



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

TESIS

Determinación de la presencia de anticuerpos específicos y evaluación de su efecto bactericida contra *Salmonella enterica* serotipo Typhimurium, *Escherichia coli* enteropatógena atípica y *Escherichia coli* enteroagregativa en individuos pertenecientes a una zona endémica de Yucatán.

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA

BERENICE JOCELYN HERNÁNDEZ ARREGUÍN



CIUDAD UNIVERSITARIA. CDMX. 2018



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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: PATRICIA ELVIRA BERRÓN RUIZ
VOCAL: LUCIANO HERNÁNDEZ GÓMEZ
SECRETARIO: MARÍA TERESA ESTRADA GARCÍA
1er. SUPLENTE: OCTAVIO CASTRO ESCAMILLA
2° SUPLENTE: TANYA PLETT TORRES

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

LABORATORIO DE EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR, DEL DEPARTAMENTO DE BIOMEDICINA MOLECULAR DEL CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL (CINVESTAV – IPN)

ASESOR DEL TEMA:

MARÍA TERESA ESTRADA GARCÍA

SUPERVISOR TÉCNICO:

CATALINA LÓPEZ SAUCEDO

SUSTENTANTE:

BERENICE JOCELYN HERNÁNDEZ ARREGUÍN

RESUMEN

La OMS reporta que en el mundo, las enfermedades diarreicas se ubican entre las diez principales causas de defunción en niños menores de cinco años siendo más prevalente en niños de regiones con bajos recursos económicos. Los factores asociados a la diarrea dependen de la edad, del nivel socioeconómico, de la zona geográfica, de la estacionalidad, de los hábitos de higiene, del uso de antibióticos y del estatus inmunológico de los sujetos. Existen estudios epidemiológicos que demuestran que *Salmonella*, *Escherichia coli* enteropatógena atípica (EPECa) y *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC), son los principales agentes etiológicos bacterianos asociados a diarrea en el estado de Yucatán (localizado en el sureste de la República Mexicana), en donde las infecciones intestinales son la segunda causa de morbilidad en niños menores de cinco años. Debido al riesgo que estos microorganismos representan para la población, es importante determinar si los sujetos en zonas endémicas producen anticuerpos contra estos microorganismos y si estos anticuerpos pudieran ser protectores.

Considerando lo anterior, el objetivo de este proyecto fue determinar los títulos y el efecto bactericida de los anticuerpos específicos IgM e IgG contra *S. Typhimurium*, EPECa y EAEC en el suero de diez individuos pertenecientes a la comunidad de Bucztotz (ubicada a 89km de la ciudad de Mérida, Yucatán), que no habían presentado diarrea al menos en las últimas dos semanas. Los anticuerpos específicos se determinaron por ensayos de ELISA y la capacidad protectora de estos anticuerpos se determinó con el ensayo de actividad bactericida del suero dependiente de anticuerpos mediada por complemento.

Los sueros evaluados presentaron títulos de anticuerpos específicos IgM e IgG contra *S. Typhimurium*, EAEC y EPECa; estos anticuerpos presentaron actividad bactericida dependiente de complemento. Lo cual había sido demostrado con anterioridad para *S. Typhimurium* pero no para EAEC y EPECa. Estos resultados indican que los sujetos pertenecientes a la comunidad de Bucztotz, están permanentemente expuestos a estas bacterias; lo que pudiera estar induciendo un estado de protección contra estas tres bacterias.

INDICE

INTRODUCCIÓN	1
1. Enfermedades diarreicas	1
1.1 Agentes etiológicos causantes de diarrea en México	2
2. <i>Escherichia coli</i> (<i>E. coli</i>)	2
2.1. Características generales de <i>E. coli</i>	2
2.2. Mecanismos de patogenicidad de <i>E. coli</i>	4
3. <i>Escherichia coli</i> enteropatógena (EPEC)	5
3.1. Características generales de EPEC	5
3.2 Patogénesis molecular de EPEC	6
4. <i>Escherichia coli</i> enteroagregativa (EAEC)	9
4.1 Características generales de EAEC	9
4.2 Patogénesis molecular de EAEC	9
5. <i>Salmonella</i>	12
5.1. Características generales	12
6. <i>Salmonella enterica</i> serotipo Typhimurium (<i>S. Typhimurium</i>)	14
6.1. Factores de virulencia de <i>S. Typhimurium</i>	15
6.2. Mecanismo de patogenicidad	16
7. Epidemiología de la diarrea en México	17
7.1. Epidemiología de la diarrea en el Estado de Yucatán, México	19
8. Importancia de los estudios de seroprevalencia	22
8.1. Seroprevalencia de los grupos diarreogénicos de <i>E. coli</i>	22
8.2. Seroprevalencia de <i>Salmonella</i>	24
9. Anticuerpos protectores	25
JUSTIFICACIÓN	28
HIPÓTESIS	28
OBJETIVO GENERAL	28
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	28
MATERIAL Y MÉTODOS	29
1. Material biológico	29
1.1. Cuadros clínicos de los tres pacientes de donde se obtuvo el aislado de <i>S. Typhimurium</i> , EPECa y EAEC.	29
1.2. Obtención de muestras de suero humano	29

2. Desarrollo experimental	30
2.1. Cinéticas de crecimiento de cada cepa bacteriana	30
3. Producción de anticuerpos de conejo anti-eritrocitos de carnero (hemolisina) para utilizarlos en la valoración de la actividad hemolítica del complemento	31
3.1. Obtención de hemolisina	31
3.1.1. Inmunización de conejo por vía intravenosa	31
3.1.2. Sangrado de corazón	32
3.2. Obtención de suero de cobayo para su empleo como fuente exógena de complemento	32
3.2.1. Sangrado de corazón	32
3.3. Titulación de la hemolisina con el suero de cobayo	33
4. Determinación por ELISA de la presencia de inmunoglobulinas IgG e IgM específicas en sueros humanos de <i>S. Typhimurium</i> , EPECa y EAEC	34
4.1. Curva de calibración	34
4.2. Determinación de la presencia de inmunoglobulinas IgG e IgM específicas contra <i>S. Typhimurium</i> , EPECa y EAEC en sueros humanos	36
5. Ensayo bactericida de los sueros humanos contra <i>S. Typhimurium</i> , EPECa y EAEC	37
RESULTADOS	38
1. Determinación del punto medio de la fase logarítmica en las cinéticas de crecimiento de cada una de las cepas bacterianas	39
2. Titulación de la hemolisina con suero de cobayo	44
3. Títulos de inmunoglobulinas IgM e IgG específicas contra <i>S. Typhimurium</i> , EPECa y EAEC en sueros humanos y su actividad bactericida	45
3.1 Títulos de inmunoglobulinas IgM e IgG específicas contra <i>S. Typhimurium</i>	46
3. 2 Títulos de inmunoglobulinas IgM e IgG específicas contra EPECa	48
3. 3 Títulos de inmunoglobulinas IgM e IgG específicas contra EAEC	50
DISCUSIÓN	53
CONCLUSIONES	62
REFERENCIAS	63

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Patogénesis molecular de EPEC	8
Figura 2. Clasificación del género <i>Salmonella</i>	13
Figura 3. Sensibilización de placa de ELISA para la curva de calibración	34
Figura 4. Diagrama de la metodología de la producción de anticuerpos de conejo anti-eritrocitos de carnero (hemolisina).	32
Figura 5. Diagrama de la metodología de la Titulación de la hemolisina con el suero de cobayo	34
Figura 6. Diagrama de la metodología de la técnica ELISA para determinar la presencia de inmunoglobulinas IgG e IgM específicas contra <i>S. Typhimurium</i> MDR, EPECa y EAEC en sueros humanos	37
Figura 7. Determinación de la presencia de inmunoglobulinas IgG e IgM específicas contra las bacterias evaluadas	39
Figura 8. Resultados obtenidos en la titulación de hemolisina con suero de cobayo	49

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Epidemiología de los agentes etiológicos causantes de diarrea en México	21
Tabla 2. Epidemiología de los grupos de <i>E. coli</i> causantes de diarrea en México	21
Tabla 3. Protocolo de inmunización del conejo con eritrocitos de carnero	32
Tabla 4. Cinéticas de crecimiento de <i>S. Typhimurium</i>	39
Tabla 5. Cinéticas de crecimiento de EPECa YUHE 08-273B	41
Tabla 6. Cinéticas de crecimiento de EAEC YUHE 08-246A	42
Tabla 7. Diluciones de hemolisina evaluadas en la titulación con suero de cobayo	44
Tabla 8. Títulos de inmunoglobulinas IgM e IgG específicas y bactericidas contra <i>S. Typhimurium</i>	46
Tabla 9. Títulos de inmunoglobulinas IgM e IgG específicas y bactericidas contra EPECa	48
Tabla 10. Títulos de inmunoglobulinas IgM e IgG específicas y bactericidas contra EAEC	50
Tabla 11. Resumen de los títulos de inmunoglobulinas IgM e IgG específicas y bactericidas contra <i>S. Typhimurium</i> , EPECa y EAEC.	53

INDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Cinéticas de crecimiento de <i>S. Typhimurium</i> realizadas por duplicado	40
Gráfico 2. Promedio de las tres cinéticas de crecimiento <i>S. Typhimurium</i> realizadas por duplicado	40

Gráfico 3. Cinéticas de crecimiento de EPECa YUHE 08-273B realizadas por duplicado	41
Gráfico 4. Promedio de las tres cinéticas de crecimiento EPECa YUHE 08-273B realizadas por duplicado	42
Gráfico 5. Cinéticas de crecimiento de EAEC YUHE 08-246A realizadas por duplicado	43
Gráfico 6. Promedio de las tres cinéticas de crecimiento EAEC YUHE 08-246A realizadas por duplicado	
Gráfico 7. Anticuerpos específicos anti-S. Typhimurium	
Gráfico 8. Títulos de anticuerpos específicos y bactericidas anti-S. Typhimurium de cada individuo.	47
Gráfico 9. Anticuerpos específicos anti- EPECa	48
Gráfico 10. Títulos de anticuerpos específicos y bactericidas anti-EPECa de cada individuo.	49
Gráfico 11. Anticuerpos inespecíficos anti- EAEC	50
Gráfico 12. Títulos de anticuerpos específicos y bactericidas anti-EAEC de cada individuo.	51
Gráfico 13. Títulos de anticuerpos bactericidas contra S. Typhimurium MDR, EPECa YUHE 08273-B y EAEC YUHE 08-246A de cada individuo.	52

INTRODUCCIÓN

1. Enfermedades diarreicas

Las enfermedades diarreicas representan un problema de salud pública a nivel mundial. La Organización Mundial de la Salud (OMS) reporta que en todo el mundo ocurren alrededor de 1,700 millones de casos de enfermedades diarreicas cada año, además son la segunda causa de muerte de niños menores de cinco años, siendo más prevalente en niños de regiones con bajos recursos económicos. La OMS reporta 760 000 millones de muertes infantiles cada año (OMS-WHO 2013).

En México, en el Anexo Estadístico del Quinto Informe de Gobierno 2016-2017 se reportó que la tasa de mortalidad por enfermedades diarreicas en niños menores de 5 años fue de 7.2 por cada 100 mil niños, lo cual implica un descenso considerable en los últimos años. Sin embargo, es importante mencionar que, a pesar de la disminución en la tasa de mortalidad por diarrea, no se ha reflejado una disminución en la tasa de morbilidad. Esto puede deberse a que no se han mejorado las condiciones de vida de la población de bajos recursos económicos, ya que se sabe que en esta población, el número de episodios diarreicos en los infantes es mayor que en la población con un nivel mayor de ingresos económicos (Kosek y Guerrant, 2003). Es por esto que la reducción de las tasas de mortalidad y morbilidad de las enfermedades diarreicas continúa siendo un reto para la salud pública (Navarro y Estrada-García, 2010).

Muchos de los factores de riesgo que contribuyen para contraer una enfermedad diarreica están asociados con condiciones socioeconómicas bajas, las cuales se relacionan con un difícil acceso de agua potable para consumo humano, así como a malos hábitos de higiene y malas prácticas en la preparación de los alimentos (Ahs *et al.*, 2010); además de estar asociados otros factores como la zona geográfica, la estacionalidad, el uso de antibióticos y el estatus inmunológico de los sujetos (Monkemuller, 2001).

La diarrea se define como un desorden intestinal caracterizado por un incremento anormal en el líquido de las heces y en la frecuencia de las evacuaciones, lo cual es generalmente el resultado de la movilidad intestinal. Dichas evacuaciones pueden estar acompañadas de otros trastornos como cólicos, fiebre y vómito, cuya duración es usualmente de uno a dos días, además de que ceden normalmente sin ningún tratamiento con antibióticos. Sin embargo, la diarrea puede causar deshidratación, lo que significa que el cuerpo pierde suficiente cantidad de líquidos (agua y electrolitos), que son necesarios para el adecuado funcionamiento de las células. Si se pierde más del 10% del fluido corporal puede ocurrir la muerte (Giono *et al.*, 1994).

1.1. Agentes etiológicos causantes de diarrea en México

Diferentes estudios epidemiológicos, en los que se realizó la búsqueda de agentes etiológicos causantes de diarrea en México, han mostrado la participación principalmente de virus (*Rotavirus*, *Adenovirus*, *Astrovirus*), parásitos (*Cryptosporidium sp.*, *Giardia sp.*) y bacterias (*Salmonella sp.*, *Shigella sp.*, *Campylobacter sp.*, *Vibrio cholerae*, *Aeromonas sp.*, y los grupos de *Escherichia coli* diarreogénicos (GED)) (Cravioto *et al.*, 1987; Sepúlveda *et al.*, 1990; Flores *et al.*, 1993; Velázquez, 2001; Cerna, 2003).

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

2.1. Características generales de *E. coli*

El bacteriólogo alemán Theodore Escherich en 1885, fue el primero en aislar y describir 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 (Cerna, 2003). En 1894 se demostró su presencia en orina de jóvenes con infecciones del tracto urinario, postulándolo como un agente oportunista. Y posteriormente en 1895, el nombre de *Bacterium coli commune* cambio por *Escherichia coli* (*E. coli*) en honor a Theodore Escherich

(Quiroz, 1992). Durante muchos años se consideró a *E. coli* como un microorganismo comensal del intestino grueso de humanos y animales, hasta que Massini, 1907; Dulaney y Michelson, en 1935 mostraron que podía ser la causa de diarrea en neonatos (Frenk *et al.*, 2002).

E. coli pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*, filum proteobacteria; 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 (Cerna, 2003; Toro, 2004). *E. coli* crece a temperaturas desde 2.5 a 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 a 9.0; esta bacteria crece en medios de cultivos simples, donde utiliza glicerol o glucosa como única fuente de carbono y energía. Sobre medios sólidos las colonias son circulares y lisas, con bordes bien definidos (Rodríguez, 1994; Cerna 2003; Sussman, 1985).

E. coli es el principal anaerobio facultativo de la flora microbiana que reside en el colon humano, coloniza el intestino del individuo pocas horas después del nacimiento, estableciendo una relación simbiótica con el hospedero durante toda la vida. Esta asociación conlleva a un beneficio mutuo; destacando el papel importante de esta bacteria que es mantener la homeóstasis del organismo (Nataro *et al.* 1998).

E. coli posee una estructura antigénica compleja, esto ha permitido utilizar diferentes antígenos para su tipificación (Orskov *et al.* 1984). Para determinar el grupo patógeno al que pertenecen las cepas de *E. coli*, Kauffman en 1940 desarrolló un esquema de serotipificación que es continuamente actualizado y que consta de 176 antígenos somáticos (O), 112 flagelares (H) y por lo menos 80 antígenos capsulares (K) (Rodríguez, 2002). Por medio de este procedimiento ha sido posible establecer algunos serotipos asociados con la enfermedad diarreica (Orskov *et al.* 1984). 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 los cuadros clínicos en particular (Rodríguez, 2002), sin embargo en muchos de los casos no hay correlación.

A pesar de que *E. coli* es una bacteria comensal del colon humano, modificaciones genotípicas de ésta, a través de mecanismos de transferencia horizontal (conjugación, transducción y transformación) pueden hacer que esta bacteria adquieran factores de virulencia, expresando finalmente un fenotipo patógeno (Patzl, 2009).

2.2. Mecanismos de patogenicidad de *E. coli*

Las cepas de *E. coli* puede causar diarrea mediante los siguientes cuatro mecanismos de patogenicidad:

- 1) Propiedades de virulencia que están codificadas en plásmidos y en cromosoma.
- 2) Las adhesinas permiten que la bacteria pueda adherirse y colonizar el epitelio de ciertas áreas del intestino.
- 3) Producción de toxinas que son liberadas una vez que la bacteria ha colonizado el intestino, dependiendo de sus características pueden tener un efecto en la estimulación de secreción de agua y electrolitos (enterotoxinas) y/o la destrucción celular (citotoxinas).
- 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.

Las infecciones por *E. coli* pueden estar limitadas a la superficie de las mucosa intestinal o pueden presentarse en varios órganos o tejidos (Cerna, 2003; Ibarra, 1994)

Los grupos de *Escherichia coli* diarreogénicas se encuentran entre los principales agentes etiológicos bacterianos causantes de diarrea; pueden causar diarrea leve a severa y otros síntomas en los seres humanos. Estas cepas constituyen un grupo heterogéneo de organismos con diferentes propiedades de virulencia, epidemiología y asociación con la enfermedad. Basado en sus factores de virulencia específicos y rasgos fenotípicos, las cepas de *E. coli* diarreogénicas se dividen en seis grupos: *E. coli* enteropatógena (EPEC), *E. coli* enteroagregativa

(EAEC), *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* enterodifusa o de adherencia difusa (DAEC), *E. coli* enteroinvasora (EIEC) y *E. coli* productora de toxina shiga (STEC), que incluye el subgrupo conocido como *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) (Kaper *et al.*, 2004).

3. *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC)

3.1. Características generales de EPEC

A principios de la década de 1940 Varela y colaboradores, encontraron un grupo de *E. coli* asociado con diarrea infantil severa; más tarde en esa misma década Bray y colaboradores, en Inglaterra también describen un grupo de *E. coli* asociado a diarrea infantil (Moon, 1983). En 1956 estos organismos se denominaron *E. coli* "enteropatógenas" (EPEC).

Actualmente EPEC se define como aquellas cepas de *E. coli* que producen diarrea, no producen las toxinas parecidas a toxina shiga (Stx1, Stx2), no son invasivas y producen lesiones histopatológicas de adherencia y esfacelamiento (A/E) (Trabulsi *et al.*, 2002), que es el fenotipo característico de estos organismos, donde las bacterias se adhieren firmemente al epitelio intestinal, lo que resulta en la pérdida de las microvellosidades adyacentes (Moon *et al.*, 1983).

Varios años después se demostró que la formación de estas lesiones A/E eran producto de la unión íntima entre la bacteria y el enterocito debida a la interacción de la proteína llamada intimina en la superficie bacteriana con su receptor Tir ("*Translocated intimin receptor*") el cual es translocado por la misma EPEC hacia el enterocito a través de un sistema de secreción tipo 3 (SST3) (Kenny *et al.*, 1997).

La lesión se lleva a cabo mediante un mecanismo de virulencia complejo, que induce la movilización del citoesqueleto alterando la morfología normal de las microvellosidades y de la región apical del enterocito; esta alteración morfológica es debida a la acumulación de filamentos de actina polimerizada bajo el sitio de adherencia de la bacteria que conlleva a la formación de una estructura en forma

de pedestal sobre la cual se posa la bacteria (Nataro, 1998; Celli *et al.*, 2000; Goosney *et al.*, 2000).

EPEC se ha dividido en dos subtipos con base en la presencia o ausencia de un factor de virulencia (Nisa, 2013). Las cepas que contienen el plásmido EAF (“*EPEC adherence factor*”) de 69 kb dentro del cual se encuentran los 14 genes involucrados en la producción de una fimbria tipo IV denominada BFP (“*Bundle-forming pili*”) son nombradas cepas típicas de EPEC (EPECt), mientras que las cepas que carecen de EAF se denominan cepas atípicas de EPEC (EPECa) (Trabulsi *et al.*, 2002).

Hasta la década de 1990, las cepas de EPECt fueron aisladas más frecuentemente que las cepas de EPECa, pero estudios realizados en la última década han indicado que la prevalencia de las cepas de EPECt ha disminuido y que están siendo reemplazadas gradualmente por las EPECa (Trabulsi *et al.*, 2002). Estrada-García y colaboradores en 2009 reportaron que la prevalencia de cepas de EPEC atípica y las típicas aisladas de casos de diarrea en niños de México fue de 44.5% y 10%, respectivamente (Estrada-García *et al.*, 2009). Del mismo modo, los estudios en Perú (Contreras *et al.*, 2010), Brasil (Nunes *et al.*, 2012), Japón (Yatsuyanagi *et al.*, 2003) y Australia (Nguyen *et al.*, 2006) han informado un aumento de los casos de diarrea debido a EPECa. Lo que sugiere que EPECa es un patógeno diarreogénico emergente, no sólo en los países en desarrollo, sino también en los países industrializados (Canizalez *et al.*, 2013).

3.2. Patogénesis molecular de EPEC

El modelo de patogénesis de EPEC se divide en tres fases: adherencia inicial, translocación de factores y transducción de señales; y por último el contacto íntimo y formación del pedestal (Vidal *et al.*, 2007) (Figura 1).

a) Adherencia inicial

La adherencia es un proceso fundamental en la patogénesis y de ella pueden distinguirse dos fases; la primera implica la adherencia inicial entre las mismas

bacterias en donde participa la fimbria BFP, a este fenotipo se le conoce como autoagregación; y la segunda involucra la adherencia de las bacterias a la célula del hospedero (Nataro, 1985).

b) Translocación de factores y transducción de señales

Luego del contacto inicial, la bacteria transloca a la célula una serie de proteínas “efectoras” mediante el SST3. La mayor parte de estas proteínas están codificadas en el cromosoma de EPEC, dentro de una isla de patogenicidad de 35 kb denominada LEE (“*Locus of Enterocyte Effacement*”) (McDaniel *et al.*, 1995) la cual se encuentra organizada en cinco operones policistrónicos (LEE1 a LEE5)

a) los operones LEE1, LEE2 y LEE3 codifican los genes de las proteínas del SST3, las cuales forman un complejo de aguja (CA) o inyectisoma (estructura cilíndrica hueca);

b) en el operón LEE4 se encuentran los genes de las proteínas que se secretan a través del SST3 las cuales se conocen de forma colectiva con el nombre de Esp (proteínas secretadas por EPEC de la familia SPATE (“*Serine protease autotransporters of the Enterobacteriaceae*”));

c) en el operón LEE5 contiene los genes *eae* y *tir* que codifican para una proteína llamada intimina y su receptor, llamado Tir (“*Translocated intimin receptor*”) respectivamente, porque es translocada por la misma bacteria a través del SST3 hacia el interior de la célula del hospedero (Celli *et al.*, 2000; Vinney *et al.*, 1999).

c) Contacto íntimo y formación de pedestales

La última etapa de la infección por EPEC se caracteriza por la unión estrecha entre la bacteria y la célula del hospedero, así como la formación de los pedestales de actina (Vidal *et al.*, 2007). La adherencia íntima entre la bacteria y el enterocito es consecuencia de la interacción de la proteína de membrana externa intimina con su receptor Tir (Kenny *et al.*, 1997). Después de que Tir es translocado a la célula hospedera mediante una chaperona específica llamada CesT, se inserta en la membrana plasmática del eritrocito en donde adopta una

topología de asa en la que los extremos amino y carboxilo se mantienen citosólicos (Campellone, 2003), mientras que su región central permanece extracelular y actúa como un receptor para la intimina (Kenny et al., 1997; Croxen 2013). Tir es fosforilado para después interactuar con la proteína adaptadora Nck, que a su vez recluta y activa a N-WASP (*Neural-Wiskott-Aldrich syndrome protein*) y al complejo Arp 2/3 (*Actin-related protein 2/3*). El reclutamiento de este complejo resulta en la nucleación de filamentos de actina debajo del lugar de adhesión de la bacteria y la formación de una estructura en forma de pedestal característica de la infección por EPEC, debida a la reorganización del citoesqueleto y la alteración de la morfología de la región apical de las células, lo que conlleva finalmente a la pérdida de las microvellosidades intestinales. Los pedestales se componen sobre todo de actina polimerizada y otras proteínas relacionadas con actina, como actinina α , fibrina, miosina, talina y ezrina (Finlay et al., 1992; Goosney et al., 2000)

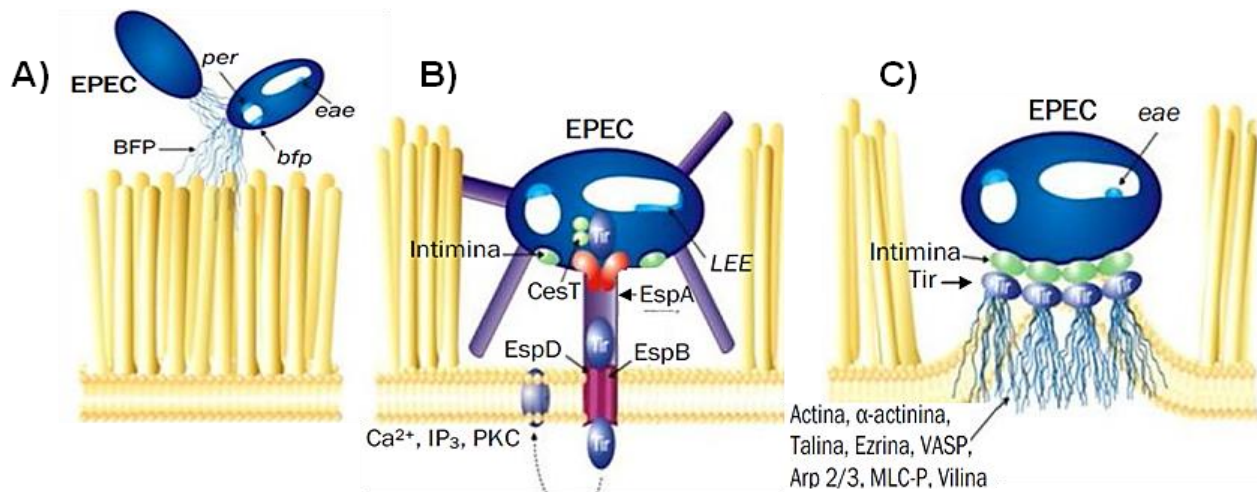


Figura 1. Patogénesis molecular de EPEC.

A) Adherencia inicial. Representación del BFP de EPEC mediante la adhesión inicial entre las bacterias y entre la bacteria y el hospedero. **B) Translocación de factores y transducción de señales.** Representación de EPEC expresando el SST3, mediante el cual transloca proteínas efectoras hacia el citoplasma del hospedero, entre éstas se encuentra Tir que se inserta en la membrana. **C) Adherencia íntima.** Esquema de la adhesión íntima entre EPEC y el enterocito, la actina se polimeriza debajo del sitio de adhesión de la bacteria, originando una estructura en forma de pedestal. Tomada y modificada de <http://www.fernness.com/science-15.htm>

4. *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC)

4.1. Características generales de EAEC

EAEC fue descrita por primera vez por Nataro, J.P., en 1983, cuando era estudiante en el laboratorio del Dr. James Kaper. En sus estudios de adhesión de *E. coli* a células Hep-2 (carcinoma epidermoide de laringe humano) observó tres patrones distintos de adhesión que describió como patrones de adherencia difusa, localizada y agregativa. Sin embargo, la primera asociación de EAEC con la enfermedad diarreica fue publicada en 1987, como parte de un estudio prospectivo de diarrea pediátrica en Chile (Nataro *et al.*, 1987).

Poco después de su primera descripción, la infección con EAEC se asoció con diarrea persistente en los niños de la India (Bhan *et al.*, 1989), y más tarde se demostró que la infección con EAEC en niños con diarrea y en niños sin síntomas, tiene un efecto importante sobre niños desnutridos (Guerrant *et al.*, 2008). Además EAEC es capaz de causar diarrea en adultos; es el segundo patógeno causante de diarrea del viajero superada sólo por ETEC (Shah *et al.*, 2009) y ha sido implicado como agente etiológico causal de diarrea persistente (mayor a 14 días de duración) tanto en niños en países en vías de desarrollo como en países industrializados (Sheikh *et al.*, 2002).

EAEC se define como una *E. coli* que no secreta toxina termoestable (ST) o toxina termolábil (LT), toxinas que caracterizan a *Escherichia coli* enterotoxigénica (ETEC) y que se caracteriza por presentar un patrón de adherencia particular, conocido como adherencia autoagregativa (AA) o en forma de ladrillos apilados (“*stacked bricks*”) en cultivos de HEp2. (Boisen *et al.*, 2013).

4.2. Patogénesis molecular de EAEC

La capacidad de adherencia, que contribuye a la colonización así como la producción de toxinas son propiedades que se consideran como los principales mecanismos de patogenicidad de la bacteria, se tienen reportados tres eventos básicos en la patogénesis de EAEC.

a) Adherencia inicial a la mucosa

Involucra la adherencia inicial de la bacteria a la mucosa intestinal y/o a la capa de moco. El fenotipo de AA de las cepas de EAEC está asociado con la presencia de un plásmido pAA de 60-65 MDa, el cual codifica para fimbrias de 2-3 nm de diámetro, designadas fimbria de adherencia agregativa I (AFF/I), II (AFF/II) y III (AFF/III) (Girón *et al.*, 1993).

- AAF/I (Fimbria de Adherencia Agregativa I). Codificada por el gen *aggA* esta fimbria media la adherencia de las cepas de EAEC a las células HEp-2 y al enterocito provocando un daño en el epitelio de la mucosa, manifestado por la exfoliación de las células epiteliales (Nataro, 1998; Cerna, 2003).
- AAF/II (Fimbria de Adherencia Agregativa II). Codificada por el gen *aafA* y le permite a la bacteria unirse a la mucosa intestinal (adherencia agregativa) (Nataro *et al.*, 1998; Navarro-García *et al.*, 1998).
- AAF/III (Fimbria de Adherencia Agregativa III). Codificada por el gen *agg-3*, y actúa como una adhesina (Guadarrama, 2010).

AggR es un activador transcripcional, que regula la expresión de las fimbrias de adherencia agregativa, además de la expresión de la dispersina, la cual es una proteína exportada por un transportador ABC (“*ATP Binding Cassete*”), codificada por el gen *aap* y responsable de la dispersión de las bacterias por la mucosa del intestino permitiéndole una adherencia y agregación eficientes (Sheikh *et al.*, 2002).

b) Formación de una biopelícula bacteria-moco en la superficie del intestino.

Después de la adhesión, multiplicación y colonización de la superficie intestinal, las EAEC característicamente aumenta la secreción de moco por la mucosa intestinal, la bacteria se incrusta en el depósito de una capa gruesa de moco, formando una biopelícula. La colonización de EAEC podría aumentar por la interacción entre el moco y el patrón hidrofóbico de la fimbria de adherencia agregativa y por la elaboración de toxinas que puedan aumentar la producción de moco (Nataro *et al.*, 1994; Nataro *et al.*, 1998).

c) Producción de toxinas y/o proceso inflamatorio

Además de la formación de la biocapa de moco característico, muchas cepas de EAEC inducen efectos citotóxicos a la mucosa intestinal. La producción de enterotoxinas y citotoxinas, está relacionada con genes presentes en el cromosoma y en plásmidos de la bacteria. Varios estudios han demostrado la participación de diferentes toxinas, entre ellas: EAST1, Pet, Pic y ShET1 (Nataro *et al.*, 1998; Eslava *et al.*, 1998).

El plásmido llamado pAA, contiene los genes que codifican para la enterotoxina termoestable EAST-1 y para Pet la cual es integrante del grupo SPATE (Eslava *et al.*, 1998).

- EAST-1 (“*enteroaggregative heat-stable enterotoxin 1*”), es un péptido de 38 aminoácidos (4.1 kDa) codificada por el gen *astA* en el plásmido pAA, produce un incremento en la secreción de iones en segmentos intestinales montados en cámara de Ussing (Navarro-García *et al.*, 1998).
- Pet (“*plasmid-encoded toxin*”) es una proteína de alto peso molecular (104 kDa) codificada por el gen *pet* en el plásmido pAA. La proteína Pet purificada, tiene efecto citotóxico sobre células epiteliales a través de un mecanismo, en el que su sitio blanco de acción es fodrina, una proteína análoga de espectrina, la cual forma parte del citoesqueleto de la membrana citoplásmica. Fodrina y actina son proteínas que constituyen el citoesqueleto que requieren de proteínas accesorias para formar una red que se asocia con la membrana y la estabilizan. También se ha demostrado que Pet debe ser internalizada para inducir su efecto citotóxico, que involucra daño al citoesqueleto (Navarro *et al.*, 2001).

Además del plásmido pAA, algunas EAEC expresan otros factores de virulencia codificados por genes presentes en el ADN cromosomal como lo son Pic (mucinasa) y ShET1 (enterotoxina) (Herdenson *et al.*, 1999).

- Pic (“*protein involved in intestinal colonization*”) es una proteína de 116 kDa implicada en colonización intestinal, codificada en el cromosoma de EAEC

O42 y de *Shigella flexneri* 2457T. Pic se ha caracterizado como una proteína que provoca hemaglutinación, participa en la ruptura de la molécula de hemoglobina para la liberación de hierro y posteriormente en la captación del mismo y cataliza la degradación de mucina que es responsable de una de las características fisiopatológicas de la diarrea mediadas por EAEC (Henderson *et al.*, 1999; Navarro *et al.*, 2010).

- ShET1 (“*Shigella enterotoxin 1*”) esta enterotoxina de 55 kDa, presenta una subunidad A (codificada por el gen *set 1A*) de 20 kDa y cinco subunidades B (codificadas por el gen *set 1B*) de 7 kDa. La subunidad A de ShET1 es responsable de la actividad secretora, mientras que la subunidad B está relacionada a la unión irreversible del receptor del enterocito (Behrens *et al.*, 2002).

5. *Salmonella*

5.1. Características generales

Salmonella fue descrita por primera vez en 1880 por Karl Joseph Eberth en cortes histológicos de bazo y nódulos linfáticos mesentéricos procedentes de personas fallecidas por fiebre tifoidea y se aisló por primera vez de cerdos muertos por peste porcina (*Salmonella choleraesuis*) por Smith y Salmon en 1885 (De la Torre Martínez, 2006).

Salmonella pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*, no forman esporas y tienen forma de bastón, su diámetro es de alrededor de 0.7 a 1.5µm, con una longitud de 2 a 5µm. Son bacterias anaerobias facultativas y presentan predominantemente motilidad peritrica. La temperatura óptima de crecimiento para *Salmonella* es de 35 a 37°C pero puede crecer de 4 a 54° C, el pH óptimo de crecimiento es de 7 a 7.5 y puede crecer a pH de 4.1 a 9 (De la Torre Martínez, 2006).

El género *Salmonella* se clasifica de acuerdo al esquema de Kauffmann-White en dos especies, *S. bongori* y *S. enterica*. *S. enterica* se puede dividir en seis subespecies *S. enterica* subsp. *enterica* (I), *S. enterica* subsp. *salamae* (II), *S.*

enterica subsp. *arizonae* (IIIa), *S. enterica* subsp. *diarizonae* (IIIb), *S. enterica* subsp. *houtenae* (IV), y *S. enterica* subsp. *indica* (VI) (Figura 2).

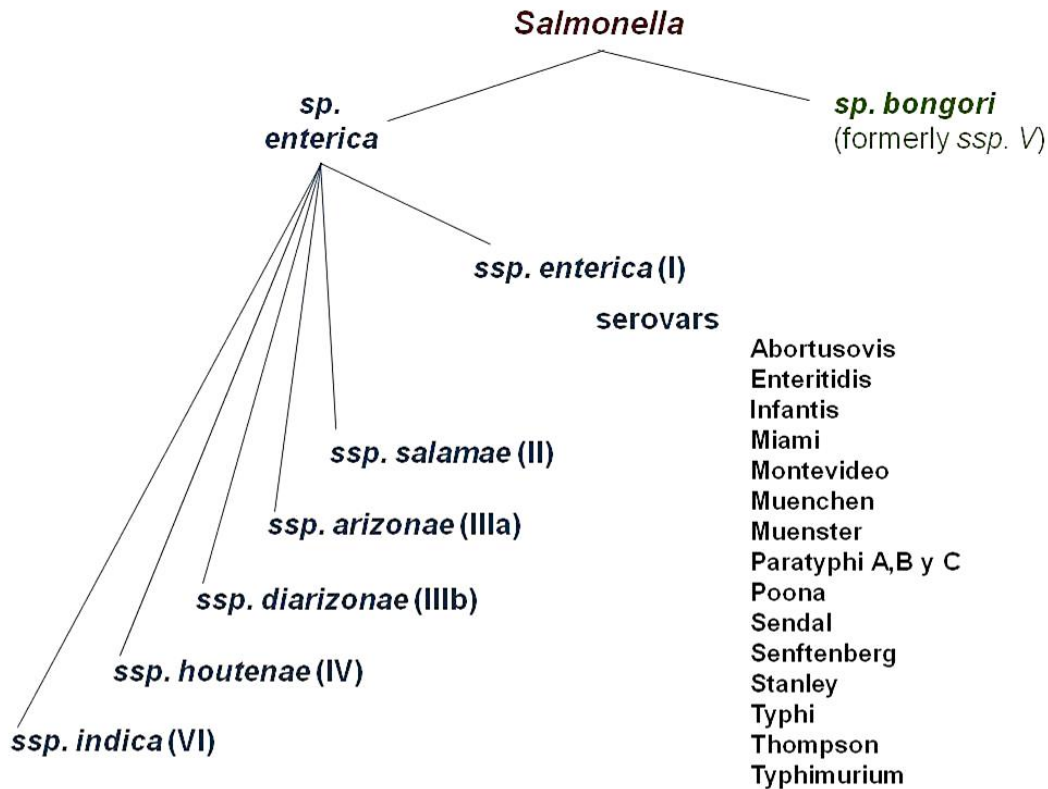


Figura 2. Clasificación del género *Salmonella* (Tomado y modificado de Swearingen, 2012)

Además, *S. enterica* se puede clasificar con base en el antígeno de superficie O (lipopolisacárido (LPS)) en 67 serogrupos y en 2 557 serotipos o serovariedades cuando se diferencian por los antígenos O y H (flagelar) (Fabrega, 2013).

Más del 60% de los 2,557 serotipos identificados hasta ahora pertenecen a la subespecie *enterica*, en la que se encuentra el 99% de los serovares responsables de causar enfermedades en animales (Brenner *et al.*, 2000).

Salmonella enterica está ampliamente distribuida en la naturaleza y causa varias enfermedades en el hombre y en los animales, que pueden ocasionar varios síndromes tales como fiebre entérica, gastroenteritis, septicemia e infecciones focales. Las gastroenteritis son causadas por muchos serotipos considerados

Salmonellas no tifoideas (NTS). Los serotipos más comunes de NTS, respecto a la salud humana, son Typhi, Paratyphi, Typhimurium y Enteritidis (Calva, 2012).

La gastroenteritis causada por NTS es una infección que se mantiene localizada en el intestino y en los ganglios linfáticos mesentéricos, no coloniza el hígado, el bazo ni la médula ósea. El inicio de la gastroenteritis es de 12 a 72 h con una duración menor a 10 días, y se manifiesta con fiebre, dolor abdominal, náuseas, diarrea y vómitos; el breve curso clínico sugiere el inicio de una respuesta inmune adaptativa resultando en eliminación de la infección (Reddy *et al.*, 2010).

Las infecciones con *Salmonella* ocurren en varios países del mundo, produciendo pérdidas económicas considerables en la economía pecuaria de los mismos. Estas infecciones cobran aún más importancia por el riesgo que representan para la salud pública, puesto que son una de las principales causas de enfermedades entéricas en el ser humano. La OMS ha reportado que anualmente existen de 16 a 21 millones de casos de fiebre tifoidea, con 200,000 a 600,000 muertes, y 93.8 millones de casos de gastroenteritis y diarreas debidas a salmonelosis no tifoideas, que producen 155,000 muertes anuales, siendo éstas últimas las infecciones de origen alimentario más comunes a nivel mundial, generando un alto índice de morbilidad (Bhan *et al.*, 2005; Majowicz *et al.*, 2010).

6. *Salmonella* Typhimurium

Dentro del género *Salmonella*, existen serotipos específicos de un hospedero, como *Typhi* y *Paratyphi*, los cuales infectan sólo a humanos, y serotipos que infectan a varios hospederos, como Typhimurium, el cual afecta tanto a humanos como a diversos animales. *Salmonella enterica* serotipo Typhimurium (*S. Typhimurium*) puede ocasionar los dos tipos de infección, dependiendo de su hospedero (Haraga *et al.*, 2008). Algunos factores de riesgo asociados al hospedero que predisponen a la gastroenteritis por NTS son: el estado nutricional, edad, enfermedades crónicas, tratamientos con inmunosupresores, cáncer, enfermedades reumatológicas, infección por VIH y defectos congénitos inmunes (Calva, 2012; Gordon, 2011).

En México se han presentado cepas de *S. Typhimurium* multirresistentes a antibióticos aisladas de pollos, cerdos y bovinos, que son los reservorios más frecuentes de diferentes serovares de *Salmonella*. El uso de antibióticos es la medida más frecuente para controlar a este patógeno, sin embargo, los casos de salmonelosis se han incrementado de manera alarmante ocasionando enfermedades graves y muerte en pacientes lactantes menores de 6 meses (Zaidi *et al.*, 2006).

6.1. Factores de virulencia de *Salmonella Typhimurium*

La trascendencia de la salmonelosis está determinada por los factores de virulencia empleados por la bacteria para interaccionar y evadir la respuesta inmune del hospedero, la cual depende del estado de salud del mismo. Los factores de virulencia comprenden adhesinas, flagelo, componentes esenciales para la formación del biopelícula y proteínas que constituyen un SST3 y las que se secretan a través de éste. Los genes que codifican para los factores de virulencia se localizan en el cromosoma o en el plásmido de virulencia pSLT (Marcus *et al.*, 2000; Coburn *et al.*, 2007).

▪ Islas de patogenicidad de *Salmonella*

Las islas de patogenicidad (PI, de *Pathogenicity Islands*) son regiones del genoma de *Salmonella* de entre 10 a 200 Kb, en las que se encuentran codificados muchos de los genes necesarios para su virulencia. Se ha propuesto que *Salmonella* adquirió estas islas de patogenicidad mediante transferencia horizontal de DNA proveniente de otras especies bacterianas. (Porwollik *et al.*, 2002).

Hasta ahora se han reportado más de 10 SPIs; algunas se conservan entre los miembros del género *Salmonella*, mientras que otras son específicas de ciertos serotipos. Las SPI-1 y SPI-2 son las SPIs más estudiadas en *Salmonella*; ambas codifican para un SST3, así como también para varias proteínas efectoras y chaperonas que son esenciales en diferentes etapas de la infección y que son translocadas hacia la célula hospedadora mediante el correspondiente SST3 codificado en cada SPI. (Ochman y Groisman, 1996; Marcus *et al.*, 2000).

- **SPI-1:** La isla de patogenicidad 1 se localiza en todos los miembros del género *Salmonella*. Es una de las islas mejor caracterizadas, se encuentra en el centisoma 63 del cromosoma, consta de 39 genes y tiene un tamaño de 40 kb. Los genes que forman parte de esta isla codifican para proteínas que constituyen un sistema de secreción tipo 3 (SST3), (Hensel, 2004; Ochman *et al.*, 1996). El papel primordial de SPI-1 se da durante las primeras etapas de la infección por *Salmonella*, es decir, cuando la bacteria se encuentra en el lumen del intestino. Las proteínas codificadas en esta isla contribuyen a la invasión de la bacteria a las células del hospedero y a la respuesta inflamatoria intestinal (Galán y Curtís, 1989; Santos *et al.*, 2003).
- **SPI-2:** Se localiza en el centisoma 31, su tamaño es de 40 kb y consta de 44 genes los cuales regulan la supervivencia y la replicación bacteriana en los compartimientos intracelulares de los fagocitos y las células epiteliales. La SPI-2 también codifica para un SST3 que se activa cuando la bacteria se encuentra intracelularmente dentro de una vacuola. (Jones y Cols., 2001).

Los dos SST3 que posee *Salmonella* translocan distintas proteínas efectoras a las células hospederas, en diferentes etapas de la patogénesis de esta bacteria (Jones y Cols., 2001).

6.2. Mecanismo de patogenicidad.

Los hospederos de *Salmonella* adquieren la infección por vía oral, al ingerir agua o alimentos contaminados con esta bacteria. Una gran proporción de organismos ingeridos son destruidos por el pH bajo del estómago, pero aquellas bacterias que sobreviven pueden llegar al epitelio intestinal. Las bacterias colonizan el intestino delgado e invaden células epiteliales no fagocíticas, logrando así el acceso al tejido linfático subyacente. La invasión está mediada por el SST3 codificado en SPI-1, ya que las proteínas que se translocan por medio de éste hacia la célula intestinal, provocan en ella una sucesión de cambios fisiológicos, entre los que

inicialmente se encuentran modificaciones en el citoesqueleto de actina, permitiendo así la internalización de la bacteria a la célula hospedera. Después de la invasión de las células del epitelio intestinal, *Salmonella* puede diseminarse a cualquier tejido, ya que la bacteria es capaz de sobrevivir y propagarse dentro de los macrófagos, un proceso que requiere del SST3 codificado en SPI-2. Las proteínas efectoras del SST3 de la SPI-2 llevan a cabo una serie de funciones cuyo objetivo es permitir la replicación de *Salmonella* en las vacuolas dentro del macrófago. (Hansen Wester y Hensel, 2001; Haraga *et al.*, 2008)

7. Epidemiología de la diarrea en México

En México después de la llegada de la epidemia del cólera en 1991, se intensificaron las campañas de salud pública, lo cual provocó un cambio en el patrón de las diarreas. De esta manera, con el propósito de contar con estudios epidemiológicos para establecer la importancia e identificación de los microorganismos productores de diarrea aguda que requiere hospitalización, se llevó a cabo el proyecto “*El estado actual de los enteropatógenos causantes de diarrea aguda grave en niños mexicanos*” en el cual se realizó el análisis de las muestras de heces de 699 niños menores de cinco años hospitalizados por diarrea aguda en tres hospitales de segundo nivel del Instituto Mexicano del Seguro Social, en la Ciudad de México, durante los periodos de marzo de 1998 a febrero de 1999 y marzo de 2000 a febrero de 2001.

Los principales agentes causales de diarrea aguda identificados en este estudio fueron: *Rotavirus* en el 42% de los pacientes, continuando con *Shigella* (13%), los grupos diarreogénicos de *Escherichia coli* (GED) (9%), *Salmonella* (5%), *Adenovirus* (4%), *Campylobacter sp.* (3%), *Astrovirus* (2%), *Cryptosporidium sp.* (1%), *Aeromonas sp.*, *Giardia sp.* y *Vibrio cholerae* con menos del 1% y finalmente el 20.5% sin identificación del agente etiológico. De acuerdo a estos datos los GED fueron la segunda causa de diarrea bacteriana y *Salmonella* la tercera (ver tabla 1).

La caracterización molecular de los GED, en este estudio y en otros que se mencionan posteriormente, se realizó en el laboratorio a cargo de la Dra. Teresa Estrada-García, en el Departamento de Biomedicina Molecular del CINVESTAV del IPN, en este laboratorio Jorge Cerna y Oscar Luna en el año 2003 establecieron la prevalencia y la epidemiología de los cuatro principales GED (ETEC, EPEC, STEC y EIEC). El GED aislado con mayor frecuencia fue EPEC, el cual se identificó en el 35% de los pacientes en donde el 25% le correspondió a EPECa y el 9% fue para EPECT; el siguiente GED aislado con mayor frecuencia fue ETEC con el 30%, STEC con el 25% y EIEC con el 10%. En este estudio no se buscó EAEC y DAEC (ver tabla 2).

En el año 2007 Leova Pacheco determinó la etiología de las diarreas agudas en niños menores de 5 años en Tabasco. Se estudiaron 482 pacientes menores de cinco años de edad con diarrea aguda que acudieron al Servicio de Urgencias del Hospital del Niño en Villahermosa Tabasco, de febrero de 2004 a febrero de 2006. Las heces de estos niños se procesaron para buscar enteropatógenos bacterianos, parásitos y *Rotavirus*. Los patógenos identificados con mayor frecuencia fueron *Rotavirus* (57%), GED (40%), *Shigella spp.* (5%) y *Salmonella* (2%). El resto de los patógenos, *Giardia lamblia*, *Ascaris lumbricoides*, *Campylobacter spp.*, *Cryptosporidium*, *V. cholerae*, se encontraron en menos del 1% de los casos. La prevalencia de los GED en este estudio fue del 49% para EAEC, 22% EPECa, 16% ETEC, 7% STEC, 5% EPECT, y el 1% EIEC. Con lo que se concluyó que *Rotavirus* continuaba siendo el agente causante de diarrea más común en este grupo etario y se demostró la importancia de los GED como la primera causa de diarrea bacteriana, mientras que *Salmonella* se mantuvo en el tercer lugar. En este estudio el GED más prevalente fue EAEC, seguido de EPEC, sin embargo no se buscó DAEC (ver tabla 1 y 2).

En México también se han realizado estudios de diarrea en comunidad. Estrada-García y colaboradores en el año 2009 publicaron parte de un estudio de cohorte en niños menores de 2 años de una comunidad conurbada de la Ciudad de México; reportaron el seguimiento durante 1 año de 76 niños, se determinó la

infección asintomática y la diarrea aguda asociada a GED. Se analizaron 795 muestras de heces, 125 (16%) fueron positivas para GED. La mayoría de las infecciones de un solo GED fueron asintomáticas, y de los 32 episodios de diarrea por GED, el 41% se asociaron con EPECa, el 37,5% con ETEC, el 9% EPECT, 9% con EIEC, y 3% con STEC. Una de las conclusiones a las que se llegó en este estudio fue que los GED son causas importantes de infección entérica y diarrea adquirida en la comunidad. En este estudio no se buscó EAEC y DAEC (ver tabla 1 y 2).

7.1. Epidemiología de la diarrea en el Estado de Yucatán, México

El estado de Yucatán, se localiza en el sureste de la República Mexicana y al norte de la península de Yucatán, su clima es cálido y húmedo debido a su proximidad con el Golfo de México. La temperatura media anual máxima es de 33°C, que van desde 28°C en enero a 36°C en mayo, pero las temperaturas a menudo se elevan por encima de 38°C. Las bajas temperaturas oscilan entre 18°C en enero a 23°C en mayo y junio. La temporada de lluvias es de junio a octubre. La precipitación media anual es de 115 centímetros, siendo más pesada durante los meses de verano (Patzí, 2015).

En el año 2015, el INEGI reportó una población de 2 097 175 habitantes, de los cuales 84% pertenece a la población urbana y el 16% a la población rural (INEGI, 2015). En este contexto, debido a sus condiciones climáticas y a la gran población rural con la que cuenta, Yucatán es uno de los estados del país que presenta un mayor número de episodios de diarrea anualmente. Estos casos están asociados al consumo de agua (Vázquez y Zapata, 1992), reportándose un incremento de 4% en la proporción de niños y niñas con episodios de diarrea entre el 2006 y el 2012 (Ferreira *et al.*, 2013); de este porcentaje, las poblaciones localizadas en la franja costera presentan mayor vulnerabilidad (Alonso y Acosta, 2013).

El Laboratorio de Investigación en Microbiología y la Unidad de Hidratación Oral (UDATHOS) del Hospital General O´Horan que recibe a niños con diarrea moderada a severa, de todo el Estado de Yucatán; junto con el Laboratorio de

Epidemiología Molecular del CINVESTAV Zacatenco, de la Ciudad de México, han realizado estudios epidemiológicos para determinar la prevalencia de los agentes etiológicos causantes de diarrea en niños menores de 5 años pertenecientes a la comunidad de Buctzotz y en niños hospitalizados por diarrea aguda grave en la unidad de rehidratación oral del Hospital General O´Horan de Mérida, Yucatán.

Buctzotz es una localidad perteneciente al estado de Yucatán, que se encuentra a 89 km de la ciudad de Mérida, con aproximadamente 8 887 habitantes (INEGI, 2015), el clima es cálido subhúmedo y la temperatura media anual es de 26.3 °C. Buctzotz tiene una tasa elevada de diarrea por *Salmonella* Typhimurium y GED además de una elevada prevalencia tanto de *Salmonella* Typhimurium multidrogorresistente como no multidrogorresistente (MR y no-MR) en cerdos vivos y carne del mercado municipal que abastece a casi toda la población (Zaidi *et al.*, 2006).

Durante el periodo de octubre de 2006 a febrero de 2008 se colectaron muestras de heces en 337 niños de la comunidad de Buctzotz, Yucatán. Los GED se identificaron en el 12% de los niños, *Salmonella* en el 7%, *Shigella* en el 6% y *Campylobacter* 3%. En el 70% de los casos no se identificó ningún patógeno bacteriano. La distribución de los GED se presentó de la siguiente manera: EAEC en el 44%, seguido del 35% de EPECa, el 17% de ETEC y 4% de los casos fueron causados por EIEC (Patzi, 2009). No se buscó DAEC (ver tabla 1 y 2).

En el año 2015 Patzi Vargas y colaboradores, publicaron un estudio en el que se determinó la prevalencia de enteropatógenos bacterianos en 831 niños menores de cinco años de edad con diarrea aguda que requieren hospitalización, durante el período de enero de 2007 a enero de 2009 y de enero de 2010 a diciembre de 2011, en Yucatán, México. Uno o más enteropatógenos bacterianos fueron identificados en 463 niños (56%). Los GED fueron identificados en 232 niños (28%), superando a *Salmonella* (12%) y *Shigella* (9%), mientras que *Vibrio cholerae* (2%) fue el menos frecuente. Los GED predominantes fueron DAEC (35%), EAEC (24%), y EPECa (16%), seguidos de ETEC (9%), EPECt (4%), EIEC (0.4%) y STEC (0.4%) (ver tabla 1 y 2).

Los estudios antes descritos muestran claramente la importancia de los grupos diarreogénicos de *E. coli* y *Salmonella* como agentes causales de diarrea en los niños < 5 años en el estado de Yucatán, destacando la participación de EPECa y EAEC (ver tabla 1).

Tabla 1. Epidemiología de los agentes etiológicos causantes de diarrea en México

Patógeno Identificado	Cerna y Luna 2003 CDMX. N=699 <5años Mar 1998-Feb 1999 Mar 2000-Feb 2001	Pacheco 2007 Villahermosa, Tabasco. N=482 <5años Feb 2004-Feb 2006	Estrada-García 2009 CDMX N=76 <2años Ene- Dic 1998	Patzi 2015 Yucatán N=831 <5 años Ene 2007- Ene 2009 Ene 2010- Dic 2011
Rotavirus	42%	57%	NE	NE
GED	9%	40%	16%	28%
Shigella	13%	5%	NE	9%
Salmonella	5%	2%	NE	12%

NE: No evaluado

Tabla 2. Epidemiología de los grupos de *E. coli* causantes de diarrea en México

Patógeno Identificado	Cerna y Luna 2003 CDMX. N=699 <5años Mar 1998-Feb 1999 Mar 2000-Feb 2001	Pacheco 2007 Villahermosa, Tabasco. N=482 <5años Feb 2004-Feb 2006	Estrada-García 2009 CDMX N=76 <2años Ene- Dic 1998	Patzi 2015* Yucatán N=831 <5 años Ene 2007- Ene 2009 Ene 2010- Dic 2011
EPECa	25%	22%	41%	16%
EPECt	9%	5%	9%	4%
EAEC	NE	49%	NE	24%
ETEC	30%	16%	37.5%	NE
STEC	25%	7%	3%	0.4%
EIEC	10%	1%	9%	0.4%

NE: No evaluado

* Patzi 2015. En este estudio se evaluó la prevalencia de DAEC, la cual se presentó en el 35% de los casos.

8. Importancia de los estudios de seroprevalencia

Además de sugerir que las infecciones por los GED y por *Salmonella* son altamente frecuentes en México, los trabajos descritos con anterioridad ponen en evidencia la falta de estudios que nos indiquen la prevalencia de diarrea en población adulta y resaltan la importancia de realizar estudios en esta población en nuestro país, debido a que la prevalencia de los agentes etiológicos causantes de diarrea en la población adulta prácticamente no se conoce, lo cual puede deberse a que generalmente la población adulta no acude a los servicios de salud en casos de diarrea.

Los estudios de seroprevalencia nos aportan información sobre las infecciones que se han tenido con un patógeno en un área geográfica. A través de los datos obtenidos por esta vía, se puede identificar la presencia de anticuerpos específicos en el suero contra un patógeno. Cuando hay anticuerpos específicos en el suero se interpreta como una señal de contacto previo con el patógeno. Estos anticuerpos pueden ser inducidos por la infección natural con el patógeno o por vacunación con vacuna atenuada o inactivada (Heras, 2001).

8.1. Seroprevalencia de los grupos diarreogénicos de *E. coli*

En general los estudios que existen de seroprevalencia de los GEDs son escasos. En el año 2006 Zapata Quintanilla y colaboradores publicaron un estudio en el que se evaluaron los niveles de anticuerpos séricos IgG e IgM anti-EHEC O157: H7, anti-EHEC O111: H-, anti-EPEC O111: H- y los niveles de anticuerpos anti-LPS O111, LPS O157 y LPS O55 en adultos sanos que viven en Sao Paulo, Brasil. Se confirmó la presencia de anticuerpos séricos anti-bacterianos y anti-LPS. Las concentraciones de IgM anti-LPS fueron significativamente mayores que las de IgG, y las concentraciones de anti-LPS O157 fueron altas en vista del aislamiento poco frecuente de las bacterias O157 en Brasil. Estos resultados sugieren que existe una inmunidad de reacción cruzada a EHEC en la población brasileña, que puede ser el resultado de la inmunidad a antígenos de EPEC (Zapata- Quintanilla *et al.*, 2006).

David Huang y colaboradores en el año 2008 evaluaron la seroconversión en 195 estudiantes estadounidenses durante un período de cuatro semanas después de su llegada y partida de Cuernavaca, México, utilizando como antígeno la proteína dispersina que es secretada por EAEC, encontraron que 36 de los 88 estudiantes que desarrollaron diarrea y 52 de los 107 estudiantes que no la presentaron incrementaron sus títulos de IgG contra dispersina al momento de partir de Cuernavaca. Además observaron que en contraste con la infección por ETEC, a la que los viajeros adultos son más susceptibles durante las primeras semanas de exposición, los viajeros siguen siendo susceptibles a la infección EAEC a lo largo de su estancia; el número de sujetos con colonización EAEC aumentó con el tiempo, mientras que el número de casos de diarrea EAEC disminuyó con el tiempo de estancia; y ninguno de los 16 pacientes que desarrollaron diarrea por EAEC tuvo un episodio repetido debido a esta bacteria. Estas observaciones sugieren que la inmunidad a la diarrea sintomática por EAEC puede haber sido adquirida de manera temprana durante el viaje, pero que la resistencia a la infección entérica asintomática no ocurrió en esta población adulta (Huang *et al.*, 2008; Estrada-García *et al.*, 2014).

En el año 2012 Quillan y colaboradores realizaron un estudio de seroprevalencia y factores de riesgo asociados con *E. coli* O157 en una población agrícola. Evaluaron anticuerpos anti-LPS O157 en una cohorte representativa de los trabajadores agrícolas de tres regiones geográficamente distintas del Reino Unido durante dos rondas de muestreo en un período de 2 años. Un total de 31/946 (3,3%) muestras de suero contenían anticuerpos contra el LPS O157 de *E. coli*. Observaron mayor seroprevalencia asociada al contacto reciente con ganado vacuno, con el suministro de agua y en el grupo etario menor de 5 años. Sólo cinco personas seropositivas informaron síntomas leves de una infección del tracto gastrointestinal. Estos resultados apoyan aún más la premisa de la inmunidad adquirida a *E. coli* O157 asociada con exposiciones antigénicas prolongadas dentro del entorno agrícola (Quilliam, 2012).

8.2. Seroprevalencia de *Salmonella*

MacLennan y colaboradores en 2008 publicaron un estudio en el que se identificaron anticuerpos contra *Salmonella* no Typhi (NTS) que se realizó en niños de Malawi, África. El objetivo fue establecer si los anticuerpos protegían contra bacteremia producida por NTS especialmente en niños menores de dos años, los cuales son más susceptibles a sufrir cuadros de bacteremia con excepción de los niños menores de 4 meses ya que en este grupo etario no se han observado cuadros de bacteremia. Se observó que todos los sueros de los niños sanos mayores de 16 meses contenían anticuerpos anti-*Salmonella* que tenían efecto bactericida sobre las NTS, mientras que los niños sanos menores de 16 meses no tenían anticuerpos específicos contra NTS y por lo tanto no había efecto bactericida contra estas bacterias, concluyendo que los niños de Malawi se exponen a las NTS después de los 16 meses de edad, lo que sugirió que los anticuerpos protegen contra bacteremia por NTS apoyando el desarrollo de vacunas que induzcan anticuerpos contra estas bacterias (MacLennan, 2008).

Hasta el momento se han realizado pocos estudios de seroprevalencia en humanos para *Salmonella* y los grupos diarreogénicos de *E. coli* en poblaciones asintomáticas, realizar este tipo de estudios proporciona información sobre la cantidad de personas en un lugar y tiempo determinados que tienen anticuerpos contra alguna infección, lo que indica qué porcentaje de ellos han tenido contacto con un agente infeccioso específico sin ser necesario aislar al microorganismo. Es importante destacar que aunque se determine la presencia de anticuerpos, éstos no siempre son protectores.

9. Anticuerpos protectores

Se estima que los individuos que desarrollan anticuerpos protectores, ya sea por una infección clínica o por la vacunación, están protegidos contra la infección o la enfermedad. Para la mayoría de las enfermedades prevenibles por vacunación, los anticuerpos específicos pueden ser usados como indicador de protección contra la enfermedad (Cedré, 2012).

Los anticuerpos están formados por dos cadenas pesadas y dos ligeras, unidas entre sí por enlaces disulfuro; tienen una región variable y una región constante. Esta dualidad estructural le confiere el carácter bifuncional que los caracteriza. Por la región variable, responsable de su especificidad, se une con el antígeno (Fab de "*fragment antigen binding*"). La región constante, denominada Fc, es la responsable de sus funciones biológicas, tales como unir componentes del sistema del complemento o facilitar la fagocitosis de microorganismos al unirse el anticuerpo por su región Fc a los receptores presentes en la superficie de las células fagocíticas (Abbas *et al.*, 2002).

Se considera que los isotipos IgM e IgG (IgG1 e IgG3) son los responsables de la actividad bactericida presente en el suero humano. Estos isotipos llevan a cabo su función activando la vía clásica del complemento que se inicia cuando el componente C1q se une específicamente a la región constante (Fc) de un anticuerpo, unido a un antígeno de la superficie celular (Chatterjee *et al.*, 2006). Tanto por la vía clásica como por la alternativa, la activación del componente C3 inicia un sistema común con la formación de C5 convertasa y la progresiva activación de los factores C5, C6, C7, C8 y C9, hasta formar el complejo de ataque a la membrana (CAM), que tiene una estructura tubular transmembranal, lo que le permite anclarse a la membrana citoplasmática, produciéndole orificios que determinan el ingreso masivo de agua en la célula, la pérdida de los gradientes de concentración de iones y la salida de macromoléculas intracelulares, lo que trae como consecuencia la lisis celular (Rus *et al.*, 2001)

Prácticamente todos los géneros de bacterias Gram negativas son susceptibles a la acción bacteriolítica de los anticuerpos y el complemento. Este fenómeno puede ser detectado *in vitro* mediante el ensayo bactericida del suero (EBS) (Taylor, 1983), este ensayo también es conocido como actividad bactericida de los anticuerpos mediada por la vía clásica del complemento. El EBS ofrece una medida de la capacidad funcional de los anticuerpos, en conjunto con el complemento, para lisar bacterias.

En el año 2010, Adriana Guadarrama determinó la seroprevalencia de *Salmonella* Typhimurium, EPECa y EAEC, en una población endémica, asintomática para diarrea, Buctzotz, Yucatán y evaluó el efecto bactericida de los anticuerpos específicos contra *Salmonella* Typhimurium. Utilizando la técnica de ELISA y FACS se estableció la prevalencia de anticuerpos específicos, de la clase IgM como IgG, contra 3 aislados clínicos: *S. Typhimurium*, EPECa y EAEC, en 109 sueros de individuos que no habían presentado diarrea al menos en las últimas dos semanas, los cuales presentaron la siguiente distribución etaria (100 sujetos \geq 15 años, y 9 niños <1 año). De los 9 sueros de los niños <1 año ninguno mostró anticuerpos IgM contra los 3 aislados clínicos probados, 6 de ellos tuvieron anticuerpos IgG específicos contra *S. Typhimurium* y EPECa y sólo 4 niños tuvieron anticuerpos IgG contra EAEC. Con respecto al grupo de sujetos ≥ 15 años, más del 90% de ellos presentaron anticuerpos IgM e IgG específicos contra las 3 cepas bacterianas probadas. Sugiriendo que los sujetos de esta pequeña comunidad, están permanentemente expuestos a estas 3 bacterias, confirmando el hecho de que estos microorganismos son endémicos de esta región.

Se ha documentado una prevalencia alta de *Salmonella* en Yucatán (Zaidi *et al.*, 2008) así como para el serotipo *S. Typhimurium* (Zaidi *et al.*, 2007). Dado estos antecedentes, Guadarrama también evaluó si los anticuerpos específicos IgG contra *S. Typhimurium* tenían un efecto bactericida. Se evaluaron 45 sueros de los sujetos ≥ 15 años, divididos en grupos de 15 con base en sus concentraciones inferidas por ELISA (altas, intermedias y bajas) y los 6 sueros positivos para IgG del grupo de los niños <1 año. Observó que existe una correlación directa entre las concentraciones (altas, intermedias y bajas) de anticuerpos específicos y los títulos bactericidas.

Esta información resulta importante para conocer la magnitud real de este problema en poblaciones específicas, identificar grupos con mayor ocurrencia del evento, generar conocimiento sobre posibles grupos de riesgo y orientar acciones para mejorar la efectividad de las estrategias de control de la transmisión de infecciones (Giraldo *et al.*, 2013).

JUSTIFICACIÓN

Varios estudios han mostrado que *Salmonella enterica* serotipo Typhimurium, *E. coli* enteropatógena atípica y *E. coli* enteroagregativa, son unos de los principales agentes etiológicos bacterianos asociados a diarrea en el estado de Yucatán. Debido al riesgo que estos microorganismos representan para la población, es importante contar con estudios epidemiológicos de seroprevalencia en la población y caracterizar los anticuerpos contra estas bacterias para establecer si estos son protectores con base en su efecto bactericida. Realizar este tipo de estudios proporcionará información para identificar los grupos de mayor riesgo en poblaciones endémicas.

HIPÓTESIS

Los sueros de sujetos de zonas endémicas de *Salmonella enterica* serotipo Typhimurium, *E. coli* enteropatógena atípica y *E. coli* enteroagregativa tienen anticuerpos específicos contra las cepas bacterianas evaluadas y si estos anticuerpos tienen efecto bactericida sobre dichas bacterias.

OBJETIVO GENERAL

Determinar los títulos y el efecto bactericida de los anticuerpos específicos IgM e IgG contra *Salmonella enterica* serotipo Typhimurium, *E. coli* enteropatógena atípica (EPECa) y *E. coli* enteroagregativa (EAEC), en una población endémica de Yucatán.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar los títulos de los anticuerpos (IgM e IgG) específicos contra *S. Typhimurium*, EPECa y EAEC en sujetos de una zona endémica.
- Establecer las condiciones adecuadas para realizar un ensayo bactericida en suero de los anticuerpos específicos contra las bacterias estudiadas.
- Evaluar la actividad bactericida dependiente de la activación de la vía clásica del complemento, de los sueros de sujetos de una zona endémica contra *S. Typhimurium*, EPECa y EAEC.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Material biológico

1.1. Cuadros clínicos de los tres pacientes de donde se obtuvo el aislado de *S. Typhimurium*, EPECa y EAEC.

La cepa de *Salmonella enterica serotipo Typhimurium* multidrogresistente (*S. Typhimurium* MDR) que se utilizó en este estudio fue recuperada del hemocultivo de un niño de tres meses de edad, que fue hospitalizado por diarrea aguda en el Hospital O'Horan de Yucatán en mayo del 2002. Pese a que el niño recibió terapia con ampicilina y gentamicina falleció a las 48 horas. Dicha cepa de *Salmonella Typhimurium*, llamó la atención de los clínicos ya que fue resistente a once antibióticos incluyendo cefalosporinas de amplio espectro. Posteriormente se aisló esta cepa multidrogresistente de 44 niños hospitalizados por infecciones intestinales durante el periodo el periodo del 2003 al 2005 y dos de éstos fallecieron.

La cepa de EPECa YUHE 273-B, que se utilizó en este estudio fue recuperada de las heces de una niña de 24 meses. La niña presentó un cuadro clínico de diarrea con sangre con una duración de un día, presentó 10 evacuaciones y fiebre mayor de 38.5°C.

La cepa de EAEC YUHE 246-A fue recuperada de un niño de 9 meses con diarrea con sangre, cuya duración fue de cuatro días, con 10 evacuaciones por día, fiebre mayor de 38.5°C, vómito el cual tuvo falla renal y hepática, choque y el cual finalmente falleció (Patzí 2009).

1.2. Obtención de muestras de suero humano

Al azar se seleccionaron domicilios distribuidos en todas las zonas de la comunidad de Buctzotz, Yucatán. Se seleccionaron individuos sanos mayores a 15 años de edad que no presentaban diarrea. Para la obtención de las muestras de sangre se utilizaron agujas y tubos Vacutainer. El suero para la determinación de anticuerpos, se obtuvo centrifugando las muestras a 5000 rpm por 10-12

minutos (lo cual fue realizado en el Centro de Salud de Buctzotz) y se transportaron en neveras con geles refrigerantes a la ciudad de Mérida para ser enviados en un lapso máximo de 18 horas por servicio de mensajería al laboratorio de la Dra. María Teresa Estrada García en el CINVESTAV, Unidad Zacatenco de la Ciudad de México (Guadarrama 2010).

2. Desarrollo experimental

2.1. Cinéticas de crecimiento de cada cepa bacteriana

Cada cepa bacteriana se sembró por estría cruzada en una placa de agar MacConkey y se incubó a 37°C durante 18 horas. Después se seleccionó una colonia de aproximadamente 2 mm de diámetro y se cultivó en un matraz Erlenmeyer con 5 mL de caldo soya tripticaseína estéril a 37°C durante 18 horas. Después se procedió a realizar la cinética de la cepa correspondiente, para esto, transcurridas las 18 horas de incubación del cultivo, se transfirió 1 mL de la suspensión bacteriana a un matraz Erlenmeyer con 50 mL de caldo soya tripticaseína estéril, se homogenizó, se tomaron dos alícuotas de 1 mL del cultivo, cada mililitro se colocó en una celda, y se leyó la densidad óptica en un espectrofotómetro (Smartspec 300, Bio-Rad) a una longitud de onda (λ) de 600 nm, esta lectura se consideró como tiempo cero ($t=0$). El matraz Erlenmeyer con los 48 mL del cultivo se incubó a 37°C con agitación constante a 180 rpm durante 30 minutos. Trascurrido este tiempo se tomaron nuevamente dos muestras de 1 mL del cultivo en condiciones de esterilidad, se procedió a leerlas en el espectrofotómetro y la lectura se consideró como el tiempo 1 ($t=1$), posteriormente se repitieron los pasos anteriores a los siguientes tiempos de incubación 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 220, 240, 260 minutos.

Para cada una de las cepas bacterianas se realizaron tres réplicas del ensayo descrito anteriormente, en la primera se determinó el punto intermedio de la fase logarítmica de la curva de crecimiento, el cual se consideró como el punto más conveniente para determinar las UFC/mL por siembra en placa con varilla acodada (plaqueo), ya que en esta fase todas las bacterias están vivas. El plaqueo del

punto seleccionado se realizó tomando dos muestras de 100 μL del cultivo, se colocaron en tubos de microcentrífuga de 1.5mL que contenían 900 μL de solución salina al 0.085% estéril, esta dilución corresponde a 1:10, posteriormente se realizaron diluciones seriadas 1:100, 1:1000, 1:10 000 etc. por duplicado hasta la dilución en la que se obtenía un número teórico cercano a 1000 y 100 bacterias, de cada una de estas diluciones se tomó una alícuota de 50 μL y se sembró con varilla acodada en una placa de agar soya tripticaseína, las cuales se incubaron a 37°C durante 18-24 horas. Finalmente se procedió a contar el número de colonias presentes en cada placa de agar y se realizaron los cálculos para determinar el número de UFC/mL (Ver Figura 3).

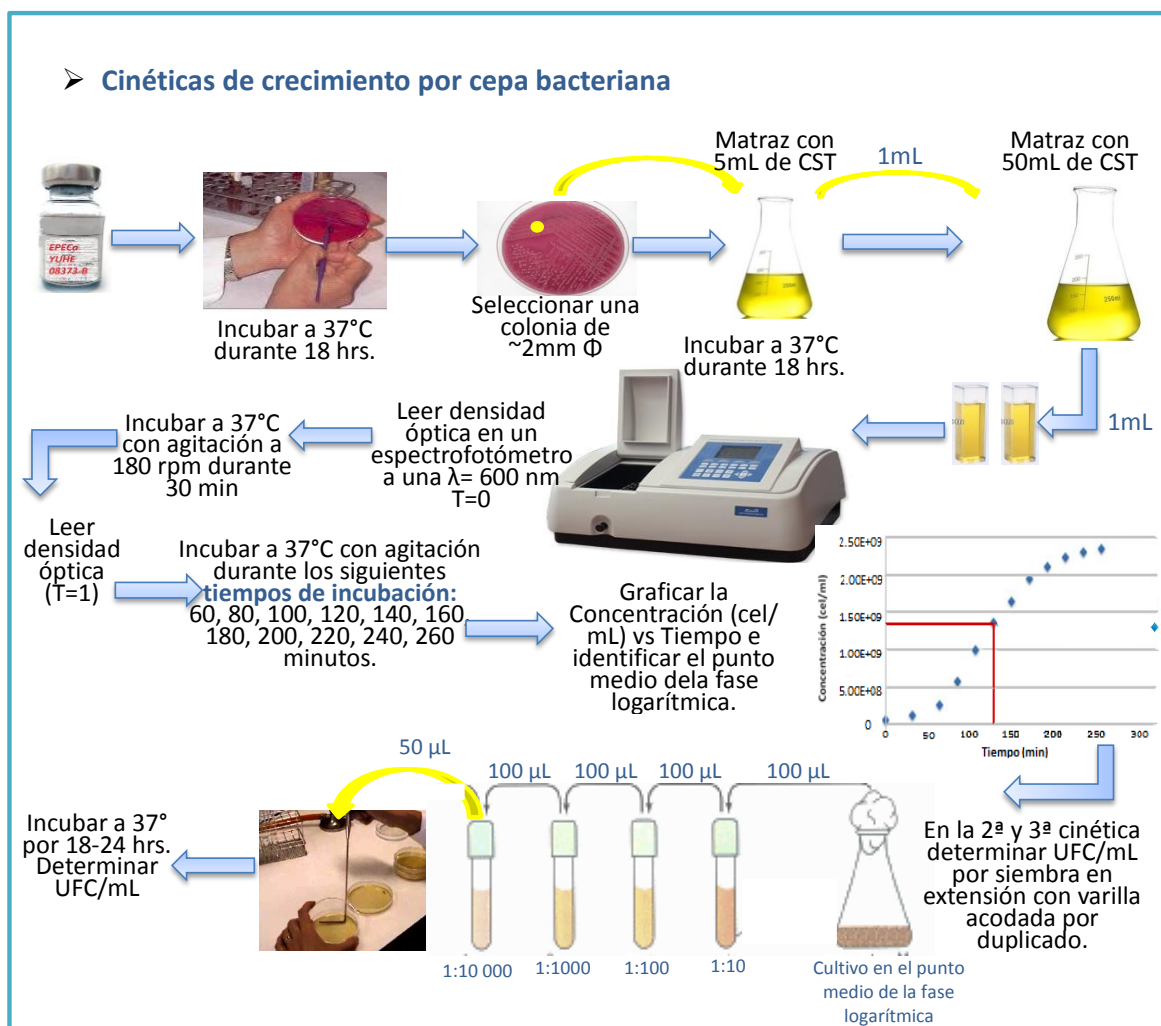


Figura 3. Diagrama de la metodología de las cinéticas de crecimiento de cada cepa bacteriana

3. Producción de anticuerpos de conejo anti-eritrocitos de carnero (hemolisina) para utilizarlos en la valoración de la actividad hemolítica del complemento.

Se le da el nombre de hemolisina a los anticuerpos dirigidos contra eritrocitos que son capaces de activar la vía clásica del complemento. La hemolisina se produce inmunizando a un animal (generalmente conejo) con eritrocitos heterólogos (generalmente de carnero).

3.1. Obtención de hemolisina

3.1.1. Inmunización de conejo por vía intravenosa

Para iniciar la inmunización del conejo se procedió a colocarlo en un cepo, posteriormente sujetando la oreja del animal con los dedos medio y anular, se localizaron las venas marginales de la oreja, se limpió la zona de inmunización con alcohol al 70% y finalmente se procedió a inyectar al animal con una suspensión de eritrocitos de carnero al 10% en solución salina. Se llevó a cabo una serie de inmunizaciones comenzando en el extremo de la oreja más alejado de la cabeza y procediendo a inyectar hacia la base de la oreja llevando a cabo el protocolo de inmunización indicado en la tabla 2.

Inyección No.	Tiempo (día)	Dosis	Vía
1	0	1 mL	Intravenosa
2	2	1 mL	Intravenosa
3	4	1 mL	Intravenosa
4	6	1 mL	Intravenosa
5	8	1 mL	Intravenosa
6	10	2 mL	Intravenosa
7	12	2 mL	Intravenosa
8	14	2 mL	Intravenosa
9	16	2 mL	Intravenosa
Sangrado	21 ó 22		

Tabla 3. Protocolo de inmunización del conejo con eritrocitos de carnero.

3.1.2. Sangrado de corazón

Con la ayuda de otra persona se sujetó al conejo de las cuatro patas, colocándolo con el tórax hacia arriba, se colocó la mano en la zona del tórax para localizar el corazón con el tacto, se limpió con una torunda la zona localizada y se procedió a realizar una punción con una jeringa de 20 mL con aguja de 20 x 32 mm. La sangre extraída se centrifugó durante 20 min a 2800 rpm a 4°C, finalmente se separó el sobrenadante, el cual fue alicuotado y conservado a -20°C hasta su uso.

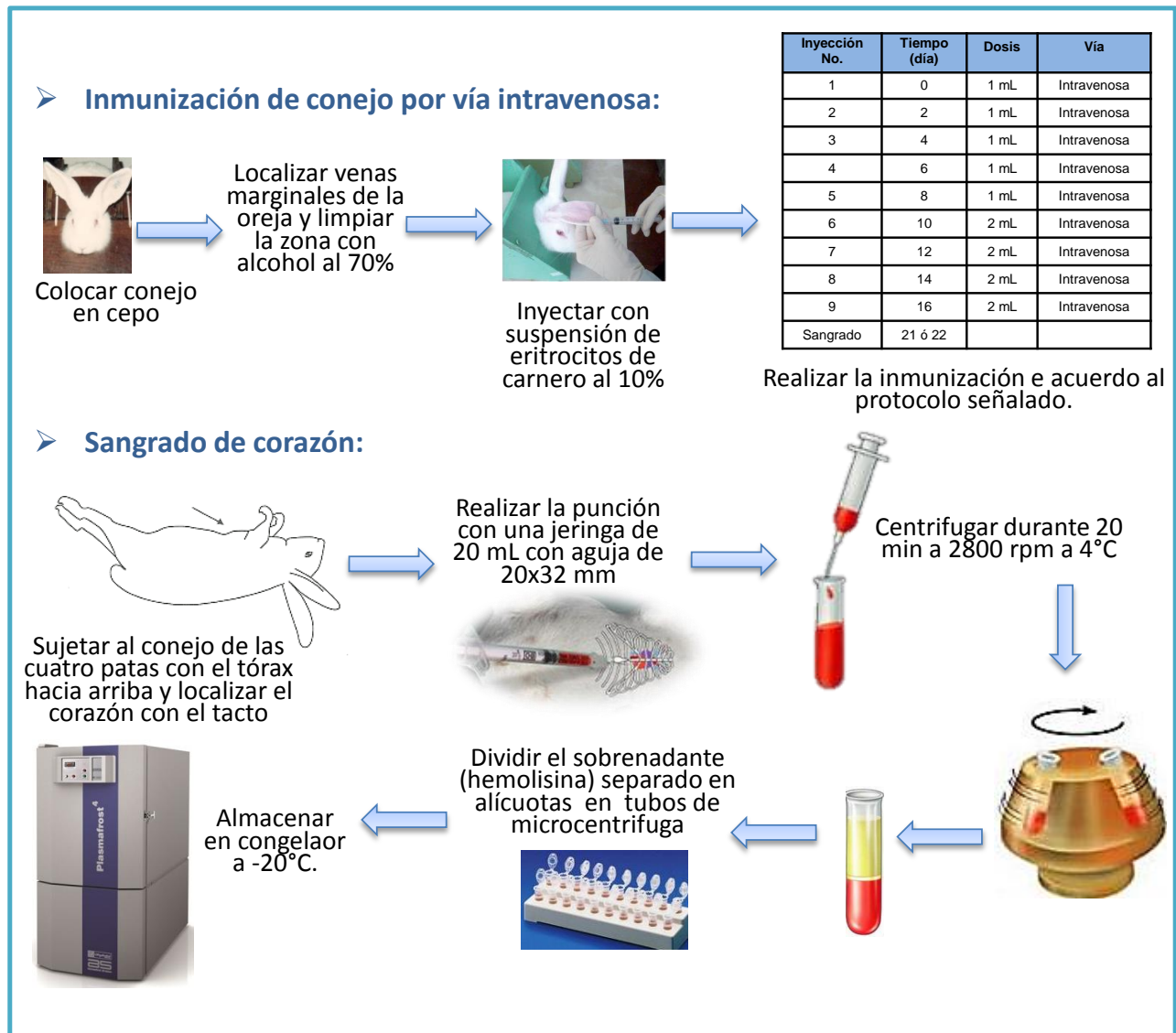


Figura 4. Diagrama de la metodología de la producción de anticuerpos de conejo anti-eritrocitos de carnero (hemolisina).

3.2. Obtención de suero de cobayo para su empleo como fuente exógena de complemento

3.2.1. Sangrado de corazón

Se sujetó al cobayo de las cuatro patas, colocándolo con el tórax hacia arriba, se colocó la mano en la zona del tórax para localizar el corazón con el tacto, se limpió con una torunda la zona localizada y se procedió a hacer una punción con una jeringa de 10 mL con aguja de 20 x 32 mm. La sangre extraída se centrifugó durante 20 min a 2800 rpm a 25°C, finalmente se separó el sobrenadante el cual fue alicuotado y conservado a -70°C hasta su uso.

3.3. Titulación de la hemolisina con el suero de cobayo

Se marcaron los tubos de ensayo de 13x100 numerados del 1-24 y se hicieron diluciones de la hemolisina con factor de dilución 2 en solución salina amortiguada de trietanolamina (TBS) en inglés "*Tris- buffered saline*" 1x y gelatina 0.05% (TBS-gelatina), utilizando volúmenes de 125µL, en el tubo número 1 se adicionaron 125µL de hemolisina más 125µL de TBS-gelatina, después al tubo número 2 se le agregaron 125µL de la dilución del tubo anterior más 125µL de TBS-gelatina, realizando el mismo procedimiento con diluciones en serie hasta el tubo 19. Posteriormente al tubo número 20 sólo se le adicionaron 250µL de TBS-gelatina y al tubo número 21 sólo 250µL de la hemolisina sin diluir. A continuación se agregaron a todos los tubos 125µL de una suspensión de eritrocitos de carnero (GRC) lavados previamente con solución salina amortiguada de fosfato (PBS) en inglés "*Phosphate-buffered saline*" 1x y ajustados al 1% en TBS-gelatina; los tubos se incubaron a 37°C con agitación constante a 25 rpm durante 20 min. Transcurrido el tiempo de incubación se adicionó a los tubos del 1 al 20, 125µL de suero de cobayo, fuente de complemento, al tubo número 21 solo se le adicionó TBS-gelatina y nuevamente se incubaron a 37°C con agitación constante a 25 rpm durante 20 min. Posteriormente se agregaron 250µL de TBS-gelatina frío a todos los tubos para detener la reacción y se centrifugaron a 2000 rpm durante 5 min.

Los tubos 20 y 21 corresponden a los testigos del complemento y de la hemolisina respectivamente y al final de la reacción no deben mostrar hemólisis.

El título se expresó como el valor inverso de la máxima dilución del anticuerpo que aún permite que se lleve a cabo la reacción.

➤ Titulación de hemolisina

Realizar diluciones seriadas de hemolisina con factor de dilución 2 en TBS

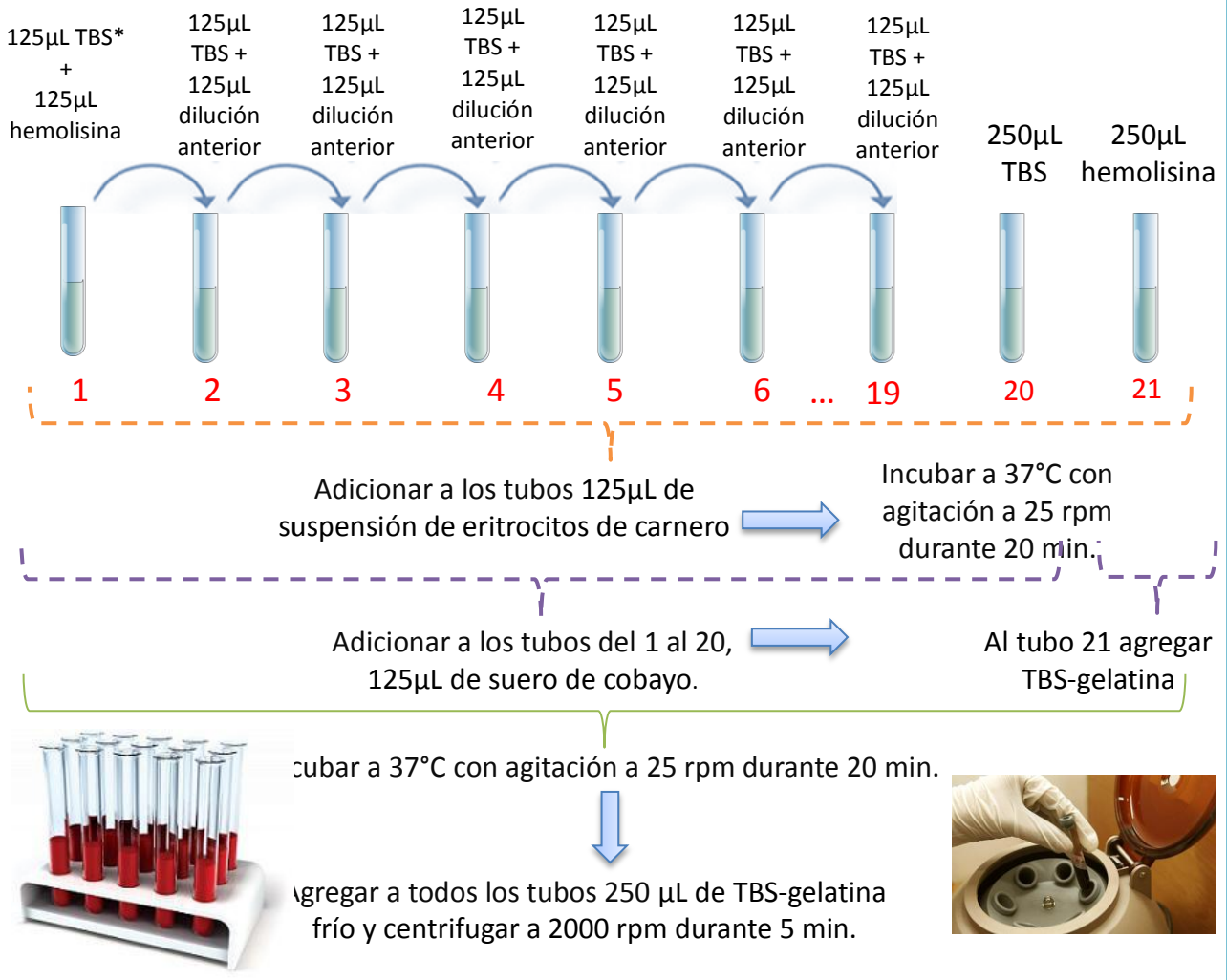


Figura 5. Diagrama de la metodología de la Titulación de la hemolisina con el suero de cobayo

4. ELISA para determinar la presencia de inmunoglobulinas IgG e IgM específicas contra *S. Typhimurium* MDR, EPECa y EAEC en sueros humanos

4.1. Curva de calibración

Para la realización de la técnica de ELISA se utilizaron microplacas de unión de alta afinidad (Corning inc. Costar 3590) de 96 pozos. Estas placas se sensibilizaron durante 18-24 horas a 4°C con 60 µL por pozo de un anticuerpo de captura: anti IgA, IgG e IgM humana (Jackson Inmuno Research No. Cat. 109-006-064) tanto para la curva de IgG como para la IgM. Se probaron dos concentraciones de este anticuerpo de captura, 0.5 y 1 µg/mL en regulador de bicarbonatos (pH 9.6) para estandarizar las dos curvas de calibración, de estas dos concentraciones probadas se decidió utilizar 0.5 µg/mL debido a que se observaba una mejor señal al momento de leer la placa.

Se destinaron los pozos 1 al 8 de las filas A y B de la placa para colocar el anticuerpo de captura; en los siguientes pozos 9A y 9B se colocaron 60µL por pozo de regulador de bicarbonatos (pH 9.6); en los pozos 10A y 10B se colocaron 60µL por pozo de los anticuerpos secundarios anti-IgG (Zymed No. Cat. 62-7120) y anti IgM (Zymed No. Cat. 62-7520) marcados con peroxidasa de rábano (HRP) en inglés "*horseradish peroxidase*" diluido 1:1000 en regulador de bicarbonatos (pH 9.6) y finalmente en los pozos 11A, 11B, 12A, 12B se colocaron 60µL por pozo de inmunoglobulinas puras de humanos: IgG (Sigma Aldrich No. Cat. I2511) e IgM (Sigma Aldrich No. Cat. 18260-IMG) a una concentración de 0.5 µg/mL en regulador de bicarbonatos (pH 9.6) (Figura 7).

Transcurrido el tiempo de sensibilización de las placas se decantó el regulador de bicarbonatos en un solo paso y se lavó la placa 6 veces con 100µL por pozo de PBS1x-Tween 0.1%, agitando levemente y decantando en cada lavado.

Posteriormente se bloqueó la placa con 100 µL por pozo de una solución de albúmina sérica bovina (BSA) 0.1% en PBS1x-Tween 0.1% (solución bloqueadora), durante una hora a 37°C. Al cumplirse este tiempo se lavó la placa

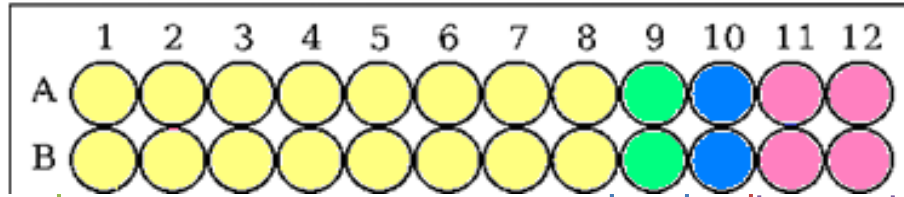
6 veces con 100µL por pozo de PBS1x-Tween 0.1%, se agitó y se decantó.

Para la realización de la curva de calibración se utilizaron inmunoglobulinas puras de humanos: IgG (Sigma Aldrich No. Cat. I2511) e IgM (Sigma Aldrich No. Cat. 18260-IMG), para ambas inmunoglobulinas se realizaron diluciones seriadas iniciando en una concentración de 0.5 µg/mL hasta 0.0002 µg/mL, se colocaron por duplicado 60 µL por pozo de las diluciones correspondientes a las concentraciones de 0.03125 a 0.00024 µg/mL, en los pozos 1 al 8 de las filas A y B de la placa, debido a que en este intervalo de concentraciones se observó un comportamiento lineal en la curva de calibración. La placa se incubó durante 1 hora a 37°C. Posteriormente, se lavó la placa 6 veces con PBS1x-Tween 0.1% agitando levemente y decantando.

Posteriormente se colocaron por pozo 60 µL de los anticuerpos secundarios anti-IgG (Zymed No. Cat. 62-7120) y anti IgM (Zymed No. Cat. 62-7520) marcados con HRP diluido 1:1000 en solución bloqueadora, según corresponda a la curva realizada. Nuevamente se incubó la placa durante una hora a 37°C. Después de este tiempo se lavaron los pozos como se describió anteriormente. Previamente se preparó la solución reveladora con 1.2 mg de ABTS (2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido-sulfónico) 98% (SIGMA, A1888-5G) y 1.2 µL de peróxido de hidrogeno al 30% (SIGMA, H1009-500 mL), por cada 2600 µL de solución reveladora. A los pozos se les adicionó 60 µL de la solución reveladora y la placa se incubó a temperatura ambiente 15 minutos, cubierta de la luz con papel aluminio. Transcurrido el tiempo de incubación se adicionaron 60µL por pozo de una solución de paro de dodecilsulfato sódico (SDS) al 1% y finalmente la placa se leyó en un lector de ELISA (Tecan, sunrise) a una longitud (λ) de 405 nm.

➤ **ELISA. Curva de calibración.**

Sensibilizar la placa de ELISA de 18- 24 hrs a 4°C de la siguiente manera:



60 μ L por pozo del anticuerpo de captura a una concentración de 0.5mg/mL

60 μ L buffer de carbonatos

60 μ L anticuerpo puro

60 μ L anticuerpo anti IgA HRP diluido 1:1000

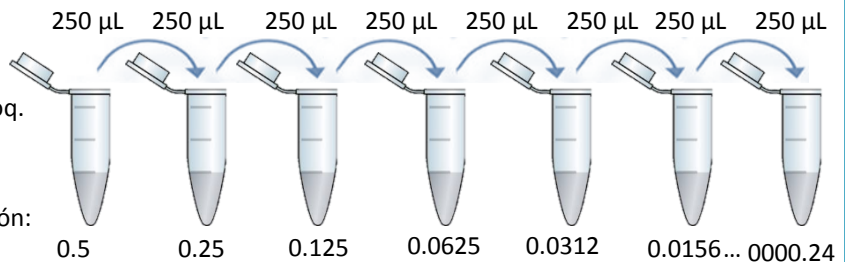
Trascurrido el tiempo decantar el regulador de carbonatos y lavar la placa 6 veces con 100 μ L de PBS-Tween 0.01% por pozo.

Bloquear la placa con 100 μ L por pozo de solución bloqueadora durante 1 ha 37°C y lavar 6 veces con PBS-Tween 0.01%

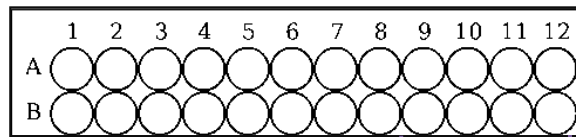
Realizar diluciones seriadas del anticuerpo puro de 0.5 μ g/mL a 0.0002 μ g/mL

Incubar 1 hr. a 37°C y lavar la placa 6 veces con PBS-Tween 0.01%.

500 μ L Sol. Bloq. + 0.25 μ L IgA
Concentración: μ g/mL



Colocar 60 μ L del anticuerpo secundario marcado con HRP diluido 1:1000 en sol. bloqueadora



Incubar 1 hr. a 37°C y lavar la placa con PBS-Tween 0.01%.

Diluciones seriadas

Solución bloqueadora



Adicionar 60 μ L de sol reveladora de ABTS, incubar a temperatura ambiente 15 min cubierto de la luz.

Adicionar 60 μ L de sol de paro de SDS al 1% y leer placa a $\lambda=405$ nm.

Figura 6. Diagrama de la metodología de la técnica ELISA para determinar la presencia de inmunoglobulinas IgG e IgM específicas contra *S. Typhimurium* MDR, EPECa y EAEC en sueros humanos

4.2. Determinación de la presencia de inmunoglobulinas IgG e IgM específicas contra *S. Typhimurium*, EPECa y EAEC en sueros humanos

Una vez estandarizadas las curvas de calibración se procesaron las muestras de sueros humanos. Para estos ensayos se utilizó un ELISA indirecto. Se colocó una concentración de 5×10^8 UFC de *S. Typhimurium*, EPECa o EAEC, pegadas directamente a la placa con regulador de bicarbonatos y se colocaron 60 μ L por pozo de esta suspensión bacteriana, en las filas C a la H, la placa se incubó 1 hora a 37°C. Después de este tiempo en las filas A y B de cada placa se realizó un ELISA tipo sandwich correspondiente a la curva de calibración como se describió previamente, la placa se incubó de 18 a 24 horas a 4°C para sensibilizarla. Transcurrido el tiempo de sensibilización se decantó el contenido de la placa, se lavó 6 veces con PBS1x-Tween 0.1% y se bloqueó con solución bloqueadora durante 1 hora a 37°C. Después del tiempo de incubación se decantó el contenido de la placa y se lavó 6 veces con PBS1x-Tween 0.1%.

Se realizaron las diluciones correspondientes a la curva de calibración como se describió anteriormente y se hicieron diluciones seriadas de los sueros en solución bloqueadora, para IgM se utilizaron diluciones seriadas en el intervalo de 1:10 a 1:1280 y para IgG se utilizaron diluciones seriadas en el intervalo de 1:500 a 1:64000 y se colocaron en los pozos correspondientes. Nuevamente se incubó 1 hora a 37°C. Transcurrido este tiempo de incubación se decantó el contenido y se lavó 6 veces con PBS1x-Tween 0.1% y se colocó el anticuerpo de anti IgG-HRP o anti IgM-HRP según corresponda en una dilución de 1:1000 en los pozos correspondientes a la curva y a los pozos problema. Se incubó durante 1 hora a 37°C. Transcurrido este tiempo se lavaron nuevamente los pozos, se adicionaron 60 μ L por pozo de la solución reveladora y se incubó la placa cubierta de la luz a temperatura ambiente 15 minutos, posteriormente se adicionaron 60 μ L por pozo de una solución de paro de SDS al 1% y finalmente la placa se leyó en un lector de ELISA (Tecan, sunrise) a una longitud de onda (λ) de 405 nm.

➤ **Determinación de Ac específicos IgM e IgG contra las tres bacterias estudiadas**

Colocar una 60 μL de una suspensión de 5×10^8 UFC de bacteria en las filas C a la H

➔ Incubar 1 hr a 37°C

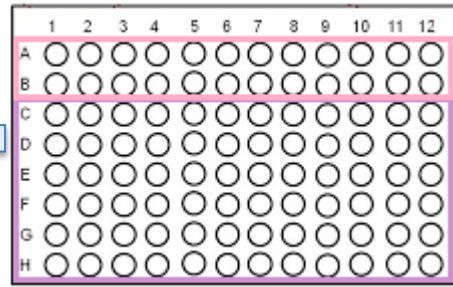
➔ En las filas A y B colocar los reactivos para la primera parte de la curva de calibración.

➔ Sensibilizar la placa de ELISA de 18- 24 hrs a 4°C



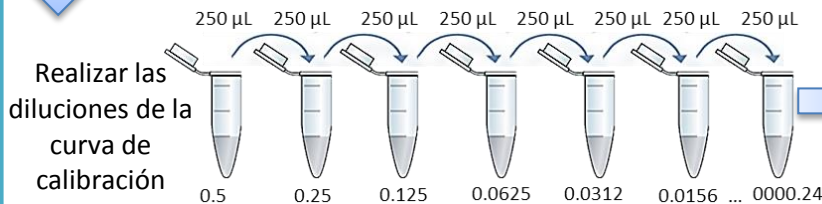
Bloquear la placa con 100 μL por pozo de solución bloqueadora durante 1 ha 37°C y lavar 6 veces con PBS-Tween 0.01%

➔ Transcurrido el tiempo decantar el contenido y lavar la placa 6 veces con 100 μL de PBS-Tween 0.01% por pozo.



Curva de calibración

Suspensión bacteriana



➔ Realizar diluciones seriadas del suero en sol. bloqueadora

IgM 1:10 a 1:1280
IgG 1:500 a 1:64000



➔ Incubar 1 hr a 37°C y lavar la placa 6 veces con PBS-Tween 0.01%.

➔ Colocar 60 μL del anticuerpo secundario marcado con HRP diluido 1:1000 en sol. bloqueadora

➔ Incubar 1 hr a 37°C y lavar la placa 6 veces con PBS-Tween 0.01%.

➔ Adicionar 60 μL de sol reveladora de ABTS, incubar a temperatura ambiente 15 min cubierto de la luz.

➔ Adicionar 60 μL de sol de paro de SDS al 1% y leer placa a $\lambda=405$ nm.



Figura 7. Determinación de la presencia de inmunoglobulinas IgG e IgM específicas contra las bacterias evaluadas

5. Ensayo bactericida de los anticuerpos específicos contra *S. Typhimurium*, EPECa y EAEC en los sueros humanos

Para realizar el ensayo bactericida de los anticuerpos específicos contra *S. Typhimurium*, EPECa y EAEC en los sueros humanos, cada cepa bacteriana a evaluar se sembró por estría cruzada en una placa de agar MacConkey y se incubó a 37°C durante 18 horas. Después se seleccionó una colonia de aproximadamente 2 mm de diámetro y se cultivó en un matraz Erlenmeyer con 5 mL de caldo soya tripticaseína estéril a 37°C durante 18 horas. Posteriormente se transfirió 1 mL de la suspensión bacteriana a un matraz Erlenmeyer con 50 mL de caldo soya tripticaseína estéril, y se homogenizó, después se tomaron dos alícuotas de 1 mL del cultivo, cada mililitro se colocó en una celda, se leyó la densidad óptica en un espectrofotómetro (Smartspec 300, Bio-Rad) a una longitud de onda (λ) de 600 nm. El matraz Erlenmeyer con el cultivo se incubó a 37°C con agitación constante a 180 rpm durante el tiempo en el que se determinó que cada cepa bacteriana alcanza el punto intermedio de la fase logarítmica de la curva de crecimiento, el cual garantiza que la mayoría de las bacterias están vivas en este punto. A continuación se descomplementaron los sueros a evaluar y un tubo de microcentrífuga conteniendo una dilución de suero de cobayo 1:10, incubándolos a 56°C durante 30 minutos en un baño de agua.

Posteriormente se realizaron diluciones seriadas del suero problema en el intervalo 1:200 a 1:32000 en solución salina equilibrada de Hanks' (Gibco 14185-052), se transfirieron 30 μ L de cada una de estas diluciones por duplicado a tubos de microcentrífuga previamente etiquetados. Más tarde se adicionaron aproximadamente 300 bacterias en un volumen de 20 μ L, de la cepa bacteriana a evaluar, para esto se colocó 1mL del medio de cultivo previamente incubado en cuatro tubos de microcentrífuga, se lavaron dos veces con solución salina 0.85% y se resuspendieron en 1mL de solución de Hanks'. A continuación se adicionó 50 μ L de la fuente de complemento (suero de cobayo) diluido 1:10 en solución de Hanks'. Los tubos se incubaron durante 45 min a 37° y 25 rpm. Trascurrido el tiempo de incubación se realizó una dilución 1:5 de los todos los tubos tanto los de

reacción como los controles. Finalmente se vertió todo el contenido de cada tubo en placas con agar soya-tripticaseína, se incubaron a 37 °C durante 14 horas. Se procedió a la cuenta de colonias viables en las placas y se reportaron las unidades formadoras de colonias (UFC) en cada dilución.

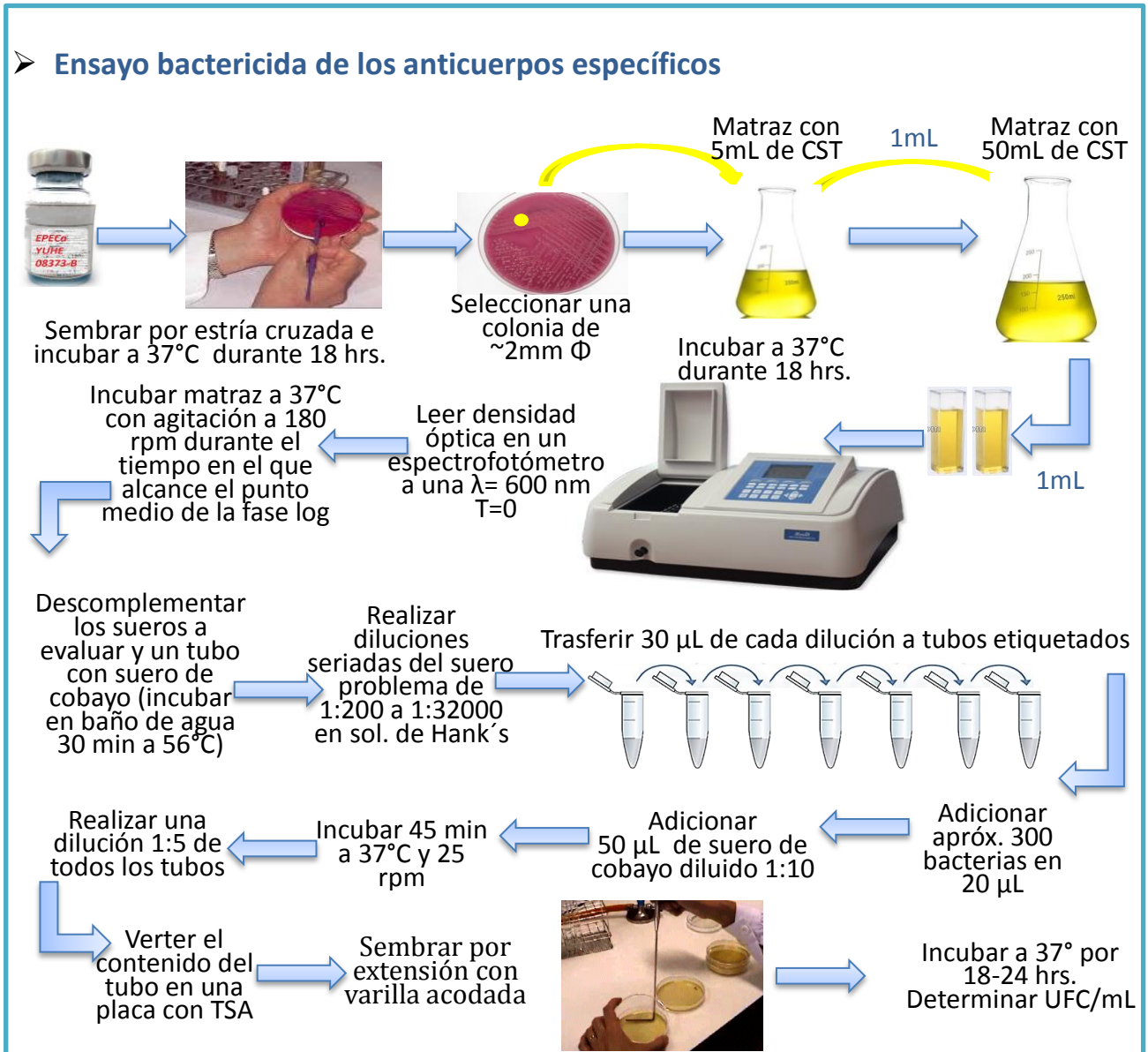


Figura 6. Diagrama de la metodología del Ensayo bactericida de los anticuerpos específicos contra *S. Typhimurium*, EPECa y EAEC en los sueros humanos.

Es importante mencionar que para detectar la sensibilidad bacteriana al complemento y confirmar la validez de la actividad bactericida, en cada ensayo se empleó como control positivo el suero de un ratón inmunizado con *Citrobacter rodentium* obtenido 14 días post-infección cuyo efecto bactericida fue determinado empleando la misma metodología descrita anteriormente. Además se emplearon cuatro controles negativos conformados de la siguiente manera: control de células viables (bacterias), control independiente de complemento (bacterias + suero problema), control de suero de cobayo (bacterias + suero de cobayo sin descomplementar) y control de suero de cobayo descomplementado (bacterias + suero problema + suero de cobayo descomplementado).

El porcentaje de bacterias muertas se calculó con base al número de UFC del control negativo (bacteria + Solución Hanks'). Los títulos bactericidas se definieron como el recíproco de la dilución del suero a la que se lisan $\geq 50\%$ de las células.

RESULTADOS

1. Determinación del punto medio de la fase logarítmica de las curvas de crecimiento de cada una de las cepas bacterianas

Se realizaron tres cinéticas de crecimiento de cada cepa por duplicado; las tablas 4, 5 y 6 y los gráficos 1, 3 y 5, muestran la reproducibilidad en los ensayos de las cinéticas de crecimiento de cada una de las cepas bacterianas evaluadas.

De cada curva de crecimiento se determinó por cuenta en placa, las UFC del punto medio de la fase logarítmica de los 3 ensayos que se hicieron por duplicado, para esto se calculó el promedio de UFC/mL de cada curva. Las UFC/mL cuantificadas en el espectrofotómetro el día que realizó la cinética fueron similares a las obtenidas en el plaqueo (ver tablas 4, 5 y 6). Las UFC promedio de los tres ensayos por plaqueo fueron: 1.19×10^9 para *S. Typhimurium*, 1.12×10^9 para EAEC y 1.21×10^9 para EPECa. Estos resultados nos indican que las bacterias estaban viables en este punto de la curva.

Tabla 4. Cinéticas de crecimiento obtenidas a partir del espectrofotómetro a una $\lambda=600\text{nm}$ y determinación del punto medio de la fase logarítmica de la curva de crecimiento de *Salmonella Typhimurium*.

Cinéticas de crecimiento de <i>Salmonella Typhimurium</i>							
	Cinética 1		Cinética 2		Cinética 3		Promedio
Tiempo (min)	Concentración (cel/mL)	Concentración (cel/mL)	Concentración (cel/mL)	Concentración (cel/mL)	Concentración (cel/mL)	Concentración (cel/mL)	Concentración (cel/mL)
0	36500000	36550000	26200000	23850000	28950000	25000000	29508333
30	69400000	72400000	64300000	56200000	56900000	56650000	62641667
60	156500000	158500000	140000000	147000000	146500000	165000000	152250000
80	276500000	273500000	325000000	262500000	271500000	259500000	278083333
100	617000000	627000000	479000000	501000000	641000000	615500000	580083333
120	802000000	795000000	696000000	702500000	947000000	942000000	814083333
140*	1165000000	1150000000	1032000000	1050000000	1165000000	1205000000	1127833333
160	1290000000	1350000000	1425000000	1415000000	1450000000	1515000000	1407500000
180	1565000000	1605000000	1450000000	1455000000	1620000000	1685000000	1563333333
200	1660000000	1690000000	1540000000	1565000000	1700000000	1680000000	1639166667
220	1945000000	1955000000	1720000000	1815000000	1890000000	1890000000	1869166667
240	2020000000	1905000000	1840000000	1855000000	2015000000	2010000000	1940833333
260	1930000000	1950000000	1865000000	1825000000	1990000000	2035000000	1932500000

*Punto medio de la fase logarítmica de la curva de crecimiento de *Salmonella Typhimurium*.

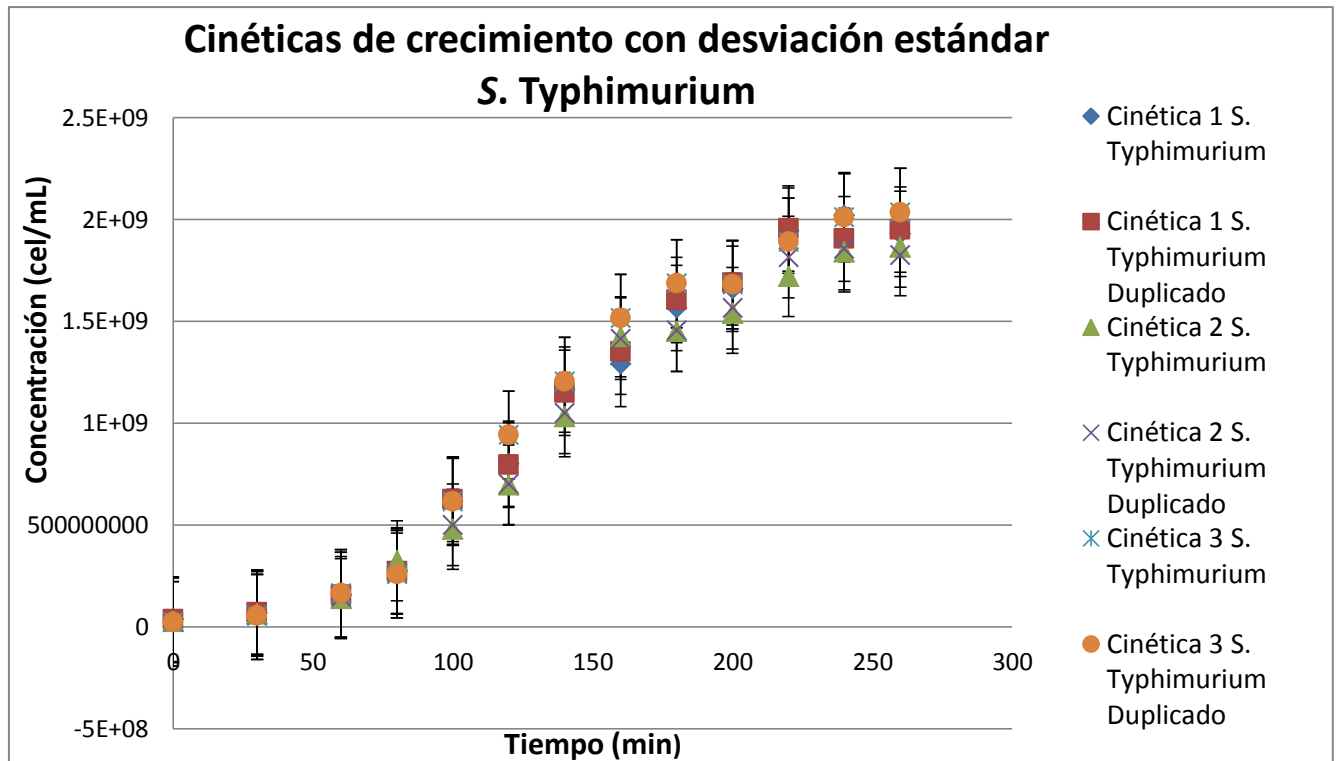


Gráfico 1. Cinéticas de crecimiento de *S. Typhimurium* realizadas por duplicado.

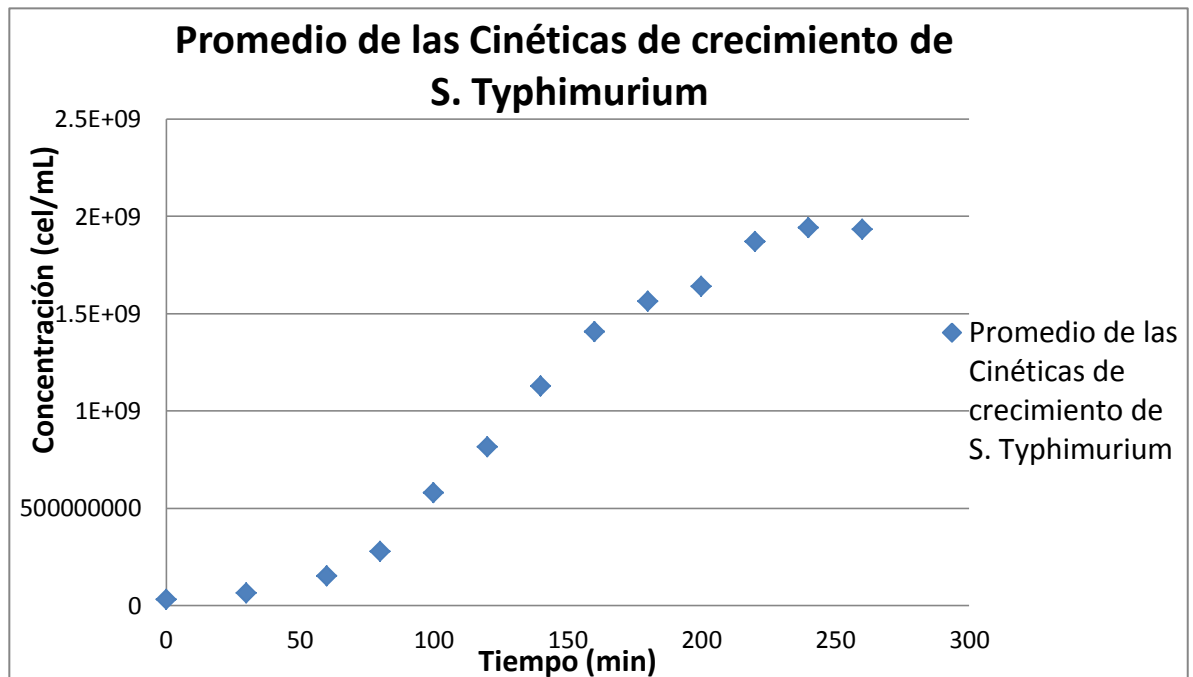


Gráfico 2. Promedio de las tres cinéticas de crecimiento *Salmonella Typhimurium* realizadas por duplicado y determinación del punto medio de la fase logarítmica.

El punto medio de la fase logarítmica de la curva de crecimiento para de *Salmonella Typhimurium* fue a los 140 min, en este punto de la curva las bacterias demostraron estar viables.

Tabla 5. Cinéticas de crecimiento obtenidas a partir del espectrofotómetro a una $\lambda=600\text{nm}$ y determinación del punto medio de la fase logarítmica de la curva de crecimiento de EPECa YUHE 08-273B.

Cinéticas de crecimiento de EPECa YUHE 08-273B							
	Cinética 1		Cinética 2		Cinética 3		Promedio
Tiempo (min)	Concentración (cel/mL)	Concentración (cel/mL)	Concentración (cel/mL)	Concentración (cel/mL)	Concentración (cel/mL)	Concentración (cel/mL)	Concentración (cel/mL)
0	47300000	50550000	33400000	34850000	35300000	37500000	39816667
30	114500000	91850000	62150000	61250000	80350000	73850000	80658333
60	188500000	195000000	134500000	136500000	158000000	156500000	161500000
80	251000000	254000000	227500000	228000000	241000000	238500000	240000000
100	517000000	576500000	434500000	457000000	352500000	353000000	448416667
120	839000000	855000000	682000000	609500000	706500000	739500000	738583333
140 *	1170000000	1210000000	1100000000	1170000000	945500000	1006500000	1100333333
160	1585000000	1635000000	1305000000	1370000000	1270000000	1240000000	1400833333
180	1760000000	1745000000	1625000000	1615000000	1520000000	1505000000	1628333333
200	1890000000	1965000000	1830000000	1870000000	1675000000	1710000000	1823333333
220	2115000000	2035000000	2130000000	2130000000	1950000000	2025000000	2064166667
240	1975000000	1990000000	2010000000	2110000000	2160000000	2030000000	2045833333

*Punto medio de la fase logarítmica de la curva de crecimiento de EPECa YUHE 08-273B.

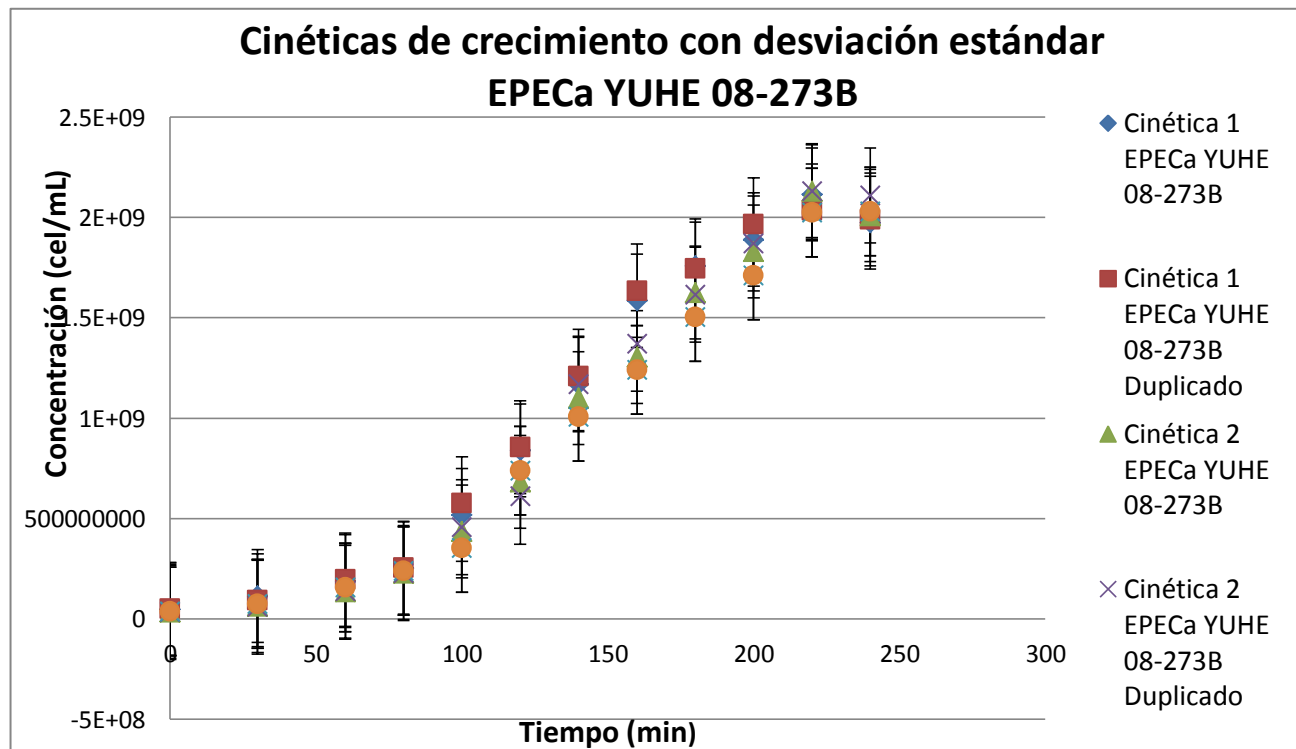


Gráfico 3. Cinéticas de crecimiento de EPECa YUHE 08-273B realizadas por duplicado.

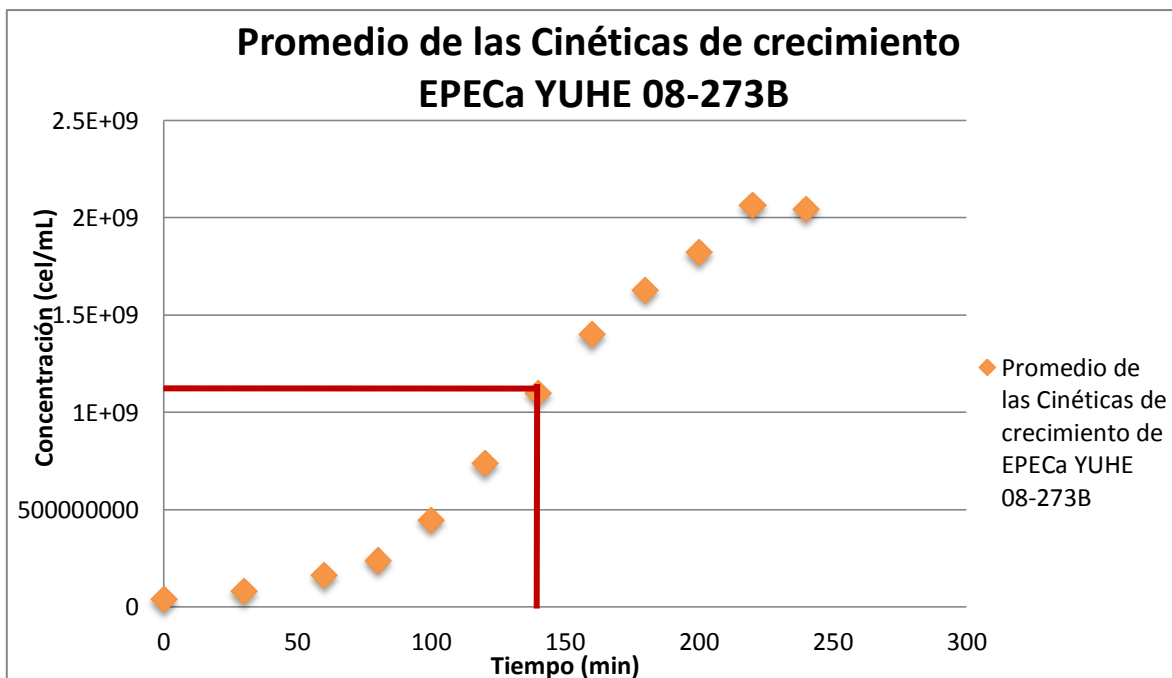


Gráfico 4. Promedio de las tres cinéticas de crecimiento de EPECa YUHE 08-273B realizadas por duplicado y determinación del punto medio de la fase logarítmica.

El punto medio de la fase logarítmica de la curva de crecimiento para de EPECa YUHE 08-273B fue a los 140 min, en este punto de la curva las bacterias demostraron estar viables.

Tabla 6. Cinéticas de crecimiento obtenidas a partir del espectrofotómetro a una $\lambda=600\text{nm}$ y determinación del punto medio de la fase logarítmica de la curva de crecimiento de EAEC YUHE 08-246A.

Cinéticas de crecimiento de EAEC YUHE 08-246A						
	Cinética 1	Cinética 2		Cinética 3		Promedio
Tiempo (min)	Concentración (cel/mL)	Concentración (cel/mL)	Concentración (cel/mL)	Concentración (cel/mL)	Concentración (cel/mL)	Concentración (cel/mL)
0	26200000	20780000	20780000	59400000	61450000	37722000
30	90250000	44200000	44200000	131000000	132000000	88330000
60	201000000	145500000	145500000	318000000	316500000	225300000
80	346000000	280500000	277500000	655500000	644500000	440800000
100	727500000	833500000	812000000	1060000000	1095000000	905600000
120*	1035000000	1140000000	1150000000	1420000000	1425000000	1234000000
140	1500000000	1625000000	1630000000	1660000000	1600000000	1603000000
160	2055000000	1810000000	1790000000	1750000000	1850000000	1851000000
180	2065000000	2000000000	2010000000	2035000000	1990000000	2020000000
200	1995000000	2070000000	2120000000	2250000000	2175000000	2122000000
220	2090000000	2090000000	2115000000	2155000000	2200000000	2130000000
240		2250000000	2215000000	2265000000	2385000000	2278750000

*Punto medio de la fase logarítmica de la curva de crecimiento de EAEC YUHE 08-246A

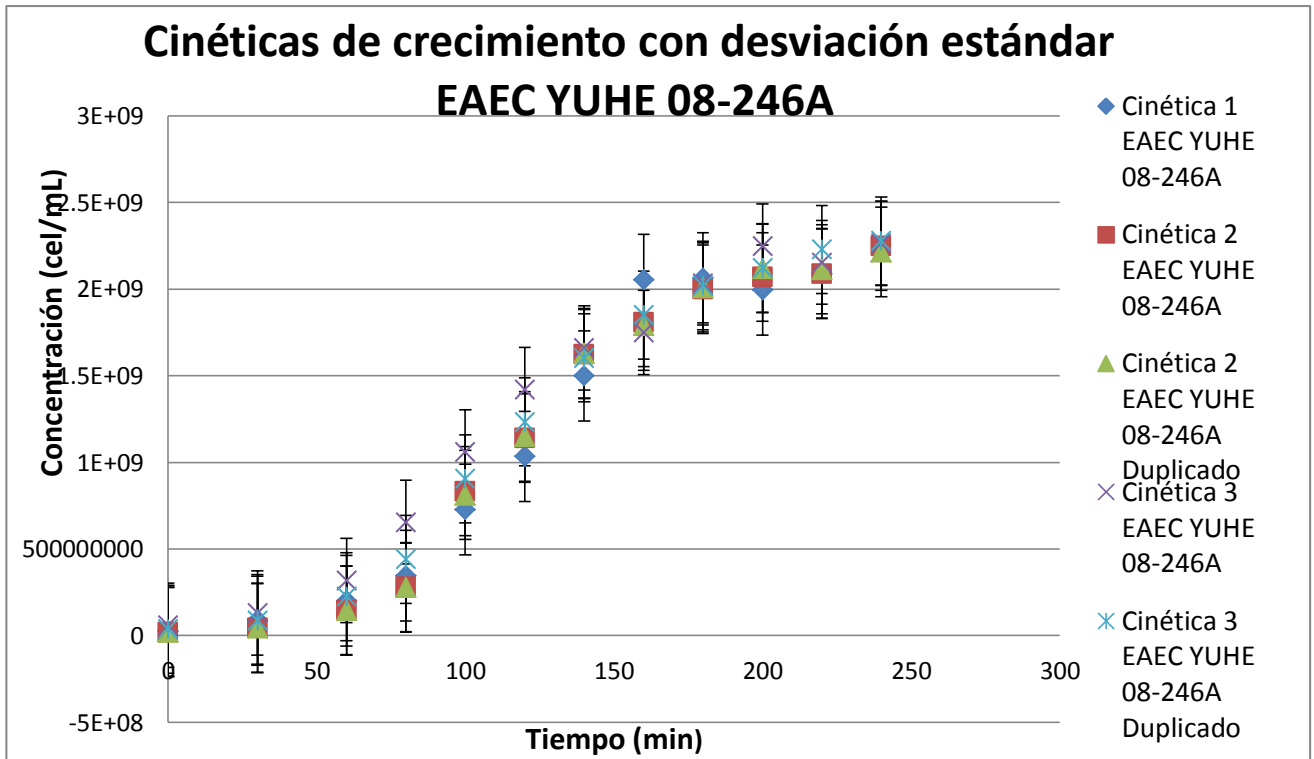


Gráfico 5. Cinéticas de crecimiento de EAEC YUHE 08-246A realizadas por duplicado.

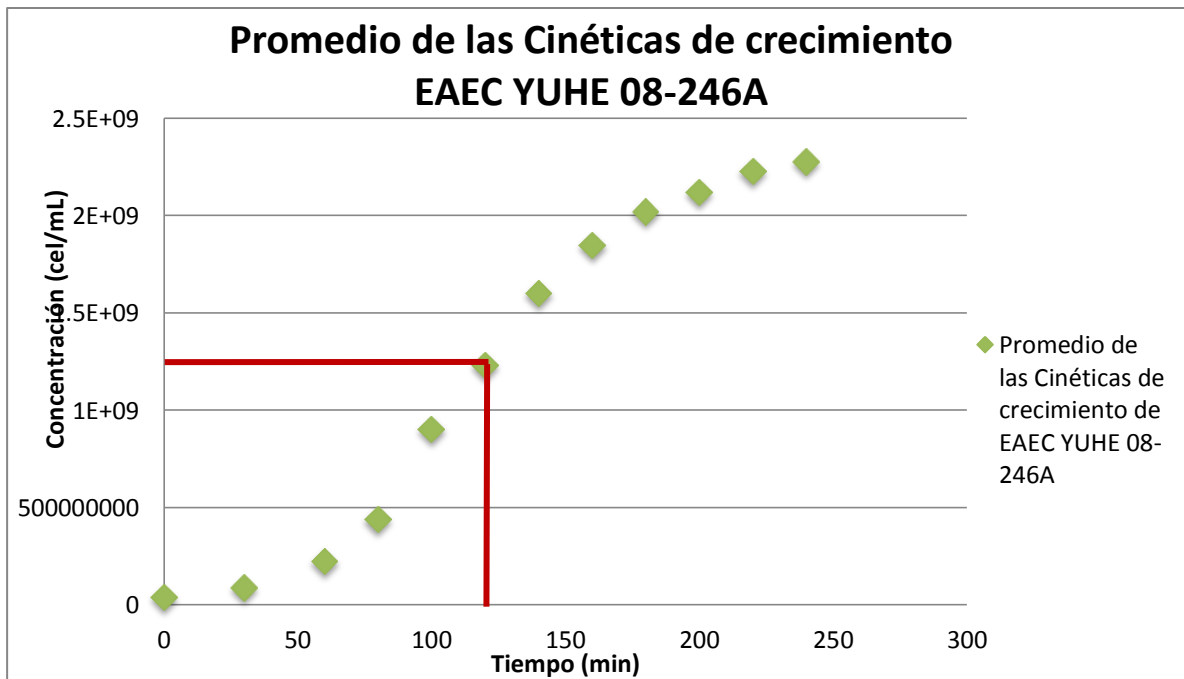


Gráfico 6. Promedio de las tres cinéticas de crecimiento de EAEC YUHE 08-246A realizadas por duplicado y determinación del punto medio de la fase logarítmica.

El punto medio de la fase logarítmica de la curva de crecimiento para de EPECa YUHE 08-273B fue a los 120 min, en este punto de la curva las bacterias demostraron estar viables.

Titulación de la hemolisina con el suero de cobayo

La capacidad funcional del sistema complemento se evaluó a través de su actividad hemolítica, para esto se realizó la titulación de la hemolisina obtenida al inmunizar un conejo con eritrocitos de carnero (ver sección de material y métodos). La titulación se realizó utilizando varias diluciones de hemolisina en presencia de cantidades fijas de suero de cobayo (fuente de complemento), (ver Tabla 7).

Tabla 7. Diluciones de hemolisina evaluadas en titulación con suero de cobayo.

Diluciones realizadas	
T1	1:2
T2	1:4
T3	1:8
T4	1:16
T5	1:32
T6	1:64
T7	1:128
T8	1:256
T9	1:512
T10	1:1024

T11	1:2048
T12	1:4096
T13	1:8192
T14	1:16384
T15	1:32756
T16	1:65536
T17	1:131072
T18	1:262144
T19	1:524288
T20	Control suero de cobayo
T21	Control hemolisina

En la figura 4 se muestran los tubos del ensayo de titulación de hemolisina con el suero de cobayo No.3, ya que este suero fue el único que demostró tener un complemento funcional. El título se expresó como el valor inverso de la máxima dilución del anticuerpo que aún permite que se lleve a cabo la reacción. Resaltado en un cuadro rojo, se muestra el último tubo en donde se observó reacción positiva, es decir hemólisis, correspondiente al tubo No. 8 con la dilución 1:256. Los tubos 20 y 21 corresponden a los testigos del complemento y de la hemolisina respectivamente observando que en el tubo testigo del complemento no presentó hemólisis y en el tubo testigo de hemolisina presentó hemólisis ligera y en los dos hubo formación de botón.

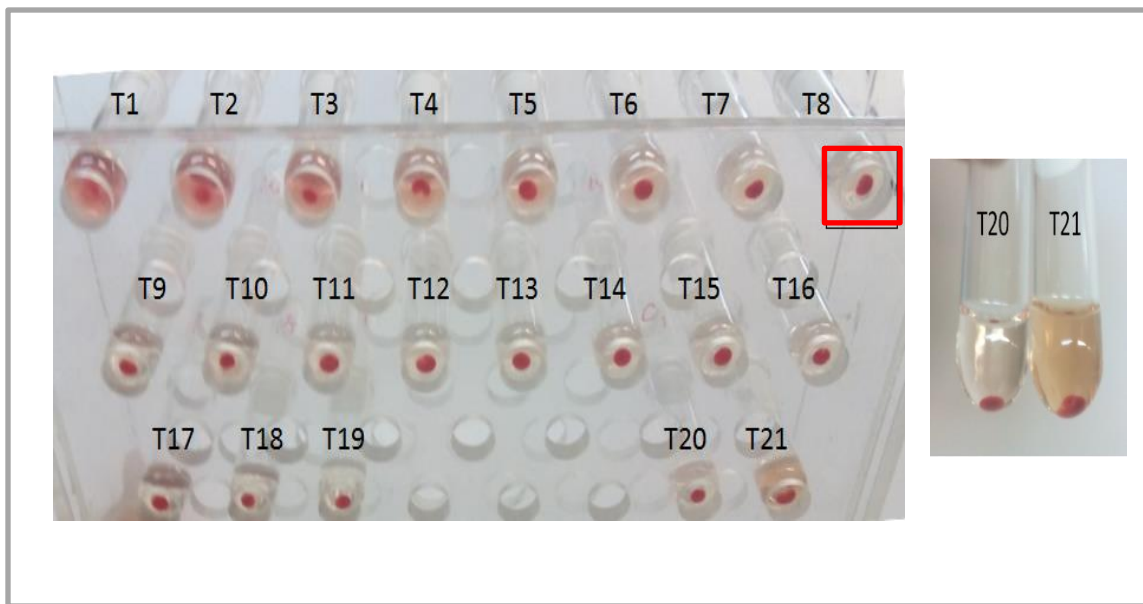


Figura 4. Ensayo de hemolisina. Se muestran los tubos del ensayo de titulación de hemolisina utilizando el suero del cobayo No. 3 y diluciones de la hemolisina (1:2-1:524288) y los tubos 20 y 21 corresponden a los tubos testigos del complemento y la hemolisina respectivamente.

La realización de este ensayo demostró que el suero de este cobayo contiene complemento funcional, el cual se utilizó como fuente exógena de complemento en los ensayos de actividad bactericida.

2. Títulos de las inmunoglobulinas IgM e IgG específicas contra *S. Typhimurium*, EPECa y EAEC en sueros humanos y su efecto bactericida

Como se menciona en la sección de materiales y métodos con base en las concentraciones de IgM e IgG reportadas por Guadarrama Santillán en su tesis de maestría (Guadarrama Santillán, CINVESTAV 2010), se eligieron 10 sueros con concentraciones altas totales de inmunoglobulinas IgM y de IgG, las edades de los sujetos oscilaba entre los 38-77 años, su promedio fue de 57 años y la mediana de 53.5 años. A los 10 sueros se les determinaron nuevamente los títulos de IgM e IgG específicos contra *S. Typhimurium*, EPECa y EAEC sin lisar en una concentración de 1×10^8 por el método de ELISA.

3.1 Títulos de las inmunoglobulinas IgM e IgG específicas contra la cepa de *S. Typhimurium* MDR en sueros humanos y su efecto bactericida

Tabla 8. Títulos de inmunoglobulinas IgM e IgG específicas y bactericidas contra *S. Typhimurium* MDR.

Suero AST 09-	Edad	Títulos (ELISA) <i>S. Typhimurium</i> MDR				Títulos de anticuerpos bactericidas	Log 10 del inverso Títulos de anticuerpos bactericidas
		IgM específica	Log 10 del inverso IgM	IgG específica	Log 10 del inverso IgG		
405	38	1: 320	2.505	1: 16 000	4.204	1: 12 800	4.107
419	45	1: 160	2.204	1: 4 000	3.602	1: 4 000	3.602
426	50	1: 640	2.806	1: 8 000	3.903	1: 4 000	3.602
430	51	1: 320	2.505	1: 4 000	3.602	1: 3 200	3.505
435	53	1: 320	2.505	1: 8 000	3.903	1: 6 400	3.806
436	54	1: 80	1.903	1: 4 000	3.602	1: 2 000	3.301
440	60	1: 160	2.204	1: 16 000	4.204	1: 4 000	3.602
452	69	1: 320	2.505	1: 32 000	4.505	1: 12 800	4.107
454	73	1: 640	2.806	1: 16 000	4.204	1: 6 400	3.806
456	77	1: 320	2.505	1: 32 000	4.505	1: 4 000	3.602

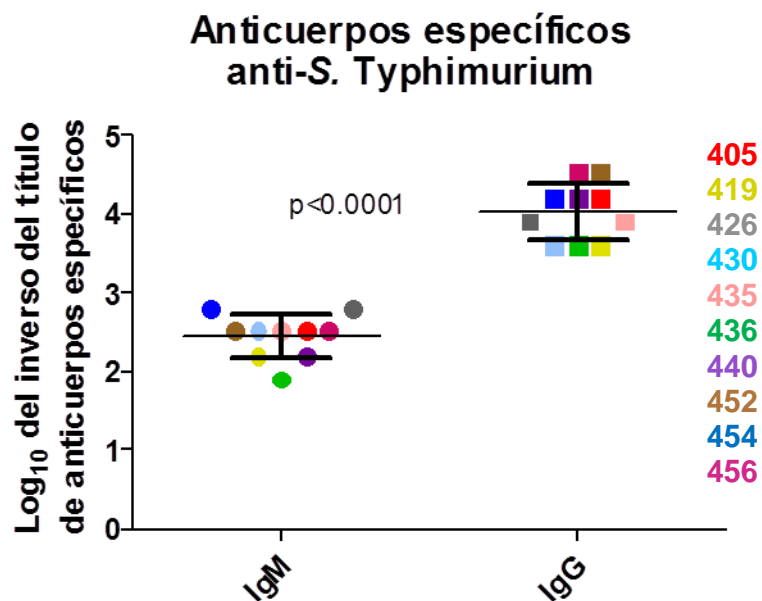


Gráfico 7. Anticuerpos específicos anti-*S. Typhimurium*. Representación del logaritmo base diez del inverso del título de anticuerpos específicos anti-*S. Typhimurium* de las clases IgM e IgG de los 10 sueros evaluados.

En el gráfico 7 se observa que los títulos IgM específicos contra *S. Typhimurium*, fueron significativamente menores ($p < 0.001$) que los títulos de IgG específicos. Destacan los sueros 426 y 454 por sus títulos altos de IgM; además 5 de los sujetos presentaron títulos de IgM iguales a la mediana, 1:320. Con respecto a los títulos de anticuerpos específicos IgG los sueros 452 y 456 fueron los que presentaron los títulos más altos, estos sueros también presentaron títulos de IgM iguales a la mediana; mientras que el suero 436 presentó el título más bajo tanto de IgM como de IgG.

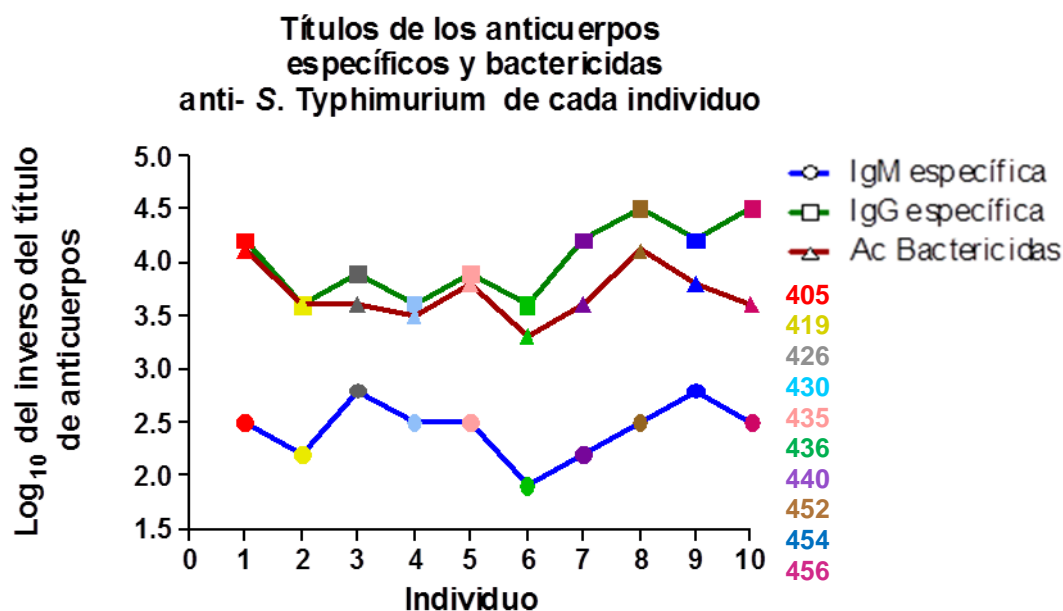


Gráfico 8. Títulos de anticuerpos específicos y bactericidas anti-*S. Typhimurium* de cada individuo. Representación del logaritmo base diez del inverso del título de anticuerpos anti- *S. Typhimurium* de la clase IgG e IgM específicos y bactericidas

En el gráfico 8 se observa que los diez sueros analizados mostraron tener efecto bactericida contra *S. Typhimurium* MDR. Los sueros 452 y 456 que presentaron títulos elevados de anticuerpos IgM e IgG, también fueron los que presentaron los títulos de anticuerpos bactericidas más elevados contra *S. Typhimurium*. Además los sueros 419, 426, 430 y 435 muestran títulos de anticuerpos IgG y bactericidas similares. El suero 436 que presentó los títulos más bajos de anticuerpos IgM e IgG, mostró tener los títulos de anticuerpos bactericidas más bajos.

3.2 Títulos de las inmunoglobulinas IgM e IgG específicas contra la cepa de EPECa YUHE 08-273B en sueros humanos y su efecto bactericida.

Tabla 9. Títulos de inmunoglobulinas IgM e IgG específicas y bactericidas contra EPECa YUHE 08-273B

Suero AST 09-	Edad	Títulos (ELISA) EPECa YUHE 08-273B				Títulos de anticuerpos bactericidas	Log 10 del inverso Títulos de anticuerpos bactericidas
		IgM específica	Log 10 del inverso IgM	IgG específica	Log 10 del inverso IgG		
405	38	1: 640	2.806	1: 8 000	3.903	1: 6 400	3.806
419	45	1: 1 280	3.107	1: 16 000	4.204	1: 12 800	4.107
426	50	1: 1 280	3.107	1: 8 000	3.903	1: 4 000	3.602
430	51	1: 320	2.505	1: 16 000	4.204	1: 12 800	4.107
435	53	1: 320	2.505	1: 32 000	4.505	1: 8 000	3.903
436	54	1: 1 280	3.107	1: 16 000	4.204	1: 8 000	3.903
440	60	1: 640	2.806	1: 16 000	4.204	1: 6 400	3.806
452	69	1: 640	2.806	1: 8 000	3.903	1: 3 200	3.505
454	73	1: 1 280	3.107	1: 64 000	4.806	1: 12 800	4.107
456	77	1: 640	2.806	1: 32 000	4.505	1: 8 000	3.903

Anticuerpos específicos anti-EPECa

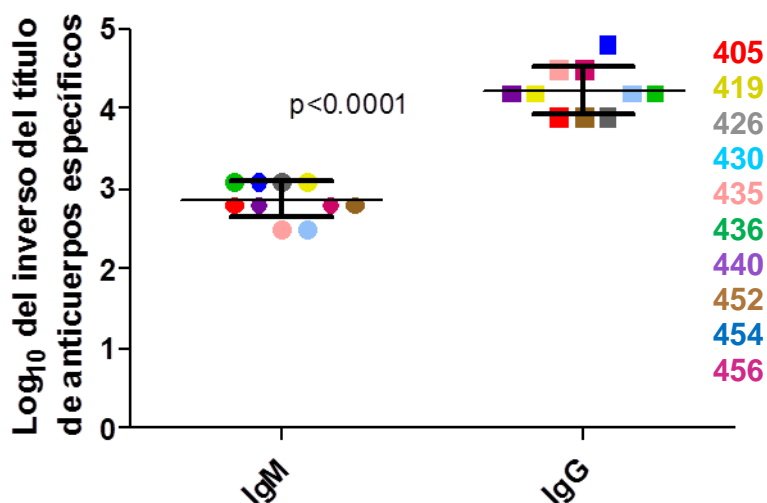


Gráfico 9. Anticuerpos específicos anti-EPECa. Representación del logaritmo base diez del inverso del título de anticuerpos específicos anti-EPECa de las clases IgM e IgG de los 10 sueros evaluados.

En el gráfico 9 se observa nuevamente que los títulos IgM específicos contra EPECa, fueron significativamente menores ($p < 0.001$) que los títulos de IgG específicos. Además la mayoría de los sueros presentaron títulos de anticuerpos específicos IgM en el intervalo de 1:640-1:1280, mientras que los títulos de IgG en el intervalo de 1:8000-1:16000. Asimismo destaca el suero 454 por tener títulos elevados tanto de IgM como de IgG; y los sueros 430 y 435 que tuvieron títulos de IgM por debajo de la mediana.

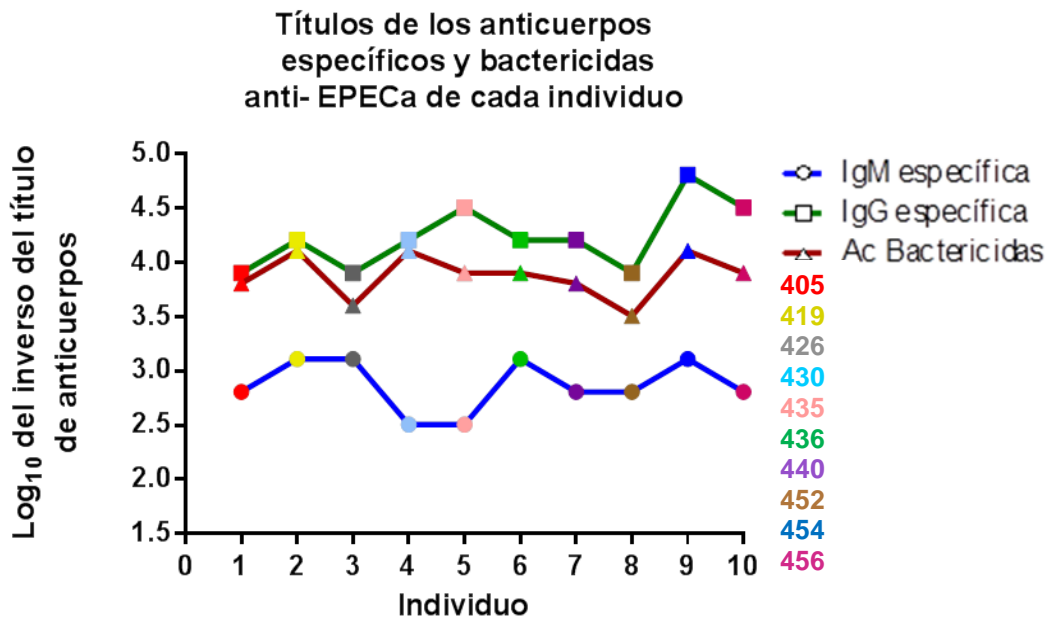


Gráfico 10. Títulos de anticuerpos específicos y bactericidas anti-EPECa de cada individuo. Representación del logaritmo base diez del inverso del título de anticuerpos anti-*S. Typhimurium* de la clase IgG e IgM específicos y bactericidas

En el gráfico 10 se muestra que los diez sueros analizados presentaron efecto bactericida contra EPECa YUHE 08-273B, destacando los sueros 454 y 456, que presentaron títulos elevados de anticuerpos IgM, IgG y bactericidas contra EPECa al igual que para *S. Typhimurium*. Por otra parte los sueros de los individuos 419, 426, 430 y 435 presentaron títulos de anticuerpos IgG y bactericidas contra EPECa similares.

3.3 Títulos de las inmunoglobulinas IgM e IgG específicas contra la cepa de EAEC YUHE 08-246A en sueros humanos y su efecto bactericida

Tabla 10. Títulos de inmunoglobulinas IgM e IgG específicas y bactericidas contra EAEC YUHE 08-246A

Suero AST 09-	Edad	Títulos (ELISA) EAEC YUHE 08-246A				Títulos de anticuerpos bactericidas	Inverso Títulos de anticuerpos bactericidas
		IgM específica	Log 10 inverso IgM	IgG específica	Log 10 inverso IgG		
405	38	1: 320	2.505	1:8000	3.903	1: 4 000	3.602
419	45	1: 160	2.204	1:32000	3.505	1: 2 000	3.301
426	50	1: 320	2.505	1:16000	4.204	1: 8 000	3.903
430	51	1: 160	2.204	1:8000	3.903	1: 6 400	3.806
435	53	1: 1 280	3.107	1:32000	4.505	1: 16 000	4.204
436	54	1: 640	2.806	1:16000	4.204	1: 6 400	3.806
440	60	1: 640	2.806	1:32000	4.505	1: 8 000	3.903
452	69	1: 320	2.505	1:8000	3.903	1: 3 200	3.505
454	73	1: 1 280	3.107	1:64000	4.806	1: 16 000	4.204
456	77	1: 640	2.806	1:16000	4.204	1: 4 000	3.602

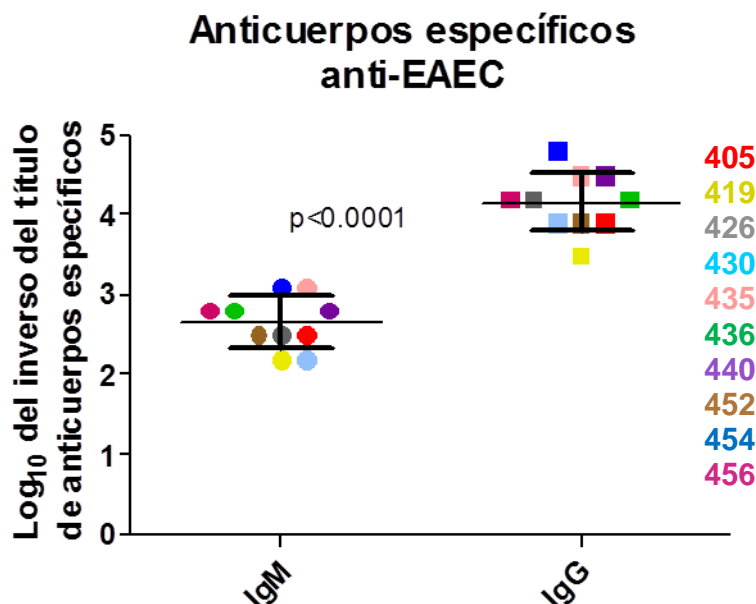


Gráfico 11. Anticuerpos específicos anti-EAEC. Representación del logaritmo base diez del inverso del título de anticuerpos específicos anti-EAEC de las clases IgM e IgG de los 10 sueros evaluados.

En el gráfico 11 se observa de nuevo que los títulos IgM específicos contra EAEC, fueron significativamente menores ($p < 0.001$) que los títulos de IgG específicos. Por otra parte más de la mitad de los sueros presentaron títulos de anticuerpos específicos IgM en el intervalo de 1:320-1:640 y de anticuerpos específicos IgG en el intervalo 1:8000-1:16000. Resalta el suero 454 por tener los títulos más elevados de anticuerpos específicos IgM e IgG. Además el suero 419 presentó los títulos más bajos tanto de IgM como de IgG.

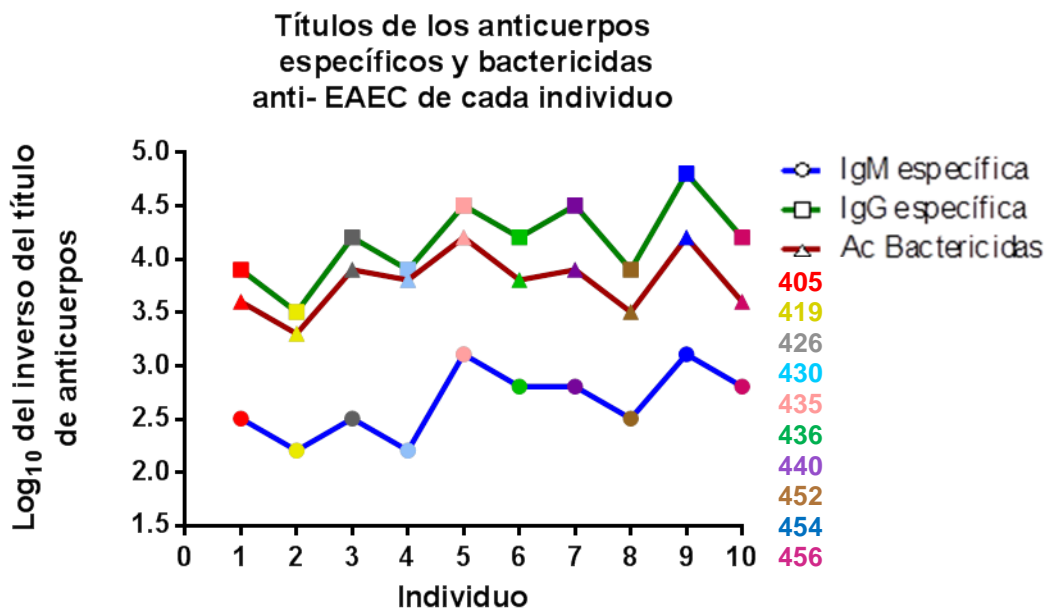


Gráfico 12. Títulos de anticuerpos específicos y bactericidas anti-EAEC de cada individuo.

Representación del logaritmo base diez del inverso del título de anticuerpos anti-EAEC de la clase IgG e IgM específicos y bactericidas.

Como se muestra en el gráfico 12 se observa que los diez sueros analizados mostraron tener efecto bactericida contra EAEC, el suero 454 como se mencionó anteriormente presentó los títulos más altos de anticuerpos IgM, IgG y también bactericidas, al igual que sucedió para EPECa y *S. Typhimurium*. Además resalta los sueros 419, 436 y 430 por sus bajos títulos de anticuerpos IgM, IgG y bactericidas.

Títulos de anticuerpos bactericidas anti- S. Typhimurium, anti-EPECa y anti-EAEC de cada individuo

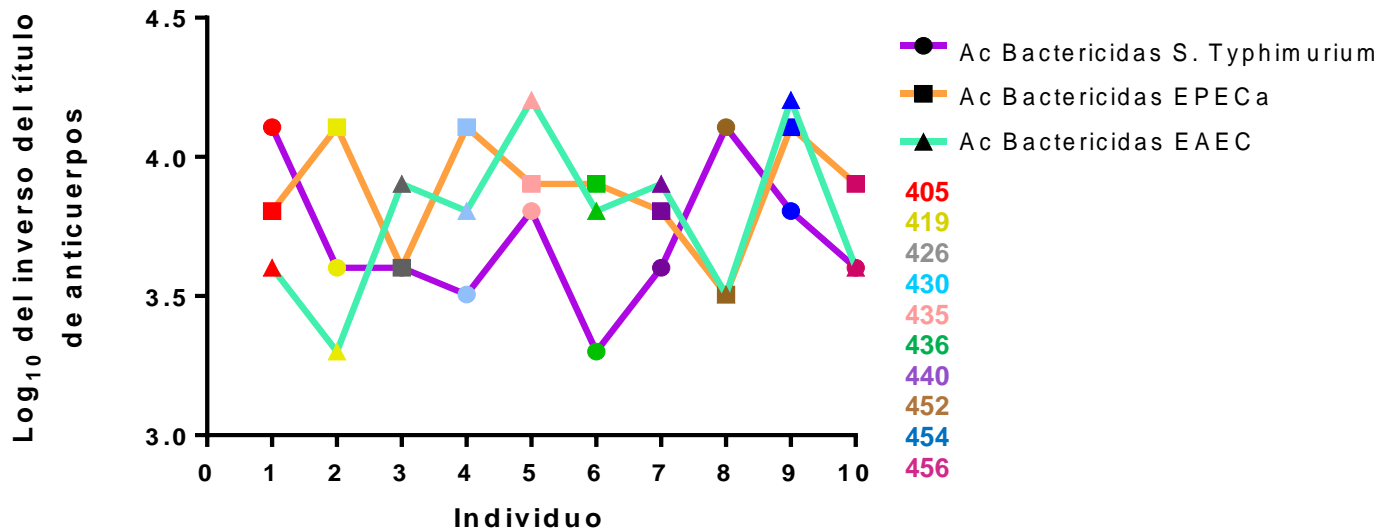


Gráfico 13. Títulos de anticuerpos bactericidas contra S. Typhimurium MDR, EPECa YUHE 08273-B y EAEC YUHE 08-246A de cada individuo.

Representación del logaritmo base diez del inverso del título de anticuerpos bactericidas contra S. Typhimurium MDR, EPECa YUHE 08273-B y EAEC YUHE 08-246A de cada

Al realizar el análisis de los títulos de anticuerpos bactericidas por individuo contra las contra S. Typhimurium, EPECa y EAEC (gráfico 13) se observó que los individuos 436, 440, 452, 454 mostraron títulos similares contra EPECa y EAEC (ver tablas 9 y 10). Sin embargo el individuo 419 presentó títulos de anticuerpos bactericidas muy diferentes para EPECa y EAEC de 1:12800 y 1:2000, respectivamente.

También observamos que el individuo 426 mostró títulos bactericidas de 1:4000 contra S. Typhimurium y EPECa. Mientras que el individuo 456 tuvo títulos de anticuerpos bactericidas de 1:4000 contra S. Typhimurium y EAEC.

Tabla 10. Resumen de los títulos de inmunoglobulinas IgM e IgG específicas y bactericidas contra *S. Thyphimurium*, EPECa y EAEC.

PACIENTES			
Títulos de inmunoglobulinas	<i>S. Thyphimurium</i> Específica	EPECa Específica	EAEC Específica
IgM			
1:80	436		
1:160	419, 440		419, 430
1:320	405, 430, 435, 452, 456	430, 435	405, 426, 452
1:640	426, 454	405, 440, 452, 456	436, 440, 456
1:1280		419, 426, 436, 454	435, 454
IgG			
1:4000	419, 430, 436		
1:8000	426, 435	405, 426, 452	405, 430, 452
1:16000	405, 440, 454	419, 430, 436, 440	426, 436, 456
1:32000	452, 456	435, 456	419, 435, 440
1:64000		454	454
Anticuerpos Bactericidas			
1:2000	436		419
1:3200	430	452	452
1:4000	419, 426, 440, 456	426	405, 456
1:6400	435, 454	405, 440	430, 436
1:8000		435, 436, 456	426, 440
1:12800	405, 452	419, 430, 454	
1:16000			435, 454

DISCUSIÓN

Salmonella enterica serotipo Typhimurium, *Escherichia coli* enteropatógena atípica y *Escherichia coli* enteroagregativa, se encuentran dentro de los principales agentes etiológicos bacterianos asociados a diarrea en niños menores de 5 años en el estado de Yucatán (Patzí, 2015; Zaidi 2012; Patzi 2009; Zaidi, 2008). Sin embargo, se desconoce la epidemiología de estos patógenos en la población adulta de esta región. A pesar del riesgo que estos microorganismos representan para la población, los estudios epidemiológicos de búsqueda intencionada de estos patógenos en diarrea infantil son escasos y en diarrea de adultos son prácticamente nulos. Además hasta el momento no hay ningún reporte de estudios epidemiológicos de seroprevalencia en sujetos asintomáticos, contra estos patógenos en México, por lo que tampoco se ha determinado si los anticuerpos generados tienen efecto bactericida contra estas bacterias.

En el presente trabajo se analizaron 10 sueros de sujetos adultos sanos de Buctzotz, una comunidad agrícola del estado de Yucatán. Se determinaron los títulos de los anticuerpos específicos IgM e IgG contra cada una de las bacterias, *S. Typhimurium*, EPECa y EAEC, las cuales fueron aisladas como agentes causales únicos, en niños yucatecos con diarrea aguda que requirieron hospitalización. Los diez sueros tuvieron anticuerpos de ambas clases contra las tres bacterias, indicando que los diez sujetos estuvieron expuestos a estos patógenos, ya que la presencia de anticuerpos específicos contra un microorganismo en el suero de un individuo es un indicador de que éste ha sido expuesto a una infección clínica o subclínica del patógeno (Abbas, 2004). Los títulos de IgM e IgG contra estos patógenos en los individuos que no tenían enfermedad, siempre mostraron ser más elevados contra IgG sugiriendo una infección secundaria. Puesto que los niveles de anticuerpos IgM específicos en una infección primaria alcanzan un pico aproximadamente a las 2 semanas después de la infección y luego generalmente disminuye a niveles no detectables; y los títulos son significativamente más elevados a los de IgG, debido a que los anticuerpos IgG específicos se empiezan a observar después de la primera semana de enfermedad e incrementan lentamente y su decaimiento es más lento

(S. Vázquez *et al.*, 2007, Sumalee Chanama *et al.*, 2004). Mientras que en una infección secundaria los títulos de anticuerpos IgM específicos son significativamente menores a los de la respuesta primaria; los anticuerpos de la clase IgG, muestran títulos de 100 a 1000 veces mayores comparados con la respuesta primaria, los cuales aparecen a tiempos más cortos que en la infección primaria, y generalmente son estos anticuerpos los que permanecen por tiempos más prolongados, incluso pueden llegar a ser detectados varios años después de la infección aunque en títulos más bajos (S. Vázquez *et al.*, 2007, Sumalee Chanama *et al.*, 2004, Cedré *et al.*, 2012).

Por otro lado los títulos de los anticuerpos específicos IgM contra EPECa fueron los más altos prácticamente en todos los sujetos, ya que el 70% tuvieron títulos $\geq 1:640$, y estos títulos sólo los presentaron el 50% y 20% de los sujetos contra EAEC y *S. Typhimurium*, respectivamente (Tabla 11). Estos resultados sugieren que a la bacteria a la que más recientemente habían estado expuestos estos 10 sujetos era EPECa. Por otro lado el 70% de los sujetos tuvieron títulos de IgG $\geq 1:16000$ contra EPECa y EAEC; y 50% contra *S. Typhimurium*. Estos datos en su conjunto indican que a la bacteria que menos han estado expuestos recientemente estos sujetos es a *S. Typhimurium*. Por otro lado como se observa en los gráficos 7, 9 y 11 los sueros que presentaron los títulos más altos de IgM específicos contra *S. Typhimurium* fueron los sueros 426 y 454, para EPECa 436 y 454; y para EAEC los sueros 436 y 454. El suero del sujeto 454 mostró los títulos más elevados de IgG contra las tres bacterias, lo cual sugiere que este individuo ha tenido una exposición reciente a estas tres bacterias. Anteriormente ya se ha documentado que esta zona es endémica para *Salmonella*, ya que ha reportaron que el 75% de la carne cruda que se vende para consumo en Buctzotz y el 4.5% de la comida rápida lista para su consumo están contaminadas con *Salmonella* (Zaidi *et al.*, 2012). Así como, que la incidencia anual de gastroenteritis por *Salmonella* es del 17.8 por cada 100 niños menores de 30 meses de edad y de 7.9 por cada 100 personas mayores de 69 años (Zaidi *et al.*, 2012; Zaidi *et al.*, 2008). Mientras que nuestro laboratorio puso en evidencia que los grupos de *E. coli* diarreogénicos son los agentes patógenos recuperados con mayor frecuencia

en los niños con diarrea de Bucztotz (10.3%), de estos grupos de *E. coli* diarreogénicos EAEC y EPECa fueron el segundo y el tercer patotipo más frecuentemente identificado en los niños con diarrea en Bucztotz (Patzl, 2009).

Hasta el momento solo se han demostrado anticuerpos específicos contra algunas de las moléculas características de EPEC y EAEC. Para EAEC se han reportado anticuerpos específicos contra dispersina, y sus toxinas pet y pic en individuos que han cursado con una infección por esta bacteria; así como también anticuerpos anti-pet en niños sin diarrea (Bellini *et al.*, 2005). Sin embargo, no se han reportado estudios que evalúen anticuerpos contra la bacteria completa. Los anticuerpos específicos en suero contra factores de virulencia de EPEC (pili BfpA, intimina, proteínas EspA y EspB) han sido reportados en población infantil de Brasil (Martinez *et al.*, 1999) que ha cursado con una infección natural por EPEC. En México también se han determinado anticuerpos contra el pili BfpA, intimina, proteínas EspA y EspB en mujeres en puerperio mediato y en neonatos sanos (Parissi-Crivelli *et al.*, 2000).

Solo los sujetos 405 y 454 (20%) mostraron los mismos títulos de IgM e IgG específicos contra EPECa y EAEC, el resto de los sujetos tuvieron títulos diferentes contra estas bacterias. Considerando que esto es una ventana en el tiempo y que se está evaluando contra cada bacteria el mismo suero bajo las mismas condiciones, se sugiere que en realidad los anticuerpos que se generan contra los dos patotipos de *E. coli* tal parece que no identifican los mismos epítomos, al menos no la mayoría de los inmunodominantes. En un estudio utilizando los sueros de niños y de adultos mexicanos sanos, se demostró que sólo el 20% de las muestras estudiadas reaccionaron simultáneamente a los LPS de *E. coli* O157, O7 y O116 (Navarro *et al.*, 2003).

Zapata Quintanilla y colaboradores evaluaron los niveles de anticuerpos séricos IgG e IgM anti-EHEC O157: H7, anti-EHEC O111: H-, anti-EPEC O111: H- y los niveles de anticuerpos anti-LPS O111, LPS O157 y LPS O55 en adultos sanos que viven en Sao Paulo, Brasil. Se confirmó la presencia de anticuerpos séricos anti-bacterianos y anti-LPS. Las concentraciones de IgM anti-LPS fueron

significativamente mayores que las de IgG, y las concentraciones de anti-LPS O157 fueron altas en vista del aislamiento poco frecuente de las bacterias O157 en Brasil. Estos resultados sugieren que existe una inmunidad de reacción cruzada a EHEC en la población brasileña, que puede ser el resultado de la inmunidad a antígenos de EPEC (Zapata- Quintanilla *et al.*, 2006). Además se ha mostrado que la exposición a *E. coli* O157 con el entorno agrícola, en particular con el contacto constante con el ganado vacuno induce una inmunidad adquirida contra este patógeno (Quillan, 2012).

Al realizar el ensayo de ELISA de los sueros de individuos pertenecientes a Buctzotz obtuvimos que todos los sueros estudiados tienen anticuerpos específicos contra *S. Typhimurium*, EAEC y EPECa, sin embargo, con el ensayo de ELISA no se pueden predecir las características funcionales de los anticuerpos específicos identificados (Montzouros y Howell, 2000). El ensayo de actividad bactericida del suero dependiente de anticuerpos mediado por el complemento, se considera el ensayo de elección *in vitro* para determinar la presencia de anticuerpos con actividad bactericida (Montzouros y Howell, 2000). Al evaluar los 10 sueros de los sujetos sanos de Buctzotz en el ensayo bactericida se observó que todos los sueros tuvieron efecto bactericida contra las tres bacterias evaluadas. Los títulos de los anticuerpos bactericidas fueron menores que los títulos de anticuerpos específicos, esto nos indica que no todos los anticuerpos específicos tienen la misma actividad bactericida (Montzouros y Howell, 2000).

Hasta el momento solo se han documentado anticuerpos bactericidas anti-*S. Typhimurium* (MacLenann *et al.*, 2008, Trebicka *et al.*, 2013; Guadarrama 2010) este es el primer trabajo en donde se demuestran anticuerpos bactericidas contra EPECa y EAEC. MacLenann y colaboradores en el año 2008 analizaron los sueros de 64 niños sanos de Malawi y se observó que la mayoría de los niños mayores de 16 meses tenían anticuerpos séricos IgM e IgG específicos anti-*S. Typhimurium* con actividad bactericida dependiente del complemento, pero que la mayoría de los niños sanos por debajo de esta edad no presentaban anticuerpos específicos contra *Salmonellas no-typhi* (SNT) y no mostraron actividad

bactericida, contra *S. Typhimurium* (MacLenann et al., 2008). Trebicka y colaboradores en 2013, evaluaron en Estados Unidos, en donde se tiene una prevalencia de la enfermedad causada por un SNT considerablemente menor a la de Malawi (alrededor de 1,4 millones de infecciones y 400 muertes por año), la actividad bactericida sérica contra *S. Typhimurium* en niños y adultos sanos en Boston, confirmaron algunas de las observaciones que ya se habían visto en los niños de Malawi, ya que mostraron una amplia prevalencia de anticuerpos específicos, con actividad bactericida y su incremento con respecto a la edad (Trebicka et al., 2013). Nuestro grupo de trabajo también demostró anticuerpos específicos contra *S. Typhimurium*, EPECa y EAEC, en un grupo más amplio de 100 sueros de adultos y 9 sueros de niños sanos de Buctzotz, Yucatán; y la actividad de los anticuerpos específicos contra *S. Typhimurium* en 45 sueros (Guadarrama, 2010). De los grupos de *E. coli* diarreogénicos solo se ha reportado altos niveles de IgG anti-LPS O157 de *E. coli* con actividad bactericida en el suero de adultos y niños de 2 a 5 años, vacunados con el LPS O157 conjugado a una proteína acarreadora (Chen Szu & Ahmed, 2015).

Considerando que la actividad bactericida en humanos esta mediada por los isotipos IgM e IgG (IgG1, IgG3 y en menor grado IgG2), estos isotipos llevan a cabo su función activando la vía clásica del complemento que se inicia cuando el componente C1q se une específicamente a la región constante (Fc) de un anticuerpo, unido a un antígeno de la superficie celular (Chatterjee et al., 2006). Con respecto a las bacterias se ha documentado que los anticuerpos que inducen lisis bacteriana de SNTs van dirigidos contra proteínas de membrana externa (PME) (Siggins et al., 2011) y que la PME OmpD de estas SNTs tiene una gran homología con: la porina OmpC de *S. Typhi*, la NmpC de *E.coli* (75%), la OmpC de *S. Typhimurium* (68%) y la porina Lc del bacteriófago PA-2 (75%); inclusive se ha reportado reacción cruzada de anticuerpos anti-OmpD con algunas de las proteínas ya mencionadas debido a que existen epítomos externos que están muy conservados en la familia *Enterobacteriaceae* (Singh 1996). Esto podría explicar que en nuestros resultados observamos que los individuos 405, y 454 mostraron los mismos títulos específicos para IgM e IgG contra EPECa y EAEC, lo cual

puede sugerir que estas dos bacterias comparten antígenos, pero no todos ya que el 80% de los sujetos muestran títulos diferentes.

Finalmente este proyecto destaca la importancia de realizar estudios seroepidemiológicos en poblaciones endémicas para bacterias diarrogénicas en nuestro país, debido a que particularmente la prevalencia de los agentes etiológicos causantes de diarrea prácticamente no se conocen en población adulta. Además los estudios de seroprevalencia nos aportan información sobre las infecciones que se han tenido debido a un patógeno en determinada zona geográfica y a través de los datos obtenidos por esta vía, se puede identificar la presencia los factores de riesgo y las medidas preventivas para disminuir la frecuencia de infección.

CONCLUSIONES

- Los sueros evaluados de individuos pertenecientes a la región de Buctzotz, Yucatán, presentan títulos de anticuerpos específicos IgG significativamente mayores que IgM contra *Salmonella enterica* serotipo Typhimurium, *Escherichia coli* enteropatógena atípica y *Escherichia coli* enteroagregativa.
- Los anticuerpos específicos IgM e IgG contra las tres bacterias estudiadas tienen actividad bactericida dependiente de la activación de la vía clásica del complemento. Lo cual había sido demostrado con anterioridad para *Salmonella* Typhimurium pero no para, *Escherichia coli* enteropatógena atípica y *Escherichia coli* enteroagregativa.
- Los títulos de anticuerpos específicos IgM e IgG contra *Salmonella enterica* serotipo Typhimurium, *Escherichia coli* enteropatógena atípica y *Escherichia coli* enteroagregativa no presentaron correlación con los títulos de anticuerpos bactericidas contra estas tres bacterias.
- Los individuos pertenecientes a la comunidad de Buctzotz, Yucatán se encuentran permanentemente en contacto con *Salmonella enterica* serotipo Typhimurium, *Escherichia coli* enteropatógena atípica y *Escherichia coli* enteroagregativa; lo que pudiera estar induciendo un estado de protección contra estas tres bacterias.

REFERENCIAS

A. Boutonnier, B. Dassy, R. Dumenil, A. Guenole, M. Ratsitorahina, R. Migliani, et al., (2003). A simple and convenient microtiter plate assay for the detection of bactericidal antibodies to *Vibrio cholerae* O1 and *Vibrio cholerae* O139. *J. Microbiol. Methods* 55.

Abonce, Maricela. (2006). Prevalencia de cuatro grupos de *Escherichia coli* que causan diarrea, en niños menores de dos años de una comunidad conurbada de la Ciudad de México. *Tesis*. Universidad Nacional Autónoma de México.

Ahs, J. W., Tao, W., Löfgren, J., & Forsberg, B. C. (2010). Diarrheal diseases in low-and middle-income countries: incidence, prevention and management. *Open Infectious Diseases Journal*, 4(1), 113-24.

Alvarado EC., Sethi S., Janitschke K. (2002). Comparison of two commercially available acidity test for toxoplasma- specific IgG antibodies. *Archives of Medical Research*. 33:520-523.

Alonzo Salomón, J., & Acosta Maya, A. (2003). Impacto de las condiciones de abastecimiento y utilización del agua sobre la incidencia de diarrea en niños de la comunidad de Celestún. *Ingeniería*, 7(3).

Amela, C., & Pachón, I. (2000). Estudio seroepidemiológico: Situación de las enfermedades vacunables en España. *Instituto de Salud Carlos III*.

Amir J, Louie L, Granoff DM (2005) Naturally-acquired immunity to *Neisseria meningitidis* group A. *Vaccine* 23: 977–83.

Anexo estadístico. Quinto Informe de Gobierno Presidencial 2016-2017.

Anjum, M. F., Marooney, C., Fookes, M., Baker, S., Dougan, G., Ivens, A., & Woodward, M. J. (2005). Identification of core and variable components of the *Salmonella enterica* subspecies I genome by microarray. *Infection and immunity*, 73(12), 7894-7905.

Bellini M.E., . Elias A. T., Gomes TL., Tanaka, Taddei R.C., Huerta R., Navarro G.F., Martinez B. M., (2005) Antibody response against plasmid-encoded toxin (Pet) and the protein involved in intestinal colonization (Pic) in children with diarrhea produced by enteroaggregative *Escherichia coli*. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 43(2): 259–264.

Bhan, M. K., Bahl, R., & Bhatnagar, S. (2005). Typhoid and paratyphoid fever. *The Lancet*, 366(9487), 749-762.

Bhan, M. K., Raj, P., Levine, M. M., Kaper, J. B., Bhandari, N., Srivastava, R., ... & Sazawal, S. (1989). Enteroaggregative *Escherichia coli* associated with persistent diarrhea in a cohort of rural children in India. *Journal of Infectious Diseases*, 159(6), 1061-1064.

Boisen N., Krogfelt K., y Nataro J. (2013). Enteroaggregative *Escherichia coli*. Chapter 8 Elsevier. Págs. 247-264. Este es un libro y te falta el título.

Boyd, M. A., Tennant, S. M., Saague, V. A., Simon, R., Muhsen, K., Ramachandran, G., ... Levine, M. M. (2014). Serum Bactericidal Assays To Evaluate Typhoidal and Nontyphoidal *Salmonella* Vaccines. *Clinical and Vaccine Immunology* : CVI, 21(5), 712–721.

Brenner, F. W., Villar, R. G., Angulo, F. J., Tauxe, R., & Swaminathan, B. (2000). *Salmonella* nomenclature. *Journal of clinical microbiology*, 38(7), 2465-2467.

Calva, E. (2007). *Salmonella typhi* y la fiebre tifoidea: de la biología molecular a la salud pública. *Instituto de Biotecnología, UNAM*.

- Calva, J. J., Estrada-Garcia, M. T., Leon, V., Vazquez, G., Figueroa, G., Tollefson, L. (2008). Integrated Food Chain Surveillance System for Salmonella spp. in Mexico. *Emerging Infectious Diseases*, 14(3), 429–435.
- Campellone, K. G., & Leong, J. M. (2003). Tails of two Tirs: actin pedestal formation by enteropathogenic *E. coli* and enterohemorrhagic *E. coli* O157: H7. *Current opinion in microbiology*, 6(1), 82-90.
- Caron, E., Crepin, V. F., Simpson, N., Knutton, S., Garmendia, J., & Frankel, G. (2006). Subversion of actin dynamics by EPEC and EHEC. *Current opinion in microbiology*, 9(1), 40-45.
- Cedré, Bárbara, & Hernández, Yaremis. (2012). Ensayo bactericida del suero para la evaluación de la respuesta inmune inducida por vacunas antimeningocócicas y anticoléricas. *Vaccinmonitor*, 21(3), 37-46.
- Celli, J., Deng, W., & Finlay, B. B. (2000). Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) attachment to epithelial cells: exploiting the host cell cytoskeleton from the outside. *Cellular microbiology*, 2(1), 1-9.
- Cerna, C.J., (2003). Prevalencia y caracterización molecular de los principales grupos de *Escherichia coli* diarreogénicos, en niños menores de cinco años hospitalizados por diarrea aguda, en la Ciudad de México. *Tesis de Doctorado en Ciencias*, Centro de Investigación y Estudios Avanzados IPN, Departamento de Biomedicina Molecular. Zacatenco.
- Cerna, J. F., Nataro, J. P., & Estrada-Garcia, T. (2003). Multiplex PCR for detection of three plasmid-borne genes of enteroaggregative *Escherichia coli* strains. *Journal of clinical microbiology*, 41(5), 2138-2140.
- Chatterjee, S. N., & Chaudhuri, K. (2006). Lipopolysaccharides of *Vibrio cholerae*: III. Biological functions. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 1762(1), 1-16.
- Clarke, S. C., Haigh, R. D., Freestone, P. P. E., & Williams, P. H. (2003). Virulence of enteropathogenic *Escherichia coli*, a global pathogen. *Clinical Microbiology Reviews*, 16(3), 365-378.
- Clarkson, J. A., & Fine, P. E. (1985). The efficiency of measles and pertussis notification in England and Wales. *International journal of epidemiology*, 14(1), 153-168.
- Clements, A., Young, J. C., Constantinou, N., & Frankel, G. (2012). Infection strategies of enteric pathogenic *Escherichia coli*. *Gut microbes*, 3(2), 71-87.
- Coburn, B., Sekirov, I., & Finlay, B. B. (2007). Type III secretion systems and disease. *Clinical microbiology reviews*, 20(4), 535-549.
- Colón, C. C. T. (2004). Respuesta inmunológica en cerditos recién nacidos de madres vacunadas con las cepas K88, K99, F41 y 987P de *Escherichia coli*. *Tesis doctoral*. Universidad de Puerto Rico, Recinto Universitario de Mayagüez.
- Cravioto, A., Reyes, R. E., Ortega, R., Fernández, G., Hernández, R., & López, D. (1987). Incidencia y etiología de la diarrea aguda durante los primeros dos años de vida de una cohorte de niños rurales. *Bol. Med. Hosp. Infant. Mex*, 44(6), 316-21.
- Croxen, M. A., & Finlay, B. B. (2010). Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. *Nature Reviews Microbiology*, 8(1), 26-38.
- De la Torre Martínez, M., Torre Mañas, M. E., & Tello Bretcha, M. (2006). *Caracterización molecular y fenotípica como herramienta de marcaje epidemiológico para cepas de salmonella de origen porcino*. Tesis doctoral. Universitat Autònoma de Barcelona.

DeVinney, R., Knoechel, D. G., & Finlay, B. B. (1999). Enteropathogenic *Escherichia coli*: cellular harassment. *Current opinion in microbiology*, 2(1), 83-88.

Edwards, P. R., & Ewing, W. H. (1962). Identification of enterobacteriaceae. *Identification of Enterobacteriaceae.*, (2nd Edition).

Elliott, S. J., Hutcheson, S. W., Dubois, M. S., Mellies, J. L., Wainwright, L. A., Batchelor, M., ... & Kaper, J. B. (1999). Identification of CesT, a chaperone for the type III secretion of Tir in enteropathogenic *Escherichia coli*. *Molecular microbiology*, 33(6), 1176-1189.

Elliott, S. J., Wainwright, L. A., McDaniel, T. K., Jarvis, K. G., Deng, Y., Lai, L. C., ... & Kaper, J. B. (1998). The complete sequence of the locus of enterocyte effacement (LEE) from enteropathogenic *Escherichia coli* E2348/69. *Molecular microbiology*, 28(1), 1-4.

Eslava, C., Navarro-García, F., Czczulin, J. R., Henderson, I. R., Cravioto, A., & Nataro, J. P. (1998). Pet, an autotransporter enterotoxin from enteroaggregative *Escherichia coli*. *Infection and immunity*, 66(7), 3155-3163.

Estrada-García, T., Cerna, J. F., Paheco-Gil, L., Velázquez, R. F., Ochoa, T. J., Torres, J., & DuPont, H. L. (2005). Drug-resistant diarrheogenic *Escherichia coli*, Mexico. *Emerging infectious diseases*, 11(8), 1306.

Estrada-García, T., Lopez-Saucedo, C., Thompson-Bonilla, R., Abonce, M., Lopez-Hernandez, D., Santos, J. I., .. & Long, K. Z. (2009). Association of diarrheagenic *Escherichia coli* pathotypes with infection and diarrhea among Mexican children and association of atypical enteropathogenic *E. coli* with acute diarrhea. *Journal of clinical microbiology*, 47(1), 93-98.

Estrada-García, T., Perez-Martinez, I., Bernal-Reynaga, R., & Zaidi, M. B. (2014). Enteroaggregative *Escherichia coli*: a pathogen bridging the north and south. *Current tropical medicine reports*, 1(2), 88-96.

et al., A simple and convenient microtiter plate assay for the detection of bactericidal antibodies to *Vibrio cholerae* O1 and *Vibrio cholerae* O139, *J. Microbiol. Methods* 55 (2003) 745e753.

Fàbrega, A., & Vila, J. (2013). *Salmonella enterica* serovar Typhimurium skills to succeed in the host: virulence and regulation. *Clinical microbiology reviews*, 26(2), 308-341.

Ferreira-Guerrero, E., Mongua-Rodríguez, N., Díaz-Ortega, J. L., Delgado-Sánchez, G., Báez-Saldaña, R., Cruz-Hervert, L. P., ... & García-García, L. (2013). Diarreas agudas y prácticas de alimentación en niños menores de cinco años en México. *salud pública de méxico*, 55, S314-S322.

Flores-Abuxapqui, J. J., Suarez-Hoil, G. D. J., Puc-Franco, M. A., Heredia-Navarrete, M. R., & Franco-Monsreal, J. (1993). Prevalencia de enteropatógenos en niños con diarrea líquida. *Revista latinoamericana de microbiología*, 35(4), 351-356.

García, P. G., Silva, V. L., & Diniz, C. G. (2011). Occurrence and antimicrobial drug susceptibility patterns of commensal and diarrheagenic *Escherichia coli* in fecal microbiota from children with and without acute diarrhea. *The Journal of Microbiology*, 49(1), 46-52.

Gauthier, A., Puente, J. L., & Finlay, B. B. (2003). Secretin of the enteropathogenic *Escherichia coli* type III secretion system requires components of the type III apparatus for assembly and localization. *Infection and immunity*, 71(6), 3310-3319.

Giono Cerezo, S., Escobar Gutiérrez, A., & Valdespino Gómez, J. L. (1994). *Diagnóstico de laboratorio de infecciones gastrointestinales*. Secretaría de Salud.

- Giraldo-Valencia, E. C., Morales-Gallo, M. E., Maya-Guerrero, M. A., Rendón-Castrillón, L. E., ARIAS, C., & ANTONIO, J. (2015). Prevalence of markers of transmissible infections in a blood bank of Antioquia, Colombia, 2010-2013. *CES Medicina*, 29(1), 59-73.
- Girón, J. A., Donnenberg, M. S., Martin, W. C., Jarvis, K. G., & Kaper, J. B. (1993). Distribution of the bundle-forming pilus structural gene (bfpA) among enteropathogenic *Escherichia coli*. *Journal of Infectious Diseases*, 168(4), 1037-1041.
- Gomes, T. A., & Gonzalez-Pedrajo, B. (2010). Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC). *Pathogenic Escherichia coli in Latin America: Betham Science Publishers Ltd*, 25-47.
- González-Pedrajo, B., & Dreyfus, G. (2003). Sistemas de secreción de proteínas en las bacterias Gram negativas: Biogénesis flagelar y translocación de factores de virulencia. *Mensaje bioquímico*, 27.
- Goosney, D. L., DeVinney, R., Pfuetzner, R. A., Frey, E. A., Strynadka, N. C., & Finlay, B. B. (2000). Enteropathogenic *E. coli* translocated intimin receptor, Tir, interacts directly with α -actinin. *Current Biology*, 10(12), 735-738.
- Gordon, M. A. (2011). Invasive Non-typhoidal Salmonella Disease—epidemiology, pathogenesis and diagnosis. *Current opinion in infectious diseases*, 24(5), 484.
- Granoff DM, Harrison LH, Borrow R. Meningococcal vaccines. In: Plotkin SA, Orenstein WA, Offit PA, editors. *Vaccines*. 5th ed. Philadelphia: WB Saunders; 2008. p. 399–434.
- Guadarrama Santillán, A. (2010). Seroprevalencia y caracterización de los anticuerpos contra: Salmonella Enterica Serovar Typhimurium, Escherichia coli, enteropatógena y enteroagregativa, en una población endémica de Yucatán. *Tesis de Maestría*. CINVESTAV Zacatenco.
- Guerrant, R. L., Oriá, R. B., Moore, S. R., Oriá, M. O., & Lima, A. A. (2008). Malnutrition as an enteric infectious disease with long-term effects on child development. *Nutrition reviews*, 66(9), 487-505.
- Hamid, N., & Jain, S. K. (2008). Characterization of an outer membrane protein of Salmonella enterica serovar Typhimurium that confers protection against typhoid. *Clinical and vaccine immunology*, 15(9), 1461-1471.
- Haraga, A., Ohlson, M. B., & Miller, S. I. (2008). Salmonellae interplay with host cells. *Nature Reviews Microbiology*, 6(1), 53-66.
- Harrington, S. M., Dudley, E. G., & Nataro, J. P. (2006). Pathogenesis of enteroaggregative *Escherichia coli* infection. *FEMS microbiology letters*, 254(1), 12-18.
- Hellerud, B. C., Aase, A., Herstad, T. K., Næss, L. M., Kristiansen, L. H., Trøseid, A.-M. S., ... Mollnes, T. E. (2010). Critical Roles of Complement and Antibodies in Host Defense Mechanisms against *Neisseria meningitidis* as Revealed by Human Complement Genetic Deficiencies. *Infection and Immunity*, 78(2), 802–809.
- Henderson IR., Susan H., Navarro G., Waldir P. & Nataro JP. (1999). Involvement of Pet in human intestinal toxicity induced by Enteroaggregative *Escherichia coli*. *Infection and Immunity*, (67), 5338-5344.
- Huang, D. B., Mohanty, A., DuPont, H. L., Okhuysen, P. C., & Chiang, T. (2006). A review of an emerging enteric pathogen: enteroaggregative *Escherichia coli*. *Journal of medical microbiology*, 55(10), 1303-1311.
- Hueck, C. J. (1998). Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. *Microbiology and molecular biology reviews*, 62(2), 379-433.

- Ibarra García, J. A. (1994) Uso de las técnicas de FAS (fluorescent-actin staining) y anaranjado de acridina para visualizar la patogénesis de *Escherichia coli* causantes de diarrea. *Tesis*, IPN-Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. 47.
- Isibasi, A., Ortiz, V., Vargas, M., Paniagua, J., Gonzalez, C., Moreno, J., & Kumate, J. (1988). Protection against *Salmonella typhi* infection in mice after immunization with outer membrane proteins isolated from *Salmonella typhi* 9, 12, d, Vi. *Infection and immunity*, 56(11), 2953-2959.
- Jang, M. S., Sahastrabudhe, S., Yun, C.-H., Han, S. H., & Yang, J. S. (2016). Serum bactericidal assay for the evaluation of typhoid vaccine using a semi-automated colony-counting method. *Microbial Pathogenesis*, 97, 19–26.
- Kaper, J. B., Nataro, J. P., & Mobley, H. L. (2004). Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology*, 2(2), 123-140.
- Kenny, B. (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(4), 1229-1241.
- Kenny, B., DeVinney, R., Stein, M., Reinscheid, D. J., Frey, E. A., & Finlay, B. B. (1997). Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) transfers its receptor for intimate adherence into mammalian cells. *Cell*, 91(4), 511-520.
- Kenny, B., DeVinney, R., Stein, M., Reinscheid, D. J., Frey, E. A., & Finlay, B. B. (1997). Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) transfers its receptor for intimate adherence into mammalian cells. *Cell*, 91(4), 511-520.
- Knutton, S., Rosenshine, I., Pallen, M. J., Nisan, I., Neves, B. C., Bain, C., ... & Frankel, G. (1998). A novel EspA-associated surface organelle of enteropathogenic *Escherichia coli* involved in protein translocation into epithelial cells. *The EMBO journal*, 17(8), 2166-2176.
- Kosek, M., Bern, C., & Guerrant, R. L. (2003). The global burden of diarrhoeal disease, as estimated from studies published between 1992 and 2000. *Bulletin of the World Health Organization*, 81(3), 197-204.
- Leova, P.G. (2007). Etiología de las diarreas agudas en niños menores de 5 años en Tabasco. *Tesis de Doctorado*. Centro de Investigación y Estudios Avanzados IPN, Departamento de Biomedicina Molecular. Zacatenco.
- Liesenfeld O., Montoya JG., Kinney S. (2001). Effect of testing for IgG avity in diagnosis of toxoplasma gondii infection in pregnant women: experience in a US reference laboratory. *J Infect Diseases*. 183: 1248-53
- Machín, A. L. B., González, D. L., García, T. J. M., & de Aparicio, C. Z. M. (2012). Producción de un anticuerpo de conejo anti-glóbulos rojos de carnero para utilizarlo en la valoración de la Actividad Hemolítica del Complemento (CH50). *Gaceta Médica Espirituana*, 4(Supl. 4), 9.
- MacLennan, C. A., Gilchrist, J. J., Gordon, M. A., Cunningham, A. F., Cobbold, M., Goodall, M., ... Molyneux, M. E. (2010). Dysregulated humoral immunity to nontyphoidal *Salmonella* in HIV-infected African adults. *Science (New York, N.Y.)*, 328(5977), 508–512.
- MacLennan, C. A., Gondwe, E. N., Msefula, C. L., Kingsley, R. A., Thomson, N. R., White, S. A., ... Drayson, M. T. (2008). The neglected role of antibody in protection against bacteremia caused by nontyphoidal strains of *Salmonella* in African children. *The Journal of Clinical Investigation*, 118(4), 1553–1562.

- Majowicz, S. E., Musto, J., Scallan, E., Angulo, F. J., Kirk, M., O'Brien, S. J., ... & International Collaboration on Enteric Disease "Burden of Illness" Studies. (2010). The global burden of nontyphoidal Salmonella gastroenteritis. *Clinical Infectious Diseases*, 50(6), 882-889.
- Martínez, P. (2014) Estudio de la capacidad inmunogénica de la porina OmpD de Salmonella Typhimurium. *Tesis de licenciatura*. UNAM. Facultad de Química.
- Martinez MB, Taddei CR, Ruiz-Tagle A, Trabulsi LR, Giron JA. (1999). Antibody response of children with enteropathogenic Escherichia coli infection to the bundle-forming pilus and locus of enterocyte effacement encoded virulence determinants. *J Infect Dis*;179:269-74.
- McDaniel, T. K., Jarvis, K. G., Donnenberg, M. S., & Kaper, J. B. (1995). A genetic locus of enterocyte effacement conserved among diverse enterobacterial pathogens. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(5), 1664-1668.
- McIntosh ED., Bröker M., Wassil J., Welsch JA., Borrow R. (2015). Serum bactericidal antibody assays - The role of complement in infection and immunity. *Vaccine*. 2015 Aug 26;33(36):4414-21.
- Medhane M, Tunheim G, Naess LM, Mihret W, Bedru A, Norheim G, et al. Avidity of IgG antibodies against meningococcal serogroup A polysaccharide and correlations with bactericidal activity in sera from meningitis patients and controls from Ethiopia. *Scand J Immunol* 2014;79(4):267-75.
- Mönkemüller, K. E., & Wilcox, C. M. (2001). Gastrointestinal infections in children. *Current opinion in gastroenterology*, 17(1), 35-39.
- Moon, H. W., Whipp, S. C., Argenzio, R. A., Levine, M. M., & Giannella, R. A. (1983). Attaching and effacing activities of rabbit and human enteropathogenic Escherichia coli in pig and rabbit intestines. *Infection and immunity*, 41(3), 1340-1351.
- Mora, J.F., Ruelas B.E., Tapia R., Castañón R., León M.M. y Guido B. (2002). "Programa Nacional de Salud 2001-2006. Estrategia 2. Reducir los rezagos en salud que afectan a los pobres". Secretaría de Salud.
- Mountzouros, K. T., & Howell, A. P. (2000). Detection of Complement-Mediated Antibody-Dependent Bactericidal Activity in a Fluorescence-Based Serum Bactericidal Assay for Group B Neisseria meningitidis. *Journal of Clinical Microbiology*, 38(8), 2878-2884.
- Murray, P., Rosenthal, K. S., & Pfaller, M. A. (2015). *Microbiología médica*. Elsevier Brasil.
- Nataro, J. P., & Kaper, J. B. (1998). Diarrheagenic escherichia coli. *Clinical microbiology reviews*, 11(1), 142-201.
- Nataro, J. P., Kaper, J. B., Robins-Browne, R. O. Y., Prado, V., Vial, P., & Levine, M. M. (1987). Patterns of adherence of diarrheagenic Escherichia coli to HEp-2 cells. *Pediatr Infect Dis J*, 6(9), 829-831.
- Nataro, J. P., Scaletsky, I. C. A., Kaper, J. B., Levine, M. M., & Trabulsi, L. R. (1985). Plasmid-mediated factors conferring diffuse and localized adherence of enteropathogenic Escherichia coli. *Infection and immunity*, 48(2), 378-383.
- Nataro, J. P., Steiner, T., & Guerrant, R. L. (1998). Enteroaggregative Escherichia coli. *Emerging infectious diseases*, 4(2), 251.
- Nataro, J. P., Yikang, D., Yingkang, D., & Walker, K. (1994). AggR, a transcriptional activator of aggregative adherence fimbria I expression in enteroaggregative Escherichia coli. *Journal of bacteriology*, 176(15), 4691-4699.
- Navarro, A., & Estrada-García, T. (2010). Epidemiology of diarrheagenic Escherichia coli Pathotypes in Mexico, past and present. *Pathogenic Escherichia coli in Latin America*, 1, 191-208.

- Navarro, A., Eslava, C., Garcia-de la Torre, G., León L.A., Licona D., León L., Zarco L. A., Cravioto A. (2007). Common epitopes in LPS of different Enterobacteriaceae are associated with an immune response against Escherichia coli O157 in bovine serum samples. *J Med Microbiol.*; 56: 1447–1454
- Navarro, A., Eslava, C., Hernandez, U., Navarro-Henze, J. L., Aviles, M., Garcia-de la Torre, G., & Cravioto, A. (2003). Antibody Responses to Escherichia coli O157 and Other Lipopolysaccharides in Healthy Children and Adults. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 10(5), 797–801.
- Navarro-García, F., Eslava, C., Villaseca, J. M., López-Revilla, R., Czczulin, J. R., Srinivas, S., ... & Cravioto, A. (1998). In vitro effects of a high-molecular-weight heat-labile enterotoxin from enteroaggregative Escherichia coli. *Infection and immunity*, 66(7), 3149-3154.
- Nisa, S., Scanlon, K. M., & Donnenberg, M. S. (2013). Enteropathogenic Escherichia coli. *Escherichia coli Pathotypes and Principles of Pathogenesis*. Elsevier. 75-119.
- O'Shaughnessy, C. M., Cunningham, A. F., & MacLennan, C. A. (2012). The Stability of Complement-Mediated Bactericidal Activity in Human Serum against Salmonella. *PLoS ONE*, 7(11), e49147.
- Organización Mundial de la Salud 2013. Nota descriptiva núm.330; <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs330/es/> Fecha y hora de consulta: 23/01/17 13:11
- Organización Mundial de la Salud <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/es/>, Fecha y hora de consulta: 23/01/16 16:22
- Ørskov, F., & Ørskov, I. (1984). 2 Serotyping of Escherichia coli. *Methods in microbiology*, 14, 43-112.
- Pallen, M. J., Beatson, S. A., & Bailey, C. M. (2005). Bioinformatics analysis of the locus for enterocyte effacement provides novel insights into type-III secretion. *BMC microbiology*, 5(1), 9.
- Parashar UD, Bresee J, Glass RI: The global burden of diarrhoeal disease in children. *Bulletin of the World Health Organization* 2003; 81: 236.
- Parissii A, Parissi-Crivelli J, Girón J. (2000). Recognition of enteropathogenic Escherichia coli virulence determinants by human colostrum and serum antibodies. *J Clin Microbiol*;38:2696-700.
- Patzi-Vargas, S., Zaidi, M. B., Perez-Martinez, I., León-Cen, M., Michel-Ayala, A., Chaussabel, D., & Estrada-Garcia, T. (2015). Diarrheagenic Escherichia coli Carrying Supplementary Virulence Genes Are an Important Cause of Moderate to Severe Diarrhoeal Disease in Mexico. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 9(3).
- Quilliam, R. S., Chalmers, R. M., Williams, A. P., Chart, H., Willshaw, G. A., Kench, S. M., ... & Jones, D. L. (2012). Seroprevalence and risk factors associated with Escherichia coli O157 in a farming population. *Zoonoses and public health*, 59(2), 83-88.
- Quiroz Sánchez. (1992). Aislamiento de cepas de Escherichia coli productoras de enterotoxinas termoestable B a partir de lechones con y sin diarrea, México. *Tesis (Químico Bacteriólogo Parasitólogo)*. IPN, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. 32.
- Reddy, E. A., Shaw, A. V., & Crump, J. A. (2010). Community-acquired bloodstream infections in Africa: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet infectious diseases*, 10(6), 417-432.
- Remington JS., Thulliez P., Montoya JG. (2004). Minireview. Recent developments for diagnosis of toxoplasmosis. *J. Clinical Microbiology*. P. 941-945

- Rodríguez. (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. *Tesis de licenciatura*. UNAM, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlan Campo 1. 112.
- Rodríguez-Angeles, G. (2002). Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. *Salud pública de México*, 44(5), 464-475.
- Romo Castillo, M. (2010). Estudio del papel de la proteína Orf15 codificada en la isla de patogenicidad LEE de *Escherichia coli* enteropatógena. *Tesis de maestría*, UNAM.
- Ruiz Aguilar, NOMBRE. (1997). Viabilidad y aislamiento de *Vibrio cholerae* y d[etección de *Escherichia coli* O157:H7 en Perejil (*Petroselinum sativum*). México, *Tesis de licenciatura*. IPN, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. 42.
- Rus, H. G., Niculescu, F. I., & Shin, M. L. (2001). Role of the C5b-9 complement complex in cell cycle and apoptosis. *Immunological reviews*, 180(1), 49-55.
- Sánchez S, Ropmecin P, Guachalla LM, Iñiguez V. Geno-phenotypic characterization of AEEC *Escherichia coli* isolated from children with infectious diarrhea in La Paz: Epidemiology and diagnostic implications. Universidad Mayor de San Andrés, Colombia. *Rev Chil Pediatr* 77 (4); 412-427, 2006
- Scaletsky, I. C., Silva, M. L., & Trabulsi, L. R. (1984). Distinctive patterns of adherence of enteropathogenic *Escherichia coli* to HeLa cells. *Infection and immunity*, 45(2), 534-536.
- Secundino-Velázquez, I. (2006) Estudio de los mecanismos de inmunidad humoral y protección inducidos por las porinas OmpC y OmpF de *Salmonella enterica* serovar Typhi. *Tesis de licenciatura*?. UNAM
- Sepúlveda, J. (1991). *Malnutrition and infectious diseases: A longitudinal study of interaction and risk factors*. Instituto Nacional de Salud Pública.
- Shah, N., DuPont, H. L., & Ramsey, D. J. (2009). Global etiology of travelers' diarrhea: systematic review from 1973 to the present. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 80(4), 609-614.
- Sheikh, J., Czeczulin, J. R., Harrington, S., Hicks, S., Henderson, I. R., Le Bouguéneq, C., & Nataro, J. P. (2002). A novel dispersin protein in enteroaggregative *Escherichia coli*. *The Journal of clinical investigation*, 110(9), 1329.
- Shousun Chen Szu y Amina Ahmed. (2014). Clinical Studies of *Escherichia coli* O157:H7 Conjugate Vaccines in Adults and Young Children. *Microbiol Spectr*; 2(6):
- Siggins, M. K., Cunningham, A. F., Marshall, J. L., Chamberlain, J. L., Henderson, I. R., & MacLennan, C. A. (2011). Absent bactericidal activity of mouse serum against invasive African nontyphoidal *Salmonella* results from impaired complement function but not a lack of antibody. *The Journal of immunology*, 186(4), 2365-2371.
- Singh Shiva P., Y.U., Tariq Abdullah, Shree R. Singh, Phillip E. Klebba. (1992) Structural Relatedness of Enteric Bacterial Porins Assessed with Monoclonal Antibodies to *Salmonella* Typhimurium OmpD and OmpC. *Journal of Bacteriology*, 1992. 174(6): p. 1965-1973.
- Singh Shiva P., S.M., Yvonne U. Williams, Kenneth E. Rudd, Hiroshi Nikaido. (1996) Immunochemical structure of the OmpD porin f rorn *Salmonella* Typhimurium. *Microbiology*. 142: p. 3201- 3210.

- Sukkua, K., Manothong, S., & Sukhumungoon, P. (2017). Seroprevalence and molecular epidemiology of EAST1 gene-carrying *Escherichia coli* from diarrheal patients and raw meats. *The Journal of Infection in Developing Countries*, 11(03), 220-227.
- Sussman, M. (1985). *Escherichia coli* in human and animal disease. *Special publications of the Society for General Microbiology*.
- Swearingen, M. C., Porwollik, S., Desai, P. T., McClelland, M., & Ahmer, B. M. (2012). Virulence of 32 *Salmonella* strains in mice. *PLoS One*, 7(4), e36043.
- Torres, A. G., Arenas-Hernández, M. M., & Martínez-Laguna, Y. (2010). Overview of *Escherichia coli*. In *Pathogenic Escherichia coli in latin America* (pp. 1-7). Bentham Science e-books San Diego.
- Trabulsi, L. R., Keller, R., & Gomes, T. A. T. (2002). 10.321/eid0805. Typical and Atypical Enteropathogenic *Escherichia coli*. *Emerging infectious diseases*, 8(5), 508.
- Trebicka, E., Jacob, S., Pirzai, W., Hurley, B. P., & Cherayil, B. J. (2013). Role of Antilipopolysaccharide Antibodies in Serum Bactericidal Activity against *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium in Healthy Adults and Children in the United States. *Clinical and Vaccine Immunology* : CVI, 20(10), 1491–1498.
- Trotter, C. L., Yaro, S., Njanpop-Lafourcade, B.-M., Drabo, A., Kroman, S. S., Idohou, R. S., Mueller, J. E. (2013). Seroprevalence of Bactericidal, Specific IgG Antibodies and Incidence of Meningitis Due to Group A *Neisseria meningitidis* by Age in Burkina Faso 2008. *PLoS ONE*, 8(2),
- Vargas, P. (2009). Incidencia y caracterización molecular de los principales patotipos diarragénicos de *E. coli* en niños menores de 5 años con diarrea aguda en Yucatán. *Tesis Maestría en Ciencias*, Centro de Investigación y Estudios Avanzados IPN, Departamento de Biomedicina Molecular. Zacatenco. 6.
- Vázquez, B. E., & Zapata, A. (1992). Relación del agua de consumo con las enfermedades gastrointestinales en una población costera. *Boletín académico de la Facultad de Ingeniería*,(19).
- Velázquez, F. R., Castellanos, A., Luna, G., Bustamante, M. E., Gómez, A., & Cedillo, R. (2001). Importancia de los agentes virales como causa de diarrea grave en los niños menores de cinco años de edad que requieren hospitalización, y factores de riesgo asociados. *Ed.: Sestante, SA de CV In: Las múltiples facetas de la investigación en salud: Proyectos estratégicos del Instituto Mexicano del Seguro Social. Ciudad de México: Instituto Mexicano del Seguro Social*, 133-52.
- Vidal, J. E., Canizález-Román, A., Gutiérrez-Jiménez, J., & Navarro-García, F. (2007). Patogénesis molecular, epidemiología y diagnóstico de *Escherichia coli* enteropatógena. *salud pública de méxico*, 49(5), 376-386.
- Yip, C. K., Kimbrough, T. G., Felise, H. B., Vuckovic, M., Thomas, N. A., Pfuetzner, R. A., ... & Strynadka, N. C. (2005). Structural characterization of the molecular platform for type III secretion system assembly. *Nature*, 435(7042), 702-707.
- Zaidi, M. B., Calva, J. J., Estrada-Garcia, M. T., Leon, V., Vazquez, G., Figueroa, G., ... & McDermott, P. (2008). Integrated food chain surveillance system for *Salmonella* spp. in Mexico. *Emerging infectious diseases*, 14(3), 429.
- Zaidi, M. B., Calva, J. J., Estrada-Garcia, M. T., Leon, V., Vazquez, G., Figueroa, G., ... Tollefson, L. (2008). Integrated Food Chain Surveillance System for *Salmonella* spp. in Mexico. *Emerging Infectious Diseases*, 14(3), 429–435.

Zaidi, M. B., Campos F. D., Estrada-Garcia, M. T., Gutierrez F., León M., Rodolfo Ch., Calva, J. J., (2012). Burden and transmission of zoonotic foodborne disease in a rural community in Mexico. *Clin Infect Dis*. 2012 Jul; 55(1): 51–60.

Zaidi, M. B., Leon, V., Canche C., Perez C., Zhao S., Hubert S., Abbott J., Blickenstaff K., McDermott P.F. (2007). Rapid and widespread dissemination of multidrug-resistant blaCMY-2 *Salmonella* Typhimurium in Mexico. , *Antimicrob Chemother* ; 60(2): 398–401

Zaidi, M. B., López, M. C., y Calva, E. (2006). Estudios mexicanos sobre *Salmonella*: epidemiología, vacunas y biología molecular. *Rev Latinoam Microbiol*, 48(2), 121-125.

Zapata-Quintanilla, L. B., Palmeira, P., Tino-De-Franco, M., Amaral, J. A., Carbonare, C. B., y Carbonare, S. B. (2006). Systemic antibody response to diarrheagenic *Escherichia coli* and LPS O111, O157 and O55 in healthy Brazilian adults. *Scandinavian journal of immunology*, 64(6), 661-667.

Zollinger, W. D., Moran, E. E., & Schmiel, D. H. (2009). Characterization of an Antibody Depletion Assay for Analysis of Bactericidal Antibody Specificity. *Clinical and Vaccine Immunology: CVI*, 16(12), 1789–1795.