



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLAS DE HIDALGO

“ESCUELA DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGÍA”

**“ASOCIACIÓN DE ROTAVIRUS CON ESCHERICHIA COLI
PATOGENA CAUSANTE DE DIARREA AGUDA EN
LACTANTES DEL HOSPITAL INFANTIL DE MORELIA
MICHÓACAN DE ENERO DEL 2004 A ABRIL DEL 2006”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUÍMICO FARMACOBIOLOGO

PRESENTA:

MARÍA DE LOURDES SÁNCHEZ CRUZ

ASESORES:

Q.B.P Martina Guadalupe Bolaños Monroy

Q.F.B Sandra María Suárez Moreno

DEDICATORIA:

A MIS PADRES:

Por todo lo que me han brindado para superarme, por su amor incondicional y por el apoyo que día con día me han dado, a ustedes dedico este trabajo ya que todo lo que e realizado a sido gracias a su ayuda.

A MI PADRE:

Por todo el sacrificio y trabajo que ha tenido que realizar para nunca me hiciera falta nada y así poder terminar una etapa muy importante de mi vida.

A MI MADRE:

Por todo el amor y apoyo que siempre me ha brindado sin esperar nada a cambiό.

A MIS HERMANOS:

Por siempre poder convivir con todos y en especial a Caro por la ayuda que siempre he tenido de ella.

A FRANCISCO:

Por todo la comprensión, ayuda, apoyo y amor que siempre he tenido de él y todo esto ha sido muy determinante para la realización de este trabajo.

AGRADECIMIENTOS:

A DIOS:

Por la vida que me presto y por siempre ser mi gran apoyo en todos los momentos de mi vida

A MIS MAESTROS:

Por todos los conocimientos que me brindaron para mi formación profesional.

A MIS ASESORES:

Q.B.P Martina Guadalupe Bolaños Monroy.
Q.F.B Sandra María Suárez Moreno.

Por todo el apoyo y conocimientos brindados ya que sin ellas este trabajo no hubiera sido posible.

A MIS REVISORES DE TESIS:

Q.F.B María Rebeca Tinoco.
Q.F.B Bertha Ballesteros.
Dr. José Luís Martínez Toledo.

Por la ayuda prestada para la revisión y mejoramiento del presente trabajo.

A TODAS LAS QUIMICAS DEL LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA Y PARASITOLOGIA DEL HOSPITAL INFANTIL:

Por todos los conocimientos que me brindaron y por la ayuda que siempre me han dado.

A MIS AMIGOS: Por su amistad brindada incondicionalmente y por estar conmigo en la momentos alegres y difíciles de mi vida.

INDICE:

Introducción.....	1
Epidemiología de las diarreas.....	2
Etiología de la diarrea aguda.....	3
<i>Escherichia coli</i>	4
Generalidades.....	4
Genoma.....	5
Habitad.....	5
Epidemiología.....	6
Características bioquímicas.....	6
Patogenicidad.....	8
Inmunidad Inducida del hospedero contra <i>Escherichia coli</i>	
Patógenas.....	10
Mecanismos intestinales de protección no específica.....	10
Mecanismos intestinales de protección específica (inmunidad	
intestinal).....	12
Tejido linfoide asociado al intestino (GALT).....	12
Inmunidad intestinal humoral.....	15
Inmunidad celular local.....	15
<i>Escherichia coli</i> Enterotoxigénica (ETEC).....	15
Patogénesis.....	15
Epidemiología.....	17
Consideraciones clínicas.....	18
<i>Escherichia coli</i> Enteropatógena (EPEC).....	19
Patogénesis.....	19
Epidemiología.....	20
Consideraciones clínicas.....	21
<i>Escherichia coli</i> Enteroinvasiva (EIEC).....	21
Patogénesis.....	21
Epidemiología.....	22
Consideraciones clínicas.....	23
<i>Escherichia coli</i> Enterohemorrágica (EHEC).....	23
Patogénesis.....	23
Epidemiología.....	25
Consideraciones clínicas.....	25
<i>Escherichia coli</i> Enteroagregativa (EAEC).....	26
Patogénesis.....	26
Histopatología.....	27
Epidemiología.....	29
Consideraciones clínicas.....	30
<i>Escherichia coli</i> con adherencia difusa (EDEC).....	30
Patogénesis.....	30
Epidemiología.....	31
Consideraciones clínicas.....	32
Rotavirus.....	32
Epidemiología.....	32
Características del virus.....	33

Estructura del virus.....	33
Patología.....	34
Fisiopatología.....	34
Patogenia.....	35
Inmunidad inducida por rotavirus.....	38
Infección natural y protección clínica.....	40
Inmunidad mediada por anticuerpos y protección.....	41
Inmunidad mediada por células y protección.....	42
Planteamiento del problema.....	45
Justificación.....	47
Objetivo general.....	48
Objetivos específicos.....	48
Metodología.....	49
Resultados.....	52
Discusión.....	59
Conclusión.....	62
Glosario.....	63
Abreviaturas.....	65
Anexos.....	66
Referencias.....	76

I.- INTRODUCCIÓN:

Las enfermedades diarreicas agudas son una enfermedad intestinal generalmente infecciosa y autolimitada, caracterizada por evacuaciones líquidas o disminuidas en consistencia y frecuentes, casi siempre en número mayor a tres en 24 horas con evolución menor de dos semanas⁶³, es un síndrome de etiología multicausal en la que el evento primario suele ser la interacción del organismo con agentes infecciosos virales, bacterianos y parasitarios.⁹⁵⁻²⁷²

Los eventos secundarios corresponden a las consecuencias del daño producido por estos agentes al organismo, particularmente al epitelio digestivo, en forma de pérdidas anormales de agua y sales, en las alteraciones de la digestión y absorción de nutrientes y posteriormente, en la afección de la nutrición.¹¹⁸⁻¹⁴³ Los mecanismos de acción de los agentes infecciosos asociados con la enfermedad diarreica son muy diversos, ya que mientras los virus no suelen inducir respuesta inflamatoria, en las infecciones por bacterias enteroinvasoras pueden presentarse evacuaciones con moco y sangre, además de leucocitos en las heces.²⁹⁻¹⁶⁹⁻¹⁸⁵

Existen diferentes tipos de diarreas, por el tiempo en que duran se clasifican en agudas y crónicas

La diarrea crónica es una afección en la que el individuo presenta episodios de diarrea constante y tiene una duración de aproximadamente 8 meses.²⁷⁵

La diarrea aguda es aquella que no dura más de 15 a 20 días y resulta generalmente por causa de una infección de etiología vírica o bacteriológica y es la causante de la muerte de muchas personas, especialmente de niños menores de 5 años en países subdesarrollados.²⁷⁵ Los agentes causales generalmente se transmiten por vía fecal-oral y adoptan diversas modalidades, dependiendo de los vehículos y las vías de transmisión.⁹

Las enfermedades diarreicas agudas también pueden resultar del:

- ✓ uso inadecuado de antibióticos
- ✓ mala técnica alimentaria
- ✓ intolerancia a disacáridos
- ✓ alergia a las proteínas de la leche
- ✓ otros padecimientos¹²⁷

La deshidratación es la complicación más frecuente de las enfermedades diarreicas agudas por lo que hay pérdida de agua y electrolitos¹⁰²⁻²⁷³. Entre los sobrevivientes, los episodios de diarrea pueden causar, precipitar o exacerbar la desnutrición, tanto macro como micro nutrientes.¹⁵⁰ Los efectos deletéreos de la diarrea sobre el estado de nutrición del niño se producen por reducción en la ingestión dietética,¹⁵¹ absorción disminuida de nutrientes,¹⁶¹⁻¹⁶² aumento en el catabolismo,²⁰⁴ pérdida directa de nutrientes por el intestino²²⁻³¹⁻⁵⁶⁻²⁰⁶ e ineficiencia metabólica debida a deficiencias de micro nutrientes.⁸³⁻²⁶² Tomando en cuenta la deshidratación y a los signos y síntomas presentes se clasifica al niño como hidratado,

deshidratado o con choque hipovolémico con la presencia de dos o más de los siguientes signos:⁶³⁻¹⁶⁶

- ✓ no puede comer o beber
- ✓ vomita todo
- ✓ tiene convulsiones
- ✓ está letárgico o inconsciente
- ✓ muestra ausencia o disminución de los ruidos intestinales.

En caso de identificarse uno o más de estos signos deberá enviarse al niño, lo más pronto posible al hospital más cercano y seguir los planes de hidratación como son a continuación:

PLAN A: Se aplica en pacientes con diarrea aguda, no deshidratados⁶³. Comprende la capacitación del responsable del cuidado del paciente con diarrea para continuar su tratamiento en el hogar, de acuerdo a las siguientes reglas:¹⁶⁶

- ✓ en alimentación continuar con lactancia materna y l alimentación habitual
- ✓ dar bebidas abundantes de líquidos de uso regular en el hogar así como "Vida suero oral" (VSO) mientras persista la diarrea.

PLAN B: Se aplica en pacientes con diarrea aguda, deshidratados se inicia con la administración de VSO: 100ml/Kg. en 4 horas, distribuido en dosis cada 30 minutos. Valorar cada hora. Si mejora, pase al plan A. Si continua deshidratado, repita plan B. Si empeora, pase al plan C.

PLAN C: Se aplica a pacientes con estado de choque hipovolémico por deshidratación y deberán ser referidos al segundo nivel.⁶³

A pesar del desarrollo y difusión de la rehidratación oral, la enfermedad diarreica aguda continúa siendo una causa importante de morbilidad y mortalidad en niños menores de 5 años. Ya que se calcula que en países en vías de desarrollo, los niños presentan entre 3 y 10 episodios de diarreas anuales durante los primeros 5 años de vida, con una duración promedio de estos episodios de 4 a 6 días.⁸⁻⁴⁸

EPIDEMIOLOGIA DE LAS DIARREAS:

Las enfermedades diarreicas agudas han constituido un problema importante de salud pública en el mundo y afecta a todos los grupos de edad, sin embargo los más vulnerables son los menores de 5 años. En México en el año de 1998 se registraron 617,509 casos de enfermedades diarreicas agudas en niños menores de un año y 982,111 en el grupo de 1 a 4 años.²³¹

Y en el Hospital Infantil de Morelia Michoacán se han registrado desde el año 2003 al 2006 6,783 casos de diarrea aguda.¹⁶

Más de 70% de las muertes por diarrea y deshidratación puede evitarse si se utiliza la terapia de hidratación oral que consiste en incrementar el consumo de líquidos y dar VSO;

además, continuar la alimentación, capacitar en los signos de alarma y no usar antidiarreicos.⁶³⁻¹⁶⁶

Taylor, Emery y Carpenter²⁴⁴ encontraron que una adecuada atención primaria permitió disminuir en un 28% la mortalidad por diarrea en niños de 6 a 35 meses de edad y alcanzar una reducción total del 35% en la mortalidad en niños de 1 a 4 años. Esto podría indicar que el acceso oportuno al tratamiento adecuado puede ser esencial para reducir la mortalidad infantil.³³⁻²⁴⁴

La mayoría de las diarreas en niños son producidas por virus en un 55%. Ningún virus es susceptible al tratamiento antimicrobiano y ninguno de los antivirales disponibles tiene actividad contra los agentes causales de diarrea. Los agentes antimicrobianos tienen efectos colaterales que pueden agravar los síntomas o el episodio diarreico y facilitar la proliferación de gérmenes más agresivos. Para corregir la deshidratación debe recurrirse al empleo de soluciones hidroelectrolíticas orales.⁹⁶⁻¹⁸⁷

ETIOLOGÍA DE LA DIARREA AGUDA:

Existen diversos agentes capaces de producir diarrea aguda entre los cuales encontramos Rotavirus, Escherichia coli enterotoxigénica (ETEC), Escherichia coli enteropatógena (EPEC), Escherichia coli enteroadherente (EAEC), *Salmonella*, *Cryptosporidium*, *Vibrio cholerae* toxigénico, *Clostridium perfringens*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Giardia lamblia*, *Virus Norwalk*, *Adenovirus* 40 y 41, entre otros.⁷⁹

Pero está bien demostrado que en México los agentes causales más frecuentes en las diarreas agudas son Escherichia coli enterotoxigénica en un 20% y Rotavirus en un 55%, en los que no está indicado el manejo con antibióticos.⁶⁻⁸⁵ Siendo este último el agente que con mayor frecuencia causan gastroenteritis infecciosa aguda en México⁸⁹⁻²²⁸.

Fue a partir del decenio de 1940, cuando se aceptó que existía una relación estrecha entre diarrea y la excreción de un tipo de Escherichia coli y la clasificación de estas bacterias a partir de sus antígenos somáticos (lipopolisacáridos) y flagelares (proteínas) ha demostrado que sólo un pequeño grupo de ellas coexiste con la enfermedad. Mediante un esquema de tipificación serológica de Kauffman publicado en 1947¹³⁹ se dio a conocer que un grupo restringido de serotipos de Escherichia coli pueden generar diarrea en seres humanos y así se aceptaron cuatro grupos de Escherichia coli relacionados con procesos diarreicos y son: Escherichia coli enteropatógena (EPEC), enterotoxigénica (ETEC), enteroinvasora (EIEC), y enterohemorrágica (EHEC)¹³⁹. Estos grupos se continúan aislando en todo el mundo hasta la actualidad.¹⁸⁶

En 1987, Levine propuso la existencia de un quinto grupo, al cual denominó como enteroadherente (EAEC), basándose en la propiedad de las cepas de Escherichia coli para adherirse en diferentes patrones a células en cultivo de tejidos.¹³⁹

En la actualidad se reconoce a otro grupo patógeno de *Escherichia coli* al que se le denominó de adherencia difusa (DAEC).

Escherichia coli

GENERALIDADES:

El género *Escherichia* comprende cinco especies: *Escherichia blattae*, *Escherichia coli*, *Escherichia fergusonii*, *Escherichia hermannii* y *Escherichia vulneris*. La especie tipo es *Escherichia coli*. (Ver figura 1) De las cinco especies solamente *Escherichia coli* tiene significación clínica. No obstante, *E. hermannii* y *E. vulneris* se han aislado raramente de infecciones extraintestinales (especialmente de heridas).

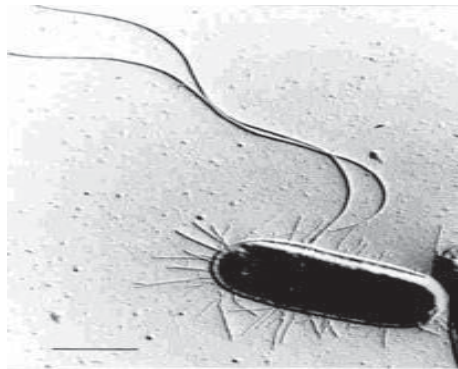
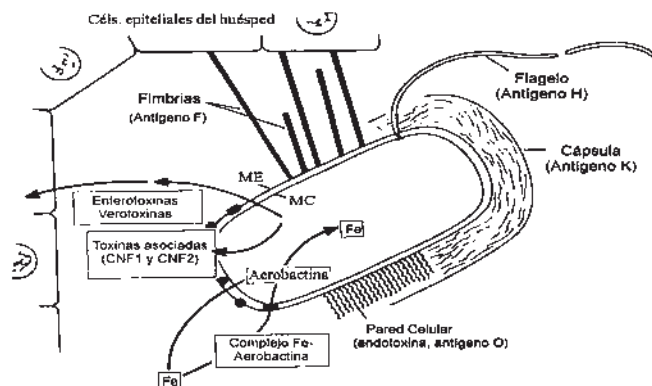


Figura 1 *Escherichia coli*

Jorge Blanco y cols, 2006

Escherichia coli fue descubierta en 1885 por Theodor Escherich, quien lo denominó inicialmente *Bacterium coli*. En 1947, Kauffmann propone una forma de diferenciar las cepas de *E. coli* en base a la determinación de los antígenos superficiales O (somáticos), K (capsulares) y H (flagelares).¹¹⁹ (Figura 2)



Esquema de la bacteria *Escherichia coli* en el que se representan los principales antígenos de superficie (O, K, H y F) y algunos factores de virulencia. Basado en el original de Johnson (Clin. Microbiol. Rev. 1991, 4: 80-128). (Figura 2)

Escherichia coli es probablemente el organismo mejor conocido del mundo, ya que se ha utilizado como modelo para estudiar todo tipo de aspectos de genética y fisiología. Su

genoma entero se conoce desde hace algunos años²¹ y su biología general esta bien estudiada, como demuestran claramente las diferentes ediciones del trabajo clásico coordinado por Neidhardt¹⁷⁷ También ha sido utilizada como organismo modelo en estudios de evolución experimental y genética de poblaciones para entender la acción de las diferentes fuerzas evolutivas a corto y largo plazo¹¹¹.

Escherichia coli se considera de flora normal, en el hombre, pero se han descrito 6 grupos de esta bacteria productores de diarreas y son Escherichia coli enterotoxigénica (ETEC), Escherichia coli enterohemorrágica (EHEC), Escherichia coli enteroinvasiva (EIEC), Escherichia coli enteropatógena (EPEC), Escherichia coli enteroagregativa (EAEC) y Escherichia coli de adherencia difusa (DAEC).²¹⁴

GENOMA:

Escherichia coli contiene 4, 639,221 pares de bases de DNA circular de doble cadena. El 87.8% de este genoma codifica para proteínas, el 0.8% codifica para RNAs estables y 0.7% consiste en DNA repetido que no tiene función conocida¹²⁹. Entre estos genes con destacan las llamadas "islas de patogenicidad" (regiones donde se encuentran los genes que confieren capacidades patógenas a una bacteria)¹⁸¹. Sin embargo, es posible que otras cepas de Escherichia coli tengan fuertes diferencias en su estructura genómica, ya que se sospecha que los mapas no siempre son colineales y hay gran variación en el tamaño del genoma entre cepas²²⁹

El genoma de E. coli es dinámico y sus elementos extracromosomales (plásmidos) son aún más. Esta bacteria puede sobrevivir sin ningún plásmido o tener un buen porcentaje de su genoma total en plásmidos²³⁻¹⁰⁶. El número y tipo de plásmidos dentro de una célula esta regulado por dos fuerzas: el número de réplicas de un mismo plásmido dentro una bacteria - fenómeno controlado en parte por el mismo plásmido- y la entrada de nuevos plásmidos por conjugación o transformación¹⁴²⁻¹⁴⁷. La información contenida en estos elementos extra-cromosomales es variable, ya que en ellos se puede encontrar información para asimilar azúcares raros, para producir sustancias alelopáticas que matan a posibles competidores de la misma especie- resistencias a antibióticos y a metales pesados, inmunidad contra fagos, genes que codifican para intercambio genético y fimbrias relacionadas con la patogenicidad y toxinas, entre otros¹⁴².

La gran plasticidad genómica de E. coli le confiere una plasticidad ecológica notable, ya que gracias a ella pueden adaptarse rápidamente a vivir en diferentes ámbitos y pueden de esta forma pasar de ser organismos de vida libre a ser comensales mutualistas del colon en los animales de sangre caliente, hasta ser un patógeno mortal en humanos y animales.¹⁴⁷

HABITAT:

Generalmente se considera que el hábitat "normal" de E. coli es el colon de organismos de sangre caliente (aves y mamíferos)²³⁵, y que aunque se pueden localizar estas bacterias en el medio externo, tradicionalmente se consideraba que su presencia representaba contaminación fecal, ya que se sospechaba que no se podía reproducir en el

medio exterior. Sin embargo, resultados recientes indican que esto es falso. Existen E. coli que viven en otras partes del tracto digestivo, como las E. coli patógenas que pueden habitar en la sangre y en el tracto urogenital. Adicionalmente, es posible encontrar poblaciones de E. coli en vertebrados de sangre fría. Por otro lado, también se han encontrado cepas particulares en ambientes acuáticos, especialmente los que son ricos en compuestos orgánicos como en el desagüe³². En estudios que utilizan marcadores genéticos, como alozimas y ribotipos, se ha descrito que la diversidad genética es mayor en estos cuerpos de agua y que las cepas encontradas en el ambiente exterior no siempre son las mismas que existen en el colon de los posibles hospederos²⁰⁵. También se ha demostrado que estas poblaciones ambientales pueden incrementar de densidad poblacional en el tiempo, indicando que crecen y sobreviven en estos ambientes externos. Además, tenemos datos que sugieren que existen cepas de E. coli que sobreviven y se replican en el suelo.

La densidad de Escherichia coli en el intestino grueso es de uno a diez millones de células por gramo de colon. Esto hace de Escherichia coli un componente menor de la flora predominantemente anaerobia de esta parte del intestino, donde la densidad bacteriana total es de unas 10^{11} células por gramo²²⁷. Escherichia coli es una de las primeras especies que coloniza al mamífero recién nacido, adquiriendo las primeras cepas del canal de parto y de las heces de su madre¹⁰. Las colonizaciones posteriores se deben por lo general a la ingestión de alimentos contaminados. Usualmente hay una cepa dominante de E. coli por hospedero, sin embargo la aparición de nuevos genotipos, ya sea por mutación o por ingestión, hace que esta dominancia sea sólo temporal y que la dinámica este dictada por procesos tanto aleatorios (deriva génica) como adaptativos (selección periódica, como los veremos más adelante¹³²). En el intestino se estima que hay una bipartición al día, mientras que en medio de cultivo rico en el laboratorio se tienen 6 biparticiones al día²²⁸. Muy bajo si se considera que se puede dividir cada 20 minutos. Se considera que en condiciones bajas de nutrientes como el agua y el lodo, el tiempo de bipartición de E. coli es aún menor que en el intestino.

EPIDEMIOLOGÍA:

En México se ha aislado Escherichia coli como agente etiológico de diarrea. Cravioto y colaboradores reportan, en un trabajo realizado en la comunidad rural de Morelos a Escherichia coli Enterotoxigénica (ETEC) como el principal agente productor de diarrea (33.5%) y un 8.1% para Escherichia coli enteropatógena (EPEC).⁴⁶ Sepúlveda y colaboradores reportaron 28% de aislamiento para Escherichia coli enteropatógena (EPEC) y 13% para Escherichia coli enterotoxigénica (ETEC) en un estudio de casos y controles, en un área del sur de la Ciudad de México.²⁵⁴ En 1990, Guerrat y colaboradores encontraron que Escherichia coli enterotoxigénica (ETEC) es endémica en nuestro medio y que causa la diarrea del turista en todo el mundo.²⁵⁴

CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS.

Es un bacilo Gram (-) no esporulado, móvil con flagelos peritricos o inmóviles, aerobio-anaerobio facultativos, capaz de crecer en agar MacConkey y en medios simples con o sin

agregado de NaCl, fermentador y oxidativo en medios con glucosa u otros carbohidratos, catalasa positivo, oxidas, reductor de nitratos a nitritos, produce ácido y gas a partir de glucosa, la arabinos, y habitualmente de la lactosa y otros azúcares. Produce reacción positiva de rojo de metilo, y negativa de de Voges-Proskauer. Es inhibido por KCN e incapaz de crecer en medio de citrato como única fuente de carbono y energía, pero si en caldo acetato. Es H₂S, ureasa y fenilalanina negativo, pero en general indol positivo y descarboxila la lisina.² (Ver tabla 1)

TABLA 1

IDENTIFICACIÓN BIOQUÍMICA DE ESCHERICHIA COLI

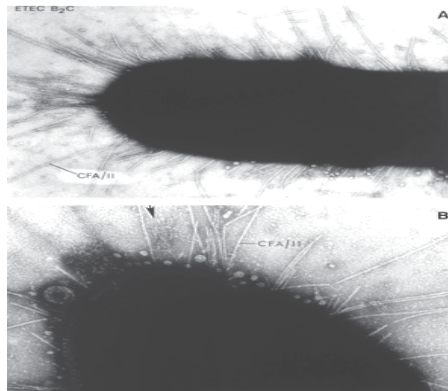
PRUEBA BIOQUÍMICA	% DE POSITIVIDAD
Oxidasa	0
Producción de indol	98
Rojo de metilo	99
Voges-Proskauer	0
Citrato de Simmons	1
H ₂ S (TSI)	1
Hidrólisis de urea	1
Utilización de malonato	0
Ácido de glucosa	100
Gas de glucosa	95
Fenilalamina desaminasa	0
Lisina descarboxilasa	90
Arginina dihidrolasa	17
Ornitina descarboxilasa	65
Movilidad a 36oC	95
Hidrólisis de gelatina a 22oC	0
KCN crecimiento en	3
Fermentación de lactosa	95
Fermentación de la sacarosa	50
Fermentación de D-manitol	98
Fermentación de D-sorbitol	94
Fermentación de mucato	95
Fermentación de dulcitol	60
Fermentación de salicina	40
Fermentación de adonitol	5
Fermentación de inositol	1
Fermentación de L-arabinosa	99
Fermentación de la rafinosa	50
Fermentación de L- ramnosa	80
Fermentación de maltosa	95
Fermentación de D-xilosa	95

Fermentación de trealosa	98
Fermentación de celobiosa	2
Fermentación a-metil-D glucosido	0
Fermentación de eritritol	0
Hidrólisis de la esculina	35
Fermentación de melobiosa	75
Fermentación de D-arabitol	5
Fermentación de D- manosa	98
Fermentación de glicerol	75
Nitrato a Nitrito	100
Tartrato de Jordán	95
Utilización de acetato	90
Lipasa(aceite de maíz)	0
DNasa a 25oC	0
ONPG	95

Rodríguez –Angeles G. 2002

PATOGENICIDAD:

Como la mayoría de los patógenos de la mucosa, *Escherichia coli* se puede decir que para seguir una estrategia indispensable de la infección necesita: 1) La colonización de un sitio de la mucosa, 2) la evasión de las defensas del anfitrión, 3) multiplicación, y 4) causar daños al anfitrión. La característica lo más altamente posible conservada de las infecciones diarreicas acusadas por *Escherichia coli* es su capacidad de colonizar la superficie de la mucosa intestinal a pesar de los movimientos peristálticos y la competición por los alimentos con la flora normal del intestino. La presencia de los fimbria superficiales (Figura 3 y 4) causantes de la adherencia es una característica de virtualmente todos los tipos de *Escherichia coli* tienen y que permiten la adherencia a la mucosa pequeña del intestino, un sitio que no se coloniza normalmente¹³⁴⁻²⁶⁰ Las diferentes morfologías de los fimbrias de *Escherichia coli* son los siguientes:



A) Morfología del fimbria rígido ilustrada por los fimbrias CS1 de ETEC (etiquetados CFA/II en la figura). El diámetro de la fimbria individual es de 7 nm. Nataro y Kaper 1998

B) Morfología de la fimbria flexible ejemplificada por el componente CS3 de CFA/II (flecha). Observe el diámetro estrecho típico, de 2 a 3 nm, y el aspecto en espiral. Nataro y Kaper 1998



C) Micrográfico de electrón que demuestra el pilus de EPEC expresado por la tensión E2348/69. Mide, 0.35 μ m. (Figura 3 y 4) Nataro y Kaper 1998

Una vez que se establezca la colonización, las estrategias patógenas de *Escherichia coli* exhiben una variedad notable. Se han descrito mecanismos generales por los cuales el *Escherichia coli* puede causar diarrea. 1) producción de la enterotoxina (ETEC y EAEC), 2) invasión (EIEC), y/o 3) adherencia íntima con señal de la membrana (EPEC y EHEC). Sin embargo, la interacción de los organismos con la mucosa intestinal es específica para cada categoría.⁹⁷⁻¹⁷²⁻²⁷¹ (Ver tabla 2)

TABLA 2

CARACTERÍSTICAS DE LOS GRUPOS DE ESCHERICHIA COLI CAUSANTES DE DIARREA

GRUPO	SINTOMAS CLINICOS	EPIDEMIOLOGÍA	SEROGRUPOS Y SEROTIPOS MÁS COMUNES	FACTORES DE PATOGENICIDAD
ETEC	Diarrea aguda acuosa	Niños menores de dos años y diarrea del viajero	O8:H9, O15:H11, O20:H-, O27:H7, O78:H12, O148:H28, O159:H20	Toxina termoestable, toxina termolábil, factor de colonización antigénico.
EHEC	Diarrea sin sangre, dolor abdominal, fiebre, vomito	Niños y adultos que la adquieren por comer carne cruda o mal cocida	O157:H7, O26:H11, O103:H2, O113:H21, O119, O128, O145	Toxina shiga, intimina, pO157
EIEC	Diarrea con moco y sangre o diarrea acuosa, también presenta cuadro disentérico	Niños menores de seis meses	O28:H, O122ac:H, O144:H, O152:H	Plásmido de invasividad 140MDa

EPEC	Diarrea aguda, dolor abdominal, vómito, fiebre baja	Niños menores de seis meses hasta dos años	O55,O86, O142, O111:H-O127	Pili con forma rizada, Plásmido de factor de adherencia de 50 a 70MDa
EAEC	Diarrea líquida, verde con moco, sin sangre, diarrea persistente de hasta 20 días	Recién nacidos y niños menores de dos años	O44:H18	Fimbria AAFI y II, Toxina termo estable de cepas enteroagregativas, Proteínas Pet, Pic y de membrana externa, plásmido de 60MDa y Citotoxina
DAEC	Diarrea acuosa sin sangre	Niños de 1 a 5 años	O126:H27	Fimbria F1845 y proteína de membrana externa

Rodríguez-Angeles 2002

INMUNIDAD INDUCIDA DEL HOSPEDERO CONTRA Escherichia coli PATOGENAS:

Una función importante a considerar en el neonato es la transferencia placentaria de anticuerpos IgG maternos dirigidos contra agentes infecciosos, como reflejo de la memoria inmunológica de la madre. Esta protección se refuerza por la ingestión de calostro y leche que contiene monoglicéridos con actividad antiparasitaria, enzimas, componentes de complemento C3 y C4, anticuerpos con actividad para bacterias (Escherichia coli, Salmonella, Bordetella pertussis) parásitos (Giardia lamblia, Entamoeba histolytica) virus (rubéola, poliomielitis, rotavirus), así como elementos celulares (polimorfonucleares, macrófagos) células que se consideran almacenadoras y transportadoras de anticuerpos IgA. Esto es importante para los lactantes alimentados con leche materna pues se detectan concentraciones importantes de anticuerpos IgA hasta la tercera semana del nacimiento. Esta actividad es reforzada por la presencia de subpoblaciones de linfocitos y de citocinas como el interferón gamma, que pueden intervenir en la modulación de la respuesta inmunitaria del lactante en contra de proteínas heterólogas y agentes enteropatógenos durante los primeros seis meses de vida, son ventajas de la alimentación al seno materno asimismo esta práctica disminuye el riesgo de infecciones tempranas al evitar el uso de biberones mal lavados.⁷⁹

MECANISMOS INTESTINALES DE PROTECCIÓN NO ESPECÍFICA:

Son mecanismos adaptativos del organismo para impedir la instalación de cualquier agente enteropatógeno.

Producción de mucopolisacáridos: Una gran cantidad de células distribuidas a lo largo del intestino sintetizan una glucoproteína denominada mucina cuya estructura es muy similar a

los ligandos que presentan las células epiteliales para las bacterias enteropatógenas. Esta mucina tiene como función principal la de impedir la adherencia de las bacterias, este mecanismo se refuerza por los movimientos peristálticos.

Flora bacteriana: La presencia constante de bacterias predominantes anaeróbicas en el colon, interfiere con los sitios disponibles para otras bacterias o parásitos. Así mismo, los lipopolisacáridos bacterianos estimulan la proliferación y localización de células linfoides de intestino. La administración de antibióticos puede alterar a los componentes de la flora y por lo tanto interferir con este mecanismo de protección.

Factores solubles: Son moléculas liberadas a la luz intestinal como lactoferrina, lisozima, peroxidasa los cuales tienen actividad antimicrobiana.

Reforzamiento de la protección intestinal por anticuerpos biliares: Se ha demostrado que la llegada de los alimentos al duodeno, provocan la liberación de la hormona colecistocinina la que por la circulación general llega a la vesícula biliar, provoca la contracción y la liberación de anticuerpos de clase IgA sintetizados en la mucosa de la vesícula biliar los que a su vez son descargados hacia el duodeno.

Competencia con receptores: Los oligosacáridos presentes en la superficie de las células epiteliales favorecen la adherencia de bacterias y parásitos. Los anticuerpos de clase IgA presentan en su estructura oligosacáridos similares a los de las células epiteliales, gracias a esto pueden interferir por este mecanismo con la adherencia de enteropatógenos. De manera similar actuarían los lactobacilos ingeridos en la dieta.

Componentes celulares asociados al intestino: En el lumen intestinal encontramos macrófagos que potencialmente podrían fagocitar partículas extrañas e inducir una respuesta inmunitaria. También se ha reportado la presencia de linfocitos citotóxicos, los cuales pueden ser muy activos cuando se incuban con linfocinas como la interleucina-2 o con polipéptidos intestinales como el VIP.

Células cebadas: Existe una gran cantidad de estas células distribuidas en el intestino delgado y grueso, las cuales liberan mediadores como histamina y eliminan parásitos intestinales.

Eosinófilos: Son elementos celulares muy importantes que responden a factores quimiotácticos producidos por las células cebadas y que de esta manera coadyuvan en la eliminación de parásitos.⁷⁹

MECANISMOS INTESTINALES DE PROTECCIÓN ESPECÍFICA (INMUNIDAD INTESTINAL):

El proceso digestivo normal da como resultado la degradación de los alimentos hasta oligopéptidos y oligosacáridos en la luz intestinal que pudieran actuar como material antigénico. La presencia constante de este material provoca la inducción de una respuesta inmunitaria local de anticuerpos IgA que retardan su entrada y esto permite un mayor contacto con las enzimas pancreáticas e intestinales y lograr una digestión más completa y disminuir su capacidad inmunogénica. Las células epiteliales de las mucosas impiden que el material antigénico interaccione directamente con las células del tejido linfoide asociado al intestino. Destacan dentro de la población de células epiteliales, las células denominadas M que recubren las placas de Peyer, que son las encargadas de transportar antígenos y completar su degradación intracelularmente. Estas células tienen en su membrana antígenos de histocompatibilidad de la clase II, de manera similar a los macrófagos presente en la luz intestinal. También es importante considerar a los linfocitos que se encuentran entre las células epiteliales que se denominan teliolinfocitos, los que pueden responder a los antígenos en forma específica.⁷⁹

Es necesario considerar que la respuesta inmunitaria para la síntesis y producción de anticuerpos de clase IgA e IgG requiere de varios días (figura 1) por lo que la llegada de toxinas a la luz intestinal ejercerían su acción inmediatamente y sólo se podría impedir su actividad por medio de anticuerpos, con base a lo anterior es necesario promover las medidas que impiden la llegada de toxinas, iniciar rápidamente la hidratación oral o realizar inmunopprofilaxis.

TEJIDO LINFOIDE ASOCIADO AL INTESTINO (GALT): El tejido linfoide asociado al tubo digestivo se considera como el sistema responsable de la producción y regulación de la respuesta inmunitaria local y sistémica.

El GALT está integrado por varios compartimientos:

- a) Ganglios linfáticos de lámina propia que toma nombres distintos de acuerdo a su localización: amígdalas, placas de Peyer con ganglios linfáticos solitarios en el intestino grueso.
- b) Células linfoides distribuidas en forma difusa en la lamina propia.
- c) El compartimiento intraepitelial, donde los linfocitos se localizan entre las células epiteliales.

Esta compleja organización permite establecer la respuesta inmunitaria humoral, o celular, adecuada al tipo de antígeno que se presenta. En el embrión el tejido linfoide de las láminas de Peyer es poblado con linfocitos T y B provenientes del timo y médula ósea, respectivamente. Después del nacimiento hay multiplicación de células inmunocompetentes y de sus precursores por consecuencia de los estímulos antigénicos provenientes de la luz intestinal.⁷⁹

Las placas de Peyer son conjunto de nódulos linfáticos localizados en la mucosa del intestino, desde el duodeno hasta el ileón. El epitelio intestinal que las recubre es de tipo plano con escasas microvellosidades, formado por células denominadas "M" por mostrar

micropliegues. En el microscopio electrónico se observan pequeñas vesículas intracitoplasmáticas que transportan sustancias de la luz intestinal hacia los folículos linfoides, dándoles la propiedad de sitios de inicio de respuestas inmunitarias. Son órganos linfáticos dinámicos, pues una vez que los linfocitos T y B se estimulan por acción antigénica, migran hacia los ganglios linfáticos mesentéricos, linfa y sangre periférica para llegar a la lámina propia de la mucosa intestinal y llevar a cabo su función efectora. A este sistema se le conoce como sistema inmunitario común de las mucosas.⁷⁹

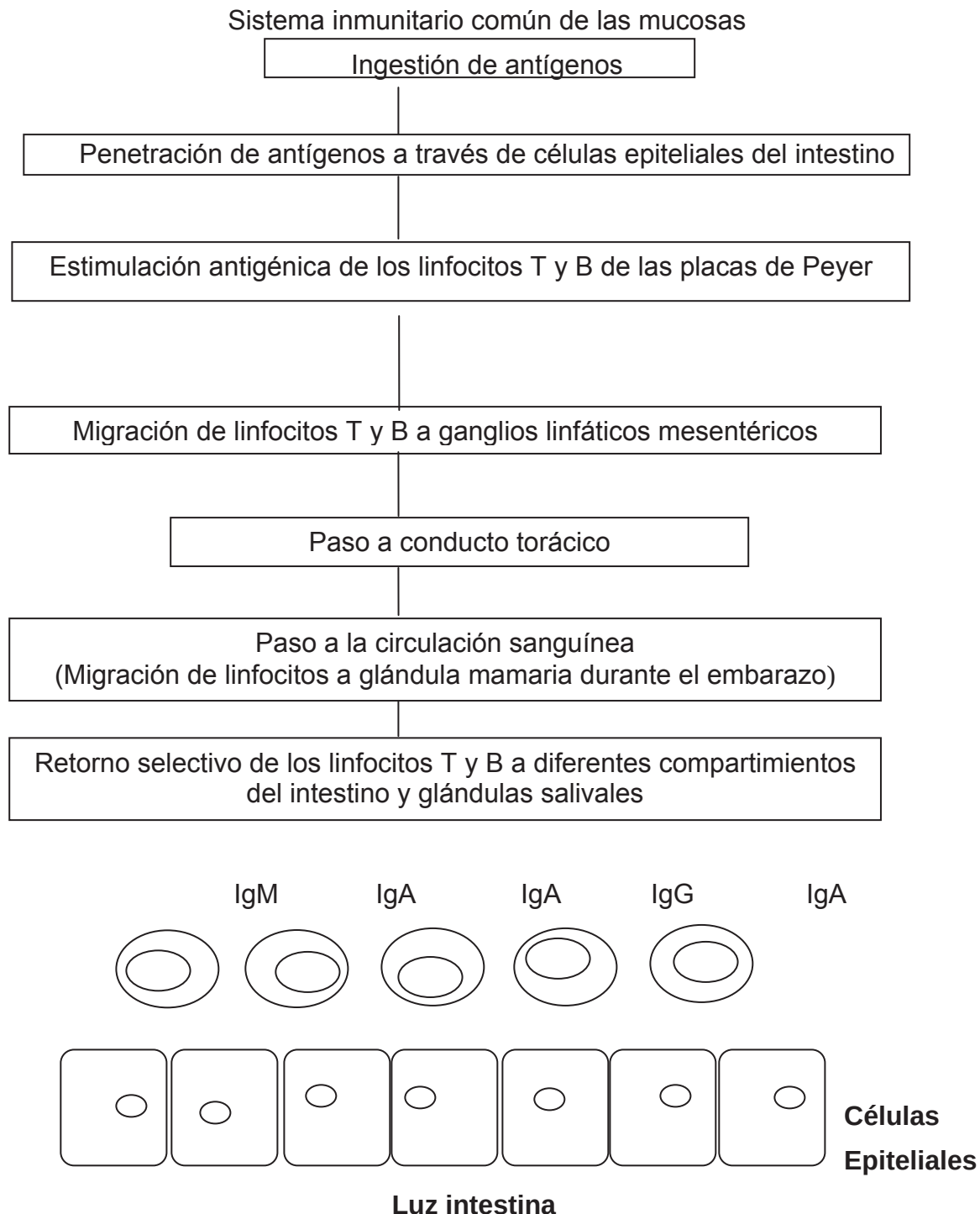


Lámina propia: En este sitio se encuentran los elementos siguientes:

Linfocitos B: Los precursores de linfocitos B se hallan principalmente en las placas de Peyer de donde migran a la lámina propia de la mucosa intestinal para diferenciarse en células plasmáticas productoras de IgA e IgE.

Linfocitos T: Estas células se localizan en la mucosa intestinal únicamente después del reto antigénico. En los humanos el 69% de linfocitos son T cooperadores (CD4+) y el 31% T citotóxicos (CD8+).

Son más abundantes ambas poblaciones en el intestino delgado que en el grueso. Estos porcentajes se modifican en pacientes con enfermedad celíaca en la que hay un ligero aumento de linfocitos T citotóxicos (40%) y disminución de los T cooperadores (60%).

La función de los linfocitos en lámina propia es regular la producción local de IgM e IgG; no obstante, después de exposiciones repetidas al antígeno por vía oral también se suprime la producción de IgA.

Macrófagos: Se encuentran principalmente en lámina propia de la mucosa intestinal. Probablemente derivan de los monolitos de la sangre, dividiéndose solamente en presencia de estímulo inflamatorio. Independientemente de su origen, los macrófagos residen en estos tejidos por largo tiempo y recirculan en linfa. En comparación con los monolitos de sangre periférica manifiestan características de células fisiológicamente maduras como son: a) mayor granulosidad citoplasmática, b) motilidad aumentada, c) adherencia al vidrio más duradera y d) mayor capacidad fagocítica de esferas de látex. La mayoría de los macrófagos presentan en su superficie antígenos de histocompatibilidad de la clase II.

En lo que se refiere a la función de estas células en la mucosa se ha encontrado que en recién nacidos existe baja capacidad fagocítica y presentadora de antígeno pero que progresivamente aumenta, en adultos, los macrófagos excretan enzimas, mediadores químicos y factores de actividad diversa; las enzimas actúan sobre células adyacentes causándoles daño cuando estas incorporan sustancias indigeribles.

En una infestación parasitaria, los macrófagos producen prostaglandinas de la serie E que intervienen en su eliminación y durante las infecciones por virus producen interferón.

Mastocitos: Se originan de médula ósea, donde se encuentran en 1 a 2% en relación a la población de linfocitos locales. Durante las infestaciones parasitarias, los mastocitos proliferan ante la presencia de IL-3 producida por células T locales.

Eosinófilos: Se encuentran en cantidades del 3 al 8% en mucosa intestinal. Se origina en médula ósea, se han descrito dos poblaciones precursoras, una que al estimularse se diferencian hacia eosinófilos circulantes maduros y otra que da lugar a células precursoras y que se dividen poco. Llegando a las mucosas, para diferenciarse en células maduras. Los eosinófilos de sangre periférica contienen cristales rectangulares que son depósito de:

peroxidasa, proteína básica rica en arginina, arilsulfatasa, histaminasa y otras proteínas catiónicas (ECP) con actividad tóxica dirigida a parásitos.⁷⁹

INMUNIDAD INTESTINAL HUMORAL

Los anticuerpos IgA diméricos producidos por las células plasmáticas de la lámina propia intestinal son transferidos a través de las células epiteliales, en donde el componente secretorio (SC), sintetizado por ellas mismas, interviene como receptor y transporta a la IgA dentro de vesículas para secretarla en la superficie de las mucosas por exocitosis.

En síntesis las funciones de los anticuerpos IgA presentes en secreciones serían:

- 1) exclusión de material antigénico presente en el intestino
- 2) interferencia con la adherencia de bacterias, parásitos y virus
- 3) actividad neutralizante de toxinas

INMUNIDAD CELULAR LOCAL

Los linfocitos T se encuentran distribuidos en el epitelio y lámina propia del intestino delgado y del grueso. Una característica de las células epiteliales es su recambio y desprendimiento de la superficie, por lo que los linfocitos son sustituidos constantemente provenientes de las placas de Peyer y ganglios linfoides mesentéricos. Una función muy importante de los linfocitos T es su papel en la eliminación de parásitos intracelulares, sin embargo su activación y estimulación constante por el material antigénico derivado de los alimentos o de los parásitos en la luz intestinal puede alterar el epitelio y provocar atrofia de las vellosidades intestinales.⁷⁹

Como ya se ha descrito existe seis grupos patógenos de *Escherichia coli* y a continuación se describirán más detalladamente cada uno de estos:

***Escherichia coli* enterotoxigénica (ETEC):**

PATOGENESIS:

Las ETEC colonizan la mucosa del intestino delgado por medio de pilis o fimbrias que tiene diversas formas denominadas CFA (colonization factor antigens), siendo su principal mecanismo de patogenicidad la síntesis de alguna o ambas enterotoxinas llamadas toxina termolábil (LT) y toxina termoestable (ST). Sus genes están en un plásmido que también puede tener información genética para los CFA, aunque algunos genes de ST se han encontrado en transposones.³⁰⁻¹⁵⁸ las toxinas LT y ST aumentan el nivel intracelular de cAMP y cGMP respectivamente, que se encuentran en la membrana de las células intestinales, provocando la salida de agua y iones.²²⁶

- Toxinas lábiles al calor. El LTs de *Escherichia coli* son toxinas que se relacionan de cerca en estructura y la función con la enterotoxina del cólera (CT) expresada por los *Vibrio cholerae*.²³² El LT y CT comparten muchas características incluyendo su estructura, la secuencia de la proteína (identidad del ca. 80%), la identidad primaria del receptor, la actividad enzimática, y la actividad sobre la célula; algunas diferencias se consideran en el proceso y la secreción de la toxina y en las respuestas del linfocito-T del ayudante.⁵⁰ Hay dos grupos importantes del LT, el LT-I y el LT-II, LT-I es expresado por las *Escherichia coli* que son patógenas para los seres humanos y los animales. LT-II se encuentra sobre todo en *Escherichia coli* del animal y raramente en aisladas en humanos.

LT-I: LT-I es una toxina compuesta de una subunidad y de cinco subunidades idénticas de 11.5-kDa²³⁹ a 28-kDa. Las subunidades se arreglan en un anillo o un "buñuelo" y atan fuertemente al gangliosidos GM1 y al GD1b y a algunas glicoproteínas intestinales²⁴⁵. La subunidad de A es responsable de la actividad enzimática de la toxina. Existen dos variantes de LT-I que exhiben reactividad cruzada. Estas variantes se llaman LTp (LTp-I) y LTh (LTh-I) las cuales fueron aisladas de cerdos o de seres humanos, respectivamente. Los genes que codifican a LT residen en los plásmidos que también pueden contener los genes que codifican los antígenos del factor del ST y/o de la colonización (CFAs).

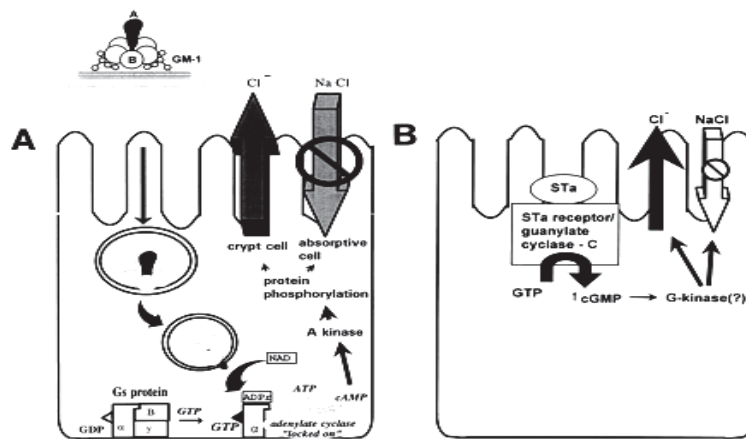


FIG. 4. Mecanismos clásicos de la acción de las toxinas de *Escherichia coli* (ETEC). (a) LT, consistiendo en una subunidad de A y cinco subunidades de B, es internado por las células epiteliales de la mucosa pequeña del intestino vía endocitosis. El A1, o la subunidad catalítica, desplazan a través de la membrana vacuolar y pasa a través del aparato de Golgi por transporte retrógrado. En la figura, la subunidad de A se demuestra como pasa a través del anillo de la subunidad de B, pero éste puede no ser el caso in vivo. A1 cataliza el ADP-RIBOSYLATION de arginina 201 de la subunidad alfa; la proteína G es decir ADP-RIBOSYLATED activa el ciclo del adenilato, lo que ocasiona niveles anormales de los transportadores intestinales de la membrana de la célula epitelial y otras enzimas de la célula huésped, así como efectos en el citoesqueleto. La activación de la quinasa Amperio-dependiente de A da lugar a la fosforilación de los transportadores de membrana (especialmente el regulador de la conductividad del transporte de líquidos), dando por resultado la secreción de los aniones (predominante Cl^- por un efecto directo, y de HCO_3^- indirectamente) por las células de la cripta y una disminución de la absorción de Na^+ y el Cl^- por las células absorbentes y pueden también tener efectos importantes en transportadores basolaterales y en los niveles intracelulares del calcio, que pueden aumentar la magnitud de los efectos sobre transporte del líquido y del ion. (b) La acción del ST. El ST actúa atando el receptor de la membrana del ST, GCC. La activación de los GCC en niveles crecientes de GMP intracelular. GMP ejerce sus efectos en la secreción de aumento del cloruro y la absorción del NaCl que disminuye activando quinasa GMP-dependiente (G-g-kinase) y/o la quinasa dependiente del amperio (Uno-a-kinase). Otros efectos del sTa en inducir la secreción fluida

Nataro y Kaper 1998

Después de unirse a la membrana de la célula huésped, la toxina entra por endocitosis y se desplaza a través de la célula en un transporte vesicular en donde participa en este proceso el aparato de Golgi¹³¹. La célula blanco del LT es el adelineto ciclase situado en la membrana basolateral de células epiteliales intestinales polarizadas y por lo tanto el canal principal del cloruro activado por el LT y CT¹³¹. Un mecanismo alternativo por el cual estas toxinas podrían actuar implica las prostaglandinas de la serie de E (PGE1 y PGE2) y del factor que activa las plaquetas. La síntesis y el lanzamiento de los metabolitos del ácido araquidónico tales como prostaglandinas y leucotrienos pueden estimular el transporte de los electrolitos y la motilidad intestinal. Un segundo mecanismo alternativo implica el sistema nervioso entérico (ENS), que regula la secreción intestinal de la motilidad y del ion. El serotonina y el polipéptido intestinal vasoactivo, pueden estimular la secreción intestinal de la célula epitelial vía el ENS⁶².

Además de sus características enterotóxicas, el LT tiene la capacidad de servir como coadyuvante de la mucosa.

LT-II. El LT-II demuestra una semejanza del 55 al 57% a LT-I y a CT en la subunidad de A pero ninguna homología a LT-I o a CT en las subunidades de B ⁷⁶⁻⁹⁴⁻¹⁹⁷⁻²²⁶⁻²³⁶. Se han descrito dos variantes antigénicas, LT-IIa y LT-IIb, que comparten la identidad del 71 y del 66% en las subunidades predichas de A y de B, respectivamente. LT-II aumenta niveles intracelulares del amperio con mecanismos similares a los implicados en LT-I, ⁷⁶. Según lo observado, no hay evidencia que LT-II está asociado a enfermedad humana o de animales.

- Toxinas termoestables. En contraste con el LT, el STs son toxinas pequeñas, monoméricas que contienen los residuos múltiples de cisterna y que posee enlaces disulfuro lo cual explican la estabilidad al calor de estas toxinas. Hay dos clases sin relación de STs que diferencian en estructura y en el mecanismo de acción. Los genes para ambas clases se encuentran predominante en plásmidos, y algunos genes que codifican a ST se han encontrado en transposones. Las toxinas del STa (también llamado ST-I) son producidas por Escherichia coli enterotoxigénica (ETEC) y varias otras bacterias gram-negativas incluyendo Yersinia sp y Vibrio cholerae no-O1²²²⁻²⁷⁴

EPIDEMIOLOGÍA.

Escherichia coli enterotoxigénica (ETEC) se asocian a dos síndromes clínicos importantes: diarrea en niños de todo el mundo y en la diarrea del viajero. El patrón epidemiológico de la enfermedad causada por Escherichia coli enterotoxigénica (ETEC) es determinado en parte grande por varios factores tales como: 1) la capacidad de Escherichia coli enterotoxigénica (ETEC) de adherirse a la mucosa sobre todo en individuos expuestos; 2) la infección requiere una dosis infecciosa relativamente alta.⁵⁸ Estas características crean una situación en la cual la contaminación de Escherichia coli enterotoxigénica (ETEC) del ambiente en áreas de la infección endémica sea extremadamente frecuente, y la mayoría de los infantes se infecten. El porcentaje de los casos de la diarrea infantil endémica esporádica que son debido a Escherichia coli enterotoxigénica (ETEC) varía generalmente a partir del 10 hasta el 30% ³⁻⁷¹⁻¹⁰⁷⁻¹³⁶⁻¹⁴⁹⁻²²⁵⁻²⁴⁶.

Las investigaciones epidemiológicas han implicado el alimento y el agua contaminados como los vehículos más comunes para la infección de *Escherichia coli* enterotoxigénica (ETEC)¹⁸⁻¹⁹⁻¹⁴⁵⁻²⁷⁰. El muestreo de las fuentes del alimento y de agua en áreas de la infección endémica ha demostrado llamativo altos índices de la contaminación de *Escherichia coli* enterotoxigénica (ETEC)²¹⁸⁻²⁷⁰. Así, la contaminación fecal del agua y de las fuentes del alimento es la razón principal de la alta incidencia de la infección de ETEC a través del mundo que se convierte, y la institución del saneamiento apropiado es la piedra angular de esfuerzos preventivos contra esta infección.

Las infecciones por *Escherichia coli* enterotoxigénica (ETEC) en áreas de la infección endémica tienden a aparecer en meses calientes, mojados, cuando la multiplicación de *Escherichia coli* enterotoxigénica (ETEC) en alimento y agua es la más eficiente¹³⁸.

Aunque la infección causada por *Escherichia coli* enterotoxigénica (ETEC) ocurre con más frecuencia en infantes, los adultos con defensas inmunológicas débiles son susceptibles. De hecho, *Escherichia coli* enterotoxigénica (ETEC) es el agente etiológico predominante que causa la diarrea del viajero entre adultos de las áreas que visitan desarrolladas del mundo donde está endémica la infección de *Escherichia coli* enterotoxigénica (ETEC)¹⁷⁻⁵⁹⁻¹⁵⁴.

CONSIDERACIONES CLÍNICAS.

La enfermedad por *Escherichia coli* enterotoxigénica (ETEC) tiene un inicio con un período corto de la incubación (14 a 50 h).⁵⁸⁻²²³ La diarrea es acuosa, generalmente sin sangre, moco, o pus; la fiebre y el vomitar están presentes en una minoría de los pacientes.⁵⁸⁻¹³⁸ La diarrea causada por *Escherichia coli* enterotoxigénica (ETEC) puede ser suave, y autolimitada pero puede dar lugar a un cuadro severo similar al que da en una infección por *Vibrio cholerae*¹³³.

La mayoría de los casos peligrosos para la vida de la diarrea causada por *Escherichia coli* enterotoxigénica (ETEC) ocurren en infantes. Aunque la administración de los antibióticos a los cuales *Escherichia coli* enterotoxigénica (ETEC) es susceptible se ha demostrado que se pueden utilizar para disminuir la duración de la diarrea y la intensidad de la excreción²⁰⁻⁶⁰ tales como los fluoroquinolones (e.g., ciprofloxacina, norfloxacina, y ofloxacina) pero hay que tener en cuenta que los agentes eficaces puede no estar disponible en áreas donde está alta la incidencia; por otra parte, la resistencia antibiótica en cepas de *Escherichia coli* enterotoxigénica (ETEC) es un problema que emerge⁵⁹. Por lo que se debe tener presente, que la piedra angular para el tratamiento de la infección causada por *Escherichia coli* enterotoxigénica (ETEC) es mantener un estado normal de la hidratación. La terapia oral de la rehidratación es a menudo salvavidas en infantes y niños con diarrea causadas por *Escherichia coli* enterotoxigénica (ETEC).

Escherichia coli enteropatógena (EPEC):

Escherichia coli enteropatógena (EPEC) es muy importante ya que está se ha ligado con la diarrea infantil en el mundo la cual se caracteriza por ser una diarrea acuosa con dolores abdominales y fiebre moderada.

PATOGENESIS:

El sello de las infecciones debido a EPEC es la A/E (histopatológica unir-y-attaching-and-effacing) o también llamada adhesina BFP, que se puede observar en especímenes intestinales de la biopsia de pacientes o de animales infectados⁴⁻¹²⁻¹²⁵⁻¹⁶⁴⁻²⁰³ como se ve a continuación:

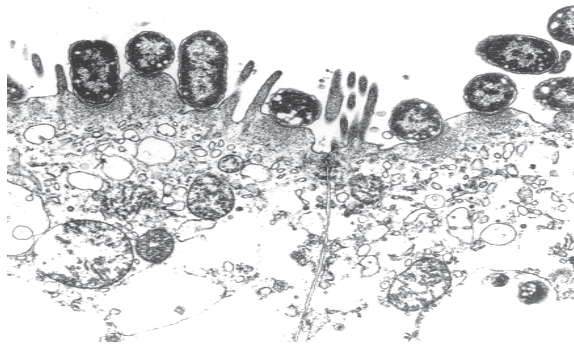
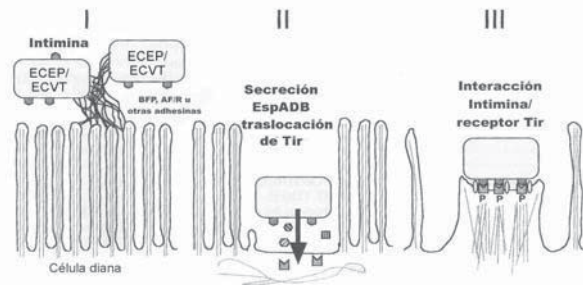


FIG. 6. Lesión característica de EPEC A/E observada en el íleon después de la inoculación oral en cochinillos. Observe el accesorio íntimo de las bacterias a la membrana del enterocito con la interrupción del citoesqueleto de la célula. El aspecto de una bacteria que se sienta en un "pedestal" de la membrana de la célula es absolutamente característico.

Nataro y Kaper 1998

A/E es responsable de la adhesión a distancia de la bacteria al enterocito y de la adhesión, localizada a células HEp-2. Escherichia coli enteropatógena (EPEC) también presenta un locus con genes denominados eae, trf, esp y sep. El gen eae codifica para una proteína de la membrana externa denominada intimina que es responsable de la adhesión íntima de la bacteria al enterocito. El gen tir (translocated intimin receptor) codifica para el receptor celular al que se une la intimina. La bacteria después de unirse a distancia al enterocito mediante las fimbrias A/E excreta el receptor Tir que se fijan al enterocito y a continuación la bacteria se une íntimamente al enterocito al fijarse la intimina al receptor Tir. Los genes esp (E. coli secreted proteins) codifican para proteínas necesarias para la producción de la lesión de adhesión y borrado (attaching and effacing) de las microvellosidades intestinales y la condensación de la actina del citoesqueleto celular que provoca la aparición de un pedestal en forma de copa sobre el que descansa la bacteria. Los genes sep (secretion of E. coli proteins) codifican para las proteínas que constituyen un sistema de secreción de proteínas tipo III. Al menos tres proteínas (EspA, EspB y EspD) y el receptor Tir son exportadas por el sistema tipo III al interior del enterocito. La entrada de EspA y EspD permite la translocación de EspB y Tir. Una vez en el interior del enterocito el receptor Tir es activado por una fosforilación realizada por la célula eucariota e insertado en la membrana del enterocito.²⁴⁸

Todo esto culmina con el corte de las microvellosidades de los enterocitos, cambios en el citoesqueleto que incluye la acumulación de la actina polimerizada, la cual se acumula directamente debajo de las bacterias adherentes y el enterocito; las bacterias se sientan o se adhieren sobre un pedestal. Estas estructuras del pedestal se pueden extender de 1µm hasta 10 hacia fuera del enterocito¹⁸³.



Nataro y Kaper 1998

Mecanismo de la diarrea: Una diarrea causada por *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC) se caracteriza por la pérdida dramática de las microvellosidades absorbentes en la lesión de A/E lo cual puede conducir a la diarrea y a la mala absorción. Sin embargo, el período de la incubación en voluntarios del adulto puede ser muy corto: tan poco como 2.9 h entre la ingestión de los organismos y el inicio de la diarrea⁵⁴. Esta rapidez sugiere que un mecanismo secretor más activo esté implicado en la diarrea causada por EPEC y que una variedad de mediadores intracelulares del transporte intestinal del ion, tales como calcio, de PKC, de los fosfatos del inositol, y del kinase del tyrosine, es afectada por la infección de EPEC. Se tienen informes recientes de que EPEC altera activamente el transporte del ion en células epiteliales²³⁷ se encontró una disminución significativa del potencial para traspasar la membrana en las células epiteliales infectadas con EPEC. Este resultado sugiere que EPEC estimula una afluencia de iones tanto positivos como de iones negativos a través de la membrana. Knutton¹²⁶ han encontrado que EPEC puede estimular un aumento rápido pero transitorio en la corriente de iones en las células epiteliales intestinales; la secreción de los iones del cloruro fue implicada en este efecto⁴².

EPIDEMIOLOGÍA:

Los casos de diarrea por cepas de *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC) en cuneros de países industrializados son muy poco frecuentes en la actualidad.¹³⁶ Por el contrario, en las naciones en desarrollo, la prevalencia de diarrea por esta bacteria sigue siendo muy alta.⁸⁴

La característica más notable de la epidemiología de la enfermedad debido a *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC) es la distribución llamativa de la edad considerada en las personas infectadas con este patógeno. La infección de *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC) es sobre todo una enfermedad de infantes menores de 2 años. Según Levine y Edelman¹³⁵, numerosos estudios en muchos países han demostrado una correlación fuerte del aislamiento de *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC) de infantes con la diarrea comparada a los infantes sanos. La correlación es más fuerte con los infantes menores de 6 meses. En niños mayores de 2 años, EPEC se puede aislar de individuos

sanos y enfermos, pero una correlación estadística significativa con enfermedad no se encuentra generalmente.

La dosis infecciosa en la infección naturalmente transmitida entre infantes no se sabe sino se presume que puede ser baja. La razón para la resistencia relativa de adultos y de niños mayores de 2 años no se sabe, pero la pérdida de receptores específicos con la edad es una posibilidad. Sin embargo, varios brotes de diarrea debido a EPEC se han divulgado en los adultos sanos⁴³⁻⁹⁸⁻²²⁴⁻²⁶¹, probablemente debido a la ingestión de un inóculo grande de una fuente común. La enfermedad esporádica también se ha considerado en algunos adultos con los factores de compromiso (diabéticos, pacientes con VIH, los ancianos)⁵⁴

CONSIDERACIONES CLÍNICAS:

Escherichia coli enteropatógena (EPEC) causa sobre todo diarrea aguda, aunque muchos casos de diarrea prolongada también se han divulgado⁵⁰⁻⁵⁴. En Cincinnati un brote divulgado por Rothbaum²¹⁷, la duración de la hospitalización se extendió de 21 a 120 días. La infección puede a menudo ser absolutamente severa, y muchos informes clínicos acentúan la severidad de la enfermedad.²⁵⁻²¹⁷

Además de la diarrea acuosa profusa, el vomitar y la fiebre de calidad inferior son síntomas comunes de la infección de EPEC. Los leucocitos fecales se ven solamente de vez en cuando, pero pruebas más sensibles para la diarrea inflamatoria tal como una prueba de aglutinación del grano del látex del contra-anti-lactoferrina son con frecuencia positivas con la infección de EPEC¹⁵⁹.

Como con otros patógenos diarreicos, la meta fundamental del tratamiento de la diarrea de EPEC es prevenir la deshidratación por desequilibrios del líquido y de electrolitos. La rehidratación oral puede ser suficiente para casos más suaves, pero casos más severos requieren la rehidratación parenteral. La corrección del desequilibrio alimenticio con fórmula sin lactosa o leche materna puede ser escasa para algunos pacientes seriamente enfermos, y la nutrición parenteral del total puede ser requerida⁵³⁻⁶⁶. Una variedad de antibióticos se ha utilizado para tratar EPEC y para haber probado útil en muchos casos⁵³, pero la resistencia antibiótica múltiple es común para EPEC⁵³. No hay vacunas actualmente disponibles o en los ensayos clínicos para prevenir la enfermedad debido a EPEC.

Escherichia coli Enteroinvasiva (EIEC)

Los primeros casos demostrados de que EIEC puede causar diarrea fueron en estudios realizados en voluntarios conducidos por DuPont et al. En 1971⁵⁸. Las lesiones causadas por EIEC es muy similar al que causa *Shigella* spp.²⁶

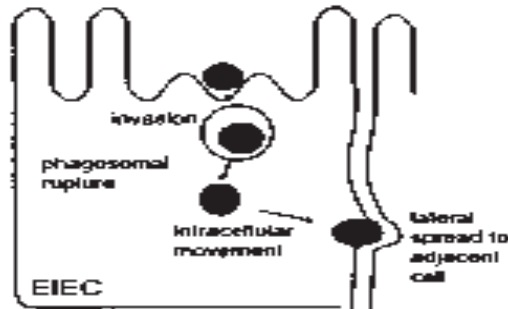
PATOGENIA:

La patología exacta de EIEC tiene que ser todavía aclarado; sin embargo, los estudios realizados sobre la patogenia de EIEC sugieren que sus características patogénicas son virtualmente idénticas a las de *Shigella* spp. En ambos organismos se ha demostrado que para invadir el epitelio utilizan un fenotipo mediado por plásmidos. Además, EIEC y

Shigella spp. Elaboran unas o más enterotoxinas secretoras que desempeñan un papel muy importante en la patogenia de la diarrea.¹⁹¹

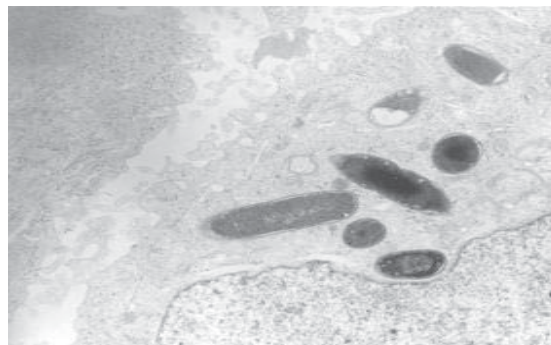
La forma en como *Escherichia coli* invade las células del intestino se lleva a cabo en varios pasos los cuales abarcan:

1. Penetración por endocitosis dentro de las células de la mucosa intestinal del colon
2. Lisis de la vacuola endocítica
3. Multiplicación intracelular
4. Movimiento intracelular
5. Diseminación lateral a las células adyacentes.⁸²⁻¹⁷³⁻²²⁰



Nataro y Kaper 1998

Cuando la infección es severa, esta secuencia de eventos ocasiona una reacción inflamatoria fuerte.²²⁰⁻²²¹ La interacción de los organismos de EIEC con las células eucarióticas se demuestra en la siguiente figura:



Interacción de EIEC con las células epiteliales. Como *Shigella*, las cepas de EIEC invaden las células epiteliales intestinales, lisan la vacuola lisosomal, y se mueven a través del citoplasma, separándose en última instancia a las células epiteliales adyacentes. Esta fotomicrografía electrónica demuestra un organismo de EIEC libre dentro del citoplasma de una célula infectada.

Nataro y Kaper 1998

Escherichia coli enteroinvasiva (EIEC) produce enterotoxinas por medio de un plásmido que codifica una proteína con un tamaño de 63kDa. El papel de la enterotoxina todavía no es muy claro pero se cree que es la responsable de la diarrea acuosa con moco y sangre presentando así un cuadro de disentería.¹⁷⁰

EPIDEMIOLOGÍA:

Los estudios epidemiológicos de *Escherichia coli* enteroinvasiva (EIEC) describen sobre todo brotes. En casos esporádicos, algunos casos de *Escherichia coli* enteroinvasiva (EIEC) se interpretan mal probablemente como *Shigella* sp. Los brotes de *Escherichia coli*

enteroinvasiva (EIEC) son generalmente producido por los alimentos²³⁴⁻²⁴⁹, aunque ocurre la transmisión de persona a persona. La dosis contagiosa de *Escherichia coli* enteroinvasiva (EIEC) en voluntarios es más alta que la dosis para *Shigella* spp.⁶¹. La enfermedad esporádica endémica ocurre en algunas áreas, generalmente donde está también frecuente *Shigella* spp., pero las características epidemiológicas pueden ser diferentes de las de *Shigella* spp.⁶¹⁻²⁴³. La incidencia de EIEC en países desarrollados se piensa es baja, pero los brotes producidos por los alimentos ocasionales, tales como un brote asociado a un restaurante en Texas donde enfermaron 370 personas.⁸⁸

CONSIDERACIONES CLÍNICAS:

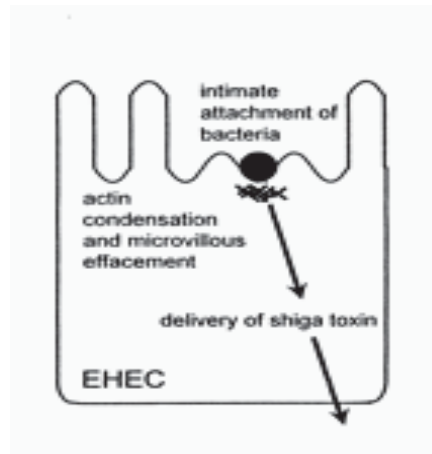
La presentación clínica de la enfermedad causada por *Escherichia coli* enteroinvasiva (EIEC) se ha documentado de brotes, de enfermedad endémica, y de los estudios del voluntario⁶¹⁻²³⁴⁻²⁴⁹⁻²⁶⁰. La infección causada por *Escherichia coli* enteroinvasiva (EIEC) se comúnmente como diarrea acuosa, que puede ser indistinguible de la diarrea secretora causada por *Escherichia coli* enterotoxigénica (ETEC). Solamente una minoría de pacientes experimenta el síndrome de la disentería, manifestado con sangre, moco, y leucocitos en las heces fecales; tenesmo; y fiebre²³⁴⁻²⁴³. Las infecciones asintomáticas debido a *Escherichia coli* enteroinvasiva (EIEC) son probablemente inusuales.

Escherichia coli enterohemorrágica (EHEC)

El término *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC) fue propuesto por Levine en 1987¹⁴⁰, e incluye cepas de diferentes serotipos que tienen características clínicas, epidemiológicas y patogénicas similares a las del serotipo O157.H7, considerado como prototipo del grupo de *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC). Zipori y colaboradores²²⁶ utilizaron un criterio más amplio para definir a este grupo bacteriano, señalando la asociación entre el aislamiento de cepas que pueden producir citotoxinas con colitis hemorrágica afrebil y síndrome hemolítico-urémico. Además de su potencial para generar un tipo de citotoxinas, las cepas que causan estos cuadros tenían la habilidad para adherirse en forma particular a la mucosa intestinal, mediante la producción de proteínas codificadas por un plásmido de 50 a 70 megadalton (mDa). Fue asociada a la ingestión de hamburguesas poco cocinadas en una cadena del restaurante de la comida rápida.

PATOGENIA:

Escherichia coli enterohemorrágica sintetiza una toxina que destruye monocapas de células derivadas del riñón del mono verde africano (Células Vero), a la que se le llama Verotoxina (VT)²⁵⁰. Esta toxina produce un efecto sobre las células distinto a la que produce la enterotoxina lábil al calentamiento (LT). La verotoxina (VT) causa una destrucción total de la monocapa celular en 48 hr. (Efecto citotóxico), mientras que LT sólo modifica la estructura de las mismas células en cultivo sin destruirlas (efecto citotóxico), además las verotoxinas están relacionadas estructuralmente e inmunológicamente con la toxina Shiga producida por *Shigella dysenteriae* tipo 1.



Nataro y Kaper 1998

La toxina Shiga es el factor principal de la virulencia, y una característica que define a Escherichia coli enterohemorrágica (EHEC), es el factor que conduce a la muerte y a muchos otros síntomas en los pacientes infectados con Escherichia coli enterohemorrágica (EHEC).¹⁷⁹⁻¹⁸⁰

Existen dos tipos de verotoxinas, VT1 (o SLT-I) y VT2 (o SLT-II), y varias variantes de VT2, entre las que se incluye la VT2e (toxina edematosa). Están constituidas por una subunidad enzimática A de aproximadamente 32.000 d y 5 subunidades B que tienen un peso molecular de unos 7.700 d y fijan la toxina a receptores celulares compuestos por glicolípidos (globotriaosilceramida, Gb3). La variante VT2e se une a Gb4. La subunidad A es translocada al citoplasma e inhibe la síntesis proteica al inactivar catalíticamente la subunidad ribosomal 60S. Todas las verotoxinas se encuentran codificadas en el genoma de profagos integrados en el cromosoma bacteriano.

Escherichia coli enterohemorrágica (EHEC) además, de producir verotoxinas, presentan factores de virulencia adicionales que incrementan su poder patógeno y así se unen al epitelio del intestino grueso a través de unas fimbrias codificadas en el plásmido pO157 (60 Mda) y posteriormente barren el microvellosidades intestinales por la acción de unas proteínas presentes en su membrana externa que están controladas por el gen cromosómico *eae* y reciben el nombre de intiminas. Aunque Escherichia coli enterohemorrágica (EHEC) se une íntimamente a los enterocitos, no llegan a invadirlos intracelularmente. El 100% de las cepas de Escherichia coli enterohemorrágica (EHEC) O157:H7 poseen los genes *eae* y el plásmido pO157 (CVD419). El gen *eae* se ha asociado claramente con la virulencia, detectándose en la mayoría (> 90%) de las cepas causantes del SUH. Aunque el gen *eae* que codifica para las intiminas es el principal gen implicado en la lesión intestinal de adhesión y barrido (attaching and effacing), existen otros genes que también están implicados (*esp*, *sep*, *tir*). Todos estos genes se agrupan en una isla de patogenicidad cromosómica conocida como "Locus Enterocyte Effacement" (LEE) (Locus del barrido del enterocito). Se ha secuenciado completamente la isla LEE de la cepa EDL933 del serotipo O157:H7 que tiene un tamaño de 43.359 pb y un total de 41 genes. Dicha isla presenta los mismos genes y en el mismo orden que la isla LEE de los ECEP. También se ha comprobado que Escherichia coli enterohemorrágica (EHEC) produce un

nuevo tipo de hemolisina denominada enterohemolisina (EntHly ó EHEC-hly) que se encuentra codificada en el plásmido pO157.

EPIDEMIOLOGIA:

Las características salientes de la epidemiología de Escherichia coli enterohemorrágica (EHEC) incluyen un depósito en la zona intestinal de ganados y de otros animales; transmisión por una variedad amplia de artículos del alimento, con la carne de vaca siendo un vehículo importante de la infección; y una dosis infecciosa muy baja, permitiendo altos índices del ataque y de la transmisión personal.

La frecuencia de casos esporádicos de la infección de Escherichia coli enterohemorrágica (EHEC) parece estar en aumento aunque la prueba y la divulgación crecientes de Escherichia coli enterohemorrágica (EHEC) complica esta conclusión. Las infecciones esporádicas debido a E. coli O157:H7 aparecen ser más comunes en Canadá que en los Estados Unidos⁹¹, pero tales infecciones han alcanzado ya proporciones importantes en muchas áreas de los Estados Unidos, en donde hay más de 20.000 infecciones y aproximadamente 250 muertes²⁴, pero la falta de muchos laboratorios clínicos de defender para este organismo complica grandemente cualquier estimación.

Además de su importancia en Norteamérica, Escherichia coli enterohemorrágica (EHEC) es un patógeno importante en Europa, Japón, Argentina, Australia, Chile, y Sudáfrica. Pero hay un fenómeno interesante observado en países en vías de desarrollo en donde Escherichia coli enterohemorrágica (EHEC) se aísla con menor frecuencia que otras Escherichia coli patógenas causantes de diarrea, tales como Escherichia coli enterotoxigénica (ETEC) o Escherichia coli enteropatógena (EPEC).

CONSIDERACIONES CLÍNICAS:

Pocos patógenos bacterianos pueden causar rutinariamente síndromes clínicos en diversos sistemas como lo que causa Escherichia coli enterohemorrágica (EHEC) ya que es la causante de HC y HUS. La importancia dual de este patógeno es reflejada por la respuesta de la comunidad médica a la observación hecha en 1983 por Karmali¹²⁴ que ligo la producción de la toxina Vero con la diarrea sangrienta y al HUS. Este papel ha sido referido por un gastroenterólogo como "una de las contribuciones más significativas a la microbiología entérica de este siglo"²⁴¹ y por los nefrólogos como indiscutiblemente el papel más importante publicado en HUS²²⁴.

Aunque HC y HUS son los síntomas clínicos más comunes, las complicaciones que pueden presentarse incluyen colitis, perforación del colón, pancreatitis, prolapso rectal, dolor del apéndice, cistitis hemorrágica, edema pulmonar, disfunción del miocardio, y anormalidades neurológicas⁹¹⁻²⁴².

El período de la incubación de la diarrea de Escherichia coli enterohemorrágica (EHEC) es generalmente de 3 a 4 días, aunque los tiempos de la incubación pueden ser de 5 a 8 días o tan cortos como 1 a 2 días. La queja inicial es generalmente diarrea, aunque esto es precedida por dolor abdominal y una fiebre de breve duración en muchos pacientes.

El vomitar puede ocurrirle a la mitad de los pacientes durante el período de la diarrea y/o en otras veces en la enfermedad. En el plazo de 1 o 2 días, la diarrea llega a ser sangrienta y aumenta el dolor abdominal. Esta etapa dura generalmente entre 4 y 10 días. En casos severos, las heces fecales son prácticamente sangre²¹². En la mayoría de los pacientes, la diarrea sangrienta se resolverá sin ningún problema, pero cerca del 10% de pacientes más joven de 10 años (y en muchos pacientes mayores), la enfermedad progresará a HUS.

El HUS es definido como una tríada, 1) anemia hemolítica, 2) trombocitopenia, y 3) falla renal; las manifestaciones clínicas iniciales incluyen oliguria o anuria, edema,. La mayoría de los pacientes se recuperarán con terapia de apoyo apropiada, pero 3 al 5% de niños afectados morirán y cerca de 12 al 30% tendrán episodios severos incluyendo la debilitación, la hipertensión, o las manifestaciones renales del sistema nervioso central²²⁹⁻²³⁶. No hay marcadores definitivos para la severidad de la enfermedad, aunque los factores del anfitrión y las intervenciones terapéuticas son importantes. La progresión a HUS es más probable ocurrir en los pacientes infectados con *E. coli* O157:H7 que experimentan diarrea sangrienta, fiebre, y cuenta elevada del leucocito y que son muy jóvenes o viejos o fueron tratados con los agentes antimicrobianos³⁶⁻¹⁹³.

Escherichia coli enteroagregativa (EAEC)

Escherichia coli enteroagregativa (EAEC) se ha asociado con la diarrea infantil en países en vías de desarrollo, y esta particularmente asociada con la diarrea persistente de más de 14 días de duración. En países desarrollados no se han estudiado sistemáticamente, pero se sabe que se aísla frecuentemente de niños y adultos con diarrea, ha provocado algunos brotes importantes y que pueden estar implicados en las diarreas crónicas que sufren pacientes infectados por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). Provoca una diarrea acuosa mucoide, pero se puede observar sangre en un número significativo de muestras fecales. Son muy frecuentes los individuos portadores asintomáticos.

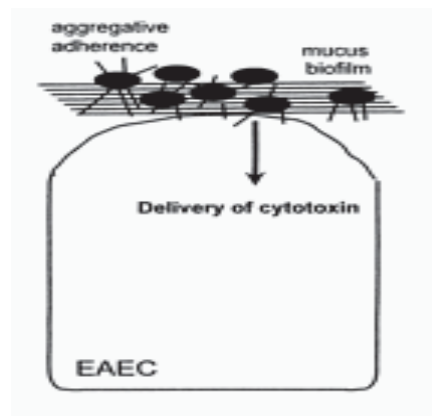
PATOGENIA:

La patogenia de la infección causada por Escherichia coli enteroagregativa (EAEC) no está bien entendida; sin embargo, se han descrito una lesión histopatológica característica y varios factores de la virulencia de la bacteria.

Los datos disponibles no permiten una descripción completa de la patogénesis de EAEC, con todo varias hipótesis pueden ser formuladas. Proponemos un modelo de la tres-etapa basado encendido in Vitro y los datos animales.

- La etapa I implica adherencia inicial a la mucosa intestinal y/o a la capa del moco. Esto por medio de varios factores que pueden facilitar la colonización inicial.
- La etapa II implica la producción del moco, conduciendo al parecer a la deposición de un biofilm. Lo cual puede promover la colonización persistente y la mala absorción de nutrientes.
- La etapa III, sugerida por medio de histopatología molecular, incluye la elaboración de citotoxinas por la *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC) que da lugar a daño a las células

intestinales. Se especula que los anfitriones subalimentados pueden deteriorar su capacidad de reparar este daño, conduciendo al síndrome de la diarrea persistente.



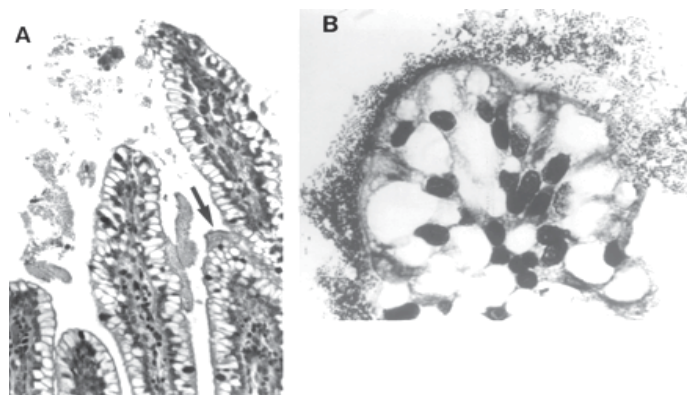
Nataro y Kaper 1998

El sitio de la infección de EAEC en el intestino humano tiene todavía que ser demostrado claramente. Los experimentos in Vitro realizados por Hicks y colaboradores han demostrado que *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC) pueden adherir a la mucosa del intestino tanto delgado como grueso.¹⁰⁰

HISTOPATOLOGÍA:

Las pistas importantes sobre la patogenia de *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC) se pueden encontrar por medio de una examinación histopatológica de pacientes y por medio de modelos animales infectados. *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC) provoca secreción del moco de la mucosa del intestino y esta bacteria se une a la mucosa por medio del biofilm producido por la bacteria.

Tzipori y colaboradores²⁵¹⁻²⁵² realizaron una serie de estudios alimentando a cochinillos con comida contaminada con *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC); aunque algunos de estos animales no experimentaron diarrea, todos los animales probados desarrollaron moco adherente cerca del epitelio del intestino delgado.



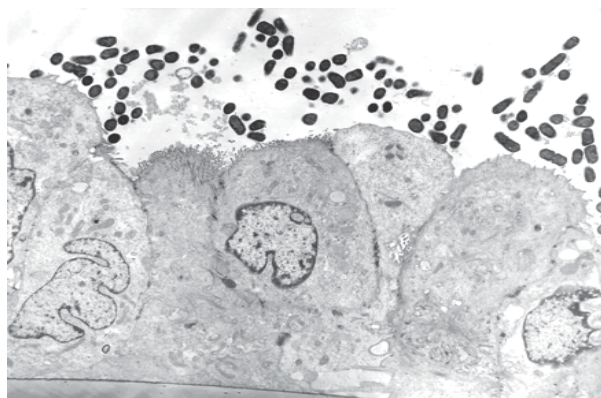
Interacción de *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC) con el epitelio intestinal. (a) Fotomicrografía del ileum de cochinillo. La flecha señala al gel grueso del moco que se adhiere a la mucosa intestinal. (b) Muestra la ampliación de la mucosa del ileum de un cochinillo alimentado con *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC). Observe los agregados de las bacterias que cubren la superficie de las vellosidades. Las vellosidades son edematosas y los enterocitos aparecen hinchados.

Nataro y Kaper 1998

La examinación del gel que se creó reveló la presencia de una gran cantidad de bacterias. Además, el epitelio intestinal exhibió picaduras de las células, sugiriendo el estímulo se debió a la hipersecreción del moco. La capacidad de Escherichia coli enteroagregativa (EAEC) de formar un moco se ha demostrado *in vitro*²⁶³, y las personas voluntarias para los estudios desarrollan una diarrea en donde predomina el moco¹⁷¹. El papel de la producción en exceso del moco en la patogenia de Escherichia coli enteroagregativa (EAEC) es confuso; sin embargo, la formación de un biofilm se puede relacionar con la diarrea producida en el organismo y, quizás, con su capacidad de causar la colonización y la diarrea persistentes.

Además de la formación del biofilm característico del moco, la evidencia experimental sugiere que la infección de Escherichia coli enteroagregativa (EAEC) sea acompañada por efectos citotóxicos sobre la mucosa intestinal²⁶⁰. Ya que se observó una lesión destructiva demostrable en microscopia ligera. La lesión fue caracterizada por el acortamiento de las microvellosidades, por la necrosis hemorrágica de las extremidades de las microvellosidades, y de una respuesta inflamatoria suave con edema y con la infiltración de leucocitos mononucleares en la submucosa. La microscopia electrónica demostró que no hay invasión de enterocitos.

La destrucción de la mucosa se ha demostrado en especímenes a los cuales se les ha realizado autopsia del ileum de los pacientes que murieron de diarrea persistente causada por Escherichia coli enteroagregativa (EAEC) durante un brote en la sala de desnutrición del hospital de Ciudad de México⁶⁴. Recientemente, Hicks y colaboradores publicaron que la citotoxicidad de Escherichia coli enteroagregativa (EAEC) se puede demostrar *in vitro* usando los especímenes intestinales pediátricos de la biopsia¹⁰¹, y Nataro y colaboradores han demostrado que Escherichia coli enteroagregativa (EAEC) tiene efectos citotóxicos sobre las células T84 (células intestinales humanas del carcinoma) *in vitro*¹⁷⁵ como se demuestra en la figura.



Citotoxicidad de Escherichia coli enteroagregativa (EAEC) en las células T84 infectadas esta bacteria. Observe la adherencia de bacterias a la membrana de la célula, asociada a una pérdida de microvellosidades.

Nataro y Kaper 1998

Modelo de la célula T84, la citotoxicidad Escherichia coli enteroagregativa (EAEC)-inducida fue evidenciada por un fenotipo único, caracterizado por la vesiculación de la membrana de la célula, seguida por muerte de la célula y la exfoliación de células. Además,

este efecto fue acompañado por la formación de la vacuola y la separación del núcleo del citoplasma circundante. Los efectos fueron considerados lo más prominente posible en las áreas donde los organismos de *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC) se adherían a las células T84.

EPIDEMIOLOGÍA:

Un número creciente de estudios ha apoyado que la diarrea causada por *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC) se puede convertir en una diarrea persistente (es decir mayor de 14 días).⁵⁵⁻⁹⁹

La asociación de *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC) con la enfermedad diarreica parece ser geográfica. En el continente Asiático especialmente en la India, se han publicado cinco estudios por separados que demuestran la importancia de *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC) en la diarrea pediátrica de este lugar¹³⁻¹²⁶⁻¹⁹². Estos estudios incluyen pacientes hospitalizados con la diarrea persistente¹³, los pacientes no internados que visitan las clínicas de la salud¹⁴, y los casos de la diarrea esporádica detectados durante la vigilancia de la casa¹².

En Brasil, Guerrant y sus colegas han demostrado una asociación constante entre *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC) y el síndrome persistente de la diarrea⁶⁷⁻¹⁴⁴⁻²⁰¹. En esta área, *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC) ha estado implicada en el 68% de los casos persistentes de la diarrea⁶⁷, que representan una parte de la mortalidad diarreica. *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC) también ha estado implicada como causa de la diarrea esporádica en México, Chile, Bangladesh, e Irán.²²⁻⁴⁷⁻⁹⁹⁻¹⁷⁴

Aunque la mayoría de los estudios realizados han demostrado que la *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC) causa diarrea endémica esporádica, un número creciente de informes ha descrito los brotes de *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC).⁶⁴⁻⁸⁰⁻²³³ Cobeljic y colaboradores han descrito un brote que afectaba a 19 infantes en un cuarto de niños de un hospital en Belgrado, Serbia, sobre un período de ocho días en 1995⁴⁰. En 16 bebés la enfermedad duró 3 a 9 días (en promedio, 5.2 días), pero en 3 infantes, la diarrea fue persistente, durando de 18 a 20 días. Los infantes con diarrea manifestaron típicamente heces fecales verdes y líquidas; en tres, el moco era visiblemente evidente. No había sangre.

Eslava y colaboradores han descrito dos brotes de diarrea persistente causada por *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC) que ocurría en la sala de la desnutrición de un hospital de la Ciudad de México⁶⁴; encontraron en los infantes que murieron debido a estos brotes lesiones necróticas desarrolladas de la mucosa del ileon. Smith y colaboradores han divulgado cuatro brotes de diarrea causada por *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC) en el Reino Unido en 1994²³³. Estos cuatro brotes implicaron a 19, 10, 51, y 53 pacientes, respectivamente. Los pacientes en estos brotes experimentaron vomito y diarrea, generalmente sin fiebre. La diarrea persistente ocurrió en un número pequeño de pacientes. Cada uno de los brotes fue asociado a la consumición de una comida del restaurante. En los Estados Unidos, *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC) se ha ligado a la diarrea en los pacientes infectados con el virus de la inmunodeficiencia humana¹⁵⁵; sin embargo, el papel exacto de *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC) en la diarrea del SIDA es desconocido.

CONSIDERACIONES CLÍNICAS:

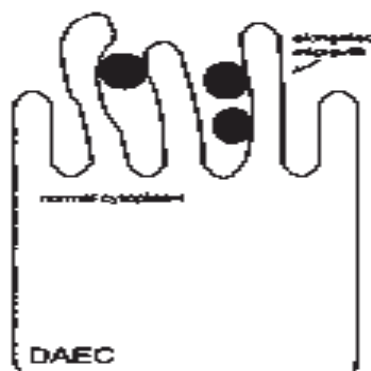
Las características clínicas de la diarrea causada por *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC) se están definiendo cada vez mejor debido a los brotes que se han dado y los estudios realizados en voluntarios. Se sugirió que esta enfermedad diarreica se caracteriza por ser acuosa, mucoide, secretora con fiebre de calidad inferior y algunas veces vomito.¹²⁻¹⁹² En los voluntarios infectados con *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC), la diarrea era generalmente mucoide y de bajo volumen sin sangre oculta o leucocitos fecales; todos los pacientes seguían sin tener fiebre. Steiner y colaboradores han encontrado que un porcentaje grande de los pacientes que excretan *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC) tiene la lactoferrina fecal perceptible (un indicador sensible de leucocitos fecales) y niveles supranormales de IL-8 en las heces fecales²³⁸. Esta observación sugiere que la infección causada por *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC) se pueda acompañar por una forma sutil de inflamación en la mucosa.

Escherichia coli con adherencia difusa (DAEC)

El término *Escherichia coli* de adherencia difusa (DAEC) fue utilizado inicialmente para referir a cualquier tipo de *E. coli* adherente a las células HEp-2 que no formara parte de *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC). Con el descubrimiento de *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC), la mayoría de los autores ahora reconocen a *Escherichia coli* de adherencia difusa (DAEC) como categoría independiente de *Escherichia coli* potencialmente causante de diarrea.

PATOGENIA:

Poco se sabe sobre las características patogénicas de la diarrea inducida por *Escherichia coli* de adherencia difusa (DAEC). Aunque su papel enteropatógeno no está claramente demostrado, se piensa que pueden causar diarrea en niños mayores de un año de edad y en adultos. Se adhiere a las células Hep-2 cultivadas in Vitro siguiendo un patrón de adherencia difuso. Se han descrito dos tipos de adhesinas: la fimbria F1845 y una proteína de la membrana externa conocida como AIDA-I (adhesin involved in diffuse adherence). Tras adherirse al epitelio intestinal provocan una elongación del microvillósidad que engloban las bacterias sin que aparentemente se produzca una invasión interna.

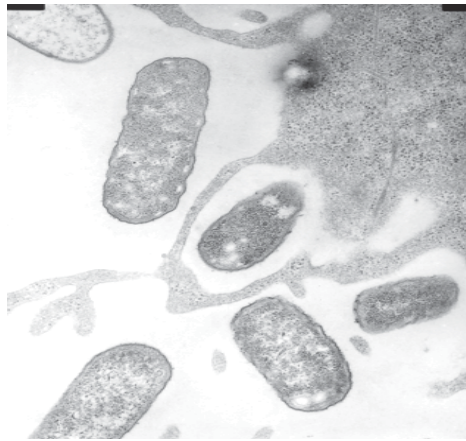


Nataro y Kaper 1998

Tanto *Escherichia coli* de adherencia difusa (DAEC), como *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC), se reparten en un amplísimo abanico de serotipos. La detección de *Escherichia coli* de adherencia difusa (DAEC) se realiza fenotípicamente determinando si la cepa aislada presenta el patrón de adherencia difusa en células Hep-2 ó genéticamente detectando las secuencias que codifican para la fimbria F1845.

Yamamoto y colaboradores²⁷⁵, Cookson y Nataro⁴¹ han demostrado que las lesiones que puede producir *Escherichia coli* de adherencia difusa (DAEC) se asemejan a proyecciones que se extienden de la superficie de las células infectadas HEP-2

Estas proyecciones "encajan al parecer" a las bacterias, proporcionando la protección contra la gentamicina pero sin el que invada. El papel de este Fenotipo en la patogenia tiene todavía que ser demostrado.



Interacción de *Escherichia coli* de adherencia difusa (DAEC) con las células epiteliales. La lesión causada por *Escherichia coli* de adherencia difusa (DAEC) con las células HEP-2 solo se lleva a cabo en 8 h. Observe la asociación de las bacterias con la membrana y la formación de un largo dedo-como las proyecciones que emanan de la célula. El abrigo de estas proyecciones alrededor de la bacteria en un fenotipo. La invasión se considera que casi no se lleva a cabo.

Nataro y Kaper 1998

EPIDEMIOLOGÍA:

Varios estudios recientes han demostrado que *Escherichia coli* de adherencia difusa (DAEC) puede causar diarrea aunque se puede cursar asintóticamente. La asociación de *Escherichia coli* de adherencia difusa (DAEC) con la diarrea se observa solamente en los niños un poco grandes⁷⁻⁸¹⁻⁹³⁻¹³⁷. Levine y colaboradores demostraron que el riesgo relativo de *Escherichia coli* de adherencia difusa (DAEC) en la asociación con diarrea aumentó con edad a partir de 1 año a 4-5 años en Santiago, Chile¹³⁷. La razón de un fenómeno tan relativo a la edad es hasta ahora desconocido. Otras características epidemiológicas, tales como el modo de la adquisición de la infección de *Escherichia coli* de adherencia difusa ((DAEC), son también hasta ahora indeterminadas. Jallat y colaboradores han demostrado que las infecciones de *Escherichia coli* de adherencia difusa (DAEC) explican una proporción grande de enfermedades diarreicas entre los pacientes hospitalizado

en Francia que no tienen ningún otro enteropatógeno identificado¹¹⁵. Este informe sugiere que las cepas de *Escherichia coli* de adherencia difusa (DAEC) puedan ser patógenos diarreicos importantes en el mundo.

CONSIDERACIONES CLÍNICAS:

Pocos estudios epidemiológicos o clínicos permiten la descripción adecuada del síndrome clínico asociado a la infección de *Escherichia coli* de adherencia difusa (DAEC). En un estudio, la mayoría de pacientes infectados con *Escherichia coli* de adherencia difusa (DAEC) tenía diarrea acuosa sin sangre ni leucocitos fecales²⁰².

ROTAVIRUS:

El primer reporte de gastroenteritis por rotavirus fue realizado por Ligh y Hodes en el año de 1943, quienes aislaron un agente filtrante en las heces fecales de niños con gastroenteritis y demostraron que este producía diarreas en terneros y los denominaron agente de Baltimore. Estas muestras se mantuvieron liofilizadas desde 1943 hasta 1972, momento cuando fueron nuevamente analizadas por tinción negativa con el empleo de la técnica de microcopia electrónica; ellas revelaron la morfología típica del rotavirus, aunque no se pudo establecer si el virus era de origen humano o de ternero, pues después de tan largo período de almacenamiento dicho virus no fue infectivo.⁸⁷

El rotavirus fue aislado por primera vez en humanos en el año 1973 de la biopsia intestinal de un paciente con diarrea. Su nombre obedece a que tiene aspecto de "rueda" al observarse con microscopia electrónica (Rota del latín rueda)¹⁰⁸. Siete grupos de rotavirus han sido descritos (de A a G), pero solo los grupos A, B y C infectan al ser humano, siendo el rotavirus del grupo A el que infecta principalmente a los niños y rotavirus del grupo C a los adultos, siendo rotavirus del grupo A los responsables de los casos de gastroenteritis en México. El genoma está constituido por 11 segmentos de RNA cada uno de los cuales codifica para una proteína, de la cual hay 5 estructuras y 6 no estructurales⁷⁷.

EPIDEMIOLOGÍA:

Los rotavirus juegan un papel importante en las gastroenteritis graves,⁴⁹ ya que se calcula que la infección por rotavirus provoca al año 111 millones de episodios de gastroenteritis, 25 millones de consultas médicas, 2 millones de hospitalizaciones y entre 352 000 y 592 000 muertes, de las cuales el 82% ocurren en los países más pobres¹⁹⁰. La mortalidad debida a las infecciones por rotavirus es muy superior en países en desarrollo, comparada con las de los países de desarrollo; la frecuencia de infección por estos virus es muy similar en ambos tipos de países.¹²²

Es claro que los virus son la causa principal de las diarreas deshidratantes en niños menores de dos años, siendo los rota virus del grupo A, serotipos G1 y G3, los responsables de la mayoría de los episodios de diarreas en el mundo.¹⁸⁹⁻²⁰⁸

CARACTERÍSTICAS DEL VIRUS:

Los rotavirus, como miembros de la familia Reoviridae, poseen características comunes a todos los géneros de esta familia, pero presentan algunas propias resumidas en la siguiente tabla:

Estructura:

- Partículas icosaedricas de entre 65 a 75 nm
- Capside formada por tres capas proteicas
- No envueltos
- La capside contiene todos los enzimas necesarios para la replicación del RNA

Genoma:

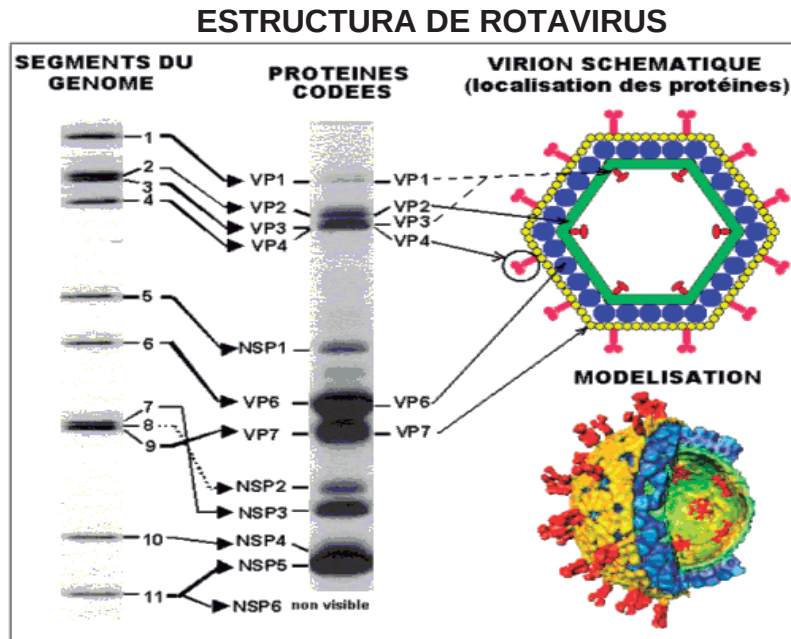
- 11 segmentos de RNA de doble cadena distinguibles electroforéticamente
- Los segmentos de RNA purificados no son infecciosos
- Cada segmento de RNA codifica para al menos 1 proteína
- En infecciones duales en una misma célula los segmentos de RNA pueden intercambiarse (en ingles "reassorting")

Replicación:

- Propagación facilitada por proteasas
- Replicación citoplasmática
- Formación de cuerpos de inclusión
- Estado transitorio de partículas envueltas durante un estadio de la morfogénesis
- Liberación de la progenie mediante lisis celular o transporte vesicular no clásico en células epiteliales polares.⁸⁷

ESTRUCTURA:

La superficie de los rotavirus del grupo A está formada por dos proteínas: VP4 y VP7. La proteína VP4 está involucrada en una variedad de funciones virales, que incluyen virulencia, aglutinación de glóbulos rojos y la penetración del virus a la célula. Por su parte, la VP7 ha sido propuesta como responsable de la unión inicial del virus a la célula blanco. Ambas proteínas de superficie contienen determinantes antigénicos, que representan blancos inmunológicos importantes e inducen respuesta inmune humoral y celular. La respuesta humoral (anticuerpos) tiene la capacidad de neutralizar la infectividad del virus tanto in Vitro como in vivo. La especificidad de estos anticuerpos para neutralizar diferentes cepas de rotavirus ha sido usada para clasificarlos en varios serotipos. Se ha propuesto nombrar G a los serotipos de VP7 (por glicoproteínas) y P a los serotipos VP4 (por proteína sensible a proteasa). Basados en VP7 se han identificado a la fecha 14 serotipos deferentes de rotavirus del grupo A, de los cuales nueve infectan al ser humano (G1 a G4, G6, G8, G9, G10 y G12), aunque sólo cuatro de ellos G1, G2, G3 y G4 son los responsables de la mayoría de las infecciones.²¹⁰



Bishop RF 1996

PATOLOGÍA:

Los cambios morfológicos en el intestino de seres humanos durante la gastroenteritis causada por rotavirus, se asemeja a aquellos encontrados en otros mamíferos.¹¹⁸ Los cambios incluyen el acortamiento variable de las vellosidades, un infiltrado de células redondas moderado en la lámina propia, y elongación de las criptas. Tempranamente en la infección se observa una vacuolación y desprendimiento de enterocitos de la porción apical de las vellosidades. Las lesiones a menudo son en placa y los síntomas pueden ocurrir en ausencia de una lesión demostrable por medio de microscopio de luz.²⁴⁷



Daño que causa *Rotavirus* en el epitelio intestinal



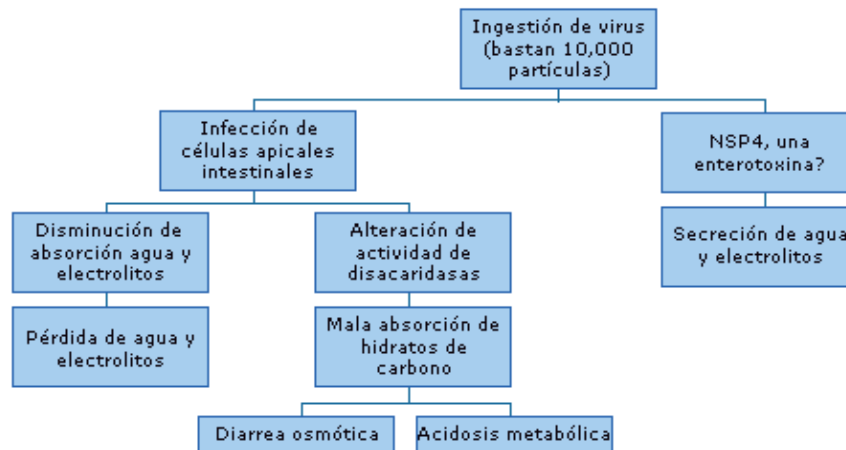
FISIOPATOLOGÍA:

La diarrea osmótica que ocasionan los rotavirus se debe a que lesionan en forma focal los enterocitos maduros de las vellosidades del intestino delgado, disminuyendo la producción de la lactasa disacaridasa, la cual es una enzima que se encuentra en el intestino delgado y

es responsable de la digestión de la lactosa que se ingiere en la dieta, lo que provoca un aumento de la osmolalidad en la luz intestinal y condiciona mayor secreción de agua, que se

pierde a través de las heces. Las células de las criptas, encargadas de reparar las vellosidades lesionadas, migran para sustituirlas en un período de 24 a 72 horas, con lo que desaparece la diarrea.²¹⁰

FISIOLOGIA DE LA GASTROENTERITIS POR ROTAVIRUS



Es conocido que los rotavirus infectan el intestino delgado a través de la vía oral, aunque también se ha probado su transmisión a través de la vía aérea, dado que incluso prácticas de higiene apropiadas no parecen ser del todo capaces de controlar las infecciones por estos virus. Las infecciones por rotavirus en niños menores de dos años pueden cursar asintomáticas hasta en un 50% de los casos. Estudios epidemiológicos sugieren que la inmunidad natural es adquirida después de un primoinfección y que esta protección se incrementa con cada nueva infección, reduciendo la gravedad de los episodios diarreicos subsecuentes.²¹⁰

PATOGENIA:

1.- INGRESO AL ENTEROCITO:

El paso inicial es el contacto del virus con el enterocito y su posterior ingreso al citoplasma. Se han descrito dos maneras por el cual el rotavirus puede ingresar al enterocito: por endocitosis o por penetración directa.

En el primer caso, en la endocitosis, el VP4 juega un rol muy importante ya que esta molécula, una vez activada, es la que va a reconocer a un receptor de membrana (el cual aún no ha sido determinado) en los enterocitos humanos. Para que el VP4 sea activado tiene que ser clivado a nivel del aminoácido arginina en las posiciones 241,231 y 247, por la tripsina pancreática dando como resultado el VPS y VP8 proporcionándole mayor infectividad y ocurriendo luego la endocitosis.

En el segundo caso, mediante el mecanismo de penetración directa, el virus ingresa a

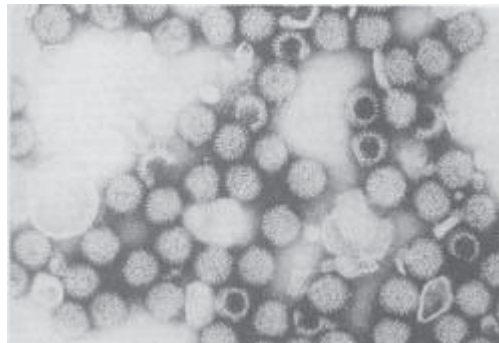
través de la membrana con su cápside interna y el core, el VP 7 se queda localizado en la membrana.⁶²

2.- FUSIÓN ENDOSOMA - LISOSOMA:

Al ingresar el virus por Endocitosis se forman los endosomas conteniendo a los virus. Estos endosomas se fusionan con los lisosomas vertiendo éstos últimos sus enzimas proteolíticas en los primeros causando hidrólisis de la capa proteica (VP 6), dejando libre en el citoplasma al Core viral.

3.- REPLICACIÓN:

Para que se inicie la replicación viral es necesario que se active la RNA polimerasa viral (Transcriptasa) que es la VP1 contenida en el core viral. Esta va a producir RNA mensajeros, los cuales van a realizar copias de cada uno de los 11 segmentos del RNA viral, que son los que finalmente van a contener los genes que van a codificar cada una de las moléculas estructurales y no estructurales.



Replicación del Rotavirus en los enterocitos

Dentro de las proteínas no estructurales que se van sintetizando, la NSP1 y la NSP3 las cuales se van a acumular en el citoesqueleto y van a servir para el ensamblaje del PRECORE, a esta estructura se une la VP2 en el viroplasma con intervención de la NSP2 y la NSP5 formándose el CORE.

Concomitantemente ocurre replicación del RNA y ensamblaje del VP 6 que va a conformar una cápside al cual se denomina partícula "Inmadura". Estas partículas virales inmaduras van a migrar desde el viroplasma hacia el Retículo endoplasmico rugoso (R.E.R) donde van a completar su maduración. Simultáneamente se sintetizan el VP7 y la NSP4 en el R.E.R. La NSP4 se constituirá, en el R.E.R., en una proteína transmembrana (asociado a una chaperona, CALNEXINA) que servirá como un receptor de virus inmaduros translocándolos al interior del R.E.R. Es en el R.E.R. donde el rotavirus termina de madurar y El VP 7 se constituirá posteriormente, conjuntamente con el VP 4, en la cápside externa del rotavirus completando de esta manera su maduración.⁵⁷

4.- LISIS CELULAR:

El ciclo de replicación termina cuando el virus es liberado al lumen intestinal por lisis celular. Al respecto se ha visto en estudios experimentales que la NSP 4 produciría cambios en la permeabilidad de la membrana del R.E.R. y eventualmente muerte celular. Se ha podido observar que habría un incremento en la permeabilidad al calcio.

Mecanismos reproducción de diarrea

Los mecanismos por los cuales el rotavirus produce diarrea no han sido completamente estudiados. Se han propuesto los siguientes:

- Mal absorción secundaria a la destrucción de enterocitos.
- Alteraciones en el balance de fluidos transepitelial.
- Isquemia vellosa local.

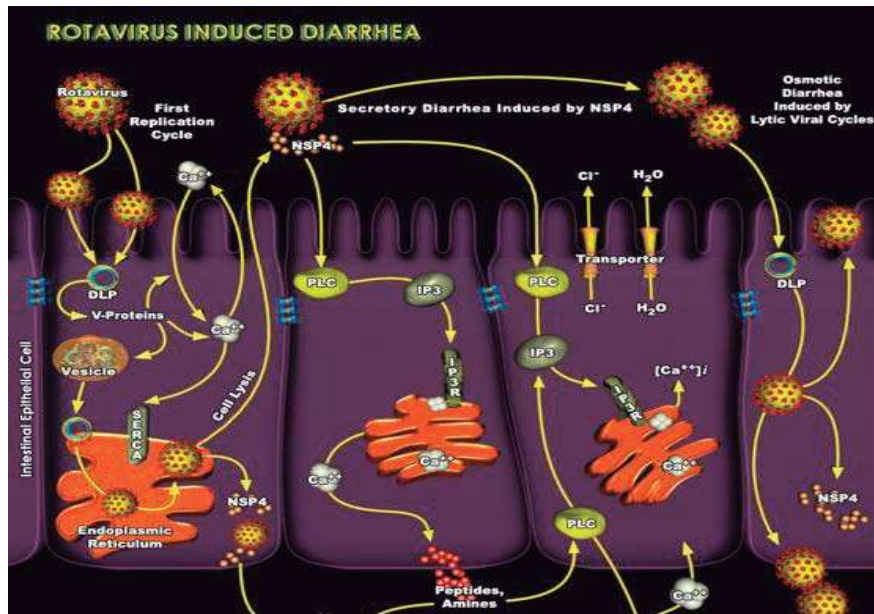
Estos mecanismos, sin embargo, no explicarían porqué muchas veces la diarrea se presenta mucho antes que aparezcan cambios histológicos. En vista de esto se han propuesto otros mecanismos patogénicos.

A) El efecto "Toxina viral-like" se produciría durante el contacto del virus con el enterocito, es decir, que el sólo hecho de entrar en relación con la membrana del enterocito o su ingreso a las células es suficiente para inducir diarrea, esto se comprobó cuando genéticamente se inactivaron a rotavirus, y que a pesar de tener una replicación defectuosa y causar pocos cambios histológicos, inducían diarrea en un modelo animal.

B) Se ha demostrado que la NSP 4 (o un péptido correspondiente a los residuos 114 a 135) se comporta como una "Enterotoxina viral". Actuaría sobre un receptor a nivel de membrana aún no identificado, produciendo incremento de calcio intracitoplasmático, activación de AMPc y aumento en la secreción de cloruro y diarrea secretoria. En 1996 J.M. Ball y col. publicaron en Science su trabajo realizado en ratones de 6 a 10 días de edad a quienes administró NSP4 intraperitonealmente o directamente en el lumen intestinal (siendo mayor la respuesta en esta última), causando diarreas en 1 a 4 horas postadministración. Este efecto fue edad y dosis dependiente. En tal sentido el NSP 4 expresado en células infectadas sería liberado dentro del lumen intestinal y se ligaría a un receptor sobre células adyacentes provocando una diarrea secretoria.

C) En ratones neonatales el rotavirus provoca cambios en la micro circulación a nivel de las vellosidades intestinales. A las 18-48 horas postinfección hay una marcada isquemia (hipoxia) y atrofia de las vellosidades concomitantemente hay incremento pasajero de la división celular necesaria para reconstruir las vellosidades, induciendo hipersecreción. A las 72 horas hay recuperación de las vellosidades y microcirculación hiperémica incipiente. A las 96 horas hay microcirculación hiperemia marcada, alterando el sistema de contracorriente, disminuyendo la osmolalidad de la zona hiperosmótica localizada en la punta de la

vellosidad, empeorando la absorción de agua y prolongando la diarrea. A las 168 horas hay recuperación de la microcirculación y cese de la diarrea.



D) Otra hipótesis planteada últimamente señala que el rotavirus produciría secreción de líquidos y electrolitos por activación del sistema nervioso de la pared intestinal (Sistema Nervioso Entérico). La NSP4 al incrementar el calcio intracelular puede desencadenar la liberación de aminas o péptidos de las células endocrinas del intestino las cuales estimularían a las dendritas o terminaciones nerviosas libres localizadas debajo de la capa epitelial activando los reflejos secretorios nerviosos. Estos hallazgos también implican los potenciales sitios de acción de nuevas drogas en el tratamiento de la diarrea, como por ejemplo el bloqueo de los receptores de los neurotransmisores a nivel de los enterocitos o el empleo de los bloqueadores de los canales de calcio tipo 1 que disminuyen la liberación de aminas y péptidos de estas células.⁵⁷

INMUNIDAD INDUCIDA POR ROTAVIRUS:

Los rotavirus producen una infección local que afecta principalmente las células maduras de las vellosidades intestinales. El período de incubación (1-3 días) es relativamente corto por lo que induce una inmunidad parcial y poco duradera¹⁸³. Este tipo de infección es similar a producida por los virus respiratorios y contrasta con la inmunidad producida por los virus sistémicos, como el polio, rubéola, varicela y sarampión, que tienen un período de incubación más largo (7-14 días), y producen una inmunidad que dura toda la vida¹⁸³. La inmunidad de la mucosa constituye una defensa muy importante en las infecciones intestinales producida por el rotavirus.⁴⁴⁻¹¹⁴

La infección comienza con la unión de los rotavirus a receptores específicos en las células epiteliales. Luego los virus se replican y hacen contacto con las células M que los transportan a las Placas de Peyer donde son presentados por los macrófagos, las células B y

otras células presentadoras de antígenos (células dendríticas) a las células vírgenes (Th0).

Después de haber sido activadas estas células (Th2), ellas inician la expansión clonal de las células B virus específicas y de las células precursoras de los linfocitos T citotóxicos (LTCp) ¹⁸³. Las células B virus específicas y las LCTp penetran los nódulos linfáticos, llegan al sistema circulatorio vía el ducto torácico para luego regresar al lugar de origen donde fueron estimulados o a sitios asociados a respuesta efectora en la lámina propia del intestino. Se sabe que este regreso a lámina propia es selectivo y mediado por receptores en los linfocitos T (integrinas) y en células endoteliales (glicoproteína) ¹⁵⁶. En esta zona, tanto la secreción de IgA por las células B diferenciadas (células plasmáticas) como la diferenciación de las LCTp en linfocitos T citotóxicos CD8⁺ efectores son inducidas por citocinas ¹⁸³. Las citocinas que inducen la secreción de IgA específica por las células plasmáticas son las interleucinas (IL-4, IL-5 y IL-6). La diferenciación de las células B virus específicas en células IgA secretoras (IgA-s) es un proceso que toma de 3-5 días después del período de incubación ⁴⁴. La IgA dimérica se ubica en la superficie basolateral de la vellosidad, adquiere la fracción secretora en el citoplasma y es excretada al lumen intestinal. El mecanismo por el cual la IgA elimina al virus es mediante su unión con el antígeno (interferencia conformacional) bloqueando la unión del virus a los receptores celulares y, por ende, su entrada a la célula. También se ha postulado que la IgA puede actuar intracelularmente ⁷⁶. El interferón y la interleucina IL-2 son las citocinas que promueven la maduración de los CTLp a CTL efectores. La CTL específicas y efectoras residen en la vellosidad intestinal mientras que las células B específicas y las CTLp permanecen en la lámina propia. Así que, mientras las Placas de Peyer son el principal lugar para la inducción de la respuesta inmune, la lámina propia es el principal lugar para la maduración de las células específicas transformándose en efectoras.

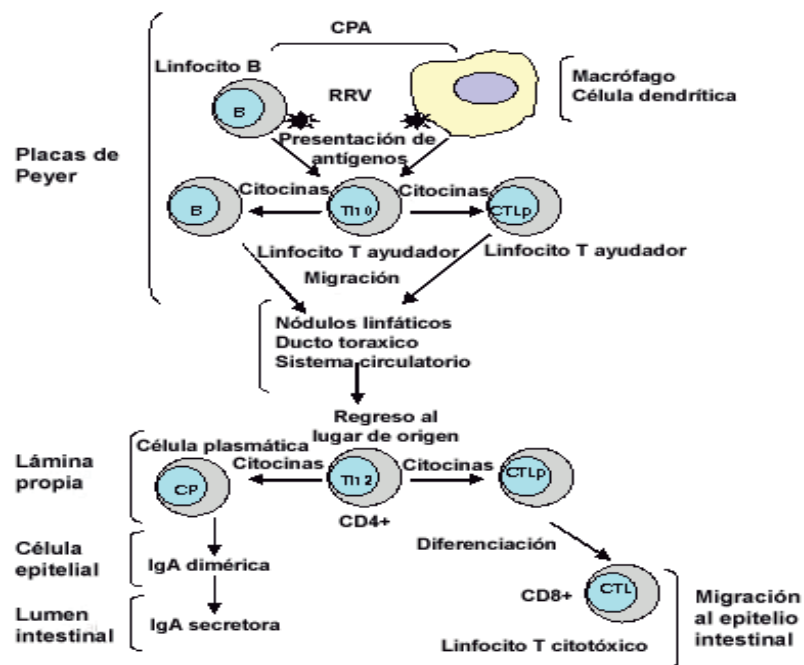


Figura 5: Inmunidad en la infección por rotavirus
Adaptado de Offit, 1996

La desventaja de la inmunidad de mucosa es su corta duración, pero se compensa con una rápida respuesta anamnésica en contactos posteriores -re-exposición- con el antígeno. Cuando este sistema no es estimulado, los anticuerpos disminuyen con el tiempo y su acción protectora mengua de 6 a 12 meses posteriores al contacto viral. Otra desventaja es la posibilidad de presentar dificultades en la respuesta a los antígenos administrados por la vía parenteral. Pero, en el caso de los rotavirus, los estudios hasta el momento indican la producción de una adecuada respuesta sérica a la inmunización parenteral en animales.¹⁴⁻⁶⁵

INFECCIÓN NATURAL Y PROTECCIÓN CLÍNICA:

El papel protector de la inmunidad inducida durante la infección natural por rotavirus ha sido demostrado ampliamente en varios estudios, que constituyen las bases para el desarrollo de vacunas contra este agente viral. El primer estudio fue llevado a cabo por la Dra. Bishop en Australia¹¹, en el cual se demuestra que neonatos infectados con rotavirus durante el primer mes de la vida -seguidos por 3 años- son protegidos contra la enfermedad severa, aunque no así contra re-infecciones; mientras que los neonatos no infectados sufrieron diarreas severas por rotavirus en una significativa mayor proporción que los neonatos infectados. Estudios posteriores, realizados en neonatos en la India⁹ y, en niños lactantes, también confirmaron que la infección primaria protege contra la diarrea severa en contactos posteriores con el virus.¹⁵²⁻²⁶⁶ Posteriormente, un estudio de la historia natural de la infección por rotavirus -el primero de su tipo-, realizado con 200 niños mexicanos, seguidos por 2 años, confirmó estas observaciones³⁷. Este estudio mostró que después de la primera infección natural, independientemente de la severidad, el 88% de los niños quedaron protegidos contra las diarreas severas, 75% fueron protegidos contra las diarreas de cualquier severidad y 40% de los niños quedaron protegidos contra subsecuentes infecciones. Con el aumento del número de infecciones -dos, tres o cuatro- se incrementa el grado de protección, pero se necesitan al menos dos infecciones, sintomáticas o asintomáticas, para prevenir la enfermedad por rotavirus de cualquier severidad³⁷. Es decir que la infección natural no protege contra re-infecciones pero disminuye significativamente la severidad de la enfermedad. Estos resultados fueron también corroborados en un estudio realizado en África, donde se mostró que la infección primaria confiere 70% de protección clínica²⁵⁶. La epidemiología de la enfermedad por rotavirus, que muestra que ellos son causa importante de enfermedad en los primeros años de la vida, confirma estos hallazgos. Varios estudios muestran que la primera infección ocurre en los primeros dos años de vida y está generalmente asociada a diarrea severa, mientras que las re-infecciones se presentan en edades posteriores, durante toda la vida, y son leves o asintomáticas¹¹³⁻¹⁹⁵⁻²¹⁵. Estudios en Venezuela muestran que la severidad de la diarrea por rotavirus disminuye con la edad¹⁹⁶⁻²⁵³. Igualmente, se han descrito diarreas recurrentes causadas por el mismo o diferente serotipo de rotavirus⁹²⁻²³⁰, sin embargo, el segundo o tercer episodio de diarrea presenta una clínica muy leve, en la mayoría de las ocasiones⁹². Estos resultados tienen importantes implicaciones en el desarrollo de una vacuna para rotavirus, ya que la vacuna tendría impacto, fundamentalmente, en la mortalidad y en la enfermedad severa emulando la infección natural.⁴⁴⁻¹⁸³

INMUNIDAD MEDIADA POR ANTICUERPOS Y PROTECCIÓN:

La infección por rotavirus induce inmunidad mediada por anticuerpos específicos IgM, IgG e IgA que pueden ser detectados de los 7 a 28 días post-infección en suero, saliva, contenido duodenal y heces¹⁰³⁻¹⁰⁹⁻¹⁹⁵. De esta manera, los virus que infectan las mucosas, como los rotavirus y virus respiratorios, inducen una respuesta local tipo IgA secretora (IgA-s), factor primordial en la defensa de la mucosa intestinal o vías respiratorias, según el caso. Por otro lado, las proteínas de la capa externa, VP4 y VP7, inducen anticuerpos neutralizantes (IgG) 66,100, y la proteína VP6, ubicada en la capa intermedia, así como la proteína no estructural NSP4, son también inmunogénicas²⁸⁻²⁴⁰.

En general, anticuerpos neutralizantes (IgG) homotípicos a la VP7, y en menor proporción a la VP4, aparecen después de la primera infección³⁴⁻⁷⁰⁻⁹⁰. En cambio, la re-infección estimula la aparición de anticuerpos heterotípicos contra la VP7 y VP4⁷⁰⁻⁹⁰⁻¹⁸³⁻²¹⁸. Lo que quiere decir que la inmunidad producida durante el primer contacto con el virus es principalmente homotípica y la respuesta inmune heterotípica aparece con la edad como resultado de posteriores exposiciones al virus, tanto en niños infectados en forma natural como en niños vacunados³⁵⁻⁷⁰⁻¹⁵⁷⁻¹⁸⁸⁻²⁵⁵. Estos resultados apuntalan o sostienen la necesidad de sufrir, al menos, 2 infecciones para producir una respuesta inmune de amplio espectro, lo que implicaría la necesidad de administrar 2 dosis de la vacuna.

En la actualidad, la relación entre inmunidad mediada por anticuerpos y protección es motivo de controversia y su definición es crítica para el desarrollo de una vacuna. La correlación entre protección e IgA-s específica en el intestino (S-IgA) ha sido demostrada⁴⁴⁻⁶⁹⁻¹⁰⁴. Sin embargo, su presencia en el intestino es de corta duración - menor de 1 año –⁴⁴⁻¹⁰³⁻¹⁸³, lo que explicaría la aparición de episodios recurrentes¹¹⁴⁻¹⁰⁵⁻¹⁴⁸. Se ha postulado que la IgA en suero y en heces podrían ser buenos predictores de la S-IgA secretora⁴⁵⁻¹⁰³ y, en consecuencia, buenos marcadores para los estudios de vacuna. En la infección natural por rotavirus, se ha demostrado que la protección clínica es mediada por IgA específica en suero¹⁵⁻³⁵⁻²⁵⁷ y en heces⁶⁹⁻¹⁵³, aunque se ha reportado que la IgA en heces podría ser mejor predictor de respuesta inmune de tipo protector que la sérica¹⁴⁸. Sin embargo, no se ha demostrado el papel protector de la IgA sérica en niños vacunados⁷⁴⁻²⁵⁷⁻²⁶⁷ y en heces no ha sido evaluada. En este sentido, es de alta prioridad dirigir las investigaciones para encontrar mejores marcadores inmunológicos en la inmunización activa²⁶⁸. Sin embargo, hasta ahora, la respuesta IgA sérica es el ensayo estándar, requerido por los organismos internacionales, para predecir protección, en los ensayos de campo con la vacuna de rotavirus.

El papel protector de los anticuerpos neutralizantes serotipo específicos en suero tampoco está completamente definido. Hay trabajos que reportan una asociación entre protección y títulos pre-existentes homotípicos en suero anti-VP7³⁴⁻³⁵⁻⁷⁰, pero otros estudios no muestran esta correlación³⁸, así como tampoco estudios con niños vacunados¹²⁸⁻²⁵⁹; más bien, se ha demostrado protección heterotípica contra infecciones por rotavirus humanos, en niños vacunados con cepas animales - bovinas- que no comparten el serotipo con las cepas humanas.³⁹⁻⁷²⁻²⁵⁸⁻²⁵⁹

La baja frecuencia de rotavirus asociado a diarrea severa en niños de 0 a 2 meses de edad ¹⁶³⁻²¹⁵⁻²⁵⁶ confirma que los anticuerpos de origen materno, tipo IgG neutralizantes homotípicos o anticuerpos presentes en la leche materna, confieren protección clínica ⁷⁰⁻¹⁸⁴⁻²⁶⁴. Estudios en animales también confirman la protección clínica conferida por la inmunidad pasiva de origen materno ¹¹⁷. También, se ha observado que la administración oral de anticuerpos específicos antirotavirus a niños inmunosuprimidos e inmunocompetentes produce una recuperación más pronta al compararlos con niños no tratados ¹⁶⁸⁻¹⁹⁴.

En síntesis, hasta el momento, no existen acuerdos definitivos sobre la correlación entre inmunidad mediada por anticuerpos y protección, aunque las diferencias metodológicas y la variabilidad en el tipo de muestra, utilizada en la mayoría de los trabajos, podrían explicar la diversidad de resultados ²⁶⁵. Adicionalmente, la información obtenida hasta el momento, muestra cierta utilidad además es la única disponible de fácil uso de la inmunidad por anticuerpos para predecir eficacia en la infección natural, pero se necesitan estudios adicionales que definan mejor el papel protector de los anticuerpos en la inmunización. Además, pareciera, que la presencia de anticuerpos específicos, en el intestino y en cantidad suficiente - sean estos IgA, IgG o neutralizantes-, es crítica para que se produzca el efecto protector ²⁴⁹.

Los resultados contradictorios, en los niños vacunados, complican el logro de marcadores inmunológicos adecuados para predecir el grado de protección, aunque pudieran ser explicados en parte, por el limitado conocimiento de la inmunidad inducida por cepas animales o virus rearreglados, en la inmunización en humanos ²⁶⁵. También, se ha sugerido la posibilidad de utilizar la cuantificación de las células secretoras de anticuerpos circulantes (CSAs), que son un reflejo de la inmunidad intestinal, o de células de memoria, rotavirus específicas T y B en suero, como marcadores que puedan predecir la potencia y eficacia de una vacuna ²⁶⁸.

INMUNIDAD MEDIADA POR CÉLULAS Y PROTECCIÓN:

Ambos componentes de la inmunidad, la mediada por anticuerpos y la mediada por células, cumplen una función en la protección clínica del rotavirus ¹⁻¹⁸³⁻²⁶⁴. Los componentes de la inmunidad mediada por células que participan en la protección y la actividad viral, en humanos y animales, son: células natural killer (NK), linfocitos T citotóxicos (LTCs), las citocinas y otros productos químicos ⁷³. Los LTC específicos ejercen su actividad antiviral a través de la lisis directa, la inducción de apoptosis y la producción de citocinas. Las células NK destruyen la célula infectada y las citocinas tienen funciones críticas en la regulación de la respuesta inmune, y actúan por actividad citotóxica y por mecanismos no citopáticos que eliminan al virus sin destruir la célula infectada.

La inmunidad mediada por células LTC ha sido primordialmente estudiada en modelos animales infectados con rotavirus ¹⁸³ y se conoce poco de ella en humanos. Hasta el momento, se sabe que la inmunidad mediada por células tiene más que ver con la recuperación de la enfermedad que con la prevención. En la infección por rotavirus, la participación de las CTCs, particularmente las CD8 ha sido demostrada ¹⁻¹⁸³, pero también se

ha planteado la participación de las CD4¹. Las citocinas, células NK y otros productos inmunológicos también juegan un papel en la resolución de la enfermedad. Se ha demostrado el papel protector de las células LTC en ausencia de IgA en la clínica de ratones con infección natural⁷⁵, y en ratones vacunados⁸⁶⁻¹⁹⁴. También por otro lado, se ha mostrado la presencia de citocinas, en mayor cantidad en la inmunización cuando se compara con la infección natural, lo que podría explicar el efecto protector de la citocinas o células NK en niños vacunados, en las cuales no se ha demostrado efecto protector mediado por anticuerpos¹⁹⁴.

Igualmente, la modificación del curso de la enfermedad depende de la diferenciación de las células B de memoria en células B secretoras de anticuerpos⁴⁴, lo que se explica, entre otras razones, por el corto período de incubación que tiene el rotavirus¹⁸³. En ratones, las células de memoria B, o la primera línea de defensa en la re-infección, y las LTC, que median, acortando el proceso de la infección, aparecen 3-4 días después de la infección y posiblemente sean las células primarias efectoras las que participan en los mecanismos de defensa⁴⁴. En resumen, las células B y T participan eliminando la viremia en la infección primaria y protegen contra re-infecciones, y las células T, particularmente las CD8, parecen acelerar la eliminación del virus; mientras que los anticuerpos median la protección contra la re-infección y también ayudan a la resolución de la enfermedad¹.

Recientemente, el Dr. Franco y colaboradores caracterizaron las células T en humanos¹⁵⁶⁻¹⁷⁶⁻²¹⁶. Ellos demostraron la presencia de células T rotavirus específicas productoras de interferón gamma, en adultos y niños infectados con rotavirus. Estas células son en su mayoría del tipo CD8+ y expresan el receptor integrina, lo que indica su origen intestinal¹⁷⁶⁻²¹⁶. Pero esta respuesta es menor que la inducida por los virus sistémicos, como el citomegalovirus⁹². También pareciera que el interferón no juega un papel en la infección por rotavirus⁴⁴. Sin embargo, se necesitan futuros estudios para clarificar mejor el papel inmune de las células B y T en la infección por rotavirus inducida por virus salvaje o por vacuna.

Por último, los hallazgos recientes sobre el papel patogénico e inmunológico de la proteína NSP4 y el mecanismo de protección viral asociado a la proteína VP6 abren nuevos caminos en la investigación sobre la inducción de inmunidad mediada por anticuerpos o por células en la infección por rotavirus. Recientemente, se encontró que la proteína no estructural NSP4 tiene la capacidad de producir diarrea - actúa como una enterotoxina y produce diarrea en ratones- y de inducir anticuerpos protectores en ratones¹⁴⁶. Estas investigaciones mostraron que la proteína NSP4 induce una respuesta humoral y es capaz de producir una respuesta celular que posiblemente involucre células T citolítica²⁶⁹. Por otro lado, también se demostró que la proteína VP6, localizada en la capa media del virus, es capaz de inducir inmunidad protectora en ratones -anticuerpos no neutralizantes IgA anti-VP6- y de modificar la infección en ratones inmunodeficientes por inactivación del virus durante la transcitosis en el medio intracelular²⁴⁰. Este mecanismo intracelular de neutralización viral podría explicar la protección heterotípica en la infección natural y durante la inmunización activa con vacunas observada en algunos estudios. Estos hechos presentan nuevos caminos para el entendimiento de la inmunidad del rotavirus y añaden otras

posibilidades para el desarrollo de vacunas que, además, en el caso de la proteína VP6, tendría la ventaja de ser común a los rotavirus del grupo A.

II.- PLANTAMIENTO DEL PROBLEMA:

Los altos índices de morbilidad y mortalidad infantil en los países en desarrollo se deben, en gran parte, a las enfermedades diarreicas, y de acuerdo con la Organización Mundial de la Salud, la diarrea es uno de los cinco principales problemas de salud pública mundial y estimó un billón de episodios de diarrea en niños menores de cinco años en América Latina, África y Asia durante 1988. Se ha informado una frecuencia anual de diarrea de 3.6 episodios por niño en promedio, con una variación de 0.8 a 10.7, constituyendo la causa de por lo menos cinco millones de muertes al año en infantes menores de cinco años. En 60 a 70 % de los casos que fallecen por diarrea, está presente la deshidratación secundaria a la pérdida exagerada de líquidos y electrolitos como causa de muerte. Por otra parte, la mayoría de los pacientes que logran sobrevivir quedan con algún grado de desnutrición.⁷⁸

Afortunadamente, las enfermedades diarreicas han causado un descenso continuo en su participación como causa de muerte en México. Efectivamente, hasta 1960 ocuparon el primer lugar como causa de mortalidad. En este país se inició en 1984 un programa nacional para difundir y aplicar la terapia de hidratación oral. Para 1990, sólo una de cada 20 defunciones fue por enfermedad diarreica, con lo cual se ubicaron en el décimo lugar. Sin embargo, la diarrea aún ocupa el segundo lugar entre los padecimientos infecciosos, con una tasa de 3100 por cada 100 mil habitantes, siendo los menores de un año el grupo más afectado, con una mortalidad de 10 %.¹¹⁻¹⁴ En México, la diarrea es la segunda causa de morbilidad en la población general y la principal causa de demanda de consulta externa y Hospitalaria en los niños menores de cinco años, quienes representan el grupo más vulnerable y con mayor riesgo de evolución grave. Durante 1990, en las instituciones públicas de salud se registraron 2 389 365 casos de diarrea aguda en niños menores de cinco años, con un total de 14 011 defunciones para una tasa de mortalidad de 146.3 por 100 mil niños; 71.6 % de estas muertes ocurrió en el hogar, aunque 67 % había recibido atención médica, 42 % falleció en su domicilio y 80 % había recibido atención médica antes de su defunción.

La diarrea ha sido por años una de las prioridades en los programas de salud en México a fin de disminuir la mortalidad en los menores de cinco años. En 1959 se instituyó el primer centro de rehidratación oral voluntaria en el Hospital Infantil de México "Federico Gómez", el cual fue patrocinado por la Organización Mundial de la Salud. En este sitio se estudiaron 597 lactantes con gastroenteritis y deshidratación, de los cuales 252 se manejaron sin antibiótico, obteniéndose un éxito clínico en 90.9 %; no hubo defunciones.⁷⁸

Como resultado de ello, en el lapso de 1990 a 1996 se observó una importante aceleración en la tendencia descendente de la mortalidad infantil y preescolar por este padecimiento y se logró una reducción de 69.4%. Dicha tendencia no fue homogénea y muestra dos etapas: la primera, que comprende hasta 1993, en la que el descenso fue mayor (56 % en relación con 1990) derivado principalmente del incremento en el uso de la terapia de hidratación oral, de la mejoría en las condiciones sanitarias y de la intensificación de acciones para elevar la cobertura de vacunación antisarampion. En los años posteriores se

observó una segunda etapa de descenso más lento, que probablemente estuvo relacionada con el efecto de consolidación de las acciones mencionadas.

No obstante los avances logrados, el número de muertes por diarrea sigue siendo injustificadamente elevado; en 1995 esta enfermedad fue la cuarta causa de mortalidad infantil con una tasa de 127 por 100 mil nacidos vivos registrados, y la tercera en mortalidad preescolar con una tasa de 15 por 100 mil niños en este grupo de edad. El problema fue más evidente en algunos estados del país con condiciones de pobreza extrema, como Chiapas y Oaxaca.

En el periodo de 1998 al 2004 las enfermedades diarreicas han disminuido en casos de mortalidad (aproximadamente un 65%) hecho que se ha relacionado a los diferentes programas que se han empleado para la vigilancia y control de las enfermedades diarreicas y la introducción de las sales de rehidratación oral (vida suero oral)¹⁶⁰, pero en contraste con la disminución de la mortalidad, la morbilidad se ha mantenido estable e incluso muestra una tendencia ascendente hacia el final de la década de los noventa,⁸⁻¹⁶⁶ por lo que es evidente que este problema de salud sigue siendo un motivo de consulta frecuente y cotidiano en el primer nivel de atención.¹⁶⁵

En cuanto a la etiología, está bien demostrado que los agentes más frecuentes son *Escherichia coli* enterotoxigénica y rotavirus, en los cuales no está indicado el manejo con antibióticos. Es importante reconocer que la diarrea casi siempre se autolimita y que la mortalidad por esta enfermedad se relaciona con las complicaciones, siendo la deshidratación la causa de muerte en cerca de 70 %.

III.- JUSTIFICACION:

Cada año, en el mundo las diarreas agudas representa aproximadamente 384 000 casos, 64 000 consultas, 30 000 hospitalizaciones y 1 600 muertes.²¹¹

La tasa promedio de mortalidad asociada a la enfermedad diarreica en América Latina es de 650/ 1000,000 de habitantes por año.¹⁹⁹

En México, la diarrea aguda es una de las primeras cinco causas de mortalidad en niños de entre 1 y 5 años²⁰⁷, la tasa promedio de mortalidad asociada a la enfermedad diarreica es de 62.9/ 100,000 de habitantes por año.⁷⁸

Aunque la mortalidad de la enfermedad diarreica ha disminuido no ha sido así con la morbilidad ya que se estima que en México un niño presenta de 2 a 4 episodios de diarrea por año.

Esto es muy importante ya que la enfermedad diarreica ocasiona grandes pérdidas económicas ya que se estima que el costo de un episodio de diarrea tanto médico y no médico es de \$289.00 USD y los cuidados de hospitalización y seguimiento ambulatorio para un paciente con diarrea resulta en un costo aproximado de 2 billones de dólares al año.¹⁹⁹

IV.- OBJETIVO GENERAL:

- Determinar la asociación de Rotavirus con los grupos patógenos de Escherichia coli que causan diarrea en lactantes.

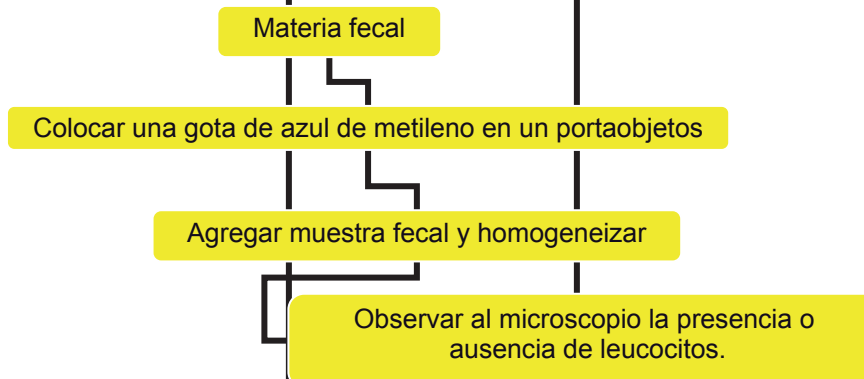
V.- OBJETIVOS ESPECIFICOS:

- Establecer el sexo y la edad de los niños donde se presente la asociación de estos patógenos.
- Conocer la estacionalidad en la que se da la asociación
- Identificar cuales son los grupos patógenos de Escherichia coli que más se asocian a Rotavirus.
- Valorar la utilidad de citología de moco fecal

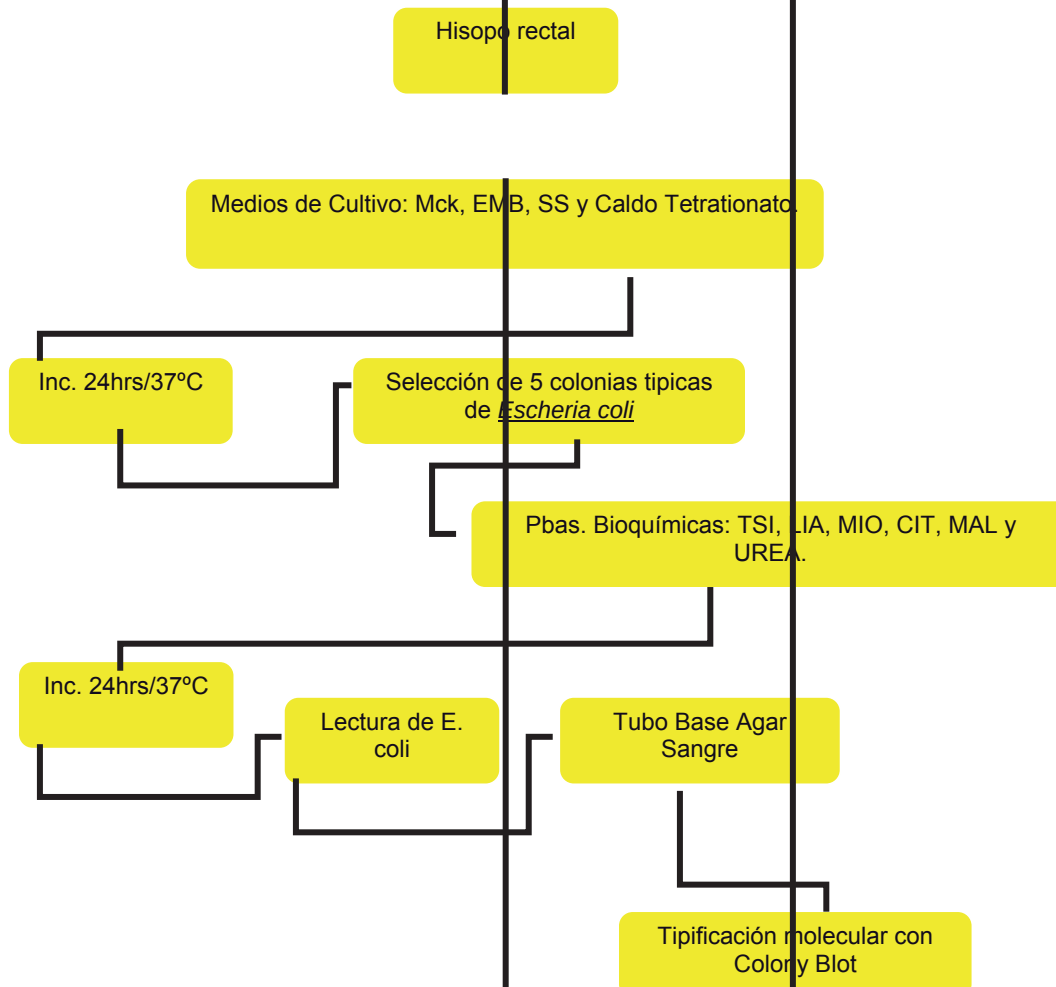
VI.- METODOLOGÍA:

- TIPO DE ESTUDIO: Ambispectivo, transversal y longitudinal.
- UNIVERSO DE TRABAJO: 231 muestras de materia fecal procedentes de niños menores de 2 años con cuadro diarreico agudo que acudieron al Hospital Infantil de Morelia Michoacán en el periodo de Enero del 2004 a Abril del 2006.
- CRITERIOS DE INCLUSIÓN: Todas la muestras de materias fecales obtenidas de niños menores de 2 años con diagnóstico de diarrea aguda que se les haya realizado citología del moco fecal (CFM), coprocultivo, tipificación de Escherichia coli por el método Colony Blot.- INDRE y rotaforesis.
- CRITERIOS DE EXCLUSIÓN: Muestras de materia fecal que les falte alguno de los parámetros estudiados, CFM. Coprocultivo, Colony Blot o rotaforesis
- CRITERIOS DE ELIMINACIÓN: Muestras de materia fecal con todos los parámetros estudiados, pero que provenga de niños mayores de 2 años o en las que no se cuente con los datos completos del paciente.
- VARIABLES DE ESTUDIO:
 - *Edad: Cuantitativa discontinua.
 - *Sexo: Cualitativa nominal.
- FUENTES DE INFORMACIÓN: Bitácoras de registro del laboratorio de investigación de Microbiología y Parasitología del Hospital Infantil de Morelia
- ANALISIS DE RESULTADOS: Porcentajes, números absolutos y programa Excel.
- PROCESAMIENTO DE LA MUESTRA FECAL: A todas las muestras de materia fecal que lleguen al laboratorio se les realizara Citología del moco fecal (CMF), Rotaforesis, Coprocultivo y las cepas de Escherichia coli se enviaron al INDRE para que se les realice tipificación molecular por el método de Colony Blot.

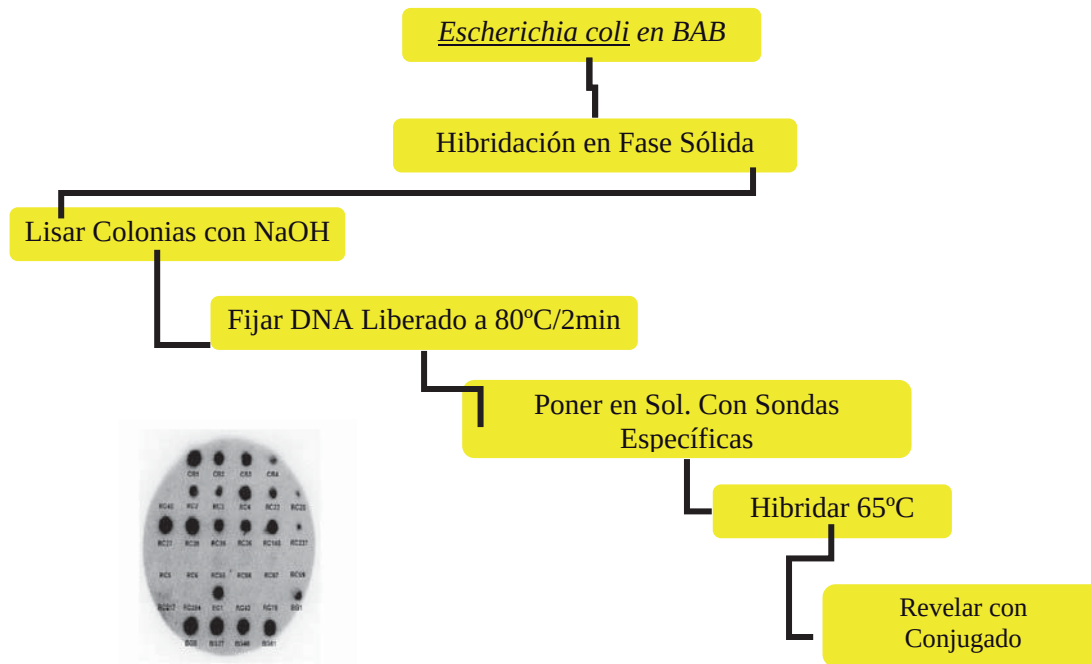
CITOLOGIA DEL MOCO FECAL (CMF):



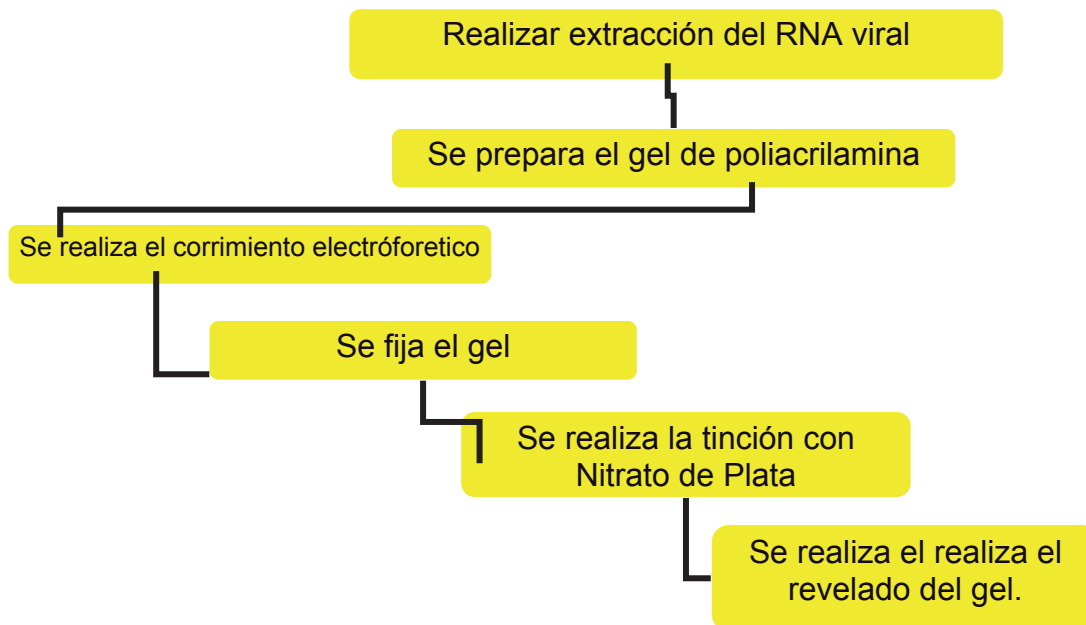
COPROCULTIVO:



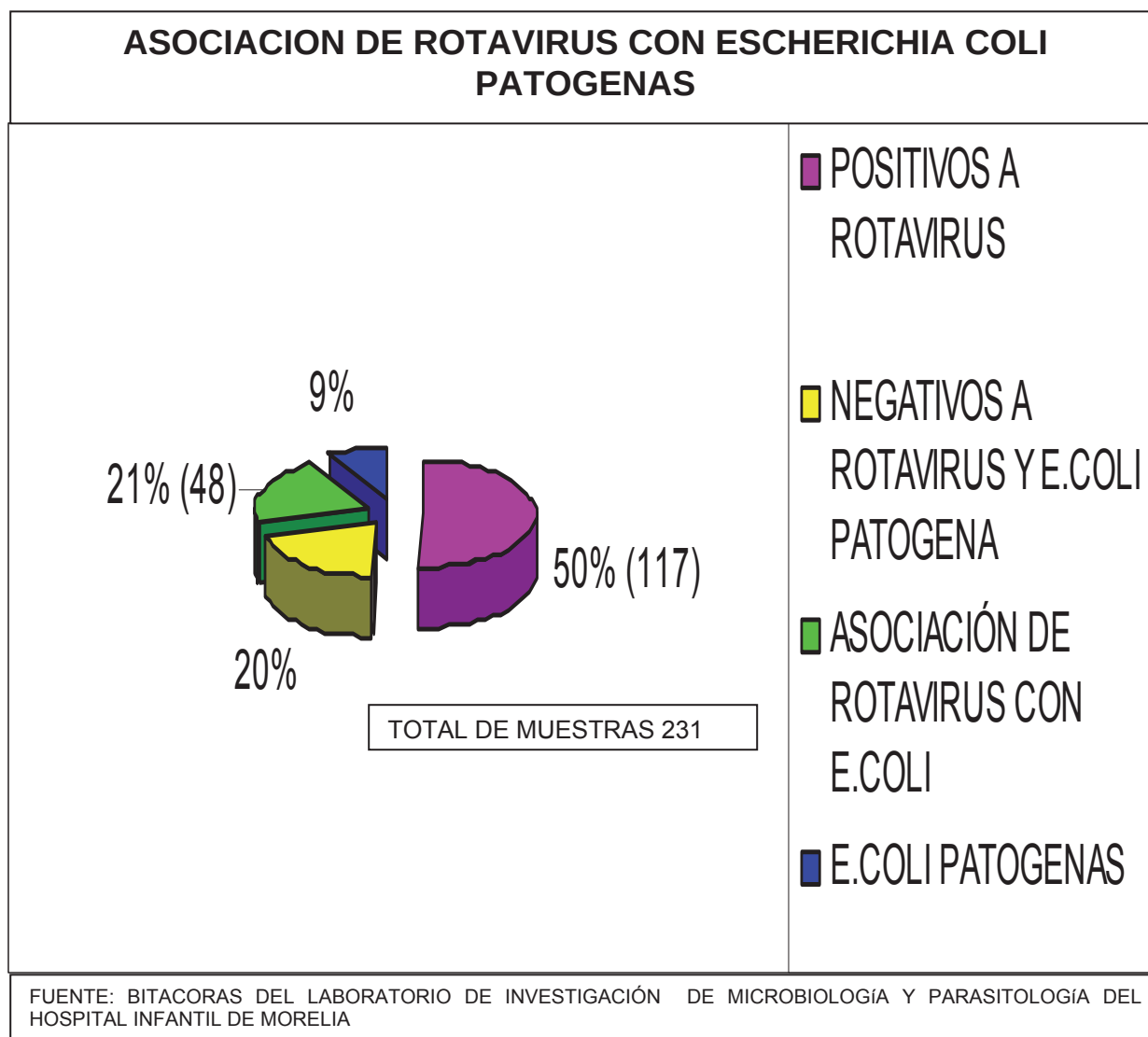
COLONY BLOT:



ROTAFORESIS:

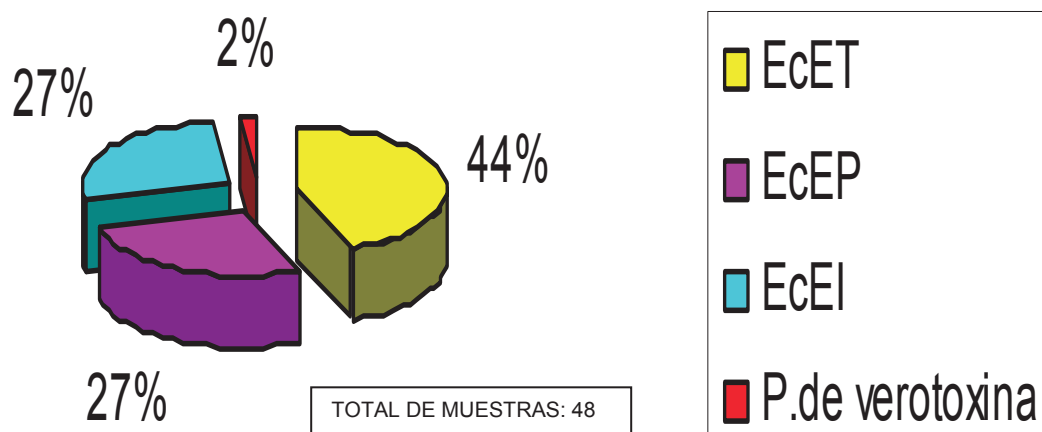


VII.- RESULTADOS



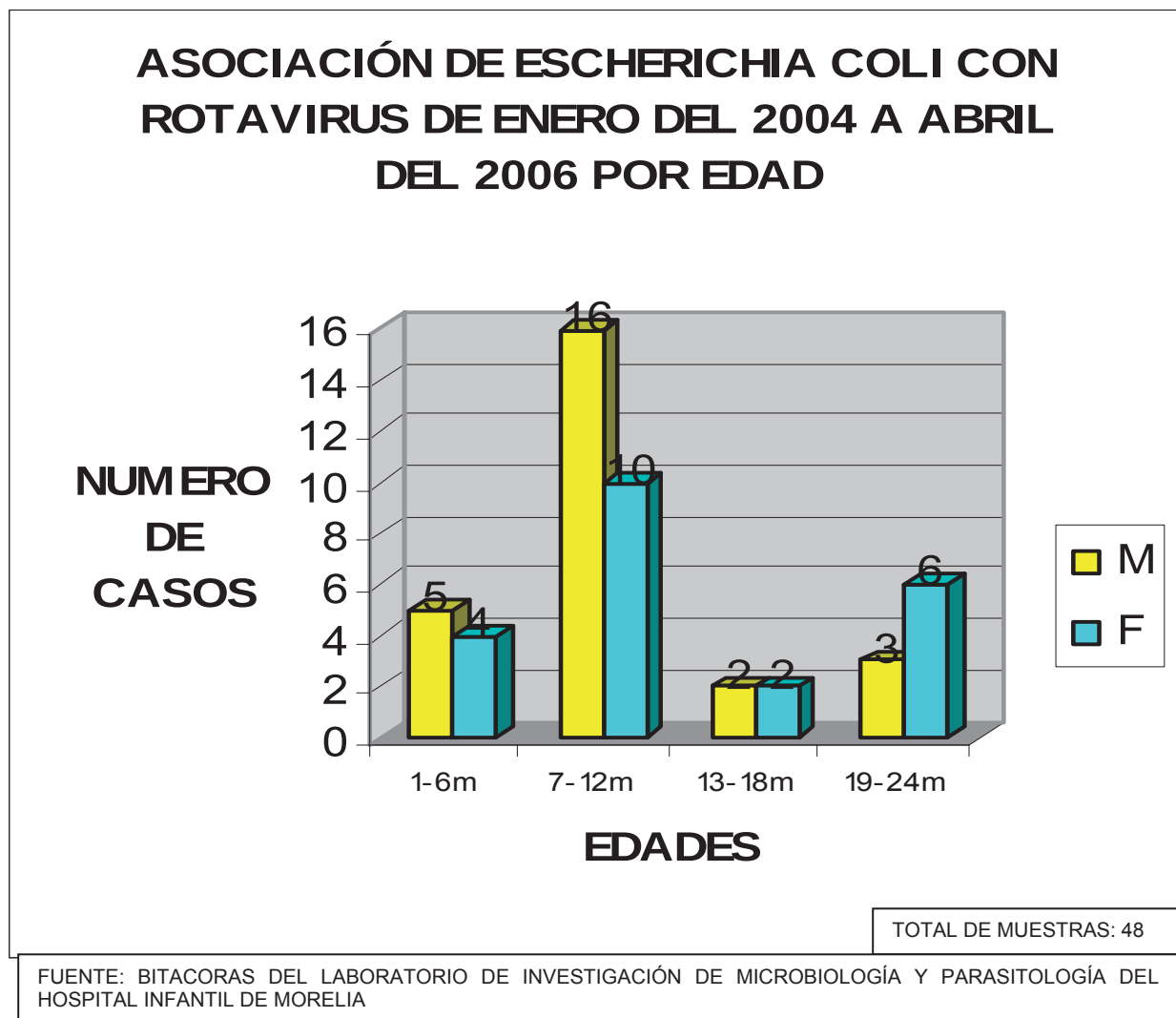
Se procesaron un total de 231 muestras de materia fecal, de las cuales el 50% resultaron positivas solamente a Rotavirus y el 21% resultaron positivas tanto a Rotavirus como algún grupo patógeno de *Escherichia coli* y solo un 9% fueron positivos a algún grupo patógeno de *Escherichia coli* sin que hubiera una asociación.

GRUPOS PATOGENOS DE ESCHERICHIA COLI ASOCIADOS A ROTAVIRUS DE ENERO DEL 2004 A ABRIL DEL 2006



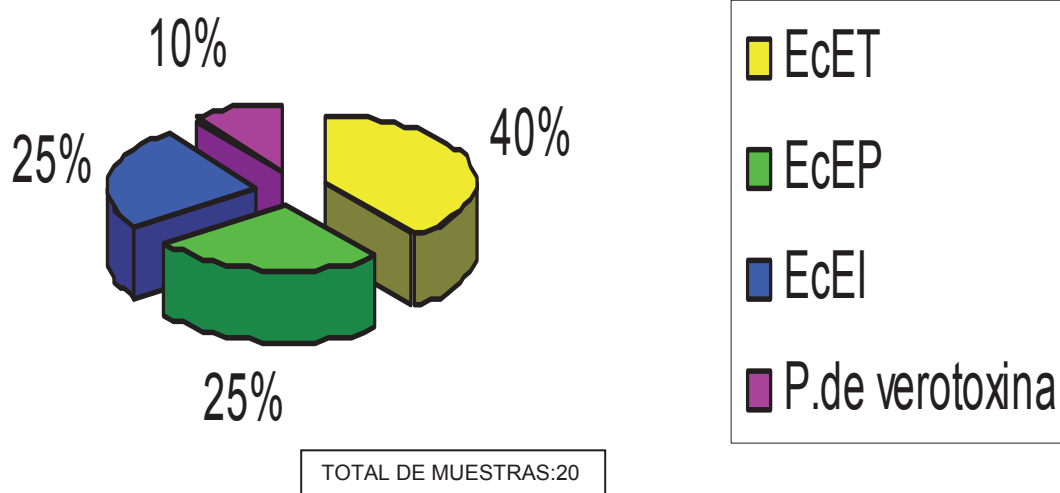
FUENTE: BITACORAS DEL LABORATORIO DE INVESTIGACIÓN DE MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA DEL HOSPITAL INFANTIL DE MORELIA.

De las 48 muestras que resultaron positivas a la asociación entre Rotavirus y algún grupo patógeno de Escherichia coli observamos que en un 44% de los casos Escherichia coli enterotoxigénica (ETEC) es la que más se asocia a Rotavirus, seguida en un 27% por Escherichia coli enteropatógena (EPEC) y Escherichia coli enteroinvasiva (EIEC) y finalmente tan solo en un 2% Escherichia coli productora de verotoxinas.



El grupo etario más afectado por la asociación entre estos patógenos oscila entre los 7 y 12 meses de edad, así como el sexo masculino es el más afectado.

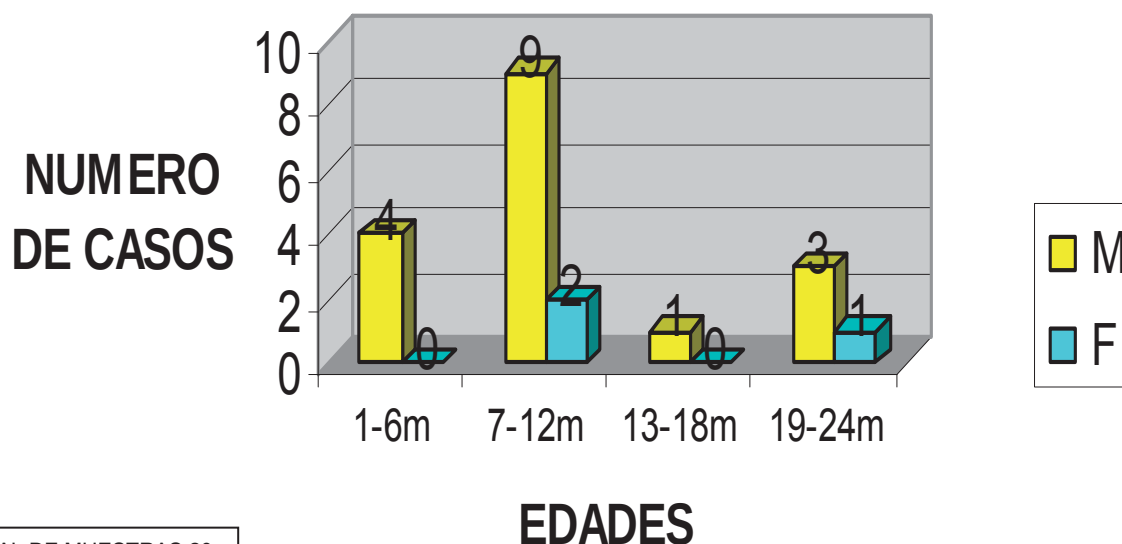
GRUPOS PATOGENOS DE ESCHERICHIA COLI SIN ASOCIACIÓN A ROTAVIRUS DE ENERO DEL 2004 A ABRIL DEL 2006



FUENTE: BITACORAS DEL LABORATORIO DE INVESTIGACIÓN DE MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA DEL HOSPITAL INFANTIL DE MORELIA

De las 28 muestras que dieron positivas a algún grupo patógeno de *Escherichia coli* sin que estas se asociaran a Rotavirus, logramos ver que en 40% se identificó a *Escherichia coli* enterotoxigénica (ETEC) como la primera causante de la diarrea aguda en estos casos, seguida en un 25% por *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC) y *Escherichia coli* enteroinvasiva (EIEC) y solo en un 10% se identificó a *Escherichia coli* productora de verotoxinas.

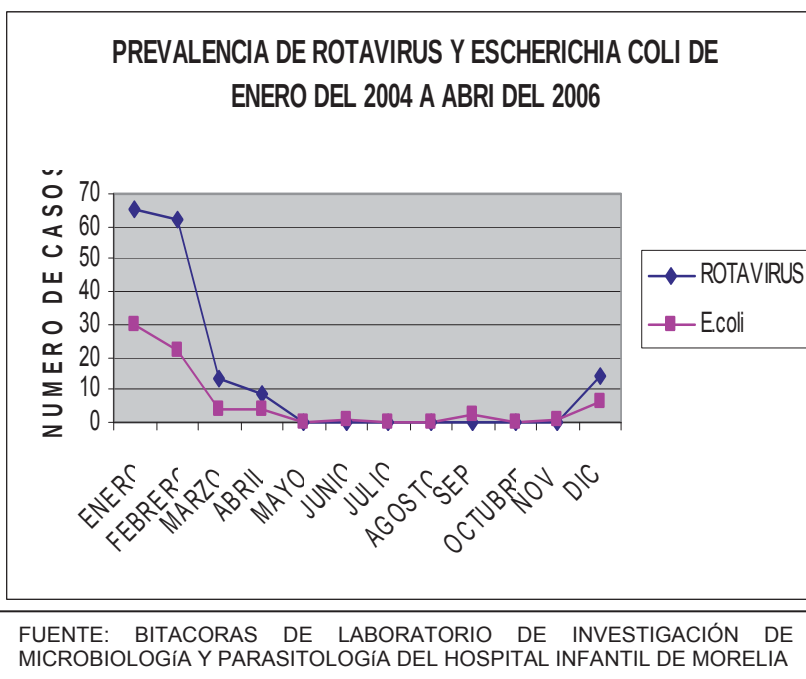
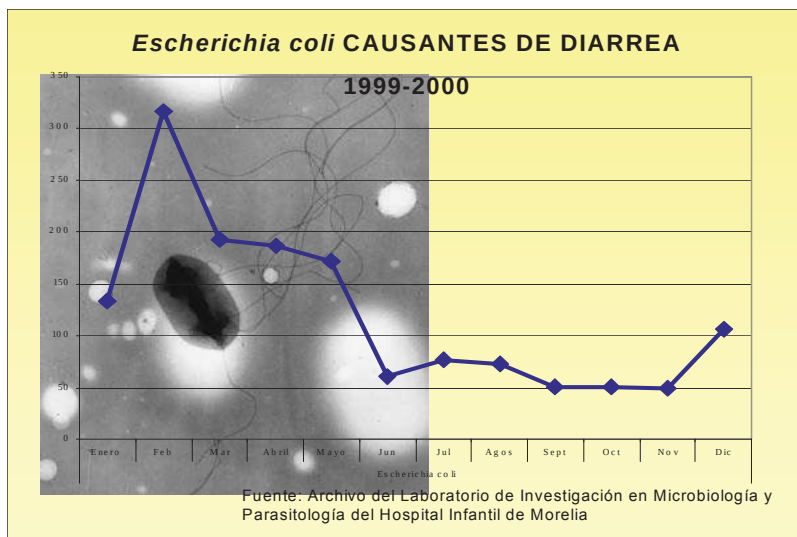
CASOS DE ESCHERICHIA COLI PATOGENA SIN ASOCIACIÓN CON ROTAVIRUS POR EDAD



TOTAL DE MUESTRAS:20

FUENTE: BITACORAS DEL LABORATORIO DE INVESTIGACIÓN DE MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA DEL HOSPITAL INFANTIL DE MORELIA.

De los casos en donde solo identificamos cepas patógenas de *Escherichia coli* sin que estas se asociaran con rotavirus, se vuelve a observar que el grupo etáreo más afectado oscila entre los 7 y 12 meses, así como el sexo masculino nuevamente es el más afectado.



La asociación entre Rotavirus y los grupos patógenos de *Escherichia coli* se da en los meses invernales de Noviembre a Marzo, esto es importante por que ya se sabe que Rotavirus se presenta en Invierno, pero la *Escherichia coli* se presenta durante todo el año ya que estudios realizados previamente en el Laboratorio del Hospital Infantil demuestran que esta enterobacteria se mantiene como causante de diarreas durante todo el año pero también tiene un pico en invierno al igual que Rotavirus , asociándose así con Rotavirus

VALORACION DE LA CITOLOGÍA DEL MOCO FECAL

ASOCIACIÓN DE ROTAVIRUS CON ESCHERICHIA COLI PATOGENA			
	Con asociación	Sin asociación	
CMF con leucocitos	29	15	44
CMF sin leucocitos	19	5	24
	48	20	68

$$S = \frac{A}{a + c} \times 100 = \frac{29}{29 + 19} \times 100 = 60.41\%$$

$$E = \frac{b}{b + d} \times 100 = \frac{15}{15 + 5} \times 100 = 75\%$$

$$VPP = \frac{a}{a + b} \times 100 = \frac{29}{29 + 15} \times 100 = 65.90\%$$

$$VPN = \frac{c}{c + d} \times 100 = \frac{19}{19 + 20} \times 100 = 79.16\%$$

El estudio realizado a la citología del moco fecal nos demostró que esta tiene una sensibilidad de 60.41%, una especificidad de 75 %, un valor de predicción positiva de 65.90% y un valor de predicción negativa de 79.16%

FUENTE: BITACORAS DEL LABORATORIO DE INVESTIGACION DE MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA DEL HOSPITAL INFANTIL DE MOREIA.

VIII.- DISCUSIÓN

Este estudio realizado en el Hospital Infantil de Morelia se logro determinar que Rotavirus se presenta en un 50% de los casos de diarrea aguda que se presentan en este hospital sin que este se llegue a asociar a algún grupo patógeno de Escherichia coli, lo cual demuestra claramente que este agente viral es el primer causante de diarrea aguda en nuestro medio, esto concuerda con lo descrito en la literatura principalmente por el Doctor Velásquez y cols. ellos reportan que Rotavirus es el principal agente causal de diarreas agudas ya que este se presenta entre un 25% a un 50%.⁵¹

En el 21% de las muestras estudiadas se observó una asociación de Rotavirus con Escherichia coli esto que se logro demostrar es algo muy importante ya que no hay estudios realizados con esta asociación, pero si existen muchos estudios sobre Rotavirus y sobre los grupos patógenos de Escherichia coli como los realizados por el Doctor Pigeon_Oliveros²⁰⁰, donde reporta que Rotavirus sigue siendo el primer agente causante de diarreas agudas y que esto mismo concuerda con lo dicho por Felipe Mota que dice que rotavirus sigue siendo el primer causante de diarreas agudas en época invernal en un 51%⁶⁸, mientras que los estudios realizados de Escherichia coli por Nataro y Harper demuestran la importancia que tiene este enteropatógeno como agente causal de diarreas agudas en todo el mundo ya que según sus investigaciones esta bacteria causa cerca del 35% de las diarreas agudas¹⁷², pero todos estos estudio han sido para estudiar a cada agente por separado, no se ha realizado un estudio buscando una asociación entre estos dos patógenos causantes de diarrea aguda, por lo que este trabajo es uno de los primeros en demostrar que estos patógenos se asocian para producir probablemente un cuadro diarreico más severo.

Escherichia coli enterotoxigénica es la que más se asocia a Rotavirus en un 44%, seguida por Escherichia coli enteropatógena y Escherichia coli enteroinvasiva en un 27%. Estos resultados concuerdan con estudios realizados por Olarte y cols. en cuanto a que Escherichia coli enterotoxigénica es una de las principales causantes de diarrea aguda, ya que el reporta que Escherichia coli enterotoxigénica es causante de la diarrea en un 17% y que Escherichia coli enteropatógena la causa en un 10%²⁰⁹. Otros estudios relacionados

realizados por Cravioto y cols. ellos reportan en un trabajo realizado en una localidad rural de Morelos en 1995 a Escherichia coli enterotoxigénica como el primer agente productor de diarrea en un 33.5%, seguido por Escherichia coli enteropatógena en un 28%¹¹²

En esta investigación la edad a la que más afecta la asociación entre Rotavirus y Escherichia coli patógena oscila entre los 7 y 12 meses de edad y el sexo que más se ve afectado o que es más susceptible es el sexo masculino. Cabe señalar que estos datos concuerdan bien con lo reportado en la literatura ya que los estudios realizados por el Doctor Rivas y cols. ellos describen que en México, en áreas urbanizadas los niños entre edades de 6 a 12 meses presentan cuadros de diarrea aguda²¹³, otros estudios realizados por la Doctora Fernández nos dicen que los niños que mas presentan diarrea aguda son los menores de dos años⁵² además también una investigación de Diana y cols. y de Felipe Mota y cols. demostraron que hay un predominio de las enfermedades diarreicas en los varones con un aproximado del 52% de los casos⁶⁸.

Cabe señalar que también se obtuvieron los datos de las diarreas causadas por Escherichia coli sin que estas se asociaran a Rotavirus y se obtuvo el mismo patrón ya que el principal causante de la diarrea aguda fue Escherichia coli enterotoxigénica en un 40% seguida por Escherichia coli enteropatógena y Escherichia coli enteroinvasiva y esto vuelve a concordar con los estudios que realizo Olarte²⁰⁹ mencionados anteriormente y además la edad más afectada que este estudio revelo vuelve a ser la edad de 7 a 12 meses de edad²¹³ y el sexo masculino vuelve a ser el más afectado por estas entero bacterias, lo cual vuelve a reforzar lo encontrado en este trabajo.

Por otra parte se logró observar la prevalencia que tiene Rotavirus con Escherichia coli, se observa que Rotavirus sigue presentandose en los meses invernales y esto esta muy bien demostrado por estudios como los realizados por Ward y cols. los cuales dicen que en los países desarrollados de clima templado, los Rotavirus presentan una marcada estacionalidad, con alta frecuencia durante los meses más fríos y secos del invierno²⁶⁵. Estudios que se han realizado en el laboratorio de Investigación de Microbiología y Parasitología del Hospital infantil de Morelia demuestran que Escherichia coli por su parte se

mantiene constante durante todo el año como causante de diarrea, pero se observa que ambos patógenos tienden a tener un repunte en los meses invernales y así se asocian ambos para probablemente causar una diarrea aguda más severa, esto no se puede comparar con algún otro dato de la literatura ya que como se a mencionado anteriormente no existen estudios sobre esta asociación.

En las muestras estudiadas se encontró la presencia de leucocitos polimorfonucleares en una mayor proporción que los monocitos y esto es contrario a lo que se reporta en la literatura la cual dice que una diarrea aguda causada por Rotavirus no presenta leucocitos en heces, pero si la diarrea aguda es causada por alguna bacteria los leucocitos si van a estar presentes en las heces y en este estudio si se encontró la presencia de estas células por lo que para nosotros esto refuerza nuestro estudio de que si existe una asociación entre Rotavirus y algún grupo patógeno de Escherichia coli ya que los leucocitos polimorfonucleares aparecen para atacar a la bacteria que esta asociada a Rotavirus y no al Rotavirus.

IX.- CONCLUSIÓN

En base a todos los resultados que se obtuvieron en esta investigación podemos concluir que Rotavirus sigue siendo el principal agente causal de diarreas agudas en nuestro medio pero que también existe una asociación muy importante entre Rotavirus y los grupos patógenos de *Escherichia coli* en especial con *Escherichia coli* enterotoxigénica (ETEC) para causar probablemente una diarrea aguda más severa que la que causa cada uno por separado y que el grupo más vulnerable a esta asociación son los niños que se encuentran los 7 y 12 meses de edad aunado a que el sexo masculino es el más afectado por estos patógenos ya que en ellos se observaron más casos de diarrea aguda que en el sexo femenino y esta asociación tiene lugar en los meses invernales que es donde se puede observar un repunte de ambos patógenos.

En base a estos resultados se pueden tomar decisiones para las autoridades del sector salud para apoyo de los programas de vigilancia epidemiológica de las diarreas, de igual manera poder normar las medidas que se pueden llevar a cabo para el tratamiento de los niños con diarrea aguda y así ayudar al mejoramiento de la salud de la población infantil.

X.-GLOSARIO

- ALEATORIOS:** Acontecimientos inciertos o relativo al azar.
- AMBIPECTIVO:** Estudio donde se recolectan datos pasados y presentes
- ANAMNESICA:** Parte del historial clínico recopilado para conocer los datos personales anteriores a la enfermedad del paciente.
- ANURIA:** Suspensión patológica de la secreción urinaria.
- ATROFIA:** Falta de desarrollo de cualquier parte del cuerpo.
- BACTERIA:** Organismo unicelular microscópico sin núcleo y desprovisto por lo común de pigmentos fotosintéticos.
- CHOQUE HIPOVOLEMICO:** Desequilibrio electrolítico.
- CISTITIS:** Inflamación de la vejiga.
- COMENSAL:** Animal que vive dentro de otro sin perjudicarlo.
- CORRELACIÓN:** Correspondencia entre dos o más cosas o series de cosas.
- DESHIDRATACIÓN:** Quitar a un cuerpo el agua que contiene.
- DISEMINACION:** Esparcir a algún otro lugar.
- DUODENO:** Parte primera del intestino delgado.
- ELONGACIÓN:** Alargamiento accidental de un miembro o estiramiento quirúrgico de un nervio.
- ENTEROCITO:** Célula del estómago.
- EPIDEMIOLOGIA:** Estudio de los diferentes factores que intervienen en la aparición, evolución y profilaxis de las enfermedades.
- FENOTIPO:** Expresión o manifestación externa de un genotipo sometido a ciertas condiciones.
- GASTROENTERITIS:** Inflamación simultánea de las mucosas de estómago y los intestinos.
- GENOTIPO:** Conjunto de genes que se encuentran en los cromosomas de las células de un individuo de una determinada especie.
- HIPOXIA:** Condición que presenta un organismo sometido a un régimen respiratorio con escasez de oxígeno.
- INCUBACIÓN:** Desarrollo de una infección en el organismo, antes de que se presenten los primeros síntomas de la enfermedad.
- ISQUEMIA:** Disminución de la circulación sanguínea en un órgano debido a la alteración transitoria o permanente de las arterias aferentes.
- LETARGICO:** Estado de disminución de la consciencia o somnolencia profunda y prolongada.
- LIGANDO:** Átomo, molécula o grupo químico que se une al átomo central de un compuesto de coordinación.
- LIOFILIZADOS:** Deseccación mediante el vacío productos o elementos orgánicos para conservación.
- LISIS:** Disolución, disociación.
- LOCUS:** Posición que ocupa un gen o uno de sus alelos en todos los cromosomas homólogos.
- LONGITUNIDAL:** Hecho o colocado en su dirección.
- MENGUAR:** Disminuir o aminorar.
- MORBILIDAD:** Proporción de personas que enferman en un lugar y tiempo determinado.

MORTALIDAD: Índice demográfico que indica el número de defunciones respecto a la población total de una región o de un país, así como el número de muertes en ella durante un cierto período de tiempo.

OLIGURIA: Merma en la cantidad de orina que se excreta en un cierto período de tiempo.

PANCREATITIS: Inflamación del páncreas.

PARASITOS: Organismo que vive en el interior o la superficie de otro, llamado huésped, a expensas del cual se alimenta.

PATOLOGIA: Parte de la medicina que trata del estudio de las enfermedades.

PLASMIDOS: Elemento genético que tiene forma de pequeña cadena circular de ADN, separado del cromosoma, en numerosas bacterias.

PROSTAGLANDINAS: Sustancia orgánica de muy variadas funciones fisiológicas, entre las que se encuentran la activación de la contracción de la musculatura.

SÍNDROME: Serie de síntomas propios de una enfermedad determinada.

TENESMO: Sensación dolorosa o molesta en el esfínter anal o uretral.

VULNERABLES: Que puede ser herido de forma física.

VIRULENCIA: Producido por un virus.

VIRUS: Entidad compuesta de un ácido nucleico y una cubierta proteica, que no manifiesta vida aparente, visible únicamente al microscopio electrónico, capaz de reproducirse en el interior de las células de otros seres y causante de enfermedades infecciosas.

XI.- ABREVIATURAS

A-E: Histopatología uniry-attachingand effeig.
CFA: Factor de colonización antigénico.
CT: Enterotoxina del cólera.
DAEC: Escherichia coli de Adherencia difusa.
DNA: Ácido Desoxirribonucleico.
EAEC: Escherichia coli enteroagregativa.
EHEC: Escherichia coli enterohemorrágica.
EIEC: Escherichia coli enteroinvasiva.
EN: Sistema Nervioso Enterico.
EPEC: Escherichia coli enteropatógena.
Esp: proteína secretora.
ETEC: Escherichia coli enterotoxigénica.
KDa: Kilodaltones.
LB: Linfocito B
LT: Linfocito T
LT: Toxina termolábil
LTc: Linfocito T citotóxico.
MDa: Megadaltones
NK: Natural-Killer.
Sep: Secreción de proteínas de Escherichia coli.
ST: Toxina termoestable.
SC: Componente secretorio.
RER: Retículo endoplasmico rugoso.
RNA: Ácido Ribonucleico.
Tir:Traslocated intimin receptor.
VOS: Vida Suero Oral.
VT: Verotoxina
VT2e: Toxina edematosa.

XII.- ANEXOS

CITOLOGIA DEL MOCO FECAL:

MATERIAL:

- Guantes
- Portaobjetos
- Cubreobjetos
- Colorante azul de metileno
- Palillos
- Microscopio(Imagen 1)



IMAGEN 1.- MATERIAL PARA CITOLOGIA DEL MOCO FECAL
FUENTE: LABORATORIO DE INVESTACIÓN DE MICROBIOLOGÍA Y
PARASITOLOGÍA DEL HOSPITAL INFANTIL DE MORELIA

MUESTRA BIOLÓGICA:

- Materia fecal

METODO:

- En un portaobjetos colocar una gota de azul de metileno y con un palillo tomar materia fecal y mezclar uniformemente con el colorante.(Imagen 2)
- Colocar un cubreobjetos y observar en el microscopio con el objetivo de 40X, determinar presencia o ausencia de leucocitos. (Imagen 3)

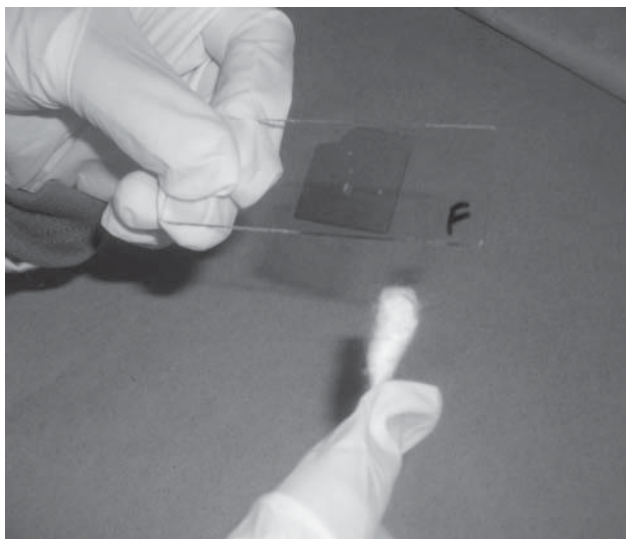


IMAGEN 2.- CITOLOGIA DEL MOCO FECAL
FUENTE: LABORATORIO DEL HOSPITAL INFANTIL DE MORELIA MICHOACÁN



IMAGEN 3.- OBSERVACION DE LA CITOLOGIA DEL MOCO FECAL.
FUENTE: LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA Y PARASITOLOGIA DEL HOSPITAL INFANTIL DE MORELIA

COPROCULTIVO:

MATERIAL:

- Guantes
- Placas de petri
- Incubadora
- Tubos de ensaye con tapa rosca
- Rejilla
- Incubadora
- Hisopos
- Medio Cary Blair como medio de transporte
- Agar Mc Conckey
- Agar eosina Azul de Metileno(EMB)
- Caldo Tetratonato (Imagen 4)

MARIA DE LOURDES SÁNCHEZ CRUZ



IMAGEN 4.- MATERIAL PARA REALIZAR COPROCULTIVO
FUENTE: LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA Y DE PARASITOLOGÍA DEL
HOSPITAL INFANTIL DE MORELIA.

MUESTRA BIOLÓGICA:

- Materia Fecal

PROCEDIMIENTO:

- Con un hisopo estéril se toma muestra de materia fecal y se coloca en un tubo que contenga el medio de transporte Cary Blair (Imagen 5)
- Se descarga el hisopo en placas con agar McConkey , EMB y caldo tetratonato con yodo. (Imagen 6)
- Se incuba por 24 horas a 37 grados centígrados.
- Se observa el crecimiento de colonias y se les realizan pruebas bioquímicas para verificar que sean cepas de Escherichia coli (Imagen 7)



IMAGEN 5.- COPROCULTIVO
FUENTE: LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA
DEL HOSPITAL INFANTIL DE MORELIA.



IMAGEN 6.- COPROCULTIVO
FUENTE: LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA
DEL HOSPITAL INFANTIL DE MORELIA.



IMAGEN 7.- SELECCIÓN DE 5 COLONIAS DE E. COLI
FUENTE: LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA
DEL HOSPITAL INFANTIL DE MORELIA.

PRUEBAS BIOQUIMICAS:

MATERIAL:

- Tubos con tapa rosca
- Rejilla
- Incubadora
- Agar triple hierro y azúcar(TSI)
- Agar de hierro y lisina (LIA)
- Agar Citrato de Simmons
-
- Agar movilidad, indol y ornitina (MIO)
- Caldo Malonato
- Caldo urea
- Reactivo de Ehrlich

MUESTRA BIOLOGICA:

- Colonia Bacteriana

METODO

- Se toman cinco colonias con una asa bacteriológica, cada colonia se siembra en una batería de pruebas bioquímicas que son caldo urea, caldo malonato, MIO, Citrato, LIA y TSI y se siembran según la consistencia de los agares, primero los medios líquidos, luego los semisólidos y al final los sólidos (Imágenes 8, 9, 10, 11, 12 y 13)

- Se incuban por 24 horas a 37 grados centígrados
- Se le agrega el reactivo de Ehrlich al tubo MIO
- Se observan los tubos para ver que den la bioquímica típica de *Escherichia coli*
- Si se obtiene cinco cepas de *Escherichia coli* se procede a sembrarlas en un tubo de agar BAB para ser enviadas al INDRE para que se les realice la tipificación molecular. (Figura 14)



IMAGEN 8.- PRUEBAS BIOQUIMICAS (UREA)
FUENTE: LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA DEL HOSPITAL INFANTIL DE MORELIA.



IMAGEN 9.- PRUEBAS BIOQUIMICAS (MALONATO)
FUENTE: LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA DEL HOSPITAL INFANTIL DE MORELIA.



IMAGEN 10: PRUEBAS BIOQUÍMICAS (MIO)
FUENTE: LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA DEL HOSPITAL INFANTIL DE MORELIA.

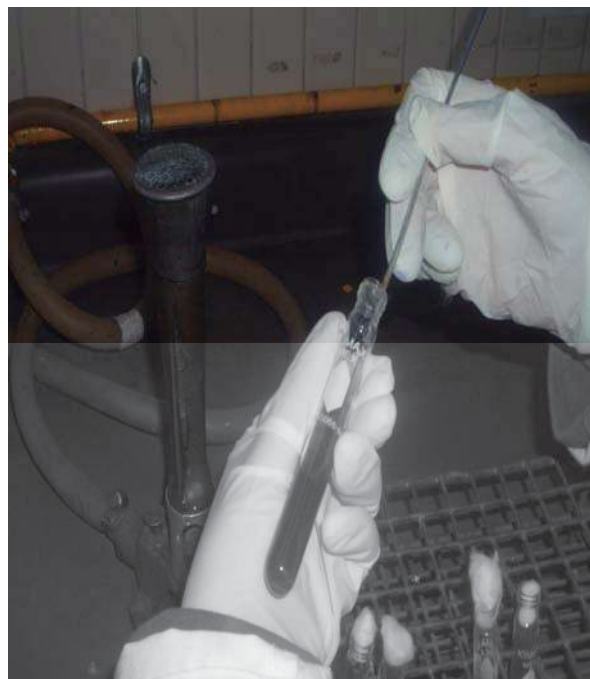


IMAGEN 11: PRUEBAS BIOQUÍMICAS (CITRATO)
FUENTE: LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA DEL HOSPITAL INFANTIL DE MORELIA.



IMAGEN 12: PRUEBAS BIOQUÍMICAS (LIA)
FUENTE: LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA DEL HOSPITAL INFANTIL DE MORELIA.



IMAGEN 13: PRUEBAS BIOQUÍMICAS (TSI)
FUENTE: LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA DEL HOSPITAL INFANTIL DE MORELIA.



IMAGEN 14 SIEMBRA EN BAB PARA ENVIO AL INDRE
FUENTE: LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA Y PARASTOLOGÍA DEL HOSPITAL INFANTIL DE MORELIA.

ROTAFORESIS:

EQUIPO:

- Centrífuga clínica de 5000 rpm
- Agitador vortex
- Cámara horizontal para electroforesis 20 x 10 cm
- Fuente de poder de 200 V BIO-RAD
- Refrigerador
- Congelador
- Incubadora

MATERIAL:

- Tubos para centrifuga de 75 x 100 (5 mL)
- Pipetas Pasteur de cuello largo
- Dos juegos de placas de vidrio 7.5 x 6.5 cm
- 2 peines de diez pozos
- Bulbos de hule
- Pipetas graduadas desechables de 1, 2 y 5 mL
- Perilla reguladora de tres salidas Gradilla
- Cajas de plástico para los geles
- Papel parafilm
- Guantes desechables
- Probeta
- Pipetas calibradas de 50 y 200 microlitros.

REACTIVOS:

- Frasco de solución A 5X
Tris base, EDTA, SDS, NaCl, agua bidestilada, mercaptoetanol
- Frasco de solución B 1X
Fenol, Tris-EDTA
- Frasco de solución C 1X
Agarosa, agua bidestilada, xilen-cianol
- Frasco de solución D 10X
Tris base, glicina, agua bidestilada
- Frasco de solución E 10X
Ácido acético, etanol
- Frasco de solución F 100X
Nitrato de plata, agua bidestilada estéril
- Frasco de solución G 125X
Formaldehído al 38%
- Frasco de solución H
Ácido acético glacial al 1%
- Cloroformo
- Bis-acrilamida
- Solución Tris
- Persulfato de amonio al 2%
- Catalizador TEMED (Tetrametilédiamina)
- Agarosa al 2%
- Solución de hidroxido de sodio al 2%
- Solución estéril
- Extran (Imagen 15)



IMAGEN 15 MATERIAL PARA REALIZACIÓN DE ROTAFORESIS
FUENTE: LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA DEL HOSPITAL INFANTIL DE MORELIA.

MUESTRA BIOLÓGICA:

- RNA viral extraído a partir de materia fecal

METODO:

- Se realiza la extracción del RNA viral a partir de las heces fecales.(Imagen 16)

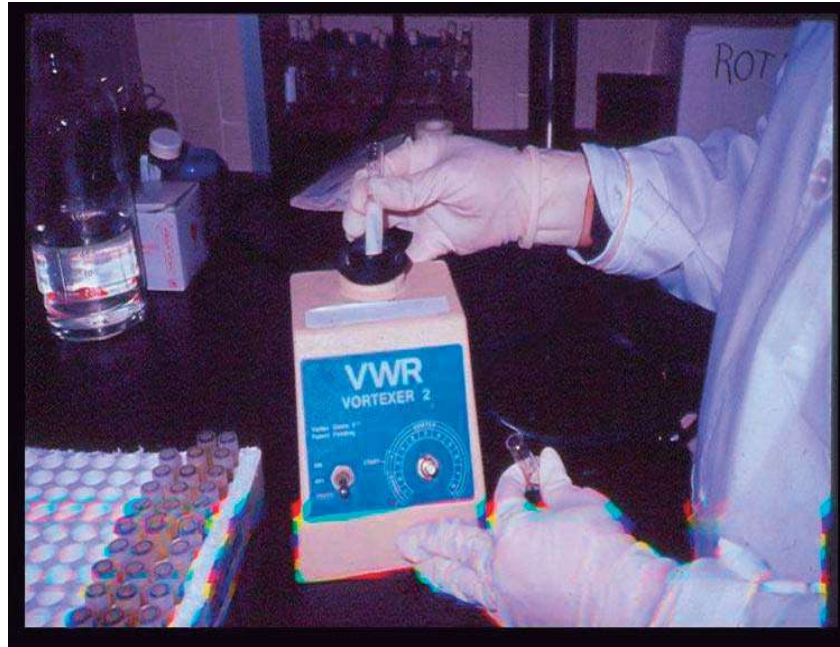


IMAGEN 16 SEPARACIÓN DEL RNA VIRAL
FUENTE: LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA DEL
HOSPITAL INFANTIL DE MORELIA.

- Se preparan los geles de poliacrilamida para ahí colocar las muestras a las que se les va a realizar el estudio.
- Se lleva acabo el corrimiento electroforético.(Imagen 17)

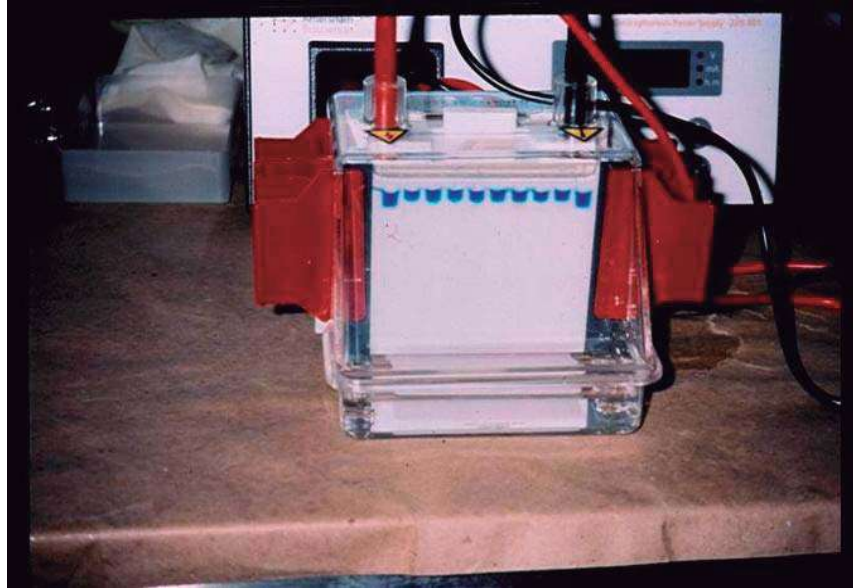


IMAGEN 17 CORRIMIENTO ELECTRÓFORÉTICO
FUENTE: LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA DEL
HOSPITAL INFANTIL DE MORELIA.

- Se realiza una fijación.
- Se efectúa la tinción con nitrato de plata.
- Se efectúa el revelado de las muestras. (Imagen 18)

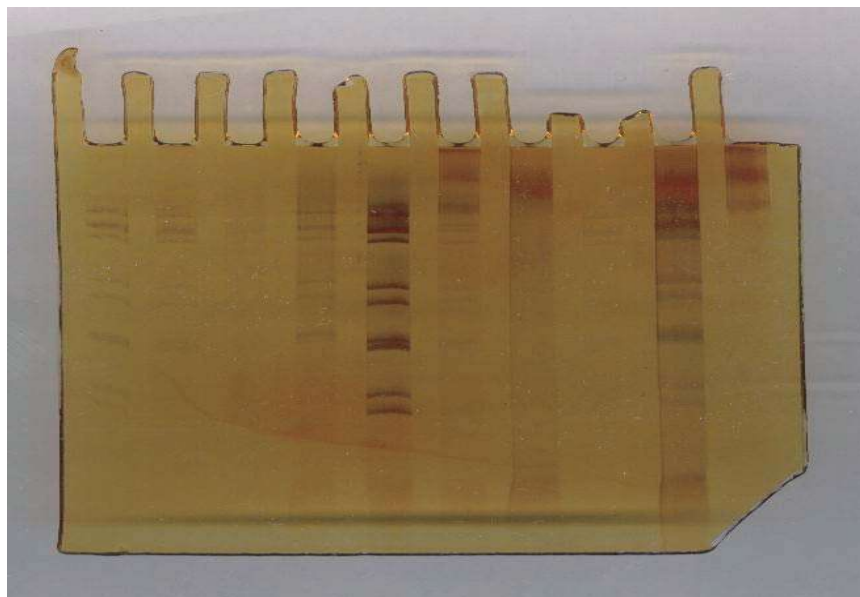


IMAGEN 18 ELECTRÓFORESIS
FUENTE: LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA DEL
HOSPITAL INFANTIL DE MORELIA.

XIII.-REFERENCIAS:

- 1.- Ada G. i. The immunology of vaccination (Chapter 3). In: Vaccines. Ed. by Plotkin SA and Orenstein WA. 3rd Edition. WB Saunders Company. Philadelphia, Pennsylvania, 1999: Pp: 28-39.
- 2.- Adachi JA, Jiang ZD, Mathewson JJ, Verenkar MP, Thompson S, Martínez Sandoval F, Steffen R, Ericsson CD, Dupont HL. Enteraggregative *Escherichia coli* as major etiologic agent in travelers diarrhea in 3 regions of the World. Clin. Infect. Dis 32: 1706-1709, 2001
- 3.- Albert, M. J., S. M. Faruque, A. S. Faruque, P. K. Neogi, M. Ansaruzzaman, N. A. Bhuiyan, K. Alam, and M. S. Akbar. 1995. Controlled study of *Escherichia coli* diarrheal infections in Bangladeshi children. J. Clin. Microbiol. 33:973-977[Abstract]
- 4.- Andrade, J. R., V. F. Da Veiga, M. R. De Santa Rosa, and I. Suassuna. 1989. An endocytic process in HEp-2 cells induced by enteropathogenic *Escherichia coli*. J. Med. Microbiol. 28:49-57
- 5.- Arduino, R. C., and H. L. DuPont. 1993. Traveler's diarrhoea. Baillieres Clin. Gastroenterol. 7:365-385[Medline].
- 6.- Anold EB. Diccionario de nutrición y tecnología de los alimentos México. Acribia, 1994 p.291.
- 7.- Baqui, A. H., R. B. Sack, and R. E. Black. 1992. Enteropathogens associated with acute and persistent diarrhea in Bangladeshi children <5 years of age. J. Infect. Dis. 166:792-796
- 8.- Bern C, Martínez J, de Zoysa I, Glass R. The magnitude of the global problem of diarrhoeal disease: a ten-year update. Bull World Health Organ. 1992; 70(6):705-714
- 9.- Bernstein DI, Sander DS, Smith VE, Schiff GM, Ward RL. Protection from rotavirus reinfection: 2-years prospective study. J Infect Dis. 1991; 164:277-283.
- 10.- Bettelheim, 1994
- 11.- Bhan MK, Lew JF, Sazawal S, Das BK, Gentsch JR, Glass RI. Protection conferred by neonatal rotavirus infection against subsequent rotavirus diarrhea. J Infect Dis 1993. 168:282-287.
- 12.- Bhan, M. K., P. Raj, M. M. Levine, J. B. Kaper, N. Bhandari, R. Srivastava, R. Kumar, and S. Sazawal. 1989. Enteraggregative *Escherichia coli* associated with persistent diarrhea in a cohort of rural children in India. J. Infect. Dis. 159:1061-1064
- 13.- Bhatnagar, S., M. K. Bhan, H. Sommerfelt, S. Sazawal, R. Kumar, and S. Saini. 1993. Enteraggregative *Escherichia coli* may be a new pathogen causing acute and persistent diarrhea. Scand. J. Infect. Dis. 25:579-583
- 14.- Bishop RF, Barnes GL, Cipriani E, Lund JS. Clinical immunity after neonatal rotavirus infection. A prospective longitudinal study in young children. N Engl J Med 1983; 309:72-76.
- 15.- Bishop RF, Bugg HC, Masendycz PJ, Lund JS, Gorrel RJ, Barnes GL. Serum, fecal, and breast milk rotavirus antibodies as indices of infection in mother-infant pairs. J Infect Dis 1996; 174:S22-29.
- 16.- Bitacora de Estadística del Hospital Infantil de Morelia Michoacán 2006
- 17.- Black, R. E. 1990. Epidemiology of traveler's diarrhea and relative importance of various pathogens. Rev. Infect. Dis. 12(Suppl. 1):S73-S79.
- 18.- Black, R. E., K. H. Brown, S. Becker, A. R. M. Abdul Alim, and M. H. Merson. 1982. Contamination of weaning foods and transmission of enterotoxigenic *Escherichia coli* diarrhoea in children in rural Bangladesh. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 76:259-264[Medline].

- 19.- Black, R. E., M. H. Merson, B. Rowe, P. R. Taylor, A. R. M. Abdul Alim, R. J. Gross, and D. A. Sack. 1981. Enterotoxigenic *Escherichia coli* diarrhoea: acquired immunity and transmission in an endemic area. Bull. W. H. O. 59:263-268[Medline].
- 20.- Black, R. E., M. M. Levine, M. L. Clements, L. Cisneros, and V. Daya. 1982. Treatment of experimentally induced enterotoxigenic *Escherichia coli* diarrhea with trimethoprim, trimethoprim-sulfamethoxazole, or placebo. Rev. Infect. Dis. 4:540-545[Medline].
- 21.-Blattner et al. 1997
- 22.- Bouzari, S., A. Jafari, A. A. Farhoudi-Moghaddam, F. Shokouhi, and M. Parsi. 1994. Adherence of non-enteropathogenic *Escherichia coli* to HeLa cells. J. Med. Microbiol. 40:95-97 .
- 23.- Boyd et al., 1996.
- 24.- Boyce, T. G., D. L. Swerdlow, and P. M. Griffin. 1995. Current concepts: *Escherichia coli* O157:H7 and the hemolytic-uremic syndrome. N. Engl. J. Med. 333:364-368
- 25.- Bower, J. R., B. L. Congeni, T. G. Cleary, R. T. Stone, A. Wanger, B. E. Murray, J. J. Mathewson, and L. K. Pickering. 1989. *Escherichia coli* O114: nonmotile as a pathogen in an outbreak of severe diarrhea associated with a day care center. J. Infect. Dis. 160:243-247
- 26.- Brenner, D. J., G. R. Fanning, G. V. Miklos, and A. G. Steigerwalt. 1973. Polynucleotide sequence relatedness among *Shigella* species. Int. J. Syst. Bacteriol. 23:1-7.
- 27.- Brown K, Pzrez F. Determinants of dietary intake during childhood diarrhea and implication for appropriate nutritional therapy. Acta Paediatr 1992; 381:127-132.
- 28- Burns JW, Siadat-Pajouh M, Krishnaney AA, Greenberg HB. Protective effect of rotavirus VP6-Specific IgA monoclonal antibodies that lack neutralizing activity. Science 1996; 272:104-107.
- 29.- Casemore DP, Sands RL, Curry A. new human pathogen. J Clin Pathol Menline
- 30.--Cassels FJ, Wolf MK, Colonization factors of diarrheagenic E.coli and their intestinal receptors. J Ind Microbiol 1995;15.214-226
- 31.- Castillo-Duran C, Vial P, Uauy R. Trace mineral balance during acute diarrhea in infants. J Pediatr 1998; 113:452-457.
- 32.- Cerritos, 1999, Parveen et al, 1999; Cruz,2000
- 33.- Chahnazarian A, Ewbank D, Makani B, Ekouevi K. Impact of selective primary care on childhood mortality in rural health zone of Zaire. Int J Epidemiol 1993; 22:32-41.
- 34.-- Chiba S, Nakata S, Ukae S, Adachi N. Virological and serological aspects of immune resistance to rotavirus gastroenteritis. Clin Infect Dis 1993; 16:S117-121.
- 35.- Chiba S, Nakata S, Urasawa T, Urasawa S, Yokoyama T, Morita Y, "et al". Protective effect of naturally acquired homotypic and heterotypic rotavirus antibodies. Lancet 1986; 2:417-421.
- 36.- Cimolai, N., S. Basalyga, D. G. Mah, B. J. Morrison, and J. E. Carter. 1994. A continuing assessment of risk factors for the development of *Escherichia coli*O157:H7-associated hemolytic uremic syndrome. Clin. Nephrol. 42:85-89
- 37.- Clark HF, Glass RI, Offit PA. Rotavirus vaccines (Chapter 41). In: Vaccines. Ed. by Plotkin SA and Orenstein WA. 3rd Edition. WB Saunders Company. Philadelphia, Pennsylvania, 1999: Pp: 987-1005.
- 38.- Clark HF, Borian FE, Bell LM, Modesto K, Gouvea A, Plotkin AS. Protective effect of WC3 vaccine against rotavirus diarrhoea in infants during a predominantly serotype 1 rotavirus season. J Infect Dis 1988; 158:570-587.

- 39.-Clemens JD, Rao M, Ahmed F, Ward RL, Huda S, Chakraborty J, "et al". Breast-feeding and the risk of life-threatening rotavirus diarrhea: prevention or postponement? *Pediatrics* 1993; 92:680-685.
- 40.-Cobeljic, M., B. Miljkovic-Selimovic, D. Paunovic-Todosijevic, Z. Velickovic, Z. Lepsanovic, D. Savic, R. Ilic, S. Konstantinovic, B. Jovanovic, and V. Kostic. 1996. Enteroggregative *Escherichia coli* associated with an outbreak of diarrhoea in a neonatal nursery ward. *Epidemiol. Infect.* 117:11-16
- 41.-Cookson, S. T., and J. P. Nataro. 1996. Characterization of HEp-2 cell projection formation induced by diffusely adherent *Escherichia coli*. *Microb. Pathog.* 21:421-434
- 42.- Collington, G. K., I. W. Booth, M. S. Donnenberg, J. B. Kaper, and S. Knutton. Attaching and effacing genes encoding secreted signalling proteins of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) are also required for modulation of host cell electrolyte transport. *Gut*, in press.
- 43.- Costin, I. D., D. Voiculescu, and V. Gorcea. 1964. An outbreak of food poisoning in adults associated with *Escherichia coli* serotype 86:B7:H34. *Pathol. Microbiol.* 27:68-78.
- 44.- Coulson BS, Grimwood K, Hudson IL, Barnes GL, Bishop RF. Role of coproantibody in clinical protection of children during reinfections with rotavirus. *J Clin Microbiol* 1992; 30:1678-1684.
- 45.- Coulson B, Grimwood K, Masendyze P, "et al". Comparison of rotavirus immunoglobulin A coproconversion with other indices of rotavirus infection in a longitudinal study in childhood. *J Clin Microbiol* 1990; 28:1367-74.G
- 46.- Cravioto A, Ortega R, Rodríguez P, Reyes R, López D, fernández G. estudio longitudinal de colonización intestinal en una cohorte de niños rurales mexicanos. I. Diseño del estudio y hallazgos iniciales durante el periodo neonatal . *Bol. Med Hosp. Infant Mex* 1985;42:287-296.
- 47.- Cravioto, A., A. Tello, A. Navarro, J. Ruiz, H. Villafan, F. Uribe, and C. Eslava. 1991. Association of *Escherichia coli* HEp-2 adherence patterns with type and duration of diarrhoea. *Lancet* 337:262-264
- 48.- Cunliffe NA, Kilgore PE, Bresee JS, Steele AD, Lou N, Hart CA, et al. epidemiology of rotavirus diarrhoea in Africa: a review to assess the need for rotavirus immunization. *Bull World Health Organ.*1998; 76(5):525-537
- 49.- DeZoysa I, Feachem RG. Interventions for the control of diarrhoeal diseases among young children: Rotavirus and cholera immunization. *Bull World Health organ* 1995; 63:569-583.
- 50.- Dickinson, B. L., and J. D. Clements. 1995. Dissociation of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin adjuvanticity from ADP-ribosyltransferase activity. *Infect. Immun.* 63:1617-1623[Abstract].
- 51.Diarrhea Morbidity and Mortality in Mexican Children. Impact of Rotavirus Disease. The Pediatric Infectious Disease Journal Volumen 23, number 10, Octubre del 2004. F.Raúl Velázquez, MD, Msc, Herlinda García Lozano, Msc
- 52.- Doctora Raquel Fernández Ferrán, Dr. Carlos Rodríguez Pérez, Dra. Isis de los A. Rodríguez Ribalta y dr. Freddy Gómez Martínez *Escherichia coli* como causante de diarrea infantil, *Revista Cubana de Pediatría*, 2003
- 53.- Donnenberg, M. S. 1995. Enteropathogenic *Escherichia coli*, p. 709-726. In M. J. Blaser, P. D. Smith, J. I. Ravdin, H. B. Greenberg, and R. L. Guerrant (ed.), *Infections of the gastrointestinal tract*. Raven Press, New York, N.Y.
- 54.- Donnenberg, M. S., C. O. Tacket, S. P. James, G. Losonsky, J. P. Nataro, S. S. Wasserman, J. B. Kaper, and M. M. Levine. 1993. Role of the *eaeA* gene in experimental enteropathogenic *Escherichia coli* infection. *J. Clin. Invest.* 92:1412-1417

- 55.- Donnenberg, M. S., J. A. Girón, J. P. Nataro, and J. B. Kaper. 1992. A plasmid-encoded type IV fimbrial gene of enteropathogenic *Escherichia coli* associated with localized adherence. *Mol. Microbiol.* 6:3427-3437
- 56.- Dossetor J, Whittle h. Protein-losing enteropathy and malabsorption in acute measles enteritis. *Br Med* 1995; 2:592-593
- 57.- Dr. Clider Arias, Dr. Daniel Torres, Fisiopatología de la infección por rotavirus *Pediatrica* 2001 4(1): 21 - 27
- 58.- DuPont, H. L., S. B. Formal, R. B. Hornick, M. J. Snyder, J. P. Libonati, D. G. Sheahan, E. H. LaBrec, and J. P. Kalas. 1971. Pathogenesis of *Escherichia coli* diarrhea. *N. Engl. J. Med.* 285:1-9[Medline].
- 59.- DuPont, H. L., and C. D. Ericsson. 1993. Prevention and treatment of traveler's diarrhea. *N. Engl. J. Med.* 328:1821-1827[Free Full Text]
- 60.- DuPont, H. L. 1995. Pathogenesis of traveler's diarrhea. *Chemotherapy* 41(Suppl. 1):33-39.
- 61.- Durno, C., R. Soni, and P. Sherman. 1989. Adherence of vero cytotoxin-producing *Escherichia coli* serotype O157:H7 to isolated epithelial cells and brush border membranes in vitro: role of type 1 fimbriae (pili) as a bacterial adhesin expressed by strain CL-49. *Clin. Invest. Med.* 12:194-200
- 62.- Eklund, S., I. Brunsson, M. Jodal, and O. Lundgren. 1987. Changes in cyclic 3'5'-adenosine monophosphate tissue concentration and net fluid transport in the cat's small intestine elicited by cholera toxin, arachidonic acid, vasoactive intestinal polypeptide, and 5-hydroxytryptamine. *Acta Physiol. Scand.* 129:115-125[Medline].
- 63.- Enfermedad diarreica. Programa de atención a la salud del niño. Manual de procedimientos técnicos. 1998. Consejo Nacional de Vacunación. Secretaria de Salud
- 64.- Eslava, C., J. Villaseca, R. Morales, A. Navarro, and A. Cravioto. 1993. Identification of a protein with toxigenic activity produced by enteroaggregative *Escherichia coli*, abstr. B-105, p. 44. *In Abstracts of the 93rd General Meeting of the American Society for Microbiology* 1993. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- 65.- Estes MK. Advances in molecular biology: Impact on rotavirus vaccine development. *J Infect Dis* 1996a; 174:S37-46.
- 66.- Fagundes-Neto, U. 1996. Enteropathogenic *Escherichia coli* infection in infants: clinical aspects and small bowel morphological alterations. *Rev. Microbiol. Sao Paulo* 27(Suppl. 1):117-119.
- 67.- Fang, G. D., A. A. M. Lima, C. V. Martins, J. P. Nataro, and R. L. Guerrant. 1995. Etiology and epidemiology of persistent diarrhea in northeastern Brazil: a hospital-based, prospective, case-control study. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 137-144
- 68.- Felipe Mota y cols. Pronostico de la diarrea por rotavirus. *Salud Publica Méx* vol. 43 no. 6 Cuernavaca Nov./Dic. 2001.
- 69.- Feng N, Burns JW, Bracy L, Greenberg HB. Comparison of mucosal and systemic humoral immune responses and subsequent protection in mice orally inoculated with a homologous or a heterologous rotavirus. *J Virol* 1994; 68:7766-7773.
- 70.- Fischer TK, Valentiner-Branth P, Steinsland H, Perch M, Santos G, Aaby P, "et al". Protective immunity after natural rotavirus infections: a community cohort study of newborn children in Guinea-Bissau, West Africa. *J Infect. Dis* 2002; 186:593-597
- 71.- Flores-Abuxapqui, J. J., G. J. Suarez-Itoil, M. R. Heredia-Navarrete, M. A. Puc-Franco, and J. Franco-Monsreal. 1994. Frequency of enterotoxigenic *Escherichia coli* in infants during the first three months of life. *Arch. Med. Res.* 25:303-307[Medline].

- 72.- Flores J, Pérez-Schael I, Boeggeman E, "et al". Genetic relatedness among human rotaviruses. J med Virol 1985; 17:135-143.
- 73.- Franco MA, Feng N, Greenberg HB. Molecular determinants of immunity and pathogenicity of rotavirus infection in the mouse model. J Infect Dis 1996; 174(Suppl 1):S47-50.
- 74.- Franco MA, Greenberg HB. Challenges for rotavirus vaccine. Virol 2001; 281:153-155.
- 75.- Franco MA, Greenberg HB. Immunity to rotavirus in T cell deficient mice. Virology 1997; 338:169-179.
- 76.- Fukuta, S., J. L. Magnani, E. M. Twiddy, R. K. Holmes, and V. Ginsburg. 1988. Comparison of the carbohydrate-binding specificities of cholera toxin and *Escherichia coli* heat-labile enterotoxins LT_H-I, LT_H-IIa, and LT_H-IIb. Infect. Immun. 56:1748-1753[Abstract/Free Full Text].
- 77.- Gentsch JR, Wood PA, Ramachandran M, Das BK, Leite JP, Alfieri A, et al. Review of G and P typing results from a global collection of rotavirus strains: implications for vaccine development. J infect Dis 1996; 174,(S1):S30-S6
- 78.- Gillis JC, Brogden RN. Rifaximin: A review of its Antibacterial activity; Pharmacokinetic and Therapeutic Potential in Conditions Mediated by Gastrointestinal Bacteria Drug, 1995; 49(3):467-484
- 79.- Giono CS, Escobar GA, Valdespino GJL. Diagnostico de Laboratorio de Infecciones Gastrointestinales.- Instituto Nacional y Referencia Epidemiológicos. Secretaria de Salud 1994
- 80.- Girón, J. A., F. Qadri, K. J. Jarvis, J. B. Kaper, and M. J. Albert. 1995. Monoclonal antibodies specific for the bundle-forming pilus of enteropathogenic *Escherichia coli*. Infect. Immun. 63:4949-4952
- 81.- Girón, J. A., T. Jones, F. Millan Velasco, E. Castro Munoz, L. Zarate, J. Fry, G. Frankel, S. L. Moseley, B. Baudry, J. B. Kaper, et al. 1991. Diffuse-adhering *Escherichia coli* (DAEC) as a putative cause of diarrhea in Mayan
- 82.- Goldberg, M. B., and P. J. Sansonetti. 1993. *Shigella* subversion of the cellular cytoskeleton: a strategy for epithelial colonization. Infect. Immun. 61:4941-4946.
- 83.- Golden B, Golden M. Plasma zinc, rate of weight gain, and the energy cost of tissue deposition in children recovering from severe malnutrition on a cow's milk or soya protein based diet. Am J Clin Nutr 1991; 34:892-899
- 84.- Gomes TAT, Blake PA, Trabulsi LR. Prevalence of *Escherichia coli* strains with localized, diffuse and aggregative adherence to HeLa cells in infants with diarrhea and matched controls. J Clin Microbiol 1989; 27:266
- 85.- Gómez F. desnutrición. Bol. Med. Hosp... Inf. Mex 1946; 3:543-551
- 86.- González AM, Jaimes MC, Cajiao I, Rojas O, Cohen J, Pothier P, "et al". Virol 2003; 305:93-105
- 87.- GONZALEZ FERNANDEZ, María de los Ángeles, HIDALGO RODRIGUEZ, Roxana y SILVA BLAY, Lis. Rotavirus: Enfermedad emergente de transmisión digestiva. Rev Cubana Pediatr, ene.-abr. 2003, vol.75, no.1, p.0-0. ISSN 0034-7531.
- 88.- Gordillo, M. E., G. R. Reeve, J. Pappas, J. J. Mathewson, H. L. DuPont, and B. E. Murray. 1992. Molecular characterization of strains of enteroinvasive *Escherichia coli* O143, including isolates from a large outbreak in Houston, Texas. J. Clin. Microbiol. 30:889-893
- 89.- Green KY, Kapikian AZ. Identification of VP7 epitopes associated with protection against human Rotavirus illness or shedding in volunteers. J Virol 1992; 66:548-553.

- 90.- Green KY, Taniguchi K, Mackow ER, Kapikian AZ. Homotypic and heterotypic epitope-specific antibody responses in adult and infant rotavirus vaccinees: Implications for vaccine development. *J Infect Dis* 1990; 161:667-679
- 91.-Griffin, P. M. 1995. *Escherichia coli* O157:H7 and other enterohemorrhagic *Escherichia coli*, p. 739-761. In M. J. Blaser, P. D. Smith, J. I. Ravdin, H. B. Greenberg, and R. L. Guerrant (ed.), *Infections of the gastrointestinal tract*. Raven Press, New York, N.Y.
- 92.- Grimwood K, Lund JCS, Coulson BS, Hudson IL, Bishop RF, Barnes GL. Comparison of serum and mucosal antibody responses following severe acute rotavirus gastroenteritis in young children. *J Clin Microbiol* 1988; 26:738-738
- 93.- Gunzberg, S. T., B. J. Chang, S. J. Elliott, V. Burke, and M. Gracey. 1993. Diffuse and enteroaggregative patterns of adherence of enteric *Escherichia coli* isolated from aboriginal children from the Kimberley region of western Australia. *J. Infect. Dis.* 167:755-758
- 94.- Guth, B. E., E. M. Twiddy, L. R. Trabulsi, and R. K. Holmes. 1997. Variation in chemical properties and antigenic determinants among type II heat-labile enterotoxins of *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 54:529-536.
- 95.- Gutiérrez G, Guiscafré H, Bronfman M, Martínez C, Padilla G, Muñoz O. Estrategias para mejorar los patrones terapéuticos utilizados en diarrea aguda en unidades de atención médica primaria. I. Metodología y características de las unidades médicas de la población estudiada. *Arch Invest Med Mex* 1998; 19:335-336
- 96.- Gutiérrez G, Tapia Conyer R, Guiscafré H, Reyes H, Martínez H, Kumate J. Impact of oral rehydration and selected public Health interventions on reduction of mortality from childhood diarrhoeal diseases in México *Bull World Health Organ* 1996;74:189-197.
- 97.- Hales, B. A., C. A. Hart, R. M. Batt, and J. R. Saunders. 1992. The large plasmids found in enterohemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli* constitute a related series of transfer-defective Inc F-IIA replicons. *Plasmid* 28:183-193[Medline].
- 98.-Hedberg, C. W., S. J. Savarino, J. M. Besser, C. J. Paulus, V. M. Thelen, L. J. Myers, D. N. Cameron, T. J. Barrett, J. B. Kaper, and M. T. Osterholm. An outbreak of foodborne illness caused by *Escherichia coli* O39: NM: an agent that does not fit into the existing scheme for classifying diarrheagenic *E. coli*. *J. Infect. Dis.*, in press.
- 99.- Henry, F. J., A. S. Udoy, C. A. Wanke, and K. M. A. Aziz. 1996. Epidemiology of persistent diarrhea and etiologic agents in Mirzapur, Bangladesh. *Acta Paediatr. Suppl.* 381:27-31.
- 100.- Heuvelink, A. E., N. C. A. J. Van de Kar, J. F. G. M. Meis, L. A. H. Monnens, and W. J. G. Melchers. 1995. Characterization of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 isolates from patients with haemolytic uraemic syndrome in Western Europe. *Epidemiol. Infect.* 115:1-14
- 101.- Hicks, S., D. C. A. Candy, and A. D. Phillips. 1996. Adhesion of enteroaggregative *Escherichia coli* to pediatric intestinal mucosa in vitro. *Infect. Immun.* 64:4751-4760
- 102.- Hirschhorn N. the treatment of acute diarrhea in children. An historical and physiological perspective. *Am J Clin Nutr* 1999; 33:637-663
- 103.- Hjelt K, Grauballe PC, Schiotz PO, Andersen L, Krasilnikoff PA. Intestinal and serum response to a naturally acquired rotavirus gastroenteritis in childre. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1985; 4:60-66.
- 104.-Hjelt K, Grauballe PC, Andersen L, Schiotz PO, Howitz P, Krasilnikoff PA. Antibody response in serum and intestine in children up to six months after a naturally acquired rotavirus gastroenteritis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1986; 5:74-80.

- 105.- Hjelt K, Grauballe PC, Paerregaard A, Nielsen OH, Krasilnikoff PA. Protective effect of preexisting rotavirus-specific immunoglobulin A against naturally acquired rotavirus infection in children. J Med Virol 1987; 21:39-47.
- 106.- Hopwood y Chater, 1989
- 107.- Hoque, S. S., A. S. Faruque, D. Mahalanabis, and A. Hasnat. 1994. Infectious agents causing acute watery diarrhoea in infants and young children in Bangladesh and their public health implications. J. Trop. Pediatr. 40:351-354[Abstract/Free Full Text]
- 108.-Hoshino Y, Kapikian AZ. Rotavirus serotypes: classification and importance in epidemiology immunity, and vaccine development. Health Popul nutr 2000; 18:5-14.
- 109.- Hoshino Y, Sereno MM, Midthun K, Flores J, Kapikian AZ, Chanock RM. Independent segregation of two antigenic specificities (VP3 and VP7) involved in neutralization of rotavirus infectivity. Proc Natl Acad Sci USA 1985; 82:8701-8704.
110. <http://www.botanical-online.com/medicinalsdiarrea.htm>
- 111- (i.e.,Papadopoulos et al., 1999; Souza et al., 2000
- 112.- Iliana Alejandra Cortés –Ortiz, Guadalupe Rodríguez-Angeles, Eustolia Alejandra Moreno –Escobar, Jesús Manuel Tenorio-Lara. Brote causado por *Escherichia coli* en Chalco México.Laboratorio de Bacteriología Molecular. Instituto de Diagnostico y Referencia Epidemiologicos. México D.F, 23 de Enero del 2002.
- 113.- Jacobson RM. The current status of the rotavirus vaccine. Vaccine 1999; 17:1690-1699.
- 114.-Jaimes MC, Rojas OL, González AM, Cajiao I, Charpilienne A, Pothier P, "et al". Frequencies of virus-specific CD4+ and CD8+ lymphocytes secreting gamma interferon after acute natural rotavirus infection in children and adults. J Virol 2002; 76:4741-4749.
- 115.- Jallat, C., V. Livrelli, A. Darfeuille-Michaud, C. Rich, and B. Joly. 1993. *Escherichia coli* strains involved in diarrhea in France: high prevalence and heterogeneity of diffusely adhering strains. J. Clin. Microbiol. 31:2031-2037
- 116.-Jerse, A. E., J. Yu, B. D. Tall, and J. B. Kaper. 1990. A genetic locus of enteropathogenic *Escherichia coli* necessary for the production of attaching and effacing lesions on tissue culture cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:7839-7843
- 117.- Jiang B, Gentsch JR, Glass RI. The role of serum antibodies in the protection against rotavirus disease: an overview. Clin Infect Dis 2001; 34:1351-1361.
- 118.-Jomas A, Avigad S, Diver- Haber A, Katznelson D. disturbed fat absorption following infectious gastroenteritis in children. J. Pediatr 1979; 95: 366-372
- 119.- Jorge Blanco , Miguel Blanco, Jesús E. Blanco, Azucena Mora, Maria Pilar Alonso, Enrique A. González y Maria Isabel Bernárdez Hermida, *Escherichia coli* patógenos para seres humanos y animales.Laboratorio de referencia de *E. coli* universidad de Santiago de Compostela, España. 2002.
- 120.- Kang, G., M. M. Mathan, and V. I. Mathan. 1995. Evaluation of a simplified HEp-2 cell adherence assay for *Escherichia coli* isolated from South Indian children with acute diarrhea and controls. J. Clin. Microbiol. 33:2204-2205
- 121.- Kaplan, B. S., R. S. Trompeter, and J. L. Moake. 1992. Introduction, p. xvii-xxvii. In B. S. Kaplan, R. S. Trompeter, and J. L. Moake (ed.), Hemolytic uremic syndrome and thrombotic thrombocytopenic purpura. Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y.
- 122.- Kapikian AZ, Flores J, Hoshino Y, Glass RI, Midthun K, Gorziglia M et al. Rotavirus: The major etiologic agent of severe infantile diarrhea may be controllable by a Jennerian approach to vaccination. J Infect Dis 1986; 153:815-822

- 123.- Karmali MA, Petric M, Lim P, Fleming PC, Arbus GS, Lior H. The association between idiopathic hemolytic uremic syndrome and infection by verotoxin-producing *Escherichia coli*. *J Infect Dis* 1985; 151:775
- 124.- Karmali, M. A., B. T. Steele, M. Petric, and C. Lim. 1983. Sporadic cases of haemolytic uremic syndrome associated with faecal cytotoxin and cytotoxin-producing *Escherichia coli* in stools. *Lancet* i:619-620.
- 125.- Knutton, S., M. M. Baldini, J. B. Kaper, and A. S. McNeish. 1987. Role of plasmid-encoded adherence factors in adhesion of enteropathogenic *Escherichia coli* to HEP-2 cells. *Infect. Immun.* 55:78-85
- 126.-Knutton, S., G. K. Collington, T. J. Baldwin, R. D. Haigh, and P. H. Williams. 1996. Cellular responses to EPEC infection. *Rev. Microbiol. Sao Paulo* 27(Suppl. 1):89-94.
- 127.- Kumate J, Gutiérrez G, Muñoz O, Santos JI. Manual de Infectología Clínica, México 1994, p66.
- 128.- Lanata CF, Black RE, del Aguila R, Gil H, Verastegui G, Gerna G, "et al". Protection of Peruvian children against rotavirus diarrhea of specific serotypes by one, two or three doses of the RIT 4237 attenuated bovine rotavirus vaccine. *J Infect Dis* 1989; 159:452-459.
- 129.- Lawrence y Ochman, 1998.
- 130.- Le Clero et al., 1996
- 131.- Lencer, W. I., C. Constable, S. Moe, M. G. Jobling, H. M. Webb, S. Ruston, J. L. Madara, T. R. Hirst, and R. K. Holmes. 1995. Targeting of cholera toxin and *Escherichia coli* heat labile toxin in polarized epithelia: role of COOH-terminal KDEL. *J. Cell Biol.* 131:951-962[Abstract].
- 132.- Levin, 1981; Caughant et al., 1981
- 133.- Levine, M. M., E. S. Caplan, D. Watermann, R. A. Cash, R. B. Hornick, and M. J. Snyder. 1977. Diarrhea caused by *Escherichia coli* that produce only heat-stable enterotoxin. *Infect. Immun.* 17:78-82[Abstract/Free Full Text].
- 134.- Levine, M. M., P. Ristaino, G. Marley, C. Smyth, S. Knutton, E. Boedeker, R. Black, C. Young, M. L. Clements, C. Cheney, and R. Patnaik. 1984. Coli surface antigens 1 and 3 of colonization factor antigen II-positive enterotoxigenic *Escherichia coli*: morphology, purification, and immune responses in humans. *Infect. Immun.* 44:409-420[Abstract/Free Full Text].
- 135.- Levine, M. M., and R. Edelman. 1994. Enteropathogenic *Escherichia coli* of classic serotypes associated with infant diarrhea: epidemiology and pathogenesis. *Epidemiol. Rev.* 6:31-51
- 136.- Levine, M. M., C. Ferreccio, V. Prado, M. Cayazzo, P. Abrego, J. Martinez, L. Maggi, M. M. Baldini, W. Martin, D. Maneval, B. Kay, L. Guers, H. Lior, S. S. Wasserman, and J. P. Nataro. 1993. Epidemiologic studies of *Escherichia coli* diarrheal infections in a low socioeconomic level peri-urban community in Santiago, Chile. *Am. J. Epidemiol.* 138:849-869[Abstract/Free Full Text]
- 137.- Levine, M. M., C. Ferreccio, V. Prado, M. Cayazzo, P. Abrego, J. Martinez, L. Maggi, M. M. Baldini, W. Martin, D. Maneval, B. Kay, L. Guers, H. Lior, S. S. Wasserman, and J. P. Nataro. 1993. Epidemiologic studies of *Escherichia coli* diarrheal infections in a low socioeconomic level peri-urban community in Santiago, Chile. *Am. J. Epidemiol.* 138:849-869
- 138.- Levine, M. M. 1987. *Escherichia coli* that cause diarrhea: enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic, and enteroadherent. *J. Infect. Dis.* 155:377-389[Medline].

- 139.- Levine MM, Escherichia coli that causes diarrhoea: enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic, and enteroagherent. J Infect Dis 1987;155:377
- 140.- Levine MM. Escherichia coli that causes diarrhea: enterotoxigénica, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic, and enteroadherent. J Infect Dis 1987;155:377
- 141.- Levine MM, Edelman R. Enteropathogenic Escherichia coli of classic serotypes associated with infant diarrhoea; epidemiology and patogénesis. Epidemiol Rev 1984;6:31
- 142.- Lewin,1998
- 143.- Lifshitz F, Coello RP, Gutiérrez TG, C oronado CMC: Carbohydrate intolerance in infants with diarrhea. J Pediatr 1991, 79:760-767
- 144.- Lima, A. A. M., G. Fang, J. B. Schorling, L. De Albuquerque, J. F. McAuliffe, S. Mota, R. Leite, and R. L. Guerrant. 1992. Persistent diarrhea in Northeast Brazil: etiologies and interactions with malnutrition. Acta Paediatr. Scand. 81(Suppl. 381):39-44.
- 145.- Long, K. Z., J. W. Wood, E. Vasquez Gariby, K. M. Weiss, J. J. Mathewson, F. J. de la Cabada, H. L. DuPont, and R. A. Wilson. 1994. Proportional hazards analysis of diarrhea due to enterotoxigenic *Escherichia coli* and breast feeding in a cohort of urban Mexican children. Am. J. Epidemiol. 139:193-205[Abstract/Free Full Text].
- 146.- Lundgren O, Peregrin AT, Persson K, Kordasti S, Uhnöo I, Svensson L. Role of the enteric nervous system in the fluid and electrolyte secretion of rotavirus diarrhea. Science 2000; 287:491-495.
- 147.- Madingan et al., 2000
- 148.- Madore HP, Christy C, Pichichero M, Long C, Pincus P, Vosefsky D, "et al". Field trial of rhesus rotavirus or human-rhesus rotavirus reassortant vaccine of VP7 serotype 3 or 1 specificity in infants. J Infect Dis 1992; 166:235-243.
- 149.- Mangia, A. H., A. N. Duarte, R. Duarte, L. A. Silva, V. L. Bravo, and M. C. Leal. 1993. Aetiology of acute diarrhoea in hospitalized children in Rio de Janeiro City, Brazil. J. Trop. Pediatr. 39:365-367[Abstract/Free Full Text]
- 150.- Martínez H, Tomkins A. Nutrition management of diarrhea. Food Nutr Bull 1995; 16:349-355
- 151.- Martorell R, Yarbrough C, Yarbrough S, Klein R. The impac of ordinary illnesses on the dietary intakes of malnourished children. Am J Clin Nutr 1980; 33:345-350
- 152.- Mata L, Simhon A, Urrutia JJ, Kronmal RA, Fernández R, García B. Epidemiology of rotaviruses in a cohort of 45 Guatemalan Mayan Indian children observed from birth to the age of three years. J Infect Dis 1983; 148:452-461
- 153.- Matson DO, O'Ryan ML, Herrera I, Pickering LK, Estes MK. Fecal antibody responses to symptomatic and asymptomatic rotavirus infectious. J Infect Dis 1993; 167:577-583
- 154.- Mattila, L. 1994. Clinical features and duration of traveler's diarrhea in relation to its etiology. Clin. Infect. Dis. 19:728-734[Medline]
- 155.- Mayer, H. B., and C. A. Wanke. 1995. Enteroaggregative *Escherichia coli* as a possible cause of diarrhea in an HIV-infected patient. N. Engl. J. Med. 332:273-274
- 156.- Mazanec MB, Kaetzel CS, Lamm ME., Fletcher D, Nedrud JG. Intracellular neutralization of virus by immunoglobulin A antibodies. Proc Nat. Acad Sci USA; 1992; 89:6901-6905
- 157.-McNeal MM, Broome RL, Ward RL. Active immunity against rotavirus infection in mice is correlated with viral replication and titers of serum rotavirus IgA following vaccination. Virology 1994; 204:642-650

- 158.- McVeigh A, Fasano A, Scout DA, Jelacic S, Moseley SL, Robertson DC et al. IS1414 an *Escherichia coli* insertion sequence with a heat-stable enterotoxin gene embedded in a transposase3-like gene. *Infect Immun* 200;68:5710-5715
- 159.- Miller, J. R., L. Barrett, K. Kotloff, and R. L. Guerrant. 1994. A rapid diagnostic test for infectious and inflammatory enteritis. *Arch. Intern. Med.* 154:2660-2664
- 160.- Ministerio de Salud y Ambiente de la Nación, Epinoticias. Número 527, 4 de febrero del 2005
- 161.- Molla AM; Rahim A, Sarker SA, Mozasfar Z y Rahaman M et al. Intake and absorption of nutrients in children with cholera and rotavirus infection during acute diarrhea and after recovery. *Nutr Res* 1992; 2:1233-1242
- 162.- Molla A, Molla A, Sarker S, Rahaman M. Food intake during and after recovery from diarrhea in children . En: Chen L, Scrimshaw NS, ed. *Diarrhea and malnutrition*. Nueva York: Plenum Press, 1993.
- 163.- Molback K, Wested N, Hojlyng N, Scheutz F, Gottschau A, Aaby P, "et al". The etiology of early childhood diarrhea: a community study from Guinea-Bissau. *J Infect Dis* 1994; 169: 581-587.
- 164.- Moon, H. W., S. C. Whipp, R. A. Argenzio, M. M. Levine, and R. A. Giannella. 1993. Attaching and effacing activities of rabbit and human enteropathogenic *Escherichia coli* in pig and rabbit intestines. *Infect. Immun.* 41:1340-1351
- 165.- Mota H BernándeZ Felipe. Disminución de la mortalidad por diarrea en niños en México. *Bol. méd. Hosp. Infant. Méx*;57(1):32-40, ene. 2000. tab, graf.
- 166.- Mota- Hernández F, deshidratación por diarrea, *Bol. Med Hosp. Infant Mex* 1998; 55(9): 530-38
- 167.- Mota HF. Abuso de antimicrobianos y otros conceptos erróneos en el tratamiento de diarreas en niños. *Bol Med Hosp. Infant Mex* 1987; 44:260-264
- 168.- MSAS. Snuario de epidemiología del Ministerio de Salud y Desarrollo Social. 2001.
- 169.- Muñoz O, Torres J. Avances en los criterios diagnósticos y terapéuticos en diarrea aguda *Gad Med Mex* 1992; 128:573-580
- 170.- Nataro, J. P., J. Seriwatana, A. Fasano, D. R. Maneval, L. D. Guers, F. Noriega, F. Dubovsky, M. M. Levine, and J. G. Morris, Jr. 1995. Identification and cloning of a novel plasmid-encoded enterotoxin of enteroinvasive *Escherichia coli* and *Shigella* strains. *Infect. Immun.* 63:4721-4728
- 171.- Nataro, J. P., D. Yikang, S. Cookson, A. Cravioto, S. J. Savarino, L. D. Guers, M. M. Levine, and C. O. Tacket. 1995. Heterogeneity of enteroaggregative *Escherichia coli* virulence demonstrated in volunteers. *J. Infect. Dis.* 171:465-468 .
- 172.- Nataro, J. P., K. O. Maher, P. Mackie, and J. B. Kaper. 1987. Characterization of plasmids encoding the adherence factor of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 55:2370-2377[Abstract/Free Full Text]
- 173.- Nataro, J. P., and Y. Deng. 1993. Unpublished data
- 174- Nataro, J. P., J. B. Kaper, R. Robins Browne, V. Prado, P. Vial, and M. M. Levine. 1987. Patterns of adherence of diarrheagenic *Escherichia coli* to HEp-2 cells. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 6:829-831.
- 175.- Nataro, J. P., S. Hicks, A. D. Phillips, P. A. Vial, and C. L. Sears. 1996. T84 cells in culture as a model for enteroaggregative *Escherichia coli* pathogenesis. *Infect. Immun.* 64:4761-4768
- 176.- Nakagomi O, Nakagomi T. Rotavirus vaccines: A perspective. *Microbiol Immunol* 1996; 40:701-709.

- 177.- Neidhardt et al.(1987,1996).
- 178.- Nesbitt FC, Sotelo CN. El uso del antibiótico en el manejo de diarrea aguda. En:Mota HF;editor. Enfermedad diarreica en el niño. México: Academia Mexicana de Pediatría, 1994 p 107-112.
- 179.- Nzegwu, H. C., and R. J. Levin.1996. Luminal capsaicin inhibits fluid secretion induced by enterotoxin E-coli STa, but not by carbachol, in vivo in rat small and large intestine. Exp. Physiol. 81:313-315
- 180.- O'Brien, A. D., and R. K. Holmes. 1996. Protein toxins of *Escherichia coli* and *Salmonella*, p. 2788-2802. In F. C. Neidhardt, R. Curtiss III, J. L. Ingraham, E. C. C. Lin, K. B. Low, B. Magasanik, W. S. Reznikoff, M. Riley, M. Schaechter, and H. E. Umbarger (ed.), *Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular biology, 2nd ed. ASM Press, Washington, D.C.
- 181.- Ochman et al., 1999
- 182.- Offit PA, Clark HF. Rotavirus. Capítulo 139. En: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, eds. Mandell, Douglas and Bennett.
- 183.- Offit PA. Correlates of protection against rotavirus infection and disease. In Gastroenteritis viruses. Novartis Foundation Symposium 238. Ed. by John Wiley & Sons, LTD, Chichester, England 2001; pp:106-124.
- 184.- Offit P. Rotaviruses: immunological determinants of protection against infection and disease. Adv Virus Res 1994; 44:161-202.
- 185.- Olarte J. Etiología de las diarreas infecciosas: viejos y nuevos agentes. Bol Med Hosp. Infant Mex 1992;49:143-150
- 186.- Orskov F, Whittam TS, Cravioto A, Orskoy I. Clonal relationships among classic enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) belonging to different O groups. J Infect Dis 1990; 162:1329
- 187.- Ortiz MC, Cevallos CV, Rehidratación oral casera, ensayo piloto en una zona rural de México. Bol. Epidemiol Mex 1991;25:140-188
- 188.-O'Ryan ML, Matson DO, Estes MK, Pickering LK. Anti-rotavirus G type-specific and isotype-specific antibodies in children with natural rotavirus infections. J Infect Dis 1994; 169:504-511.
- 189.- Palacios J, Gárnez EJ, Juárez AG, Ruiz GJ, Álvarez MT: Gastroenteritis por rotavirus Gac Med Mex 1980; 116(11):493-499.
- 190.- Parashar D, Hummelman EG, Bresse JS, Miller M, Glass R. Global illness and deaths caused by rotavirus disease in children. Emerging Infec dis. 2003; 9(5):565-572.
- 191.- Parsot, C., and P. J. Sansonetti. 1996. Invasion and the pathogenesis of *Shigella* infections. Curr. Top. Microbiol. 209:25-42.
- 192.- Paul, M., T. Tsukamoto, A. R. Ghosh, S. K. Bhattacharya, B. Manna, S. Chakrabarti, G. B. Nair, D. A. Sack, D. Sen, and Y. Takeda. 1994. The significance of enteroaggregative *Escherichia coli* in the etiology of hospitalized diarrhoea in Calcutta, India, and the demonstration of a new honey-combed pattern of aggregative adherence. FEMS Microbiol. Lett. 117:319-326
- 193.- Pavia, A. T., C. R. Nichols, D. P. Green, R. V. Tauxe, S. Mottice, K. D. Greene, J. G. Wells, R. L. Sieglar, E. D. Brewer, D. Hannon, and P. A. Blake. 1990. Hemolytic-uremic syndrome during an outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections in institutions for mentally retarded persons: clinical and epidemiologic observations. J. Pediatr. 116:544-551

- 194.- Pérez ME, Glass RI, Alvarez G, Pericchi LR, González R, Kapikian AZ, "et al". Rhesus rotavirus-based quadrivalent vaccine is efficacious despite age, socioeconomic conditions and seasonality in Venezuela. *Vaccine* 2001; 19:976-981.
- 195.- Pérez-Schael I, García D, González M, González R, Daoud N, Pérez M, "et al". Prospective study of diarrheal diseases in venezuelan children to evaluate the efficacy of rhesus rotavirus vaccine. *J Med Virol* 1990; 30:219-229.
- 196.- Pérez-Schael I, Salinas B, Escalona M, González G, Barrios I, Materán M. Rotavirus mortality in Venezuelan infants. III World Congress of Pediatric Infectious Disease- WSPID Chile, 2002; pp: 87
- 197.- Pickett, C. L., E. M. Twiddy, C. Coker, and R. K. Holmes. 1989. Cloning, nucleotide sequence, and hybridization studies of the type IIb heat-labile enterotoxin gene of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 171:4945-4952[Abstract/Free Full Text].
- 198.- Pickering, L. K., T. G. Obrig, and F. B. Stapleton. 1994. Hemolytic-uremic syndrome and enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 13:459-476.
- 199.- Pickering KL. Diarrheal disease: Introduction. *Semin pediatr Infect Div*;1994;5(3):162
- 200.- Pigeón-Oliveros Humberto Gastroenteritis aguda infantil por Rotavirus humano. Estudio epidemiológico en I mHospital Ángeles, Pedregal, Julio del 2004
- 201.- Pinto, M., S. Robine-Leon, M. D. Appay, M. Keding, N. Triadou, E. Dussaulx, B. Lacroix, P. Simon-Assman, K. Haffen, J. Fogh, and A. Zweibaum. 1983. Enterocyte-like differentiation and polarization of the human colon carcinoma cell line Caco-2 in culture. *Cell* 47:323-330
- 202.- Poitrineau, P., C. Forestier, M. Meyer, C. Jallat, C. Rich, G. Malpuech, and C. De Champs. 1995. Retrospective case-control study of diffusely adhering *Escherichia coli* and clinical features in children with diarrhea. *J. Clin. Microbiol.* 33:1961-1962
- 203.- Polotsky, Y. E., E. M. Dragunskaya, V. G. Seliverstova, T. A. Avdeeva, M. G. Chakhutinskaya, I. Kétyi, A. Vertényi, B. Ralovich, L. Emody, I. Málovics, N. V. Safonova, E. S. Snigirevskaya, and E. I. Karyagina. 1997. Pathogenic effect of enterotoxigenic *Escherichia coli* and *Escherichia coli* causing infantile
- 204.- Powanda M. changes in body balnces in nitrogen and other key nutrients: description and underlying mechanisms. *Am J Clin Nutr* 1997;30:1254-1268.
- 205.- Puppo y Richarson, 1995, Cerritos, 1999; Parveen et al., 19; Cruz en revisión
- 206.-Rahaman M, Wahed M. Direct nutrient loss in diarrhea. En:Chen L, Scrimshaw NS, ed. *Diarrhea and Malnutrition*. Nueva York:Plenum Pres, 1993:157-162
- 207.- Raul Velazquez, MSC, Herlinada Garcia Lozano, Esteban Rodriguez.- Diarrhea Morbidity and Mortality in Mexican Children Impact of rotavirus Disease. The pPediatric Infectious Disease journal Volumen 23, Numbre 10, October 2004.
- 208.- Rennels MB, Glass RI, Dennehy HP, Bemenstein DI, Pychichero ME, Zito TE, et al. Safety and efficacy of high-dose rhesus reassortant rotavirus vaccines. Report of the National Multicenter Trial. *Pediatrics* 1996; 97:7-13.
- 209.-Revista Cubana de Medicina Tropical, Origen Bacteriano de la enfermedad Diarreica aguda en Merida,Venezuela . Dr. Gregorio Hernandez. Abril 2000
- 210.- Rev.Med. IMSS 2002; 40(4):329-341.
- 211.- Revista Panamericana de Salud Pública/Pan American Journal of Public Health, 1 January 2004, vol. 15, no. 1, pp. 66-70(5)
- 212.- Riley, L. W., R. S. Remis, S. D. Helgerson, H. B. McGee, J. G. Wells, B. R. Davis, R. J. Hebert, E. S. Olcott, L. M. Johnson, N. T. Hargrett, P. A. Blake, and M. L. Cohen. 1983.

Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. N. Engl. J. Med. 308:681-685

213.- Rivas EM, Ibarra JC. Procesos Infecciosos y mortalidad en Niños Mexicanos En: Temas de Pediatría, Asociación Mexicana de pediatría AC (Infectología) Mc-Graw Hill, México 1996;1-7

214.-Rodríguez-Angeles G. Principales características y diagnostico de los fupos patógenos de *Escherichia coli*, Salud Pública Mex 2002;44:464-475.

215.- Rojas AM, Boher Y, Guntiñas MJ, Pérez-Schael I. Homotypic immune response to primary infection with rotavirus serotype G1. J Med Virol 1995; 47:404-409.

216.- Rojas OL, González AM, González R, Pérez-Schael I, Butcher EC, Greenberg HB, "et al". Human rotavirus specific T cells: quantification by elispot and expression of homing receptors on CD4+T cell. Enviado a publicación

217.- Rothbaum, R., A. J. McAdams, R. Giannella, and J. C. Partin. 1982. A clinicopathological study of enterocyte-adherent *Escherichia coli*: a cause of protracted diarrhea in infants. Gastroenterology 83:441-454

218.- Ryder, R. W., D. A. Sack, A. Z. Kapikian, J. C. McLaughlin, J. Chakraborty, A. S. Mizanur Rahman, M. H. Merson, and J. G. Wells. 1996. Enterotoxigenic *Escherichia coli* and reovirus-like agent in rural Bangladesh. Lancet i:659-663.

219.- Samadpour, M., L. M. Grimm, B. Desai, D. Alfi, J. E. Ongerth, and P. I. Tarr. 1993. Molecular epidemiology of *Escherichia coli* O157:H7 strains by bacteriophage lambda restriction fragment length polymorphism analysis: application to a multistate foodborne outbreak and a day-care center cluster. J. Clin. Microbiol. 31:3179-3183

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

221.- Sansonetti, P. J. 1992. *Escherichia coli*, *Shigella*, antibiotic-associated diarrhea, and prevention and treatment of gastroenteritis. Curr. Opin. Infect. Dis. 5:66-73.

222.- Savarino, S. J., A. Fasano, D. C. Robertson, and M. M. Levine. 1991. Enteroaggregative *Escherichia coli* elaborate a heat-stable enterotoxin demonstrable in an in vitro rabbit intestinal model. J. Clin. Invest. 87:1450-1455[Medline]

223.- Schauer, D. B., and S. Falkow. 1993. Attaching and effacing locus of a *Citrobacter freundii* biotype that causes transmissible murine colonic hyperplasia. Infect. Immun. 61:2486-2492[Abstract]

224.- Schroeder, S. A., J. R. Caldwell, T. M. Vernon, P. C. White, S. I. Granger, and J. V. Bennett. 1968. A waterborne outbreak of gastroenteritis in adults associated with *Escherichia coli*. Lancet i:737-740.

225.- Schultz, C. 1994. Detection of enterotoxigenic *Escherichia coli* in stool samples by using nonradioactively labeled oligonucleotide DNA probes and PCR. J. Clin. Microbiol. 1994:2393-2397.

226.- Sears CL, Kapper JB. Enteric bacterial toxins: Mechanisms of action and linkage to intestinal secreción. Microbiol Revs 1996;60:167-215

227.- Selander et al., 1997

228.- Sepúlveda J, Willet W, Muñoz A. Malnutrition and diarrhea. A longitudinal study among urban Mexican children. Am J. Epidemiol 1988; 127:365-376.

229.- Shu-Lin et al, 199.; Bergthorsson y Ochman, 1995

230.- Simhon A, Mata L, Vives M, Rivera L, Vargas S, Ramírez G, "et al". Low endemicity and low pathogenicity of rotaviruses among rural children in Costa Rica. J Infect Dis 1985; 152:1134-1142.

- 231.- Sistema único de información para la investigación epidemiológica, Dirección General de Epidemiología SSA, 1998
- 232.- Sixma, T. K., K. H. Kalk, B. A. van Zanten, Z. Dauter, J. Kingma, B. Witholt, and W. G. Hol. 1993. Refined structure of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin, a close relative of cholera toxin. J. Mol. Biol. 230:890-918[Medline]
- 233.- Smith, H. R., S. M. Scotland, G. A. Willshaw, B. Rowe, A. Cravioto, and C. Eslava. 1994. Isolates of *Escherichia coli* O44:H18 of diverse origin are enteroaggregative. J. Infect. Dis. 170:1610-1613.
- 234.- Snyder, J. D., J. G. Wells, J. Yashuk, N. Puhr, and P. A. Blake. 1984. Outbreak of invasive *Escherichia coli* gastroenteritis on a cruise ship. Am. J. Trop. Med. Hyg. 33:281-284
- 235.- Souza et al., 1999
- 236.- Spangler, B. D. 1992. Structure and function of cholera toxin and the related *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. Microbiol. Rev. 56:622-647[Abstract/Free Full Text]
- 237.- Stein, M. A., D. A. Mathers, H. Yan, K. G. Baimbridge, and B. B. Finlay. 1996. Enteropathogenic *Escherichia coli* markedly decreases the resting membrane potential of Caco-2 and HeLa human epithelial cells. Infect. Immun. 64:4820-4825
- 238.- Steiner, T. S., A. A. M. Lima, J. P. Nataro, and R. L. Guerrant. Enteroaggregative *Escherichia coli* produce intestinal inflammation and growth impairment and cause interleukin-8 release from intestinal epithelial cells. J. Infect. Dis., in press.
- 239.- Streatfield, S. J., M. Sandkvist, T. K. Sixma, M. Bagdasarian, W. G. J. Hol, and T. R. Hirst. 1992. Intermolecular interactions between the A and B subunits of heat-labile enterotoxin from *Escherichia coli* promote holotoxin assembly and stability in vivo. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:12140-12144[Abstract/Free Full Text].
- 240.- Taniguchi K, Urasawa T, Kobayashi N, Ahmed MU, Adachi N, Chiba S, "et al". Antibody response to serotype-specific and cross-reactive neutralization epitopes on VP4 and VP7 after rotavirus infection on vaccination. J Clin Microbiol 1991; 29:483-487.
- 241.- Tarr, P. I., and M. A. Neill. 1996. Perspective: The problem of non-O157:H7 Shiga toxin (verocytotoxin)-producing *Escherichia coli*. J. Infect. Dis. 174:1136-1139
- 242.- Tarr, P. I. 1995. *Escherichia coli* O157:H7: clinical, diagnostic, and epidemiological aspects of human infection. Clin. Infect. Dis. 20:1-10
- 243.- Taylor, D. N., P. Echeverria, O. Sethabutr, C. Pitarangi, U. Leksomboon, N. R. Blacklow, B. Rowe, R. Gross, and J. Cross. 1988. Clinical and microbiologic features of *Shigella* and enteroinvasive *Escherichia coli* infections detected by DNA hybridization. J. Clin. Microbiol. 26:1362-1366
- 244.- Taylor WR, Emery JL, Carpenter RG. Identification of children at risk of unexpected death. Lancet 1998; 2(8357):1033-4
- 245.- Teneberg, S., T. R. Hirst, J. Ångström, and K.-A. Karlsson. 1994. Comparison of the glycolipid-binding specificities of cholera toxin and porcine *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin: identification of a receptor-active non-ganglioside glycolipid for the heat-labile toxin in infant rabbit small intestine. Glycoconjugate J. 11:533-540[Medline].
- 246.- Tornieporth, N. G., J. John, K. Salgado, P. de Jesus, E. Latham, M. C. Melo, S. T. Gunzburg, and L. W. Riley. 1995. Differentiation of pathogenic *Escherichia coli* strains in Brazilian children by PCR. J. Clin. Microbiol. 33:1371-1374[Abstract].
- 247.- Torregrosa L, Santos JI, Rodríguez RS, Velásquez L, García JA, Alpuche CM. Enfermedades diarreicas en el niño. 1996
- 248240.- Trend. Microbiol. 1997, 5: 109-114)

- 249.- Tulloch, E. F., K. J. Ryan, S. B. Formal, and F. A. Franklin. 1973. Invasive enteropathic *Escherichia coli* dysentery. Ann. Intern. Med. 79:13-17
- 250.- Tzipori S, Robins-Browne RM, Ganis G et al. Enteropathogenic *Escherichia coli* enteritis: evaluation of the gnotobiotic piglet as a model of human infection. Gut 1985;26:570
- 251.- Tzipori, S., J. Montanaro, R. M. Robins-Browne, P. Vial, R. Gibson, and M. M. Levine. 1992. Studies with enteroaggregative *Escherichia coli* in the gnotobiotic piglet gastroenteritis model. Infect. Immun. 60:5302-5306
- 252.- Tzipori, S., and J. P. Nataro. 1997. Unpublished data
- 253.- Urrestarazu MI, Liprandi F, Pérez de Suárez E, González R, Pérez-Schael I. Características etiológicas, clínicas y sociodemográficas de la diarrea aguda en Venezuela. Pan Am J Public Health 1999;6:149-156. Murray CJL, López AD. Global mortality, disability, and the contribution of risk factors: global burden of disease study. Lancet 1997; 349:1498-1504.
- 254.- Valdespiro JL; García ML, Del Río A, Giono S, Salcedo RA, Sepúlveda J. Epidemiología y etiología de las diarreas infecciosas. El caso de México Rev Latinoam Microbiol 1994;48:65-70
- 255.- Vásquez J, Boher Y, Pérez M, Guntiñas MJ, Rojas AM. Immune response to three doses of quadrivalent rotavirus vaccine: 1-year follow-up. Vaccine 1998; 16:1179-1183
- 256.- Velázquez FR, Matson DO, Calva JJ, Guerrero ML, Morrow AL, Carter-Campbell S, "et al". Rotavirus infection in infants as protection against subsequent infections. N Engl J Med 1996; 335:1022-1028.
- 257.- Velázquez FR, Matson DO, Guerrero LM, Shults J, Calva JJ, Morrow AL, "et al". Serum antibody as a marker of protection against natural rotavirus infection and disease. J Infect Dis 2000; 182:1602-1608.
- 258.- Vesikari T, Joensuu J. Review of rotavirus vaccine trials in Finland. J Infect Dis 1996; 174:S81-87.
- 259.- Vesikari T, Isolauri E, Delem A, D'Hondt E, Zissis G. Immunogenicity and safety of live oral attenuated bovine rotavirus vaccine strain RIT 4237 in adults and young children. Lancet 1983; 2:807-811.
- 260.- Vial, P. A., R. Robins Browne, H. Lior, V. Prado, J. B. Kaper, J. P. Nataro, D. Maneval, A. Elsayed, and M. M. Levine. 1998. Characterization of enteroadherent-aggregative *Escherichia coli*, a putative agent of diarrheal disease. J. Infect. Dis. 158:70-79[Medline]
- 261.- Viljanen, M. K., T. Peltola, S. Y. T. Junnila, L. Olkkonen, H. Järvinen, M. Kuistila, and P. Huovinen. 1990. Outbreak of diarrhoea due to *Escherichia coli* O111:B4 in schoolchildren and adults: association of Vi antigen-like reactivity. Lancet 336:831-834
- 262.- Walravens P, Hambidge K. Growth of infants fed a zinc supplemented formula. Am J Clin Nutr 1996; 29: 1114-1121
- 263.- Wanke, C. A., S. Cronan, C. Goss, K. Chadee, and R. L. Guerrant. 1990. Characterization of binding of *Escherichia coli* strains which are enteropathogens to small-bowel mucin. Infect. Immun. 58:794-800
- 264.- Ward LA, Rich ED, Besser TE. Role of maternally derived circulating antibodies in protection of neonatal swine against porcine group A rotavirus. J Infect Dis 1996; 174:276-282.
- 265.- Ward RL. Mechanisms of protection against rotavirus in humans and mice. J Infect Dis 1996; 174:S51-58.
- 266.- Ward RL, Bernstein DI for the US Rotavirus Vaccine Efficacy Group. Protection against rotavirus disease after natural rotavirus infection. J Infect Dis 1994; 169:900-904.

- 267.- Ward RL, Berstein DI for the US rotavirus vaccine efficacy group. Lack of correlation between serum rotavirus antibody titers and protection following vaccination with RRV vaccines. *Vaccine* 1995; 13:1226-1252.
- 268.- Ward RL, Clemens JD, Knowlton DR, Rao MR, Van Loon FP, Huda N, "et al ". Evidence that protection against rotavirus diarrhea after natural infection is not dependent on serotype-specific neutralizing antibody. *J Infect Dis* 1992; 166:1251-1257.
- 269.- WHO. Report of the meeting on future directions for rotavirus vaccine research in developing countries. Geneva, February 9-11, World Health Organization, 2000; pp 1-62.
- 270.- Wood, L. V., L. E. Ferguson, P. Hogan, D. Thurman, D. Morgan, H. L. DuPont, and C. D. Ericsson. 1983. Incidence of bacterial enteropathogens in foods from Mexico. *Appl. Environ. Microbiol.* 46:328-332[Abstract/Free Full Text].
- 271.- Wood, P. K., J. G. Morris, P. L. Small, O. Sethabutr, M. R. Toledo, L. Trabulsi, and J. B. Kaper. 1986. Comparison of DNA probes and the Sereny test for identification of invasive *Shigella* and *Escherichia coli* strains. *J. Clin. Microbiol.* 24:498-500[Abstract/Free Full Text].
- 272.- World Health Organization. The treatment of diarrhea, a manual for physicians and other senior health workers. Ginebra: World health Organization; 1999:1-62
- 273.- World Health Organization. A manual for the treatment of acute diarrhoea. Ginebra:WHO/CDD/Ser/80.2, rev. 1, 1994
- 274.- Yamamoto, T., and P. Echeverria. 1996. Detection of the enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1 gene sequences in enterotoxigenic *E. coli* strains pathogenic for humans. *Infect. Immun.* 64:1441-1445[Abstract]
- 275.- Yamamoto, T., M. Kaneko, S. Changchawalit, O. Serichantalergs, S. Ijuin, and P. Echeverria. 1994. Actin accumulation associated with clustered and localized adherence in *Escherichia coli* isolated from patients with diarrhea. *Infect. Immun.* 62:2917-2929