados en comparación con 50 pb DNA ladder. Los geles fueron teñidos con BrEt y fotografiados bajo luz UV utilizando el sistema de fotodocumentación modelo GEL LOGIC 100 (KODAK).

Cepas bacterianas

Las cepas de referencia de *E. coli* utilizadas como control para la PCR fueron: ETEC ATCC 35401 (*eltB* y *estA*); EPEC ATCC 43887 (*bfpA* y *eaeA*); EHEC ATCC 43890 (*vt1*, *eaeA*); EHEC ATCC 43889 (*vt2*, *eaeA*); EIEC ATCC 43893 (*ial*) y *E. coli* ATCC 11775 sin genes de virulencia (control negativo).

Susceptibilidad a antibióticos en los grupos de *E. coli* identificados.

Una vez identificados los diferentes patotipos de *E. coli*, se utilizó la técnica de Kirby-Bauer para probar la susceptibilidad y/o resistencia de cada cepa encontrada, para lo cual se tomaron 5 colonias (de cada cepa) con un asa estéril, se inocularon en 5 ml de caldo Muller Hilton, y se incubaron a 37 ° C durante 3 horas, hasta que apareció una turbidez ligera. La turbidez se ajustó con solución salina estéril hasta obtener una densidad comparable con un estándar de sulfato de bario. El estándar se preparó mezclando 5 ml de BaCl₂ 0.048 M (1.175% peso/ volumen de BaCl₂ 2H₂O) con 99.5 ml de H₂SO₄ al 1% v/v (0.36N), que fue la mitad de la densidad del estándar No. 1 de MacFarland (estándar 0.5 de MacFanarland).

Posteriormente se inoculó sobre el agar de Muller Hilton por medio de hisopos estériles, los cuales se humedecieron con la suspensión (crecimiento bacteriano) y se estriaron sobre la totalidad de la superficie del agar. Por último se tomó un sensidisco con los 12 antimicrobianos a determinar, por medio de una pinza estéril y se colocó sobre el agar de Mueller Hinton. El antibiótico se difundió formando un gradiente de concentración que inhibió o permitió el crecimiento de la bacteria en un tiempo de 24 horas a 37 ° C.

De esta manera las cepas se clasificaron como susceptibles (S) o resistentes (R) dependiendo del diámetro del halo de inhibición, el cual se midió con un vernier (Cuadro 2).

ANTIBIÓTICO	ABREV.	FAMILIA	ACCIÓN	DIÁMETRO DEL HALO DE INH. (mm)		
				R	I	S
Ampicilina	AM	Aminopenicilina	1	<28		>29
Cefalotina	CF	Cefalosporina de 1ª Gen.	1	<14	15-17	>18

Cefotaxima	CTX	Cefalosporina de 3 ^a Gen.	1	<14	15-22	>23
Ceftazidima	CAZ	Cefalosporina de 3 ^a Gen.	1	<14	15-17	>18
Cefuroxima	CXM	Cefalosporina de 2 ^a Gen.	1	<14	15-17	>18
Dicloxacilina	DC	Penicilina semisintetica	1	<10	11-12	>13
Eritromicina	E	Macrolido	2	<13	14-17	>18
Gentamicina	GE	Aminoglucosido	2	<12	13-14	>15
Pefloxacina	PEF	Quinolona	3	<14	15-22	>23
Penicilina	PE	Penicilina	1	<28		>29
Tetraciclina	TE	Tetraciclina	2	<14	15-18	>19
Trimetoprim- sulfametoxazol	SXT	Combinacion de diaminopirimidina y sulfonamida	3	<10	11-15	>16

Cuadro 2.- Antibióticos que se utilizaron contra las cepas encontradas

R= resistente, I= intermedia, S= sensible.

1. Inhibición de la formación de la pared celular
2. Interferencia en la síntesis de proteínas
3. Inhibición del metabolismo de los ácidos nucleicos.

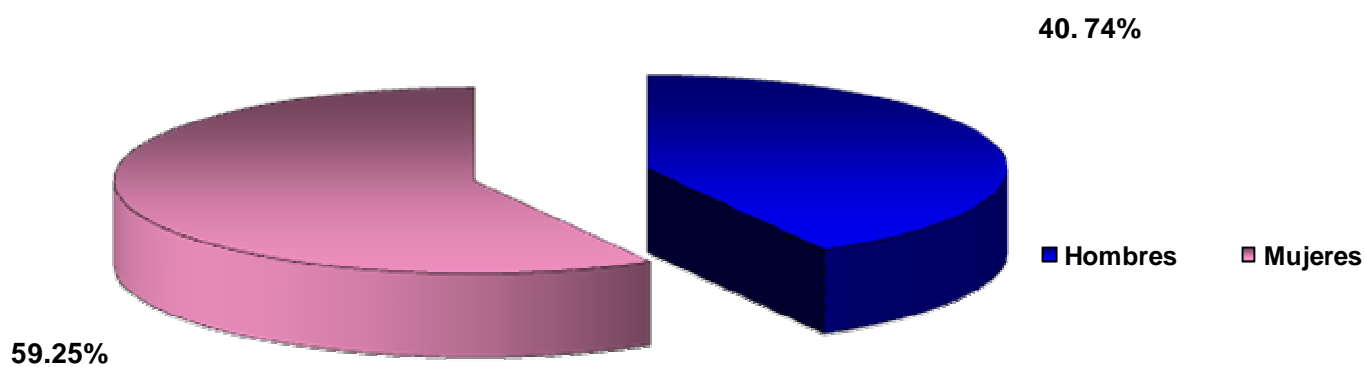
Detección de parásitos.

La detección de los parásitos se realizó por medio de la técnica de Faust (Flotación en sulfato de zinc). Para lo cual cada una de las muestras de materia fecal fueron homogeneizadas con agua potable. Posteriormente se tomó una muestra de 10 ml y se depositó en un tubo de ensaye. El tubo se centrifugo por 3 minutos a 3000 rpm, se decantó el sobrenadante, posteriormente se agregó la solución de sulfato de zinc (densidad: 1.190) y se homogeneizó la muestra con aplicadores de madera. Al término, la muestra se centrifugó nuevamente por 3 minutos a 3000 rpm, para posteriormente agregar la solución de sulfato de zinc hasta formar un menisco y colocar en la superficie un cubreobjetos. Al cabo de 10 minutos, se colocó el cubreobjetos sobre un portaobjetos que contenía una gota de lugol. Los parásitos se observaron a 40x en un microscopio óptico.

RESULTADOS

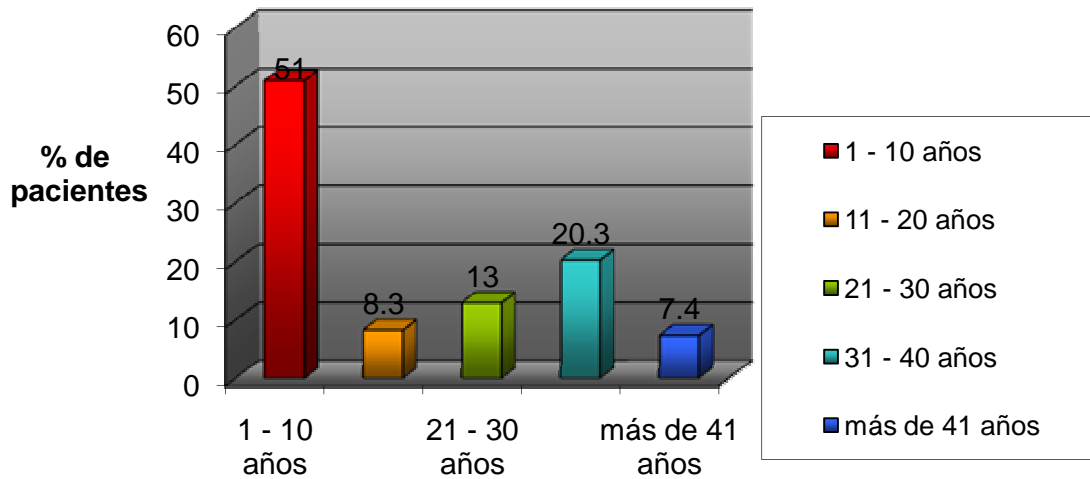
Pacientes analizados.

Para el desarrollo de este trabajo se analizaron las muestras de materia fecal de 108 pacientes (Gráfica 1) que acudieron al Laboratorio Clínico de la CUSI Iztacala. El 59.3 % (n = 64) de los pacientes correspondió al sexo femenino y el 40.7 % (n = 44) al sexo masculino (Gráfica 1).



Gráfica 1. Distribución de los pacientes analizados por sexo.

En la gráfica 2 se observa la distribución de los pacientes por edad. El grupo de edad más frecuente fue el de 1 – 10 años con el 51% (n = 55), seguido de 31 – 40 años con 20.3% (n = 22) y por el de 21 – 30 años con el 13% (n = 14). Los grupos minoritarios correspondieron al rango de 11 – 20 años con 8.3% (n = 9) y los pacientes con más de 41 años con el 7.4% (n = 8).



Gráfica 2. Distribución de los pacientes por rangos de edad.

Detección de los grupos patógenos de *Escherichia coli* por PCR multiplex.

El 22.2% de las muestra analizadas (n = 24) por PCR multiplex fueron positivas para algún patotipo de *E. coli* y el 77.8% (n = 84) fueron negativas (Gráfica 3).

Gráfica 3. Porcentaje de muestras positivas para algún patotipo de *E. coli*.

A partir de las 24 muestras PCR positivas, el patotipo ETEC se identificó en el 54.1% (n = 13) (*estA* en el 16.7%, *eltB* en el 25% y *estA* + *eltB* en el 12.5%) de las heces de los pacientes (cuadro 3, figura 1). El grupo patógeno EPEC se detectó en el 37.5% (n = 9) (*eaeA* en el 29.1% y *eaeA* + *bfpA* en el 8.3%) y el grupo EIEC en el 8.3% (n = 2) (*ial* en el 8.3%).

Patotipo de <i>E. coli</i> identificado	Distribución de los genes de virulencia en las muestras analizadas
ETEC <i>estA</i> (n = 4) <i>eltB</i> (n = 6) <i>estA</i> + <i>eltB</i> (n = 3)	16.7% 25.0% 12.5%
EPEC <i>eaeA</i> (n = 7) <i>eaeA</i> + <i>bfpA</i> (n = 2)	29.1% 8.3%
EIEC <i>Ial</i> (n = 2)	8.3%
Total N = 24	100 %

Cuadro 3. Porcentaje de los distintos patotipos de *Escherichia coli* identificados.

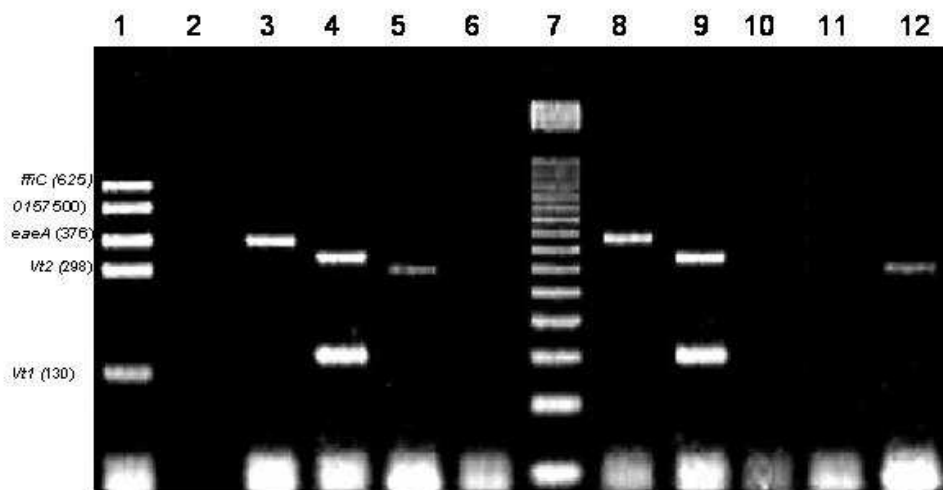
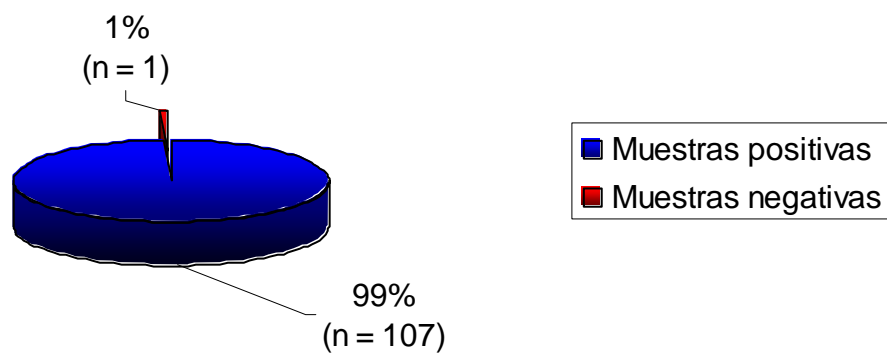


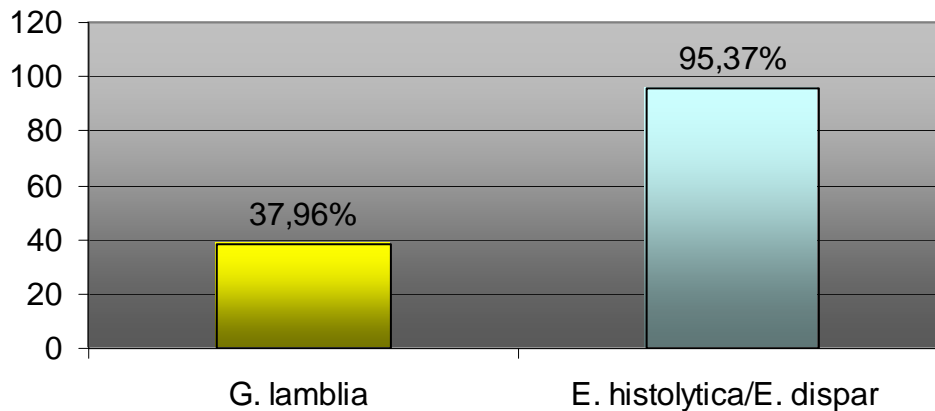
Figura 1: Línea 1: VTEC ATCC43889 y ATCC43890 (*vt1*, *vt2*, *eaeA*, 0157:H7 y *fliC*). Línea 2; Control negativo (sin DNA). Línea 3: EPEC ATCC43887 (*eaeA* 376 pb y a *bfpA* 367 pb). Línea 4; ETEC (*eltB* 322 pb y *estA* 147 pb); Línea 5; EIEC ATCC43893 (*ial* 320 pb). Línea 6; Control negativo, *E. coli* ATCC11775 (sin genes). Línea 7 ; 50-pb ladder. Línea 8; EPEC (muestra de paciente). Línea 9; ETEC (muestra de paciente). Línea 10 y 11 ; muestras de pacientes negativa. Línea 12; EIEC (muestra de paciente).

Parásitos identificados.

El 99 % (n = 107) del total de las muestras analizadas (n = 108) resultó positiva para algún parásito (Gráfica 4). El parásito identificado con mayor frecuencia fue *Entamoeba histolytica/Entamoeba dispar* con un 95.3% (n = 103), seguida de *Giardia lamblia* con un 37.9% (n = 41) (Gráfica 5).



Gráfica 4. Frecuencia de parásitos identificados en las muestras de los pacientes.



Gráfica 5. Distribución de los parásitos identificados en las muestras de los pacientes.

Asociación de los diferentes patotipos de *Escherichia coli* con los parásitos detectados.

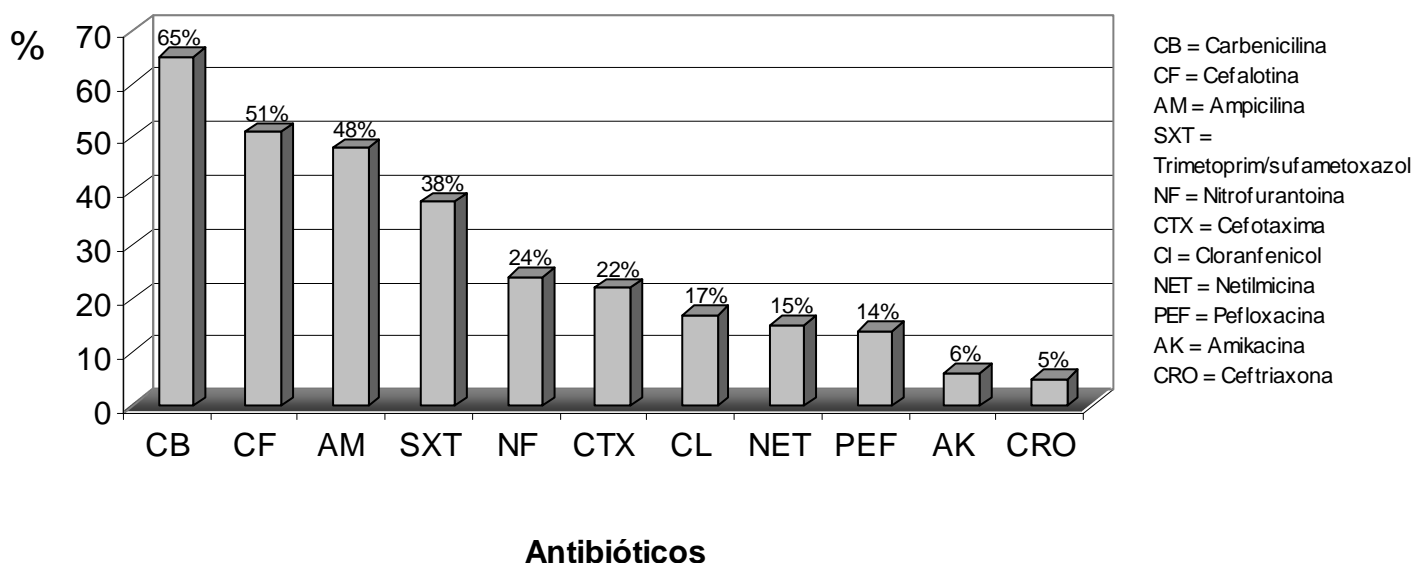
En el cuadro 4 se observan los porcentajes de asociación entre los patotipos de *E. coli* y los parásitos identificados en los pacientes. Los porcentajes de asociación de EIEC, ETEC y EPEC con *Entamoeba histolytica/Entamoeba dispar* fueron del 100%, 80% y 75%, respectivamente, mientras que la asociación del protozooario *Giardia lamblia* con ETEC y EPEC fue del 20% y 25%, respectivamente.

Patotipo de <i>E. coli</i>	<i>E. histolytica/E. dispar</i>	<i>Giardia lamblia</i>
ETEC	80% (n = 12)	20% (n = 3)
EPEC	75% (n = 9)	25% (n = 3)
EIEC	100% (n = 2)	0%

Cuadro 4. Asociación de los patotipos de *E. coli* con los parásitos identificados.

Resistencia a antibióticos de las cepas patógenas de *E. coli* identificadas.

En la gráfica 6, se observan los porcentajes de resistencia a antibióticos por las cepas patógenas de *E. coli* identificadas (ETEC, EPEC y EIEC). El 65% de las cepas fue resistente a Carbenicilina (CB), el 51% a Cefalotina (CF), el 48% resistentes a Ampicilina (AM), el 38% a Trimetoprim con sulfametoxazol (SXT), el 24% a Nitrofurantoina (NF), el 22% a Cefotaxima (CTX), el 17% a Cloranfenicol (CL), el 15% a Netilmicina (NET), el 14% a pefloxacina (PEF), el 6% a Amikacina (AK) y el 5% a Ceftriaxona (CRO).



Gráfica 6. Resistencia a antibióticos de los patotipos de *E. coli* identificados por PCR multiplex

DISCUSIÓN

Pacientes analizados

En este trabajo analizamos un total de 108 muestras de materia fecal, de las cuales el 59.3 % (n = 64) correspondió al sexo femenino y el 40.7 % (n = 44) al sexo masculino (Gráfica 1). Se ha reportado a nivel mundial que las enfermedades diarreicas representan un grave problema de salud, principalmente en países subdesarrollados, en donde las tasas de mortalidad y morbilidad son realmente elevadas (Trung Vu Nguyen *et al*, 2005). Se ha descrito que la diarrea es la principal consecuencia de las infecciones gastrointestinales, siendo la causa más frecuente de muertes principalmente en niños menores de 5 años de edad, sobre todo en los países en vía de desarrollo (Guerrant RL *et al*, 1990). A si mismo, la organización mundial de la salud (OMS) ha estimado que alrededor de dos millones de niños mueren anualmente de enfermedades diarreicas principalmente en países con bajos recursos (Alper, J, 2003). Por otra parte, se ha calculado que en países subdesarrollados de Asia, África y Latino América mueren anualmente 12,600 niños menores de 5 años de edad como consecuencia de diarrea (Guerrant RL *et al*, 1990).

En México la mortalidad por diarrea en menores de cinco años de edad durante el periodo de 1950 a 1993 disminuyó un 96% con la implementación de la rehidratación oral. No obstante estos avances, se considera que aún fallecen cerca de 20 mil personas anualmente, y que de ellas el 60% (12 mil) son menores de edad (Quijano – Pitman F. 1995). Aunado a lo anterior, el Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) en 1981 instrumentó un programa de prevención y control para las enfermedades diarreicas, con el que se disminuyeron los ingresos a hospitales por deshidratación y donde se obtuvieron resultados satisfactorios hasta en un 91.3% (Larracilla AJ, 2002).

En México la Dirección

General de Estadística e Informática de la Secretaría de Salud, registró en el año 2003 un total de 2,221 defunciones ocasionadas por enfermedades infecciosas intestinales (Dirección General de servicios de la Salud Pública, 2005).

Se ha descrito que una de las principales causas que ocasionan infecciones intestinales es la ingesta de agua o comida contaminada con microorganismos patógenos (bacterias, parásitos y virus) o por la producción de sus toxinas (Parilla CMC *et al*, 1993). Los microorganismos que causan este tipo de infecciones, tienen en común que su entrada al organismo es por la vía oral y que su hábitat en alguno de sus estadios es el intestino, por lo tanto, se eliminan con las evacuaciones; de este modo, la transmisión de microorganismos de un individuo a otro se efectúa por medio

de las heces, ya sea en forma directa de persona a persona o por medio de los alimentos y agua contaminada (Dirección General de Epidemiología, 1990). Se ha descrito que los manipuladores de alimentos (personas que intervienen en el proceso de producción y preparación para el consumo de alimentos) pueden ser la fuente principal de contaminación y adulteración de éstos, y como consecuencia los responsables de la transmisión de enfermedades (Secretaría de Salud, 1994). La contaminación de los alimentos en México constituye un problema de salud pública que afecta significativamente a sus habitantes, la cual se ve reflejada en las elevadas cifras reportadas en los casos de gastroenteritis y otras enfermedades diarreicas en el país (Secretaría de Salubridad y Asistencia, 1987). A si mismo, también se ha reportado que en México la mayoría de los cuadros diarreicos son de naturaleza infecciosa, la tasa promedio de mortalidad asociada a enfermedades diarreicas agudas en países en vía de desarrollo es muy elevada. En nuestro país en el 2003 ocurrieron 4, 556 casos por infecciones gastrointestinales (Secretaría de Salubridad y Asistencia, 2005).

Dentro de las bacterias que contaminan los alimentos y que por lo tanto, ocasionan enfermedades gastrointestinales, se encuentra *Escherichia coli* (Levine, M. M, 1987). En Suiza en el año 2000, se realizó un estudio para la detección de enteropatógenos en adultos con diarrea. Mostrando la presencia de un agente infeccioso en el 56% de los pacientes, donde se identifico a *E. coli* en el 10% de las muestras analizadas (Svenungsson B *et al*, 2000). Por otro lado, en el año 2002, se realizó un estudio para identificar el agente causal de un brote de diarrea en el municipio del Valle de Chalco, Estado de México. De las 1550 muestras tomadas con hisopos rectales, se encontró a *E. coli* con una incidencia del 76.6%; del total de las cepas de aisladas, 63.96% pertenecieron a los grupos patógenos de *E. coli* (Cortez-Ortíz *et al*, 2002).

Lo anterior establece la importancia de seguir estudiando las infecciones gastrointestinales así como sus agentes causales, ya que como se menciona, las infecciones intestinales en el mundo representan un grave problema de salud, principalmente en países subdesarrollados (Trung Vu Nguyen *et al*, 2005) las cuales son causadas principalmente por la ingesta de agua o comida contaminada con microorganismos patógenos o por la producción de sus toxinas (Parilla CMC *et al*, 1993), siendo la diarrea la principal consecuencia de estas infecciones (Guerrant RL *et al*, 1990).

Detección de los grupos patógenos de *Escherichia coli* por PCR multiplex.

De las 108 muestras de materia fecal analizadas, se encontró que el 22.2% de las muestras (n = 24) fueron positivas para algún patotipo de *E. coli* y el 77.8% (n = 84) fueron negativas (Gráfica 3). Dentro de las cuales, el grupo diarreogénico ETEC se identificó en el 54.1% (n = 13) (*estA* en el 16.6%, *eltB* en el 25% y *estA* + *eltB* en el 12.5%) de las heces de los pacientes enfermos (Cuadro 3, figura 1). El grupo patógeno EPEC se detectó en el 37.5% (n = 9) (*eaeA* en el 29.1% y *eaeA* + *bfpA* en el 8.3%) y el grupo EIEC en el 8.3% (n = 2) (*ial* en el 8.3%). La presencia de los grupos diarreogénicos de *E. coli*, ya ha sido detectada en otras partes del mundo (Black R, 1990; Cortez-Ortíz *et al*, 2002; González R *et al*, 1997; Okeke IN *et al*, 2000), donde se estima que *E. Coli* provoca anualmente alrededor de 630 millones de casos de diarrea, con aproximadamente 775, 000 muertes, afectando principalmente a la población infantil (World Health Organization, 1999).

En este trabajo se identificó a el grupo diarreogénico ETEC en el 54.16% (n = 13) del total de las muestras positivas (n = 24) (Cuadro 3). Nuestros datos coinciden con un estudio realizado en México (Cortez-Ortíz *et al*, 2002), a si como en otras partes del mundo (Qadri F *et al*, 2000), en donde se ha descrito que ETEC es el grupo diarreogénico aislado con mayor frecuencia, sobre todo en zonas con condiciones sanitarias precarias. ETEC es considerado un patógeno importante, sobre todo en niños menores de dos años, en donde la frecuencia de aislamiento de este grupo en muestras con diarrea es de 10 a 30% (Rodríguez AG, 2002). En México ya se ha aislado *E. coli* como agente etiológico de diarrea. En un trabajo realizado en una localidad rural en el estado de Morelos, entre 1982 y 1985, se identificó a ETEC como el principal agente productor de diarrea con un 33.5% (Cravioto A *et al*, 1985). En otro estudio realizado en Veracruz, en niños menores de 5 años con presencia de diarrea aguda, se encontró que del total de los 434 casos positivos para *E. coli*, el 55.4% de los grupos identificados correspondió a ETEC, siendo de esta manera el patotipo aislado con mayor frecuencia (Betancourt *et al*, 1999). A si mismo, en un estudio realizado en Chalco, México realizado en 1188 cepas de *E. coli* aisladas de corprocultivos, se detectó que el 66.2 % (n = 739) de las cepas correspondió a ETEC (Cortez-Ortíz *et al*, 2002).

En nuestro trabajo describimos que del total de los casos positivos para ETEC la presencia del gen *estA* (codifica la toxina termoestable) se identificó en el 16.7% de los casos, *eltB* (codifica la toxina termolábil) en el 25% y la presencia de ambos genes *estA* + *eltB*, en el 12.5% (Cuadro 3). Por lo que nuestros resultados concuerdan con

los obtenidos por Cortez-Ortíz y colaboradores en el 2002, quienes encontraron un total de 739 casos positivos para ETEC, de los cuales el 44.6% hibridó con la sonda para la enterotoxina LT (*eltB*), el 11.2% hibridó con la sonda para la enterotoxina ST (*estA*) y el 44.1% lo hizo con ambas sondas. De igual manera, Svenungsson y cols en el 2000, encontraron que del total de los 62 casos positivos para ETEC, el 20% (n = 12) fueron positivos para *estA*, 45% (n = 28) positivos para *eltB* y 35% (n = 22) para ambos genes.

ETEC es considerado por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como un grupo de atención especial, ya que asociada a rotavirus que ocasiona a nivel mundial el 80% de los casos de enfermedad diarreica aguda (Valdespino JL *et al*, 1994; Blanco J y Blanco M, 1993).

En cuanto a EPEC, en nuestro estudio la prevalencia de este grupo patógeno fue del 37.5% (n = 9) del total de las muestras positivas (n = 24) (Cuadro 3). Esta cepa de *E. coli*, es considerada como una de las principales causas de diarrea en niños menores de dos años, ocurriendo principalmente en países subdesarrollados (Donnenberg MS *et al*, 1997; Nataro JP and Kaper J, 1998), incluso en países del denominado primer mundo, ha ocasionado brotes de importancia (Baldwin, 1998). De tal manera, se ha reportado que en algunos países, sobre todo en aquellos en vía de desarrollo, los rangos de mortalidad en la población infantil van desde el 20 al 50%, lo que hace a la infección por EPEC una entidad clínica de inmediata respuesta. Además, en algunos países se tienen reportes que la infección por EPEC supera a la provocada por *Campylobacter* spp. y Rotavirus en los infantes (Nataro JP and Kaper J, 1998; Torres ME *et al*, 2001). Cravioto y cols reportaron, en un trabajo realizado en una localidad rural en el estado de Morelos, entre 1982 y 1985, a EPEC con un 8.1% siendo el segundo grupo patógeno de *E. coli* aislado con mayor frecuencia. A si mismo, Benitez y cols en 1991, en un estudio realizado en 75 niños en la ciudad de Cuernavaca, encontraron que la frecuencia de EPEC fue del 4%.

Nosotros describimos que del total de las muestras positivas para EPEC, el 29.1% presentó el gen *eaeA* (cepas atípicas) y el 8.3% ambos genes, *eaeA* + *bfpA* (cepas típicas). Se ha descrito que las cepas de EPEC atípicas parecen estar asociadas principalmente a causa de diarrea mixta, poniendo de manifiesto que aún no se puede definir si son responsables de casos de diarrea aguda (Trabulsi *et al*, 2002).

El grupo patógeno de EIEC fue identificado en el 8.3% (n = 2) del total de las muestras positivas (n = 24) (Cuadro 3). Se ha reportado en México como en otras partes del

mundo, que este grupo patógeno de *E. coli*, es frecuentemente identificado con bajos porcentajes. En el estudio hecho por Benítez y cols. (1991), en una comunidad rural del estado de Morelos, se aisló a EIEC en tan sólo el 4% (n = 3) del total de las muestras diarreicas analizadas (n = 75). A si mismo, Suárez y cols. (1993), realizaron un estudio en el estado de Yucatán, México, encontrando a EIEC en tan solo el 1% (n = 1) del total de las muestras diarreicas analizadas (n = 148). EIEC ha sido detectado en todo el mundo, por ejemplo, Kyung-Hee y cols. (1989) en un estudio realizado en 231 muestras diarreicas de niños coreanos, identificaron a EIEC en el 0.4% (n =1). En otro estudio realizado en Tailandia por Ratchtrachenchai y cols. (2004), encontraron a EIEC en tan solo el 0.5% (n = 12) del total de las muestras (n = 2629) diarreicas de los niños.

Parásitos identificados

De las 108 muestras de materia fecal analizadas, se encontró que el 99% (n = 107) resultó positiva para algún tipo de parásito (Gráfica 4). Donde el parásito identificado con mayor frecuencia fue *Entamoeba histolytica/Entamoeba dispar* con un 95.3% (n = 103), seguida de *Giardia lamblia* con un 37.9% (n = 41) (Gráfica 5). Estos porcentajes coinciden con lo reportado por Ávila-Rodríguez y cols en el 2007, quienes realizaron un estudio en el Centro de Investigación en Alimentos y Nutrición de la Facultad de Medicina-UJED en el estado de Durango, en el cual analizaron las muestras de materia fecal de 394 niños, detectando a *Entamoeba histolytica/ Entamoeba dispar* en el 79.7% y *Giardia lamblia* en el 20.3% de las muestras. A si mismo, en el estado de Puebla, la Secretaria de Salud del Departamento de Epidemiología reportó en el 2004, un total de 45, 236 casos de amibiasis intestinal, 1, 091 de giardiasis y 6, 500 casos de otras infecciones intestinales debidas a protozoarios (Salud Pública de México, 2005). Por lo que las infecciones por *E. histolytica* y *G. lamblia* siguen siendo un problema persistente, sobre todo en niños menores de edad. En otro estudio realizado por Sánchez-Vega y cols en el Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina en la UNAM, en el cual analizaron la materia fecal de 741 pacientes, identificaron a *G. lamblia* en el 29.9% y a *E. histolytica* en el 7.2%.

Los parásitos intestinales son los agentes infecciosos más comunes en los humanos, principalmente entre la población infantil de los países en vía de desarrollo. La Organización Mundial de la Salud a estimado que en el mundo existen 3,500 millones de habitantes parasitados y que aproximadamente 450 millones padecen una enfermedad parasitaria, principalmente en la población infantil (Ximénez C, 2002; World Health Organization, 1999). La frecuencia mundial de las distintas parasitosis

intestinales es alta especialmente en zonas geográficas donde las condiciones ecológicas favorecen la persistencia de los parásitos, además de las características socioeconómicas poblacionales como la pobreza, la ignorancia y la deficiente infraestructura; factores que comparten los países en vía de desarrollo y que, lamentablemente, en América Latina no han presentado modificaciones importantes en los últimos 50 años (Sánchez-Vega *et al*, 2000).

En México la parasitosis ha sido la quinta causa de consulta en el Instituto Mexicano del Seguro Social (Secretaría de Salud, 1989). Se ha descrito que las consultas médicas atendidas por el IMSS por problemas de parasitosis, es de alrededor de 27 millones visitas al año, con un promedio de tres visitas por paciente hasta la solución de su problema (Dirección General de Epidemiología, 1990).

En nuestro estudio describimos que de las 108 muestras analizadas, en el 95.37% (n = 103) fue identificada *Entamoeba histolytica/Entamoeba dispar* (Gráfica 5). La elevada prevalencia e incidencia en México de la amibiasis intestinal por *E. histolytica* la convirtió en el último siglo en uno de los principales problemas de salud pública. La infección se extiende de forma endémica en todo el país relacionada a deficiencias sanitarias (falta de drenaje, disposición, disposición de agua potable), a si como malos hábitos higiénicos (lavado de manos y fecalismo) (Secretaría de Salud, 1993). Se ha estimado que existen más 500 millones de personas infectadas en el mundo, de las cuales en su mayoría se observa principalmente en niños menores de diez años. Es importante señalar que los niños además del tiempo que pasan en su hogar, asisten a la escuela en donde se encuentran con otro tipo de fuentes de infección, tales como los baños que generalmente se encuentran sucios, alimentos que se preparan con una calidad deficiente de higiene y que se venden dentro y fuera de la escuela, y que posiblemente son el mayor medio de transmisión de este tipo de parasitosis (Sánchez *et al*, 1991).

Otro de los parásitos identificados en nuestro trabajo fue *Giardia lamblia* con un 37.9% (n = 41) (Gráfica 5) del total de las 108 muestras analizadas. Este organismo es cosmopolita y común, principalmente en los niños. El hombre se infecta por la ingesta de agua o alimentos contaminados con materia fecal en la cual este presente el quiste de este parásito, lo cual puede ocurrir en guarderías o escuelas (Sánchez *et al*, 1991). La giardiasis ocurre en todo el mundo y es frecuente en los niños, especialmente en sitios donde las condiciones sanitarias son deficientes. En algunos países desarrollados, la giardiasis es una de las infecciones parasitarias más frecuentes, lo cual puede deberse a que las personas que viajan a países en vía de desarrollo

ingieren agua o alimentos contaminados con este parásito (Sánchez-Vega *et al*, 2000) ya que es uno de los patógenos transmitidos por el agua (Roxstrom-Lindquist *et al*, 2006)

El estudio de las enfermedades parasitarias, toma por tanto especial interés por ser consideradas un problema de salud pública, dado que estos padecimientos, no solo son frecuentes como infección, ya que en ocasiones pueden complicarse llegando al punto de causar la muerte; ya que a veces este tipo de problemas van asociados a características socioeconómicas poblacionales como la pobreza, la ignorancia y la deficiente infraestructura (Sánchez-Vega *et al*, 2000).

Resistencia a antibióticos de las cepas patógenas de *E. coli* identificadas.

En este estudio se describió que el 65% de las cepas patógenas de *E. coli* identificadas por PCR multiplex fueron resistentes a Carbenicilina (CB), el 51% a Cefalotina (CF), el 48% resistentes a Ampicilina (AM), el 38% a Trimetoprim con sulfametoxazol (SXT), el 24% a Nitrofurantoina (NF), el 22% a Cefotaxima (CTX), el 17% a Cloranfenicol (CL), el 15% a Netilmicina (NET), el 14% a pefloxacina (PEF), el 6% a Amikacina (AK) y el 5% a Ceftriaxona (CRO) (Gráfica 6). La elevada frecuencia de resistencia a los antibióticos detectada por las cepas de *E. coli* en este trabajo, demuestra que en la actualidad es importante realizar estudios de susceptibilidad a los antimicrobianos en las bacterias aisladas de los procesos infecciosos, con la finalidad de prescribir el tratamiento médico más adecuado. La elevada resistencia a los antibióticos por *E. coli* ha sido detectada en otros estudios, por ejemplo Paniagua-Contreras y cols. (2006) realizaron un estudio en donde analizaron las infecciones de 174 pacientes que habían sido intervenidos quirúrgicamente, y encontraron que el 14.3% de las infecciones fueron ocasionadas por bacterias Gram negativas (*E. coli* = 13 y *Klebsiella ozaenae* = 7). Estos autores reportaron que el 100% de las cepas Gram negativas aisladas fueron resistentes a la cefalotina (CF) y ampicilina (AM). La elevada resistencia bacteriana a los antibióticos detectada en este trabajo, refleja que en la actualidad el uso indiscriminado de los antibióticos, ha ocasionado con el tiempo la selección de bacterias multiresistentes a los diferentes tipos agentes antimicrobianos.

CONCLUSIONES

- En este estudio detectamos que el 22.2% de las muestra analizadas por PCR multiplex fueron positivas para algún patotipo de *E. coli*.
- *Escherichia coli* enterotoxigénica (ETEC), *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC) y *Escherichia coli* enteroinvasiva (EIEC), respectivamente, se constituyeron como los principales patotipos de *E. coli* identificados en las muestras de materia fecal analizadas.
- En La mayoría de las muestras analizadas se identificó a *Entamoeba histolytica/Entamoeba dispar* como el parásito con mayor prevalencia, seguido de *Giardia lamblia* .
- La asociación de ETEC, EPEC y EIEC con *Entamoeba histolytica/Entamoeba dispar* y *Giardia lamblia*, demostró lo agudo de las infecciones intestinales.
- La elevada resistencia de las cepas patógenas de *E. coli* a los antibióticos evidencio la importancia de determinar la susceptibilidad a los antimicrobianos en las cepas patógenas.
- En este estudio la identificación de los distintos grupos diarreogénicos de *E. coli* mediante PCR multiplex, resultó ser un método eficaz, debido a su alta sensibilidad y especificidad en la identificación de microorganismos patógenos.

REFERENCIAS

1. Alper, J, 2003. Data Gaps Need Bridging To Assess Infectious Gastrointestinal Diseases. ASM News. 69:65-68.
2. Ávila-Rodríguez EH, Ávila-Rodríguez A, Araujo-Contreras JM, Villarreal-Martínez A, Douglas T, 2007. Factores asociados a parasitosis intestinal en niños de la consulta ambulatoria de un hospital asistencial. Rev Méx Pediatr. 74(1): 5-8.
3. Barreto Argilagos G., Sedrés Cabrera M., Ricardo Cuz M., Ortiz López A, 1999 .Categorías enteropatógenas de *Escherichia coli* en alimentos. Rev prod anim. Vol 12.
4. Baldwin T. J, 1998. The 18th. CL. Oakley Lecture. Pathogenicity of Enteropathogenic *E. coli*. J. Med Microbiol. 47 (4): 283-293.
5. Benitez O., Uribe F., Navarro A., Hernández D., Ruiz J y Cavrioto A, 1991. Etiología de diarrea con sangre en niños de una comunidad rural. Bol Med Hosp Infant Mex. 48(2): 65-70.
6. Betancourt SMJ, Pérez MB, 1999. Estudio de serotipos de *Escherichia coli* en niños veracruzanos con diarrea aguda. Acta Pediatr Mex. 20: 72-75.
7. Black R, 1990. Epidemiology of travellers diarrhoea and relative importance of various pathogens. Rev Infect Dis. 12(Suppl 1):S73-78.
8. Blanco J, Blanco M, 1993. ETEC, VTEC y NCEC de origen humano y bovino. Patogénesis, epidemiología y diagnóstico microbiológico. Servicio de publicaciones diputación provincial San Marcos. Lugo Galicia (Galicia) España, p. 35-48; 71-77.
9. Buysse DM, Stover CK, Oaks EV, Venkatesan M, Kopecko DJ, 1987. Molecular cloning of invasion plasmid antigen (ipa) genes from *Shigella*

flexneri: Analysis of ipa gene products and genetic mapping. J Bacteriol. 169: 2561-2569.

10. Cravioto A, Ortega R, Rodríguez P, Reyes R, López D, Fernández G, 1985. Estudio longitudinal de colonización intestinal en una cohorte de niños rurales mexicanos. Diseño del estudio y hallazgos iniciales durante el periodo neonatal. Bol Med Hosp Infant Mex. 42: 287-296.
11. Cortés-Ortiz IA, Rodríguez-Angeles G, Moreno-Escobar EA, Tenorio-Lara JM, Torres-Mazadiego BP, Montiel-Vázquez E, 2002. Brote causado por *Escherichia coli* en Chalco, México. Sal Púb Mex. 44: 297-302.
12. Dirección General de Epidemiología, 1990. Informe Semanal. p. 52.
13. Donnenberg MS, Koper JB, Finlay BB, 1997. Interactions between enteropathogenic *Escherichia coli* and host epithelial cells. Trends in Microbiol. 5: 109-114.
14. Eslava C, Villaseca JM, Cravioto A, 1993. Cepas de *Escherichia coli* relacionadas con la diarrea. En: Diagnóstico de laboratorio de infecciones gastrointestinales. Giono-Cerezo S, Escobar-Gutiérrez A, Valdespino Gómez JL, ed. México, D.F., Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos. 251-265.
15. Eslava C, Navarro F, Czeczulin JR, Henderson IR, Cravioto A, Nataro J, 1998. Pet an autotransporter enterotoxina from enteroaggregative *Escherichia coli*. Infect Immun. 66:3155-3163.
16. Estadísticas de mortalidad en México: muertes registradas en el año 2003. Sal Púb Méx. 2005. p. 47.
17. Fukushima H, Hoshina K, Gomyoda M, 2000. Selective isolation of eae-positive strains of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. J Clin Microbiol.;38:1684-1687.

18. Guerrant RL, Hughes JM, Lima NL, Crane J, 1990. Diarrhea in developed and developing countries; magnitude, special settings, and etiologies. *Rev Infect Dis.* 12 (suppl 1): S41-S50.
19. Girón JA, Sonnenberg MS, Martin WC, Jarvis KG, Kaper JB, 1993. Distribution of the bundle-forming pilus structural gene (bfpA) among enteropathogenic *Escherichia coli*. *J Infect Dis.* 168: 1037-1041.
20. González R, Díaz C, Marino M, Cloralt R, Pequenezze M, Pérez SI, 1997. Age-Specific Prevalence of *Escherichia coli* with localized and Aggregative Adherence in Venezuelan Infants with Acute Diarrhea. *J Clin Microbiol.* 35: 1103-1107.
21. Henry FJ, Udoy AS, Wanke CA, Aziz KM, 1996. Epidemiology of persistent diarrhea and etiologic agents in Mirzapur, Bangladesh. *Acta Paediatr.* 381 (Suppl):27-31.
22. International Comisión on Microbiological Specifications for Foods, 1980. *Microorganismos en los alimentos.* Zaragoza, España. ed. Acribia.
23. Kyung-Hee K, Inn-Soo S, Jung-Moog K, 1989. Etiology of childhood diarrhea in Korea. *J Clin Microbiol.* 27: 1192-1196.
24. Larracilla AJ, 2002. Hidratación oral. *Rev Med IMSS.* 40(6): 461-464.
25. Levine MM, Edelman R, 1984. Enteropathogenic *Escherichia coli* of classic serotypes associated with infant diarrhea: Epidemiology and pathogenesis. *Epidemiol Rev.* 6: 31-51.
26. Levine, M. M, 1987. *Escherichia coli* that cause diarrhea: enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic, and enteroadherent. *J Infect. Dis.* 155: 377–389.

27. Levine MM, Xu J, Kaper J, Lior H, Prado V, Tall B et al, 1987. A DNA probe to identify enterohemorrhagic *Escherichia coli* of O157:H7 and other serotypes that cause hemorrhagic colitis and hemolytic uremic syndrome. J Infect Dis. 156: 175-182.
28. Méndez-Álvarez S, 2004. La PCR múltiple en microbiología clínica. Enferm Infecc Microbiol. Clin. 22(3): 183-192.
29. Nataro JP, Kaper J, 1998. Diarrheagenic *Escherichia coli*. Clin Microbiol Rev. 11: 142-201.
30. Okeke IN, Lamikanra A, Steinru H, Kaper JB, 2000. Characterization of *Escherichia coli* Strains from Cases of Childhood Diarrhea in Provincial Southwestern Nigeria. J Clin Microbiol. 38: 7-12.
31. Paniagua-Contreras GL, Monroy-Pérez E, Alonso-Trujillo J, Vaca-Pacheco S, Negrete-Abascal E, Pineda-Olvera J, 2006. Prevalencia de infecciones en heridas quirúrgicas en pacientes dados de alta de un hospital general. Hosp Gen de Méx. 69: 78-83.
32. Parilla CMC, Castellanos JLV, Castañeda EOS and LN Fernández, 1993. Brotes de intoxicaciones alimentarias de origen microbiano y parasitario. Sal Púb Méx. 35: 456-463.
33. Quijano-Pitman F. Primicias médicas nacionales, 1995. La hidratación oral en las diarreas. Una prioridad mexicana. Gac Med Mex. 131: 584-585.
34. Ratchtrachenchai O, Subpasu S, Hayashi H, Ba-Thein W, 2004. Prevalence of childhood diarrhoea-associated *Escherichia coli* in Thailand. Journal of Medical Microbiology. 53: 327-243.
35. Rico-Martínez MG, 1995. Biología molecular en la patogenia de *Shigella* sp y *Escherichia coli* enteroinvasiva. Rev Lat Microbiol. 37: 367-385.

36. Riley LW, Remis RS, Helgerson SD, McGee HB, Willis JC and Davis BR. 1983. Hemorrhagic colitis a rare *Escherichia coli* serotype. N Engl J. 308: 681-685.
37. Rodríguez AG. 2002. Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. Sal Púb Méx. 44: 464-475.
38. Roxstrom-Lindquist K, Palm D, Reiner D, Ringqvist E, Svard SG. 2006. Giardia immunity an update. Trends Parasitol. 22(1): 26-31.
39. Sánchez B, Garrocho S y Martínez R. 1991. Parasitosis intestinales en escolares del área urbana de San Luis Potosí. Rev Mex Ped. 43-46.
40. Sánchez-Vega JT, Tay-Zavala J, Robert-Guerrero L, Romero-Cabello R, Ruiz-Sánchez D, Rivas-García C. 2000. Frecuencia de parásitos intestinales en asentamientos humanos irregulares. Rev Fac Med UNAM. 43(3): 80-83.
41. Salud Pública de México, 2005. Estadísticas de mortalidad en México. vol 47, No. 2.
42. Secretaría de Salubridad y Asistencia. Dirección General de Epidemiología. 1987. Boletín Mensual Epidemiológico. Información Estadística sobre Enfermedades Transmisibles. 2(6).
43. Secretaría de Salubridad y Asistencia. Dirección General de Epidemiología, 2005. Boletín Mensual Epidemiológico. Estadísticas de mortalidad en México en el año 2003. Sal Púb Mex. 47; 2.
44. Secretaría de Salud, Organización Panamericana de la Salud, Organización Mundial de la Salud, 1993. Diagnóstico sobre la protección de los alimentos en México. México, D.F; Secretaría de Salud. Subsecretaría de servicios de Salud. Dirección General de servicios de la Salud Pública. 1994. Curso para manejadores de alimentos. México.

45. Secretaria de Salud. Anuario Estadístico 1989. México, D.F: SSA, 1989.
46. Suárez G, Flores JJ, Heredia MR, Puc MA y Franco J, 1993. Prevalencia de bacterias enteropatógenas en niños con diarrea aguda con sangre. *Bil Med Hosp Infant Méx.* 50(3): 151-155.
47. Svenungsson B, Lagergren Sa, Ekwall E, Evenga B, Olof HK, Karnell A, Lofdahl S, Svesson L, Weintraub A, 2000. Enteropathogens in Adult Patients with Diarrhea and Healthy Control Subjects: A 1-Year Prospective Study in a Swedish Clinic for Infectious Diseases. *Clin Infect Dis.* 2000: 30: 770-778.
48. Thompson B: M. 2001. Utilización de *Escherichia coli* y *Escherichia coli* Enterotoxigénica (ETEC) como indicadores de contaminación fecal y de un patógeno humano respectivamente en alimentos de venta callejera. Tesis de Licenciatura. FES Iztacala. UNAM.
49. Torres ME, Pirez MC, Schelotto F, Varela G, Parodi V, Allende F, Falconi E, Dell'Acqua L, Gaione P, Mendez MV, Ferrari AM, Montano A, Zanetta E, Acuna AM, Chipalleri H and Ingold E, 2001. Etiology of children's diarrhea in Montevideo, *Microbiol.* 39: 2134-9.
50. Trabulsi RL, Keller R y Tardelli Gómez TA, 2002. Typical and atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. *Emerg Infect Dis.* 8: 508-513.
51. Trung Vu Nguyen, Phung Le Van, Chinh Le Huy, Khanh Nguyen Gia, and Andrej Weintraub, 2005. Detection and Characterization of Diarrheagenic *Escherichia coli* from Young Children in Hanoi, Vietnam. *J Clin Microbiol.* 42:755-760.
52. Valdespino JL, García ML, Del Río A, 1994. Epidemiología y Etiología de las diarreas infecciosas. El caso de México. *Rev Lat-amer Microbiol.* 36(4): 307-324.

53. Villaseca JM, Navarro F, Mendoza G, Nataro J, Cravioto A, Eslava C, 2000. Pet toxin from enteroaggregative *Escherichia coli* produces cellular damage associated with fodrin disruption. *Infect Immun*. 10: 5920-5927.
54. World Health Organization, 1999-98. The World health Report Making a Difference, Geneva,.
55. Ximénez C, 2002. Las parasitosis intestinales en México. México: Fundación Mexicana para la Salud, AC. p. 13-34.