

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE HONDURAS
FACULTAD DE CIENCIAS
MAESTRÍA EN ENFERMEDADES INFECCIOSAS Y ZONÓTICAS



“Caracterización fenotípica y molecular de aislamientos clínicos de *Escherichia coli* enterotoxigénica (ETEC) y enteropatogénica (EPEC) en muestras fecales de niños menores de tres años en Centros de Salud de Tegucigalpa y Comayagüela”

TESIS SUSTENTADA POR:

Jessy del Carmen Espinoza Galeas

**PARA OPTAR AL GRADO DE MÁSTER EN CIENCIAS EN ENFERMEDADES
INFECCIOSAS Y ZONÓTICAS**

TEGUCIGALPA M.D.C. MAYO DE 2013 HONDURAS C.A.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE HONDURAS
FACULTAD DE CIENCIAS
MAESTRÍA EN ENFERMEDADES INFECCIOSAS Y ZONÓTICAS

RECTORA

JULIETA CASTELLANOS, MSc

VICERRECTORA ACADÉMICA

RUTILIA CALDERON, PhD

DIRECTORA DEL SISTEMA DE ESTUDIOS DE POSTGRADO

LETICIA SALOMÓN, MSc

DECANA DE LA FACULTAD DE CIENCIAS

MIRNA MARÍN, PhD

COORDINADORA DEL POSTGRADO EN ENFERMEDADES
INFECCIOSAS Y ZONÓTICAS

MARITZA CANALES GIRÓN, MSP

TEGUCIGALPA, M.D.C. MAYO 2013 HONDURAS C.A

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE HONDURAS
MAESTRÍA EN ENFERMEDADES INFECCIOSAS Y ZONÓTICAS

ASESOR DE TESIS

Lourdes Enríquez de Madrid, MSc

Coasesora:

Annabelle Ferrera, PhD

TERNA EXAMINADORA:

Annabelle Ferrera, PhD

Lourdes Enríquez de Madrid, MSc.

Maribel Rivera MD

Contenido

RECONOCIMIENTO	i
AGRADECIMIENTOS	ii
DEDICATORIA.....	iii
LISTA DE FIGURAS.....	iv
LISTA DE CUADROS.....	v
LISTA DE ANEXOS.....	v
LISTA DE ABREVIATURAS	vi
CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO 2: REVISIÓN DE LA LITERATURA	6
1. Enfermedades diarreicas	6
1.a Diarrea y mortalidad infantil	6
1.b Etiología y clasificación de las diarreas	7
2. <i>Escherichia coli</i>	9
2.a Historia y taxonomía	9
2.b Ecología de <i>E.coli</i>	11
2.c <i>Escherichia coli</i> como causante de diarreas	11
3. <i>Escherichia coli</i> enterotoxigénica (ETEC)	15
3.a ETEC en países centroamericanos	16
3.b Serotipos de ETEC.....	16
3.c Factores de virulencia y patogenicidad de ETEC.....	17
3. c.1 Factores de Colonización (CFs).....	18
3. c.2 Enterotoxina Termolábil (LT).....	21
3. c.3 Toxina termoestable (ST).....	23
3.d Epidemiología.....	25
3.d.1 Infección de ETEC relacionada con la edad	27
3.d.2 Coinfección de ETEC con otros patógenos	28
3.d.3 Estacionalidad de ETEC.....	29
3.d.4 ETEC en el medio ambiente.....	29
3.d.5 Infecciones en los viajeros internacionales	31
3.e Manifestaciones Clínicas	32
3.f Diagnóstico.....	33
3.g Tratamiento y prevención	36

4. <i>Escherichia coli</i> enteropatógena (EPEC)	39
4.a Serotipos de EPEC.....	40
4.b Patogénesis molecular	41
4.c Epidemiología.....	48
4.c.1 Infección de EPEC relacionada con la edad	49
4.c.2 Estacionalidad de EPEC.....	49
4.d Manifestaciones clínicas EPEC	50
4.e Diagnóstico.....	51
4. f Tratamiento y prevención	54
CAPÍTULO 3: METODOLOGÍA	57
1. Objetivo general.....	57
2. Objetivos específicos	57
4. Diseño	58
5. Ubicación	58
6. Población de estudio.....	58
7. Tamaño de la muestra	59
8. Duración del estudio	60
9. Criterios de selección.....	60
10. Recolección de la muestra.....	61
11. Detección y caracterización de ETEC y EPEC en muestras de heces	62
11. a Aislamientos e identificación de <i>E.coli</i>	62
11. b Extracción de ADN	63
11. c PCR Múltiplex.....	64
11. Análisis de Datos	66
12. Flujograma de Trabajo	67
13. Consideraciones Éticas.....	68
14. Consideraciones de Bioseguridad.....	68
CAPÍTULO 4: RESULTADOS	70
1. Muestras recolectadas	70
2. Resultados fenotípicos de las muestras captadas.....	71
3. Resultados moleculares de las muestras captadas.....	71
4. Características clínicas de los pacientes captados	77
5. Características socioeconómicas	78

CAPÍTULO 5: DISCUSIÓN.....	83
CAPÍTULO 6: CONCLUSIONES	94
CAPÍTULO 7: RECOMENDACIONES	96
CAPÍTULO 8: REFERENCIAS	99
ANEXOS	106

RECONOCIMIENTO

Este proyecto de tesis ha sido posible gracias a una beca de estudio e investigación otorgada por el Programa Teasdale-Corti Honduras-Canadá, 2007-2012 *“Fortaleciendo Capacidades para Lograr la Meta No. 6 del Milenio en Honduras: Combatiendo las Enfermedades Infecciosas”*. Dicho proyecto opera con fondos del programa Teasdale-Corti para Alianzas para la Investigación en Salud Mundial de la agencia Canadiense **Iniciativa para la Investigación en Salud Mundial** (www.ghri.ca).

[This thesis project has been possible thanks to a study and research scholarship granted by the Honduras-Canada Teasdale-Corti Project 2007-2012 *“Increasing Capacity to Achieve Millennium Development Goal # 6 in Honduras: Combating Infectious Diseases”*, funded by the Teasdale-Corti Global Health Research Partnership Program of the **Global Health Research Initiative** (GHRI), Canada (www.ghri.ca).]

AGRADECIMIENTOS

A Dios por darme la oportunidad de concretar este sueño.

Familia y amigos, por acompañarme en este proceso de aprendizaje.

A Network for Research and Training in Tropical Diseases in Central América (NETROPICA) por su valiosa colaboración en el presente proyecto.

A la Secretaria de Salud por prestar las instalaciones: Alonso Suazo y Hospital Escuela, igualmente al Hospital de Especialidades del Instituto Hondureño de Seguridad Social, especialmente a: Dr. Luis Rogelio García Orellana, Dra. Maribel Rivera, Dra. Elvia Rodríguez y Dr. Denis Velásquez.

A mis asesoras Dra. Lourdes Enríquez de Madrid y Dra. Annabelle Ferrera.

A los Alumnos de la carrera de Microbiología: Isabel Díaz, Aida Murillo, Ariel Arias, Dra. Ada Mena, Dr. Jafet Ortiz y Dra. Yessy Cabrera.

A las Familias participantes por su voluntad de contribuir a la ciencia y hacer posible esta investigación.

A José Noel Galeas Portillo,
mi primo, compañero y amigo.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Clasificación de la diarrea infecciosa aguda y su etiología	9
Figura 2	Biogénesis de un pilus tipo IV	19
Figura 3	Mecanismo de patogénesis de toxina termolábil TL-I y TL-II	23
Figura 4	Mecanismo de patogénesis de STh y de la toxina STp	25
Figura 5	Manifestaciones clínicas en niños con diarrea por ETEC detectados en dos centros de salud y el Hospital principal de León Nicaragua, en un período de seis meses.	33
Figura 6	Adhesión inicial de EPEC a la célula huésped	43
Figura 7	Estructura complejo aguja, SSTT	45
Figura 8	Fase final de la adhesión de EPEC a células huésped	47
Figura 9	Manifestaciones clínicas en niños con diarrea por EPEC detectados en dos centros de salud y el Hospital principal de León Nicaragua, en un periodo de seis meses.	51
Figura 10	Distribución de según el grupo etario y género de las muestras captadas	69
Figura 11	Aislamientos bacterianos a partir de las muestras fecales de niños menores tres años	
Figura 12	PCR para la detección de ETEC	71
Figura 13	Frecuencia de ETEC y respectivo porcentaje de las diferentes cepas encontradas	72
Figura 14	PCR para la detección de EPEC	
Figura 15	Frecuencia de EPEC y respectivo porcentaje de las diferentes	73
Figura 16	Distribución de los casos positivos ETEC y EPEC según grupo etario	74
Figura 17	Distribución estacional de muestras captadas en el estudio.	74
Figura 18	Características clínicas de los pacientes positivos y negativos captados en el estudio	75
Figura 20	Método seleccionado por los participantes para tratar el agua que ingieren	78
Figura 21	Porcentaje de las diferentes formas de acceso al agua para el consumo	78
Figura 22	Porcentaje de la procedencia de los alimentos; casos positivos y negativos	79
Figura 23	Diferentes tipos de pisos de las viviendas de pacientes positivos y negativos	80
Figura 24	Exposición de excretas en las viviendas de pacientes positivos y negativos	80

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1	Diferentes serotipos O:H de cepas típicas y atípicas de EPEC	41
----------	--	----

LISTA DE ANEXOS

ANEXO I	Características bioquímicas de <i>Escherichia coli</i> .
ANEXO II	Serotipos y serogrupos más comunes de <i>E. coli</i> causante de diarrea.
ANEXO III	Ficha de recolección de datos
ANEXO IV	Procedimiento: Aislamiento e identificación de <i>Escherichia coli</i>
ANEXO V	Procedimiento para la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) múltiple para la detección de EPEC y ETEC
ANEXO VI	Consentimiento informado para participar como voluntario en el estudio de investigación
ANEXO VII	Hoja de bioseguridad de <i>Escherichia coli</i> Enterotoxigénica
ANEXO VIII	Hoja de bioseguridad de <i>Escherichia coli</i> Enteropatógena.

LISTA DE ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
AMPc	Adenosín monofosfato cíclico
A/E	Lesión, adherencia y eliminación
ARN	Ácido ribonucleico
Arp 2/3	Proteínas relacionadas con la actina dos y tres
BFP	Pili formador de penacho
CFAs	Antígenos de factores de colonización
CS	Antígeno de Superficie de <i>E. coli</i>
DAEC	<i>Escherichia coli</i> adherencia difusa
eae	Gen de la intimina
EAEC	<i>Escherichia coli</i> enteroagregativa
EAF	Factor de adherencia de EPEC
ECP	Pilus común de <i>E. coli</i> o longus
EHEC	<i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica
EIEC	<i>Escherichia coli</i> enteroinvaora
EPEC	<i>Echerichia coli</i> enteropatógena
ETEC	<i>Echerichia coli</i> enterotoxigénica
FCs	Factores de colonización
GC	Guanilato ciclasa (A, B ó C)
GMPc	Guanosina monofosfato cíclico
LA	Adherencia localizada
LEE	Locus de eliminación del enterocito
NaCl	Cloruro de sodio
NcK	proteína adaptadora que se une a Tir
NCL	Proteína nucleolina
PCF	Factor de colonización putativo
SSTT	Sistema de secreción tipo tres
ST	Toxina termoestable
STh	Toxina termoestable humana
STp	Toxina termoestable porcina
STX	Citotoxina segregada por EHEC pueden ser; Stx1 o variantes de Stx2
TC	Toxina del cólera
Tir	Receptor de la intimina
TL	Enterotoxina termolábil
WASP	Proteína del síndrome de Wiskott-Aldrich

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN

La diarrea es una manifestación clínica de las infecciones por patógenos bacterias, virus y parásitos, cuya sintomatología varía desde casos leves hasta severos [Heymann, 2005]. La diarrea aguda es la segunda causa de consulta en los centros de salud en países en desarrollo, superada solo por las enfermedades respiratorias, y es una de las principales causas de muerte en niños a nivel mundial [Black et al., 2003]. El informe presentado el 14 de octubre del 2009 por UNICEF y la Organización Mundial de la Salud (OMS) expresa que esta enfermedad cobra más vidas infantiles que el SIDA, el paludismo y el sarampión combinados. Datos recientes sobre la mortalidad relacionada con las diarreas estiman alrededor de 1.6-2.1 millones de muertes por año [Petri et al., 2008]. En los niños estas infecciones pueden conducir a mala absorción, desarrollo y crecimiento anormales, deficiencia en el aprendizaje y mortalidad [Qadri et al., 2005].

Aproximadamente 1.5 millones de muertes en el mundo son causadas por *Escherichia coli*, rotavirus, *Vibrio cholerae* y *Shigella sp.* [Qadri et al., 2005]. La Organización Mundial de la Salud (OMS) en el 2009 menciona que tanto *Escherichia coli* enterotoxigénica (ETEC) como *Escherichia coli* enteropatogénica (EPEC) son considerados como principales causas de las diarreas agudas y persistentes en la población infantil y adulta.

ETEC origina un estimado de 840 millones de infecciones gastrointestinales [Wenneras and Erling, 2004], y cerca de 380,000 muertes cada año en todo el mundo [Qadri et al., 2005]. Además es uno de los principales patógenos de animales, responsable de diarrea en el ganado vacuno, porcino neonatal y posdestete, dando lugar a importantes pérdidas financieras [Turner et al., 2006].

EPEC tiene una distribución mundial. En países en desarrollo, es uno de los principales patógenos bacterianos causantes de diarreas durante el verano, en la población infantil, los brotes de diarrea causados por EPEC están asociados a malas condiciones de higiene y hacinamiento, especialmente en hospitales y guarderías, [Romero, 2002].

Las enfermedades diarreicas causadas por ETEC y EPEC son el resultado de la ingesta de alimentos y agua contaminados como consecuencia de las pobres condiciones de saneamiento básico y ambiental [Heymann, 2005]. De acuerdo a Begum et al., 2005, en países en vías de desarrollo es frecuente encontrar ETEC en aguas superficiales, las cuales son utilizadas como medio de dilución de las aguas servidas.

En Honduras, la última encuesta de hogares refleja que a nivel nacional la población menor de 5 años representa el 11.8 % del total (845,184 niños). La prevalencia de diarrea en este grupo es de 17.0 %, afectando con mayor intensidad al área rural con 18.7 %, mientras que al área urbana es de 14.9 %. El grupo de edad más afectado por la diarrea son los niños de 12 a 35 meses (de 1 a 3 años), que equivale al 71.9 % del total de la población infantil menor de

cinco años. Esta encuesta también reveló que los hogares en donde se presenta la mayor incidencia de diarrea son aquellos que obtienen el agua de proyectos individuales [INE, 2004].

En 1979, Bendeck, Larios y Zaldívar, realizaron un estudio con el objetivo de establecer la etiología del síndrome diarreico agudo en niños de uno hasta cinco años de edad. El estudio se realizó en el Servicio de Emergencia de Pediatría del Instituto Hondureño de Seguridad Social (IHSS) en un periodo de 11 meses. Concluyeron que el número mayor de casos diarreicos estaba asociado a virus enteropatógenos (43.9%), seguido de bacterias (35.7%), de las cuales EPEC estuvo presente en 19% de los casos bacterianos.

En 1990 Figueroa y colaboradores realizaron un estudio sobre la epidemiología de las diarreas infantiles en tres comunidades de Honduras donde, mediante el seguimiento a 268 niños menores de seis años en dos comunidades urbano marginal, Linaca, Tatumbra y en el barrio urbano Villanueva en Francisco Morazán. En este estudio *Giardia lamblia* obtuvo un 29.1% del total de los casos, ETEC 21.7%, rotavirus 15%, y *Campylobacter*, 10.4%; [Figueroa et al., 1990].

Existen estudios recientes que aportan al conocimiento de la etiología de las diarreas en Honduras, sobre organismos patógenos presentes en el agua, donde se detectó ETEC en el 75% de las muestras ambientales tomadas en el Barrio las Crucitas, Comayagüela [Ferrera and Enrríquez, 2008].

Para el 2009, la Secretaría de Salud de Honduras en el nivel central, reportó 211,654 pacientes con diarrea, de los cuales 45% eran niños de uno a cuatro años y un 28% eran niños menores de un año [Secretaria-Salud, 2009]. De acuerdo a esta información, la principal causa de diarreas en niños menores de 5 años a nivel central son las pobres condiciones sanitarias que promueven la prevalencia de diversos patógenos entéricos, provenientes de agua y alimentos [Figueroa et al., 1990].

En los últimos cinco años, algunos estudios están puntualizando por el desarrollo de una vacuna contra la diarrea por ETEC. Para determinar la composición de la vacuna es importante la caracterización de las ETEC aisladas de muestras clínicas en diferentes partes del mundo en lo que respecta a los perfiles de toxinas y factores de colonización, debido a que se ha observado que éstos varían de una región geográfica a otra [Qadri et al., 2005; Shaheen et al., 2009].

A pesar de los estudios realizados, Honduras no cuenta con investigaciones sobre los perfiles de toxinas de ETEC, ni sobre la presencia de los dos tipos de EPEC en diarreas infantiles. En apoyo al conocimiento sobre la etiología bacteriana de las diarreas infantiles, este proyecto pretende caracterizar las cepas de *E. coli* a partir de aislamientos clínicos, en un estudio descriptivo transversal, en muestras fecales de niños menores de 3 años, utilizando la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), para determinar la presencia de genes responsables de la producción de toxinas LT, STh y STp de

ETEC, y la detección del gen intimina (*eaē*) y del pili (*bfp*) de EPEC, así como también, algunos de los aspectos epidemiológicos involucrados.

La caracterización de ETEC nos permitirá conocer las toxinas prevalentes en las diarreas infantiles en Tegucigalpa y Comayagüela, lo que permitirá aportar información valiosa de esta región y coadyuvar a los esfuerzos encaminados al desarrollo de vacunas basadas en toxinas y factores de colonización.

CAPÍTULO 2: REVISIÓN DE LA LITERATURA

1. Enfermedades diarreicas

1.a Diarrea y mortalidad infantil

La diarrea acuosa es una de las principales causas de muerte en todo el mundo [Black et al., 2003]. Se ha documentado que anualmente mueren 2 millones de niños al año por causa de diarrea [Kosek et al., 2003], por lo que la diarrea infecciosa es la segunda causa más común de muerte en los niños que viven en países en desarrollo después de las enfermedades respiratorias. Los agentes etiológicos más importantes causantes de muertes son *Escherichia coli* enterotoxigénica, *Escherichia coli* enteropatógena, rotavirus, *Vibrio cholerae* y *Shigella spp*; los últimos tres son de fácil detección por ensayos estándar. Sin embargo, ETEC y EPEC son de difícil determinación, por lo que a menudo no son reportados como causa importante de diarrea infantil [Ericsson, 2003].

Una asociación claramente establecida a nivel mundial manifiesta que cerca del 88% de las defunciones por diarrea se atribuyen a la mala calidad del agua, saneamiento inadecuado e higiene deficiente [OPS, 2009], representando el agua el principal vehículo de transmisión de los agentes infecciosos causantes de diarrea.

En un informe del Fondo de las Naciones Unidas para la Infancia (UNICEF) y la Comisión Nacional de Promoción de la Lactancia Materna (CONAPLAM), reportó que la prevalencia de diarreas en niños menores de cinco años en Guatemala durante los meses lluviosos en 1999 fue de 28% [UNICEF/COPANAPLAM, 2000]. En el 2004 en Nicaragua, el 71% de los casos de diarreas eran en niños menores de cinco años con una tasa de mortalidad de 11 por cada 10,000 habitantes, reportándose una tasa de morbilidad en niños menores de 1 año de 3,058 por 10,000 habitantes y de 1-4 años de edad de 1,157 por cada 10,000 habitantes [MINSANIC, 2004].

En Honduras, la población menor de 5 años representa el 11.8 % (845,184 niños). La prevalencia de diarrea en este grupo etario es del 17.0 %; el grupo de edad más afectado por la diarrea son los niños de 12 a 35 meses (de 1 a 3 años) representando el 71.9 % [INE, 2004]. Durante el año 2008 en Honduras se reportaron 200,000 consultas por diarrea aguda, 40,000 hospitalizaciones, 1,000 muertes, de las cuales 77% eran niños menores de 5 años [Secretaría-Salud, 2009].

1.b Etiología y clasificación de las diarreas

La diarrea es un síndrome clínico que frecuentemente se acompaña de otros signos y síntomas, como fiebre, deshidratación, vómito y desequilibrio de los electrolitos. Es una manifestación de la infección que puede ser originada por

diversos agentes patógenos: bacterianos, virales o parasitarios (Figura 1), pero también puede deberse a otras enfermedades infecciosas sistémicas, como paludismo y sarampión, así como a la exposición a ciertos agentes químicos y a los cambios en la flora intestinal provocados por antibióticos [Heymann, 2005].

La diarrea acuosa secretora es una diarrea profusa que causa deshidratación, resultado del movimiento neto de agua y desequilibrio de electrolitos desde la mucosa intestinal hasta el lumen y su volumen excede los 10 ml/kg/día, y su osmolalidad es parecida al plasma.

Este tipo de diarrea es causada generalmente por *Vibrio cholerae*, *Escherichia coli enterotoxigénica* (ETEC) y *Escherichia coli* enteropatogénica, aunque otras bacterias como *Shigella spp*, *Yersinia enterocolítica* y *Aeromonas spp* también pueden ocasionarla (Figura 1) [Puerta-Garcia, 2010].

La secreción se considera un mecanismo de defensa del organismo, que provoca eliminación de líquidos siempre que el epitelio intestinal presente daño, o sea invadido por agentes químicos o elementos extraños. Hay una gran cantidad de sustancias que pueden estimular al intestino a secretar líquidos entre las que se incluye las toxinas bacterianas [Romero, 2002].

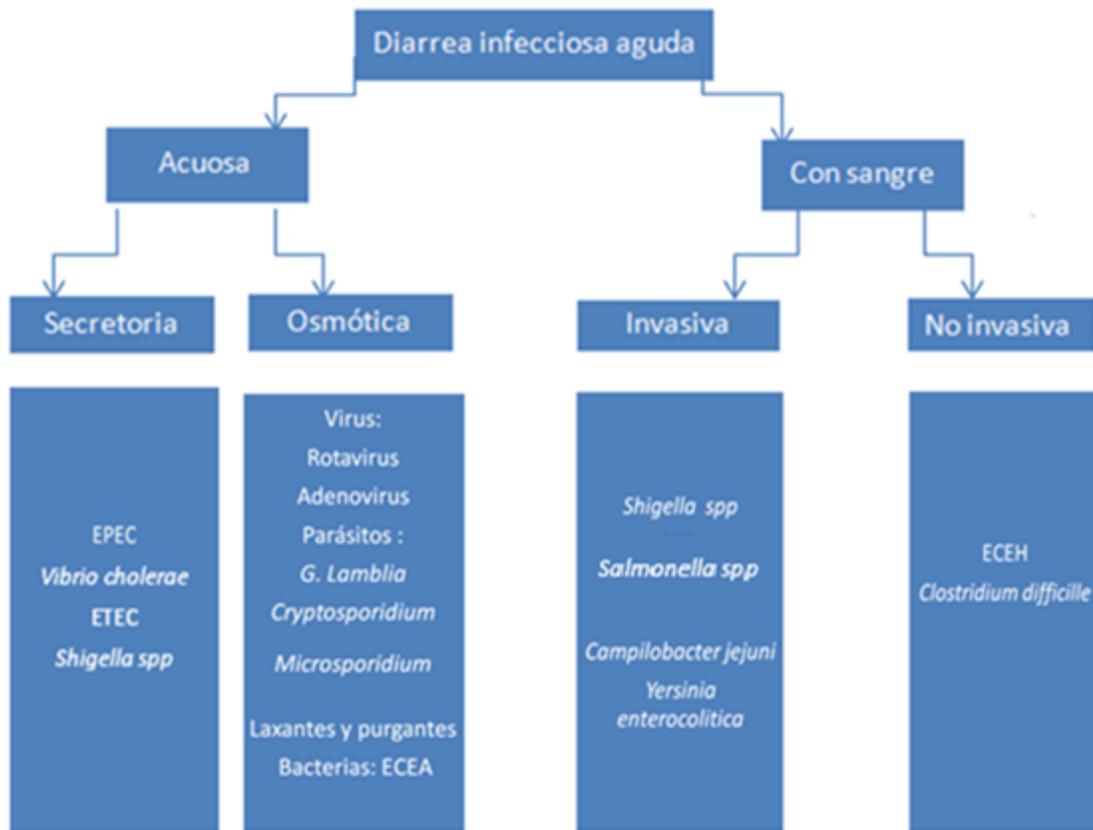


Figura 1 Clasificación de la diarrea infecciosa aguda y su etiología (Riverón Corteguera RL, 1999).

2. *Escherichia coli*

2.a Historia y taxonomía

E. coli fue descubierta en 1885 por Theodor Escherich durante su investigación sobre bacterias en las deposiciones de los niños. Es quizá el organismo más conocido del mundo y se ha empleado como modelo ya que es fácil de cultivar,

manipular y caracterizar [Bell and Kyriades, 2000]. Su genoma completo es conocido y se han realizado estudios de genética de poblaciones con este microorganismo [Touchon et al., 2009].

E. coli es una bacteria Gram negativa típica de la familia *Enterobacteriaceae*. El análisis del gen 16rARN muestra que pertenece a la subclase de proteobacterias γ , misma que se encuentra muy relacionada a las otras proteobacterias (α , β , δ) y a las cianobacterias. La subclase de proteobacterias γ , incluye además a organismos patógenos de humanos, como son *Shigella sp*, *Samonella sp*, *Vibrio sp* y *Haemophilus sp* [Esser et al., 2004].

Es un anaerobio facultativo, móvil por flagelos peritricós, no forma esporas. y sus principales características bioquímicas se muestran en el anexo I. *E. coli* prefiere utilizar azúcares sencillos como la glucosa; produce ácido y gas en presencia de lactosa y debido a que no es una bacteria fijadora, requiere nitrógeno soluble como el sulfato de amonio [Rodriguez, 2002].

Estas características también han definido a *E.coli* como indicador de la calidad de alimentos y aguas de consumo, ya que su presencia en estos ambientes es sinónimo de contaminación fecal [Bell and Kyriades, 2000].

2.b Ecología de *E.coli*

Las bacterias de la Familia *Enterobacteriaceae* se caracterizan por ser capaces de respirar facultativamente y anaeróbicamente en el interior del intestino de animales homeotermos y aeróbicamente en el ambiente exterior. Esta capacidad hace que muchos de los miembros de esta Familia sean de vida libre, mientras que otros son principalmente comensales de animales invertebrados y vertebrados, o son patógenos de plantas [Puerta-Garcia, 2010].

E. coli es un habitante normal del tracto intestinal del hombre y animales de sangre caliente. Es una de las primeras bacterias que coloniza el intestino del mamífero pocas horas después del nacimiento [Bell and Kyriades, 2000], siendo su primer contacto el canal de parto y las heces de la madre. Es considerado un microorganismo de la biota normal del intestino del ser humano, pero hay serotipos que pueden ser patógenos y causar diversos cuadros clínicos, como la diarrea [Rodriguez, 2002].

2.c *Escherichia coli* como causante de diarreas

El grupo de *E. coli* diarreogénicas es una causa importante de diarreas en niños en países en desarrollo, pero no es rutinariamente diagnosticada y es poco conocida por el médico clínico [Ericsson, 2003]. A nivel mundial no se investigan *E. coli* diarreogénicas rutinariamente en los laboratorios clínicos, debido a la falta

de métodos de diagnóstico rápidos, accesibles, y de bajo costo [Heymann, 2005].

Algunos de estos aislados de *E. coli* están siendo reconocidos como importantes enteropatógenos en países desarrollados. *E. coli* está ampliamente distribuida en la naturaleza y es inevitable que la mayoría de las materias primas para la preparación de alimentos estén contaminadas por este organismo, aunque con frecuencia en un nivel bajo [Bell and Kyriades, 2000; Cohen et al., 2005].

Las cepas de *E. coli* asociadas a diarrea se clasifican con base a criterios clínicos, epidemiológicos y moleculares en 6 grupos: (1) enterohemorrágicas (EHEC), (2) enterotoxígenas (ETEC), (3) enteroinvasoras (EIEC), (4) enteropatógenas (EPEC), (5) enteroagregativas (EAEC o EA_gEC) y de (6) adherencia difusa (DAEC) [Heymann, 2005]. Cada grupo tiene factores de virulencia específicos que sirven para su identificación y clasificación, así como diferentes serotipos y serogrupos, basados en los antígenos somáticos “O” y flagelares “H” (anexo II).

Las manifestaciones clínicas producidas por cada una de las *E. coli* diarreogénicas varían en relación a los diferentes mecanismos de producción de la enfermedad, los cuáles describimos a continuación.

ETEC coloniza la mucosa del intestino delgado por medio de pili o fimbrias que tienen diversas formas denominadas CFAs (factores de colonización antigénicos), siendo su principal mecanismo de patogenicidad la síntesis de alguna o ambas enterotoxinas llamadas toxina termolábil (LT) y toxina termoestable (ST). Los genes que codifican para las enterotoxinas residen en un plásmido que también puede contener información genética para los CFA's, aunque algunos genes de ST se han encontrado en transposones. 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 e iones [Qadri et al., 2005].

El principal factor de virulencia de EPEC es la adherencia. El proceso de patogenicidad es llamado "adherencia y esfacelamiento" (A/E), el cual consiste en la adherencia entre la bacteria y la membrana de las células del epitelio intestinal, seguida de la destrucción de la microvellosidad, con polimerización de actina, que lleva a la alteración del citoesqueleto en el sitio de la unión de la bacteria, debido al aumento de los niveles de calcio intracelular [Nougayrede et al., 2003].

El mecanismo de patogenicidad de EIEC es la invasión del epitelio del colon; para ello el primer paso es la adherencia de la bacteria a las vellosidades de la mucosa requiriendo de mucinasa y adhesinas, para después entrar por

endocitosis a la célula, y posterior multiplicación de la EIEC dentro de la célula y diseminación a células sanas adyacentes [Vidal et al., 2007].

EHEC se adhiere al epitelio intestinal y produce una o más toxinas Shiga (Stx1, y variantes de Stx2), que son su principal factor de virulencia y responsables de las complicaciones intestinales y sistémicas [Nataro and Kaper, 1998]. La citotoxina STX es el principal mecanismo de patogenicidad de EHEC y su síntesis está relacionada con la presencia del bacteriófago STX, que está insertado en el genoma. La STX actúa a nivel de síntesis de proteínas ya que se une a la subunidad 60S de los ribosomas de las células intestinales o renales del hospedero [Rivero et al., 2010].

En el mecanismo de patogenicidad de EAEC están implicadas las mismas bacterias y distintas moléculas que ésta produce; también se sabe que las cepas EAEC tienen la capacidad de incrementar en la mucosa la producción y secreción de moco que atrapa a las bacterias que se autoaglutinan en una fina película en el epitelio intestinal. La producción de moco puede estar relacionada con la capacidad de EAEC para colonizar persistentemente el intestino y causar diarrea [Vidal et al., 2007].

El mecanismo de patogenicidad de DAEC se ha caracterizado por una fimbria de superficie, conocida como F1845, involucrada en el fenómeno de adherencia difusa. Los genes que codifican para esta fimbria se pueden encontrar en el

cromosoma o en un plásmido. El fenómeno de adherencia difusa también se ha asociado con una proteína de membrana externa de 100 kDa, en una cepa del serotipo 0126:H27, cuyos genes se han secuenciado pero sólo se han encontrado en una minoría de las cepas aisladas [Riveros et al., 2011].

3. *Escherichia coli* enterotoxigénica (ETEC)

Escherichia coli enterotoxigénica (ETEC) es responsable de 380,000 muertes de niños al año en el mundo [Gupta et al., 2008]. *E. coli* enterotoxigénica (ETEC) es una de las causantes principales de diarreas en la actualidad, produce la diarrea del viajero, la diarrea acuosa, tanto en niños como en adultos [Dorsey et al., 2006]. En países en vías de desarrollo constituyen una causa importante de diarrea con deshidratación en lactantes y niños menores de tres años de edad [Heymann, 2005].

ETEC fue reconocida por primera vez en Calcuta en el año 1956 en aislados de personas con una enfermedad similar al cólera. ETEC fue inoculada en las asas de ileon de conejo y se constató que produce una acumulación masiva de líquido [Qadri et al., 2005].

Este patógeno es una bacteria anaerobia facultativa que puede obtener energía por la respiración aeróbica. Se ha demostrado que logra sobrevivir largos periodos en el ambiente, pero también puede pasar a la fermentación o

respiración anaeróbica en condiciones donde esté ausente el oxígeno, como el intestino humano [Lothigius et al., 2010].

3.a ETEC en países centroamericanos

En un estudio de diarreas agudas realizado en niños menores de cinco años en dos hospitales de Guatemala desde junio del 2001 hasta julio del 2002, ETEC resultó ser el segundo agente infeccioso de importancia encontrado en la población estudiada, con un 19.5% (16/84) de prevalencia. Las infecciones por ETEC ocurrieron en niños menores de 36 meses de edad, y la mitad de estos casos fueron niños que no habían cumplido el primer año de vida [Lemus, 2006].

En León, Nicaragua se realizó otro estudio de *Escherichia coli* diarreogénicas, donde ETEC se detectó en todas las edades de 1-5 años pero obtuvo una mayor prevalencia en niños menores de 12 meses de edad. Del total de los casos severos, ETEC fue responsable del 27.9% [Vilchez et al., 2009].

3.b Serotipos de ETEC

La serotipificación de microorganismos, es la determinación de los serogrupos por medio de sus propiedades antigénicas. En *E. coli* se han establecido los antígenos somáticos "O", antígenos flagelares "H" y antígenos capsulares "K", éstos han sido utilizados para identificar y caracterizar ETEC. Los aislamientos

clínicos de ETEC pueden pertenecer a un gran número de serotipos que puede cambiar con el tiempo [Rodríguez, 2002].

ETEC expresa especialmente los antígenos O y H; el grupo más común es O. ETEC tiene una alta variedad de antígenos somáticos. En un estudio en el 2005 se encontraron 78 diferentes grupos O en 954 aislados de ETEC [Qadri et al., 2005]. En otro estudio en Egipto también se encontró una gran variación de grupos O, 47 entre 100 cepas aisladas de ETEC, mientras que del antígeno H se encontraron 5 diferentes grupos que representaron la mitad de las 100 cepas [Bandyopadhyay et al., 2011].

La utilidad de los antisueros en la detección de serogrupos de ETEC es de poco beneficio debido a la diversidad de serotipos observados, especialmente en las cepas LT [Bell and Kyriades, 2000].

3.c Factores de virulencia y patogenicidad de ETEC

La patogenicidad de ETEC está parcialmente basada en sus factores de colonización, la expresión de adhesinas intestinales y la producción de enterotoxinas [Qadri et al., 2007], como ser: (1) la termolábil (LT), que presenta un mecanismo similar a la enterotoxina de *Vibrio cholerae* [Dorsey et al., 2006; Pierce et al., 1985], e igualmente produce (2) la toxina termoestable (ST) que contiene múltiples residuos de cisteína brindándole estabilidad; ambas toxinas pueden expresarse juntas o sólo una de estas y así ocasionar daño en las

células epiteliales [Tauschek et al., 2002]. También expresa más de 25 diferentes factores de colonización (CF) que intervienen en la adherencia de la bacteria a la pared celular intestinal [Blackburn et al., 2009].

Además ETEC contiene una fimbria denominada longus la cual constituye un factor de colonización intestinal conservado y está conformado por una subunidad de 22kDa (LngA) [Gutierrez-Cazarez et al., 2000].

3. c.1 Factores de Colonización (CFs)

Los CFs son adhesinas que se fijan a las células epiteliales del intestino. Los factores de colonización son llamados también antígenos de factores de colonización (CFAs), los cuales se clasifican en antígenos de superficie *coli* (CS) y factores de colonización putativos (PCF). Ambas son proteínas expuestas sobre la superficie y los primeros están constituidas por fimbrias o pili que facilitan la adhesión de ETEC a las células epiteliales del intestino y los PCF son adhesinas que permiten una unión más estrecha entre la bacteria y la célula hospedera los cuales no pueden ser identificados empleando el microscopio electrónico, estos CFs son también llamados “no fimbriales” [Ghosal et al., 2009; Rockabrand et al., 2006].

Hasta la fecha, más de 25 factores de colonización han sido identificados, de los cuales el CS6 es el más prevalente en muchos países [Ghosal et al., 2007],

también se ha demostrado que predominan CS1-CS5 y CFA/1 [Qadri et al., 2005].

Los genes para las subunidades estructurales y de transporte, y las proteínas de ensamble necesarias para la biogénesis de CFs, se codifican normalmente en operones. Algunas cepas poseen múltiples CFs pero en la mayoría de cepas de ETEC no se conocen CFs, ya sea porque son nuevos y no se han identificado o porque se han perdido en subcultivos de laboratorio [Valvatne et al., 2002].

El CS21 es un factor de colonización conservado denominado longus y es codificada por plásmidos de virulencia y comparte similitudes considerables con la secuencia N-terminal de las subunidades CofaA, TcpA, y BfpA de la pilina del CFaIII de ETEC [Gutierrez-Cazarez et al., 2000]. Tanto longus como CFaIII son sintetizados con un pili tipo IV en un proceso análogo a la vía de secreción tipo II (figura 2) [Peabody et al., 2003].

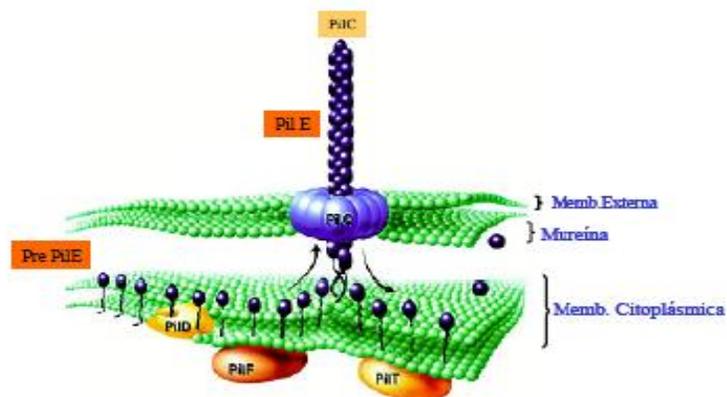


Figura 2. Biogénesis de un pilus tipo IV (Wolfgang et al., 2000).

En *E. coli*, tanto los serogrupos patógenos como los comensales, originan a 37°C una estructura adhesiva compuesta por una sub unidad proteica mayor de 21-KDa, producto del gen *yagZ* [Rendon et al., 2007]. Se demostró que este gen era ampliamente distribuido y altamente conservado en cepas de *E. coli* por lo que se le denominó “Pili Común de *E. coli*” (ECP), el gen que codifica para la subunidad del pili es *ecpA* [Blackburn et al., 2009].

El antígeno de factor de colonización I (CFA/I), fue el primer CF en ser definido y es el único que quedó con esta denominación. Para hacer más sencilla la clasificación de los CFs en humanos se estableció una nueva nomenclatura designándolos CS, que significa antígeno de superficie de *Escherichia coli*, y un número que corresponde al orden cronológico con que se van encontrando [Turner et al., 2006].

Las fimbrias CS5 y CS7 poseen dos arreglos fimbriales en una doble hélice. La fimbria CS3 en cambio tiene un diámetro pequeño con un filamento muy delgado. El peso molecular de la subunidad de la fimbria de ETEC humana, varía desde 15 a 27 KDa [Rudin et al., 1996].

La variedad de factores de colonización de ETEC explica por qué la inmunidad contra la enfermedad que provoca este patotipo depende de la adquisición de varias infecciones durante los primeros años de vida [Blackburn et al., 2009].

3. c.2 Enterotoxina Termolábil (LT)

Gyles y Barnum (1969) encontraron con que ciertas cepas de *E. coli*, aisladas a partir del cerdo producían una enterotoxina que se inactiva a 60°C por 30 minutos a la que le denominaron enterotoxina termolábil “LT” [Sack, 2011].

Las cepas de ETEC tienen plásmidos precisos para producir la enterotoxina LT, que es estructuralmente parecida a la toxina del cólera (TC) que expresa *Vibrio cholerae*, ya que los aminoácidos tiene aproximadamente 80% de similitud pero difieren en que los genes estructurales de la LT se encuentran en los plásmidos y los genes de la TC residen en los cromosomas [Sack, 2011].

Hay dos grupos de serotipos de LT: LT-I y LT-II. El primer grupo LT-I se expresa en cepas de *E. coli* que son patógenos para humanos mientras que LT-II se expresa en aislados animales en su mayoría [Kaper et al., 2004].

Una vez sintetizada la toxina LT se coloca entre la membrana interna y externa de las bacterias haciendo uso del sistema de secreción tipo II [Tauschek et al., 2002]. El contacto de la toxina LT con la célula eucariota conduce a la activación de la adenilato ciclasa, produciendo un efecto en cascada.

El AMPc se ve aumentado en las células de la mucosa del intestino delgado provocando la secreción de Cl^- e inhibiendo la absorción del cloruro de sodio (NaCl) y la pérdida de agua por las células epiteliales del intestino, teniendo como resultado una diarrea acuosa. En la figura 3 se ilustra la patogénesis de la toxina termolábil. [Ghanekar et al., 2003].

La toxina LT es una proteína de 84 KDa, compuesta de una subunidad A y una subunidad B. La subunidad A que comprende dos fragmentos "A1" y "A2" de 192 aminoácidos y 48 aminoácidos respectivamente, los cuales se encuentran enlazados por enlaces disulfuro. La subunidad B en cambio, está compuesta por cinco monómeros idénticos de 103 aminoácidos [Sack, 2011].

En este modelo de sistema de secreción tipo II que emplean las ETEC, las subunidades de las toxinas que secretan las bacterias alcanzan el espacio periplásmico o el medio extracelular, sitios en los cuales ocurre el ensamblaje de la toxina. De acuerdo a este modelo, la toxina LT sintetiza una subunidad A asociada con 5 subunidades B. Estas últimas son responsables de la interacción de las toxinas con receptores específicos localizados en la superficie de las células blanco [Dorsey et al., 2006].

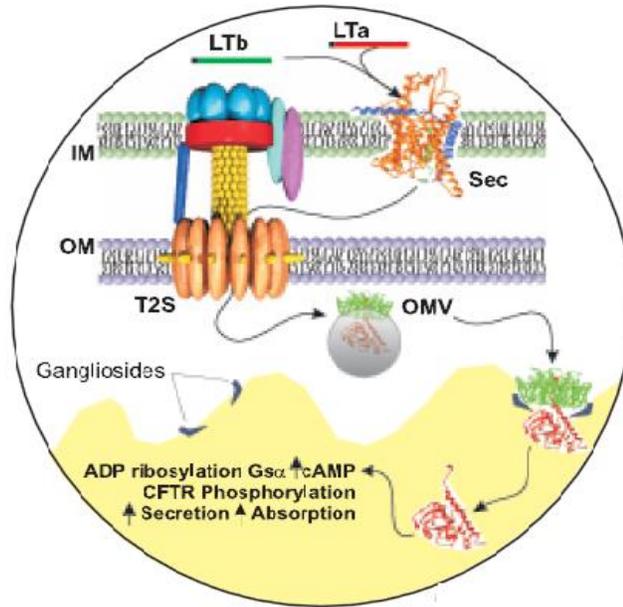


Figura 3. Mecanismo de patogénesis de la toxina termolábil LTa y LTb (Turner et al., 2006).

3. c.3 Toxina termoestable (ST)

ST contiene múltiples residuos de cisteína, responsables de la estabilidad que estas toxinas tienen al estar expuestas al calor y es poco inmunogénica. La toxina ST se divide en dos subtipos: STp y STh [Bolin et al., 2006]. STh fue descubierta en una cepa de ETEC de origen humano, mientras que STp se identificó a partir de una cepa que infecta cerdos, aunque existen STp que han sido aisladas a partir de cepas de origen bovino y humano. Ambas toxinas son sintetizadas como un péptido de 72 aminoácidos que se procesa durante la

exportación para producir toxinas maduras de 18 a 19 aminoácidos [Turner et al., 2006]. La secuencia de la señal sec se elimina durante la traslocación a través de la membrana interna, liberando el propéptido hacia el espacio periplásmico en donde el enlace disulfuro se isomeriza. DsbA, cataliza la formación de tres puentes disulfuro en el extremo C terminal antes de que sea exportado a través de la proteína transportadora de membrana externa TolC [Nair and Takeda, 1998].

La molécula blanco de STh en el intestino es una enzima transmembrana guanilato ciclasa C (GC-C) y tiene un peso molecular de 120 KDa. Pertenece a la familia de receptores ciclasas que incluyen GC-A y GC-B localizada sobre la membrana apical del epitelio intestinal [Ghanekar et al., 2003]. Al unirse se estimula la actividad de GC que aumenta los niveles internos de guanosina monofosfato cíclico (cGMP) estimulando la secreción de cloro y la inhibición de absorción de NaCl teniendo como resultado secreción acuosa intestinal [Kaper et al., 2004].

STp está asociada generalmente con cepas de origen porcino. A diferencia de STh no incrementa cAMP ni cGMP intracelularmente pero produce un incremento de iones de calcio; de igual modo estimula la liberación de bicarbonato, prostaglandina PG-E2 y de la serotonina [Kaper et al., 2004]. En la Figura 4, se muestra el mecanismo de patogénesis de la toxina termoestable ST.

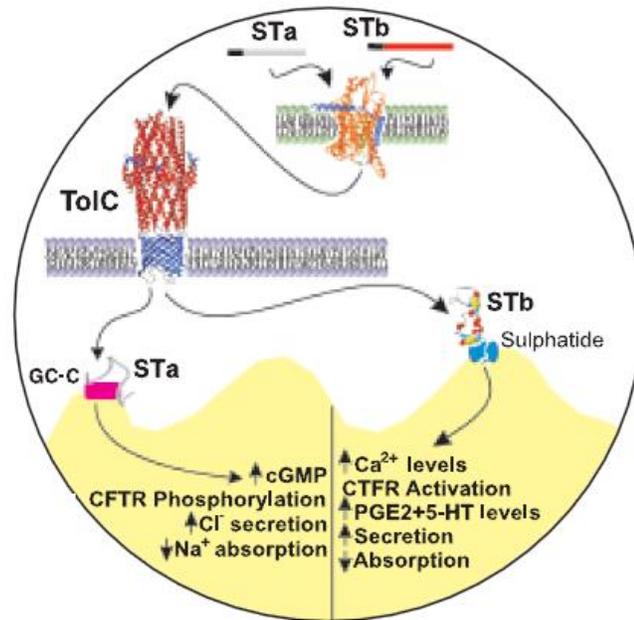


Figura 4. Mecanismo de patogénesis de la toxina STa y de la toxina STb (Turner et al., 2006)

3.d Epidemiología

Escherichia coli enterotoxigénica (ETEC) produce aproximadamente 840 millones de infecciones gastrointestinales [Wenneras and Erling, 2004], y al menos 380,000 muertes cada año en todo el mundo [Qadri et al., 2005].

El patrón epidemiológico de ETEC es determinado por varios factores: inmunidad de la mucosa que se desarrolla en individuos que han tenido contacto con el organismo, la presencia de portadores asintomáticos que pueden liberar una gran cantidad de bacterias en las heces y la dosis infectiva que es relativamente alta [Nataro and Kaper, 1998].

Para prevenir y controlar las infecciones por ETEC se requiere de condiciones adecuadas de saneamiento ambiental y un suministro de agua de consumo y alimentos seguros, pero esto resulta difícil de lograr a gran escala en países en vías de desarrollo, por lo que se busca una alternativa como la vacuna para encontrar una solución eficaz y eficiente ante la problemática de diarreas causadas por ETEC [Gupta et al., 2008].

El reservorio principal de ETEC son los animales de sangre caliente. La puerta de entrada de ETEC en un nuevo huésped es vía oral a través de alimentos, agua u objetos inanimados contaminados. La puerta de salida del agente ETEC son las heces fecales de humanos y de animales de sangre caliente [Khatib et al., 2002].

Los estudios epidemiológicos y los de reexposición en voluntarios demuestran que la infección por *E. coli* enterotoxigénica genera inmunidad específica para cada serotipo. Hacen falta muchas infecciones con diferentes serotipos para adquirir inmunidad de amplio espectro contra *E. coli* enterotoxigénica [Nataro and Kaper, 1998].

En la infección de los lactantes pudiera tener particular importancia la transmisión por alimentos contaminados usados para el destete. La falta de lavado de las manos y deficiencias en la higiene personal y el saneamiento

ambiental son factores que contribuyen a la propagación de la enfermedad [Lilius and Marnila, 2001].

Para que se produzca la enfermedad se requiere de una inoculación de 10^6 - 10^9 organismos. Por lo cual, solamente el agua y los alimentos pueden transmitir a ETEC y el contacto de persona a persona es muy improbable que constituya un medio de transmisión efectivo [Heymann, 2005].

Para cepas que poseen solo LT ó solo ST se han observado periodos de incubación cortos, de apenas 10 a 12 horas. En cambio el tiempo de incubación de las cepas LT combinadas con ST suele ser de 24-72 horas. El periodo de transmisibilidad se da mientras dure la excreción de ETEC, la cual puede ser prolongada [Heymann, 2005]

3.d.1 Infección de ETEC relacionada con la edad

ETEC suele ser una causa frecuente de diarrea en niños menores de 2 -3 años de edad [Heymann, 2005; Qadri et al., 2007] En una revisión de historiales de hospital en Bangladesh en niños de 0-5 años, el 90% de los casos de diarrea causada por ETEC fueron niños de edades comprendidas entre 3 meses a 2 años de edad [Qadri et al., 2000a].

En las áreas endémicas la disminución del riesgo de infectarse con ETEC según se incrementa la edad se debe al desarrollo de la inmunidad adquirida, mientras que los adultos en países desarrollados tienen un alto riesgo de adquirir esta infección [Isidean et al., 2011].

En pacientes hospitalizados, los adultos suelen presentar formas más graves de diarrea por ETEC que los niños y bebés. Los ancianos también son susceptibles a las infecciones por ETEC, tanto que requieren hospitalización [Faruque et al., 2004]. La razón por la que las infecciones de ETEC disminuyen después de la infancia y aumentan en la edad adulta puede ser debido tanto a factores ambientales como factores inmunológicos [Qadri et al., 2005].

3.d.2 Coinfección de ETEC con otros patógenos

La coinfección de ETEC con otros patógenos entéricos es frecuente. Las infecciones mixtas son comunes y pueden darse hasta en el 40% de casos [Qadri et al., 2000a; Rao et al., 2003] y esto podría influir en la determinación de los síntomas y dificultar la comprensión de la patogénesis real de la infección [Qadri et al., 2000c; Steinsland et al., 2003b].

La incidencia de infecciones mixtas parece aumentar con la edad según estudios realizados en Bangladesh donde se observa que existe menos coinfección en los bebés [Qadri et al., 2000c]. En los casos de infecciones mixtas en los niños, el rotavirus es la causa más común, seguido por otras bacterias

enteropatógenas, como ser: *V. cholerae*, *Campylobacter jejuni*, *Shigella spp.*, y *Salmonella spp.*[Geyer et al., 1993; Samuel et al., 1997].

3.d.3 Estacionalidad de ETEC

La infección por parte de ETEC es más frecuente durante el verano [Qadri et al., 2000a], pero siempre está presente en la temporada de invierno en países vulnerables a los fenómenos naturales debido a que las lluvias ocasionan inundaciones, contaminando las aguas superficiales con material fecal y diseminando de esta forma la infección [Rowland, 1986].

Aunque ETEC es más común en época seca, existen estudios donde la toxina termolábil no presenta ninguna estacionalidad [Qadri et al., 2005]. En una investigación realizada en Egipto, las cepas productoras de la toxina ST son más frecuentes en verano, mientras que las cepas productoras de la toxina LT no mostraron estacionalidad ya que estuvieron presentes todo el año [Rao et al., 2003].

3.d.4 ETEC en el medio ambiente

La diarrea por ETEC es el resultado de la ingestión de alimentos y agua contaminada, en lugares donde el agua potable es de poco acceso y el saneamiento es inadecuado [Qadri et al., 2005].

La obtención de agua potable en países en vías de desarrollo es limitada, las aguas superficiales en estos países son utilizadas directamente para bañarse, lavar ropa y la preparación de alimentos entre otras actividades [Begum et al., 2005].

En el 2006, un total de 2,500 millones de personas en el mundo entero carecían de acceso a instalaciones adecuadas de saneamiento y aproximadamente una de cuatro personas en los países en desarrollo defecaban al aire libre [UNICEF-OMS, 2009].

Las fuentes de agua en Bangladesh, en las zonas rurales y áreas urbanas, son altamente contaminadas con ETEC. En un estudio realizado en ese país, se obtuvieron cepas de ETEC de muestras clínicas y de los estanques, ríos y lagos de los alrededores de un establecimiento de salud. Se encontró que el 32% de muestras de agua que fueron tomadas presentaban contaminación con ETEC, se compararon estas cepas con los aislamientos clínicos, dando resultados similares en cuanto a factores de colonización y toxinas [Begum et al., 2005].

En el 2005 y 2006 se realizó un estudio sobre *Escherichia coli* como indicador fecal en 8 playas costeras de Lima en Perú, donde tres playas fueron calificadas como inaceptables para el baño. En el 2009, en la ciudad de Cajamarca, Perú, se encontró que los cultivos de hortalizas eran irrigados con aguas con alto recuento microbiano. El agua empleada era proveniente de los ríos que se

habían convertido en vertederos de aguas residuales, y la presencia de *E. coli* se detectó en el 24% del total de las muestras por lo que las aguas superficiales podrían ser una fuente importante para la supervivencia y la proliferación de ETEC [Rivera-Jacinto et al., 2009].

3.d.5 Infecciones en los viajeros internacionales

Los datos indican que 20 a 40% de los casos de diarrea del viajero son causadas por ETEC [Jiang et al., 2002; Shaheen et al., 2003]. ETEC es la causa más frecuente de diarrea en viajeros de Norteamérica y Europa que visitan países en vías de desarrollo [Shaheen et al., 2003].

Los viajeros se ven más afectados por ETEC en la época de verano. Los fenotipos de ETEC varían de país a país, por ejemplo: la toxina LT fue más frecuentemente aislada en los visitantes a Jamaica, la combinación de las dos toxinas LT / ST se observa con frecuencia en visitantes a la India, y la toxina ST se detectó en visitantes a Kenia [Shaheen et al., 2003].

Se publicó en el 2008 un estudio sobre la viabilidad de una vacuna a base de toxinas LT que se administró a los viajeros mediante parches. La investigación se realizó en viajeros de Guatemala y México con una edad comprendida entre los 18 y 64 años. Estas vacunas mostraron una eficacia protectora de un 75 por ciento para los casos de diarrea de moderada a grave [Frech et al., 2008].

3.e Manifestaciones Clínicas

La severidad de una infección por ETEC es variada, puede ir desde una infección asintomática en personas que viven en zonas endémicas a una deshidratación causada por una diarrea acuosa profusa [Steinsland et al., 2003a].

La diarrea se caracteriza por ser acuosa, sin sangre, puede estar acompañada de dolor abdominal, náuseas, vómitos y puede presentar fiebre o no. La enfermedad usualmente se auto limita después de 3 a 5 días, pero puede durar más de una semana [Heymann, 2005]. En la siguiente gráfica (Figura 5) se observa la sintomatología que presentaban niños con diarrea por *Escherichia coli* enterotoxigénica en León Nicaragua [Vilchez et al., 2009].

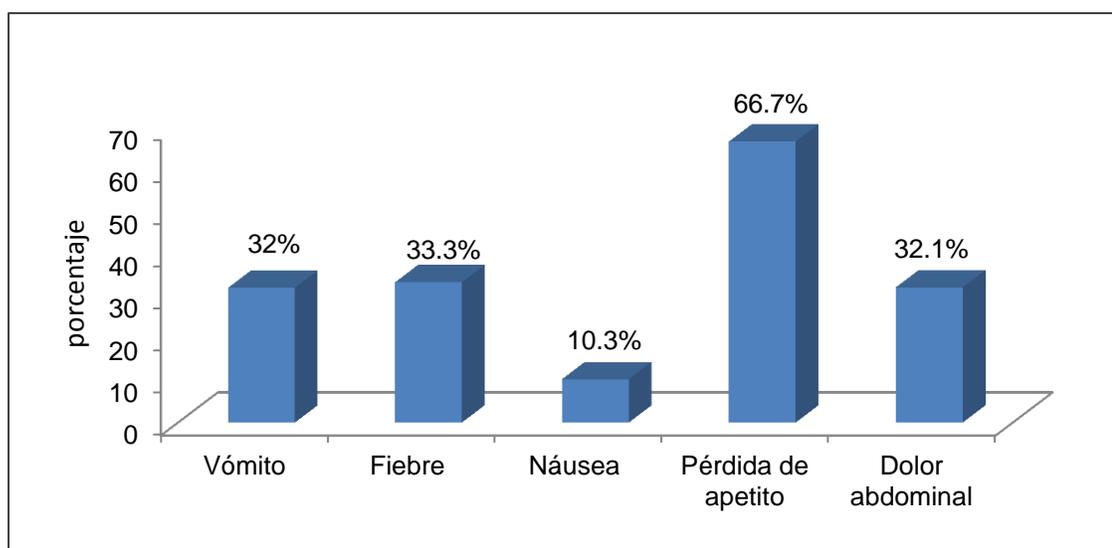


Figura 5. Manifestaciones clínicas en niños con diarrea por ETEC detectados en dos centros de salud y el Hospital principal de León Nicaragua, en un período de seis meses.

Con un tratamiento adecuado los pacientes sobreviven sin ninguna secuela y la mortalidad es muy baja. ETEC produce una respuesta inmunológica protectora por lo que hay más incidencia en niños y menos en adultos [Qadri et al., 2000c].

La pérdida progresiva de líquidos da lugar a boca seca, pulso rápido, letargo, disminución de la turgencia de la piel, disminución de la presión arterial, calambres musculares y finalmente puede terminar en un shock. El grado de deshidratación se clasifica desde leve hasta grave y esta distinción clínica es importante en la asistencia para una terapia adecuada [Qadri et al., 2005].

Se define como un caso leve cuando, el episodio de diarrea no dura más de tres días, no hay fiebre ni vómito, y con buena tolerancia de la terapia de rehidratación oral. Es un caso moderado cuando la duración es mayor a tres días con fiebre o vómitos y con tolerancia de la rehidratación oral. El caso se define como severo cuando hay, episodio de diarrea con vómito y fiebre, lo que requiere rehidratación intravenosa y hospitalización [Nicoll, 2000].

3.f Diagnóstico

Una de las principales razones de que *E. coli* sea un microorganismo tan utilizado universalmente en los laboratorios de investigación es el hecho de que crece con facilidad en los medios sencillos y también se identifica con pocas pruebas bioquímicas. Sin embargo estos métodos rutinarios de diagnóstico no

permiten diferenciar e identificar los serogrupos [Bell and Kyriades, 2000]. La diferenciación de ETEC de otras *E. coli* se logra mediante la identificación de los factores específicos de virulencia.

Existen métodos fisiológicos que pueden ser utilizados para la detección de toxinas LT, ST y CF, y que fueron considerados inicialmente como métodos de referencia (Gold Standard) para la identificación de ETEC. Entre ellos tenemos; el modelo del asa ileal de conejo para LT y el modelo de ratón lactante para ST [Rodríguez, 2002]. Estas pruebas requieren de mucho tiempo y personal calificado para su realización.

Con el avance en el desarrollo de métodos de diagnóstico se introdujeron pruebas como los inmunoensayos enzimáticos (ELISA). ELISA es un método que requiere el cultivo de las bacterias para ver las características fenotípicas de *E. coli* antes de la detección de enterotoxinas. La técnica ha sido ampliamente utilizada para la detección de LT utilizando métodos de microtitulación con gangliósido GM1. Esta técnica ha evolucionado hacia la ELISA de inhibición para la detección de ST [Rodríguez, 2002].

El Dot Blot es una técnica empleada para detectar factores de colonización utilizando una membrana de soporte de nitrocelulosa o nylon donde se coloca la muestra a analizar sometiéndose a una reacción colorimétrica permitiendo una estimación cualitativa y cuantitativa del antígeno [Qadri et al., 2000b] .

En los últimos años se han desarrollado técnicas moleculares mucho más sensibles y específicas y en muchos casos también son preferibles debido a la reducción del tiempo en la obtención de resultados, estas técnicas detectan los genes a diferencia de las primeras pruebas descritas que detectan los factores de colonización y toxinas ya expresados [Rodas et al., 2009].

La PCR es una técnica molecular muy versátil, que consiste en una reacción que ocurre en un único tubo tras mezclar en él los componentes necesarios e incubarlos en un termociclador, aparato que permite variar la temperatura de incubación a lo largo del tiempo en forma programada. En el año 1993, fue utilizado por primera vez la PCR para el diagnóstico de ETEC [Schultsz et al., 1994]. Esta técnica ha resultado útil para el diagnóstico directamente en la materia fecal como también de colonias aisladas de la bacteria [Qadri et al., 2005].

Una variación de las técnicas moleculares es la PCR múltiplex que se ha utilizado para el diagnóstico tanto de LT y ST como para la identificación de los factores de colonización. Esta técnica consiste en amplificar simultáneamente en un único tubo distintas secuencias específicas [Rodas et al., 2009].

3.g Tratamiento y prevención

Para reducir la mortalidad causada por diarreas infantiles se debe reemplazar tanto la pérdida de fluidos como de electrolitos, mediante las sales de rehidratación oral. Es importante un tratamiento adecuado y oportuno como pronta alimentación para disminuir la mortalidad causada por las diarreas [Riverón, 1999].

ETEC responden adecuadamente a trimetoprim-sulfametoxazole (TMP-SMX), azitromicina y rifaximina especialmente en diarrea del viajero, este último se encuentra disponible en Honduras bajo el nombre de isfaxin o farinil. Estos antibióticos han sido ampliamente utilizados y muestran ser altamente eficaces pero su empleo suele estar acompañado por el desarrollo de resistencia a dichos medicamentos. Se han empleado además como alternativas las fluoroquinolonas, ciprofloxacina, levofloxacina, ofloxacina en casos en que la respuesta a los tratamientos iniciales no ha sido adecuada. [Ericsson, 2003].

La alimentación con leche materna ha mostrado que puede reducir la morbilidad por gastroenteritis y reducir la incidencia de diarrea infantil producida por diferentes agentes infecciosos gastrointestinales [Lilius and Marnila, 2001].

La realización de mejoras en saneamiento básico en países en vías de desarrollo es sumamente costoso, los intentos de detener la transmisión a través

de la infraestructura como: letrinas, pozos, agua potable es efectiva pero no resuelve el problema de forma rápida [Qadri et al., 2005]. Debido a lo anterior hay un gran interés en el desarrollo de una vacuna que prevenga la enfermedad causada por ETEC [Gupta et al., 2008].

Una vacuna sería viable ya que la evidencia epidemiológica y los resultados de estudios experimentales en voluntarios humanos, han dado a conocer que existe inmunidad específica contra cepas homólogas en la siguiente infección de ETEC [Cravioto et al., 1990].

Estudios experimentales con animales y pruebas indirectas de ensayos clínicos apuntan a que la inmunidad protectora contra ETEC es mediada por la inmunoglobulina A secretando anticuerpos dirigidos contra los FC [Svennerholm and Holmgren, 1995].

La gran diversidad de serotipos basados en los antígenos H y O de ETEC hace que estos antígenos sean poco atractivos para la elaboración de una vacuna. CFA/I y CS1-CS6 son las fimbrias más comunes de ETEC en humanos y al ser buenos inmunógenos son candidatos claves para la obtención de una vacuna. Pero también se tiene que considerar a los CFs que sean de importancia en el área geográfica determinada [Qadri et al., 2005], por lo que es importante efectuar estudios que permitan brindar información sobre las características de los aislamientos de ETEC locales.

La corporación IOMAI, una empresa estadounidense que desarrolla vacunas, investigó la posibilidad de una vacuna a base de toxinas LT mediante parches. Esta vacuna que contiene la toxina LT produce una intensa actividad inmunitaria debido a la presencia de células de Langerhans que se encuentran en la epidermis, estas toman el antígeno de la vacuna y migran hacia los ganglios linfáticos induciendo la formación de anticuerpos contra la enfermedad diarreica producida por ETEC. Los investigadores estudiaron a adultos sanos, de edades comprendidas entre los 18 y los 64 años, que tenían previsto viajar a México y Guatemala y que tenían acceso a un centro de vacunación regional en EEUU. Las vacunas tuvieron una eficacia protectora de un 75 por ciento para los casos de diarrea moderada a grave. Los pacientes a los que se administraron parches de LT y que pese a ello enfermaron, sufrieron períodos más cortos de diarrea (0,5 días frente a 2,1 días) y con menos deposiciones (3,7 frente a 10,5) que quienes sólo tomaron el placebo [Frech et al., 2008].

Estos antecedentes hacen notar la necesidad de conocer las características de las cepas circulantes en nuestra región y poder analizar la posible aplicación de una vacuna contra ETEC en un futuro.

4. *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC)

Es la categoría más antigua de *E. coli* reconocida como causante de diarrea. Estudios realizados entre los años 1940 y 1950, descubrieron algunos serotipos O, que tenían relación con brotes de diarrea en salas de recién nacidos y lactantes en comunidades [Nataro and Kaper, 1998].

EPEC es una de las principales causas de diarrea infantil en los países en desarrollo. Desde fines del decenio de 1960, *E. coli* enteropatógena ha desaparecido prácticamente como causa importante de diarrea en los lactantes en Estados Unidos, Canadá y Europa. Sin embargo, sigue siendo un agente notable de diarrea infantil en muchas zonas en desarrollo, entre ellas América Latina, África meridional y Asia [Heymann, 2005].

Históricamente las cepas EPEC se definieron por la ausencia de mecanismos de patogenicidad, en especial, su incapacidad para producir enterotoxinas o para demostrar la invasividad de *Shigella*. En los últimos años, sin embargo, los mecanismos de virulencia de EPEC se han comprendido mejor, por los enfoques de biología molecular y celular [Clarke et al., 2003].

La virulencia de EPEC depende principalmente, de la inducción de una característica en la que las bacterias hacen contacto íntimo con la membrana del

enterocito, causando la destrucción localizada de las microvellosidades. Esta lesión, da como resultado una reducción en la capacidad de absorción de la mucosa intestinal, lo que lleva a un desequilibrio de los electrolitos y seguidamente causa la diarrea [Clarke et al., 2003] .

4.a Serotipos de EPEC

Las cepas enteropatógenas de *E. coli* pueden reconocerse tentativamente mediante aglutinación con antisueros, que detectan los serogrupos O. Aunque para confirmar el diagnóstico se necesita la tipificación de O y H [Heymann, 2005].

La Organización Mundial de la Salud en 1987 acordó que serían identificados como EPEC los serogrupos: O26, O55, O86, O111, O114, O119, O125, O126, O127, O128, O142 y O158 [WHO, 1987]. Estos serogrupos incluían tanto cepas típicas y atípicas, así como otras categorías diarreogénicas de *E. coli* principalmente enteroagregativa [Bando et al., 2007; Campos et al., 2004].

Las cepas típicas y atípicas de EPEC pertenecen a distintos grupos de serotipos. En un estudio realizado en Brasil, Reino Unido e Italia, resultó que la mayoría de las cepas típicas fueron aisladas en Brasil y cepas atípicas fueron más frecuentes en el Reino Unido e Italia. En el siguiente cuadro se muestran los serotipos comunes de cepas típicas y atípicas [Trabulsi et al., 2002].

Cuadro 1. Diferentes serotipos O:H de cepas típicas y atípicas de EPEC.

Cepas	Serotipos
Típicas	O55:H6, O86:H34, O111:H2, O114:H2, O119:H6, O142:H6, O142:H34
Atípicas	O26:H11, O55:H7, O55:H34, O86:H8, O111ac:H8, O111:H9, O111:H25, O119:H2, O125ac:H6, O128:H2

Las cepas de EPEC se clasifican en típicas, si poseen el plásmido EAF (Factor de Adherencia de EPEC) y cepas atípicas si carecen de este plásmido [Trabulsi et al., 2002].

4.b Patogénesis molecular

EPEC se caracteriza por su capacidad de causar la lesión llamada “adherencia y eliminación” (A/E) que promueve la degeneración de las microvellosidades del enterocito y provocan reordenamientos del citoesqueleto por debajo de las bacterias adheridas [Wong et al., 2011]. El modelo de patogénesis de EPEC se divide en tres etapas; adherencia inicial, transducción de señal y anclaje íntimo. Las diferentes fases pueden ocurrir simultáneamente [Nataro and Kaper, 1998].

Los determinantes genéticos para la característica de A/E de EPEC, se encuentran en una isla de patogenicidad llamada “LEE”. Esta isla contiene genes reguladores que codifican para la adhesina intimina, un sistema de secreción tipo III “SSTT”, y la secreción de varias proteínas incluyendo el receptor de la intimina “Tir” [Wong et al., 2011].

4.b.1 Adherencia inicial

En este proceso intervienen moléculas denominadas “Pili formador de penachos” (BFP) que son fimbrias de 7nm de diámetro y 14 a 20 µm de largo. Estos ayudan a las bacterias a adherirse entre ellas mismas, formando microcolonias que terminan adhiriéndose a las células huésped. La biogénesis de los BFP requiere 14 genes codificados en un plásmido nombrado Factor de Adherencia de EPEC (EAF) [Cleary et al., 2004].

El plásmido EAF no es esencial para la característica A/E, sin embargo su presencia incrementa la formación de esta lesión. Las cepas de EPEC se dividen en clase I o típicas si poseen el plásmido EAF y en clase II o atípicas si carecen de este plásmido. Cepas típicas y atípicas son encontradas en dos conjuntos diferentes de serotipos. Las cepas EPEC atípicas pueden ser menos virulentas que las típicas [Trabulsi et al., 2002].

La adherencia localizada (LA) es una característica de EPEC producida in vitro como en células del intestino delgado. EPEC produce más rápido LA, en las

células in vitro que in vivo. Las microcolonias se adhieren a los enterocitos ayudadas por los flagelos de EPEC, los cuales promueven el contacto inicial con las células epiteliales [Clarke et al., 2003]

Los primeros eventos en la adhesión de EPEC, son poco conocidos, pero posiblemente implica la unión de la intimina a un receptor de la célula huésped denominada, nucleolina (NCL). En la figura 6, se observa la unión del filamento EspA con las proteínas EspD y EspB. Aparte se hallan otros factores que concretan esta adherencia, como ser: la adhesina intimina y los filamentos cortos EspA [Nougayrede et al., 2003].

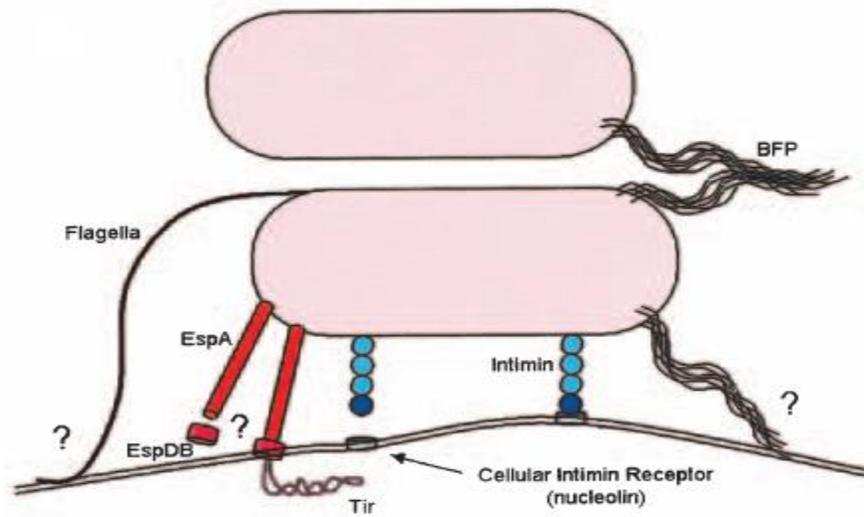


Figura 6. Adhesión inicial de EPEC a la célula huésped (Nougayrede et al., 2003).

4.b.2 Transducción de señales

Las bacterias que logran adherirse a los enterocitos, segregan proteínas codificadas en la isla de patogenicidad llamada “LEE”, que significa locus de eliminación del enterocito, debido a que se encarga de eliminar a las células epiteliales del intestino delgado. Estas proteínas son secretadas por medio del sistema de secreción tipo III (SSTT) [Jarvis et al., 1995].

Esta isla de patogenicidad, constituida por cinco operones conocidos como LEE1 a LEE5, contienen los genes involucrados en la lesión A/E como *ser*; *eae*, *esp* y *esc*. El grupo de genes *esc* que pertenecen a LEE1, LEE2 y LEE3, son responsables de la secreción de proteínas de EPEC por medio de SSTT. Los genes *esp*, antes conocidos como *sep*, son los responsables de la secreción de proteínas necesarias para la transducción de señales y pertenecen a LEE4. El LEE5 contiene los genes *eae* que codifican a la adhesina intimina [Clarke et al., 2003]

El SSTT forma un complejo aguja (CA) Figura 7, formado por las proteínas EscR, EscS, EscT, EscU y EscV, que establecen una plataforma en la membrana interna. En el espacio periplásmico se dispone la proteína EscJ. Las proteínas EscC y EscF forman un cilindro que atraviesa la membrana externa. La proteína traslocadora EspA, crea un conducto tubular que exporta las

proteínas EspB y EspD hacia la membrana externa del enterocito [Nougayrede et al., 2003].

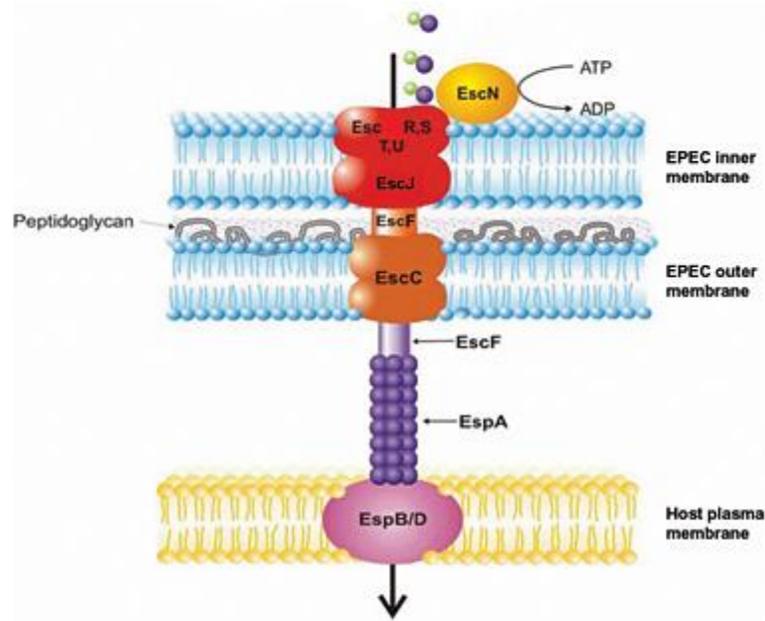


Figura 7. Estructura complejo aguja, SSTT (Celli et al., 2000).

LEE codifica por proteínas efectoras: EspF, EspG, EspH, EspZ, Map y Tir. Existen también proteínas efectoras no codificadas por LEE: Cif, EspG2, NleC, y NleD [Wong et al., 2011].

Tir es una proteína que es trasladada por el SSTT al citosol del enterocito. En el momento que Tir se encuentra en el citosol, un fragmento de este se incrusta dentro de la membrana plasmática de la célula, exponiendo un segmento en el

espacio extracelular, denominado TIBA, donde se unirá a la intimina [Nougayrede et al., 2003].

4.b.3 Anclaje íntimo

La intimina es una proteína de membrana externa codificada por el gen *eae* dentro de la isla de patogenicidad LEE, que se requiere para una adhesión íntima a las células epiteliales. El primer gen de virulencia que fue confirmado en cepas de EPEC fue *eae*. Se ha demostrado que la intimina estimula la inflamación e hiperplasia del intestino, favoreciendo la colonización de estas células en el intestino delgado [Clarke et al., 2003; Nataro and Kaper, 1998]

La fosforilación de la proteína traslocadora de la intimina (Tir) de 90 kDa, tiene como función ser receptor en la membrana de las células epiteliales. Un aumento en los flujos intracelulares de calcio, inducido por el inositol trifosfato (ITP), consecuentemente contribuyen con cambios importantes del citoesqueleto del enterocito debido a la polimerización de la actina [Cleary et al., 2004].

Tir es fosforilada en un residuo de tirosina por una quinasa de la familia c-Src [Kenny et al., 1997]. Este evento es esencial para la remodelación de la actina, pero no es necesario para la unión de la intimina [Shaw et al., 2001]. La fosforilación de Tir estimula la unión directa a una proteína adaptadora Nck [Campellone et al., 2002].

Nck se une a una proteína WASP-N (proteína del síndrome de Wiskott-Aldrich), Además recluta y activa las proteínas relacionadas con la actina 2 y 3, el complejo “Arp2/3”. El complejo Arp2/3 estimula en las células eucariotas la formación de filamentos de actina, estos se adhieren a las bacterias estableciendo finalmente una estructura en forma de pedestal (Figura 8). En la formación de pedestales también intervienen otras proteínas como; α actina, talina, vinculina y cortactina [Nougayrede et al., 2003].

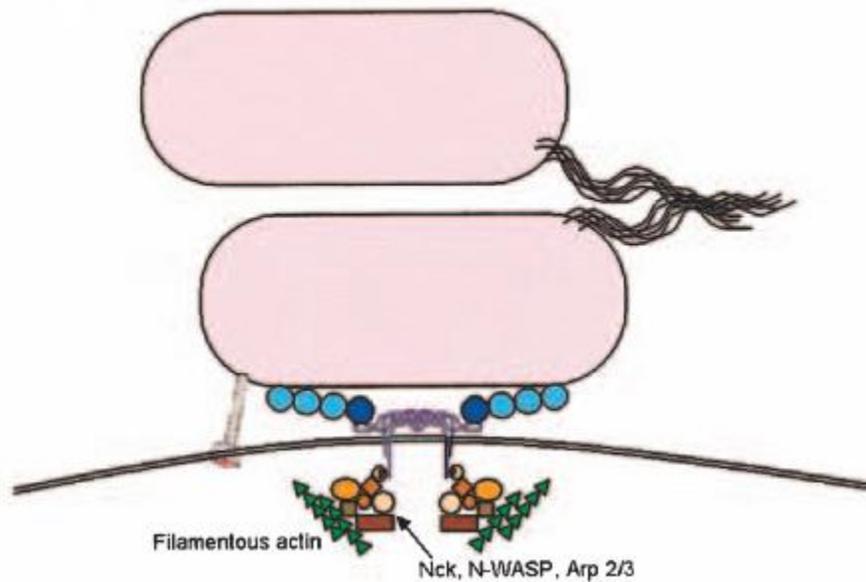


Figura 8. Fase final de la adhesión de EPEC a células huésped (Nougayrede et al., 2003).

4.c Epidemiología

La transmisión de EPEC es fecal-oral, por el consumo de leche maternizada y alimentos para el destete que han sido contaminados. En la sala de recién nacidos de los hospitales puede haber transmisión por fómites y manos contaminadas, si no se siguen prácticas de higiene necesarias como el frecuente lavado de manos [Heymann, 2005; Romero, 2002].

El periodo de incubación de las infecciones por EPEC es de 9-12 horas, el tiempo de transmisibilidad ocurre mientras persista la excreción de *E. coli* enteropatógena, que puede ser prolongada, pero usualmente suele ser autolimitada [Heymann, 2005]. La población susceptible a la infección clínica se limita a los lactantes menores de dos años, no se sabe si ello se debe a inmunidad o a factores específicos del huésped relacionado con la edad. EPEC es poco común en los lactantes alimentados directamente del pecho [Romero, 2002].

Escherichia coli enteropatógena es una causa importante de infecciones intrahospitalarias y casos ambulatorios. Se ha demostrado en estudios longitudinales, que los brotes causados por EPEC ocurren tanto en entornos urbanos como rurales [Nataro and Kaper, 1998].

4.c.1 Infección de EPEC relacionada con la edad

Las infecciones por EPEC suelen limitarse a niños menores de un año de edad. Sin embargo existen informes en niños menores de dos años años [Heymann, 2005].

La correlación más alta entre diarreas e infecciones por EPEC es entre los niños menores de 6 meses [Nataro and Kaper, 1998]. Sin embargo se han reportado brotes de diarrea causada por EPEC en adultos debido a la ingestión de un gran inóculo de una fuente en común [Yatsuyanagi et al., 2003]. También en adultos mayores, se han registrado casos esporádicos de diarrea causada por *E. coli* enteropatógena sobre todo en aquellos que padecen de alguna enfermedad. La diarrea en infantes puede ser prolongada y grave, dando como resultado altas tasas de morbilidad y mortalidad en países en desarrollo [Black et al., 2003].

4.c.2 Estacionalidad de EPEC

En países en vía de desarrollo EPEC es el principal patógeno productor de diarrea en el verano, en población infantil [Romero, 2002]. En un estudio realizado en Uruguay, EPEC presentó una distribución estable durante el año 2001. Otro estudio realizado en Chile en noviembre de 1982 a marzo de 1983 fue más frecuente el aislamiento de EPEC en la época de verano.

En una publicación realizada en Perú, en el Hospital Nacional Edgardo Rebagliati Martins (HNERM), se reportaron brotes de diarrea nosocomiales ocurridos entre los años 1978-1990. Los brotes proliferaron en verano, causados por diferentes patógenos, pero EPEC prevaleció en la mayoría de los brotes [Loayza, 1990].

4.d Manifestaciones clínicas EPEC

La diarrea causada por EPEC suele ser acuosa con moco, fiebre de bajo grado y deshidratación. Habitualmente es una infección auto limitada pero puede llegar a ser muy grave; en brotes que ocurrieron en los Estados Unidos y el Reino Unido a mediados del siglo XX, se registraron tasas de mortalidad de 25 a 50% [Heymann, 2005].

En un estudio realizado en Uruguay, los niños infectados por EPEC acudieron más tarde a la consulta que los infectados por rotavirus. Se concluyó que la mayoría de los casos asociados con rotavirus presentaron vómitos desde el comienzo de la enfermedad y no así los infectados por EPEC [Varela, 2007]. En la figura 9 se ilustra los síntomas que manifestaron niños con diarrea causada por EPEC en León Nicaragua [Vilchez et al., 2009].

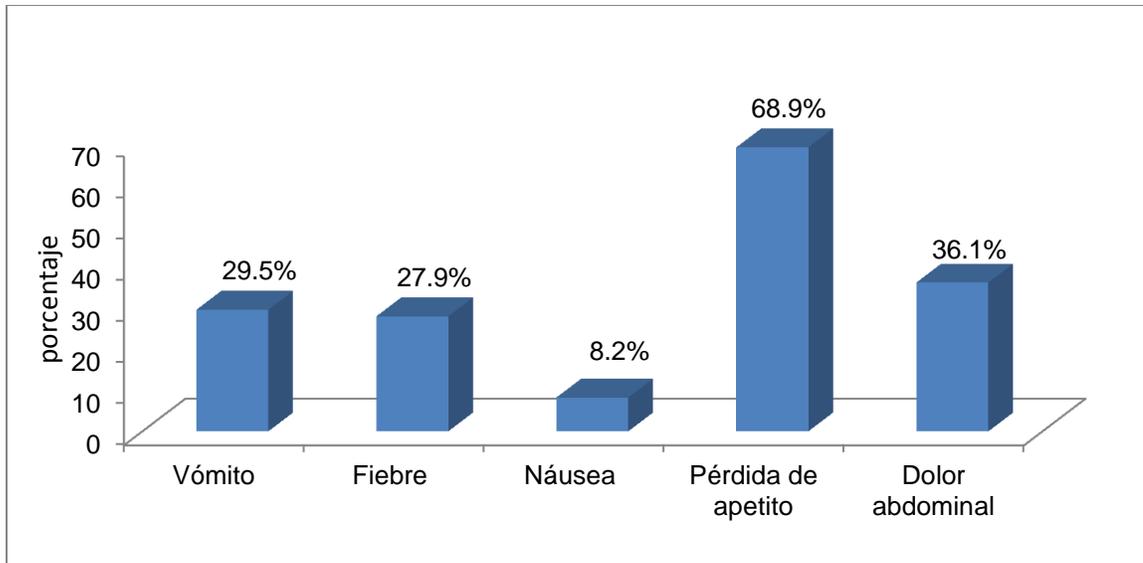


Figura 9. Manifestaciones clínicas en niños con diarrea por EPEC detectados en dos centros de salud y el hospital principal de León Nicaragua, en un período de seis meses.

La pérdida de líquidos también puede dar como resultados boca, lengua y piel secas, decaimiento del ánimo, pérdida repentina de peso, poca orina y muy oscura. Determinar el grado de deshidratación (leve, moderada, grave) es clave para una atención adecuada [Romero, 2002].

4.e Diagnóstico

E. coli se identifica a través de su cultivo en medios selectivos como el MacConkey, pero para diferenciar *E. coli* patogénica de cepas comensales se necesitan métodos más complejos, los cuales pueden ser fenotípicos o moleculares [Rodríguez, 2002].

Los grupos patogénicos de *E. coli* se clasifican según sus propiedades virulentas. Para el diagnóstico de EPEC se emplean las siguientes técnicas:

serotipificación, ensayo de adherencia con células HEp-2, prueba de FAS (tinción fluorescente para actina) y técnicas de biología molecular que amplifican genes que codifican las proteínas de virulencia [Vidal et al., 2007].

La serotipificación, utiliza propiedades antigénicas que ayudan a catalogar a *E. coli*, en determinado grupo patogénico. Esta técnica de diagnóstico es todavía un instrumento utilizado en investigaciones. Al inicio la detección de EPEC se hacía solo mediante antígenos “O”, los cuales ahora son incluidos en más de un serogrupo por lo que se deben identificar también los antígenos “H” [Campos et al., 2004].

El ensayo de adherencia en células epiteliales HEp-2 es un método que permite identificar EPEC debido a una propiedad denominada “adherencia localizada” (LA), que consiste en la agrupación de las bacterias formando microcolonias sobre las células epiteliales en cultivo [Vidal et al., 2007].

Aparte de la detección de EPEC también se puede identificar *E. coli* enteroagregativa (EAEC) y *E. coli* adherente difusa (DAEC). Ambas tienen diferentes formas de agruparse en las células epiteliales HEp-2. En el caso de EAEC se agrupan en forma de ladrillos apilados, adhiriéndose a las células y al cristal. En el caso de DAEC las bacterias se adhieren a las células de forma aleatoria [Rodríguez, 2002]

La prueba FAS es una técnica en la que se observa la acumulación de la actina del citoesqueleto en forma de puntos fluorescentes en la célula, en los que se encuentran los pedestales y las bacterias adheridas. Puede realizarse de biopsias intestinales de niños con enfermedad diarreica e in vitro [Varela, 2007].

El ensayo FAS utiliza un microscopio de fluorescencia con el cual se puede observar la acumulación de actina en las bacterias adheridas a las células HEp2. Esta técnica precisa de faloidina rodaminada que es un compuesto fluorescente que se une a la actina intracelular [Vidal et al., 2007].

Aunque el ensayo de adherencia y la prueba FAS son eficientes para detectar EPEC, las pruebas moleculares son más específicas, determinando la capacidad patogénica de la cepa aislada; detectando los factores de virulencia [Clarke et al., 2003].

Dentro de los estudios moleculares, se encuentran las sondas de ácidos nucleicos, que detectan el ADN de EPEC de muestras de heces, a partir de la secuencia genética del plásmido de virulencia EAF (*eaf*), del pili BFP (*bfp*) o del gen de la intimina (*eae*) [Vidal et al., 2007].

La posesión de las secuencias de *eae* se correlaciona con la tenencia de la isla de patogenicidad [Nataro and Kaper, 1998]. Se ha reportado que el fenotipo A/E identificado por FAS, concuerda con la detección del gen *eae* en un 98%. En

ocasiones la prueba FAS proporciona falsos positivos, por lo que, la detección del gen *eae* es altamente sensible y específica [Lopez-Saucedo et al., 2003].

Existe correlación entre las características fenotípicas de adherencia localizada en células HEP-2, con la presencia del gen *bfpA*, y la positividad de la sonda EAF. Aunque no siempre este evento se repite, en ocasiones las cepas de EPEC presentan el patrón de LA pero no se detecta la sonda EAF. Aquellas cepas en las que no se detecte el gen *eaf* pero sí el gen *eae* son reportadas como EPEC atípica [Nataro and Kaper, 1998].

4. f Tratamiento y prevención

La reposición de líquidos y electrolitos por vía oral o intravenosa es la medida más importante para una hidratación efectiva por lo que se debe aumentar la ingesta de líquidos sobre todo el suero oral. La dosis de ingesta debe de ser de 75ml en niños menores de un año de edad y 150 ml en mayores de un año de edad, después de cada evacuación, pausadamente y a cucharaditas para evitar que el niño vomite [WHO, 2008].

Si la diarrea en los lactantes es grave, se debe administrar trimetoprim-sulfametazol (TMP-SMX) por vía oral (de 10 mg por kg de peso al día) la cual reducirá la intensidad y duración del cuadro diarreico; debe administrarse cada doce horas, durante cinco días [Heymann, 2005]. Sin embargo la aparición de resistencia a nivel mundial de TMP-SMX limita su valor [DuPont et al., 2009].

Se debe mantener siempre la alimentación y en especial la lactancia materna cuando el niño es menor de seis meses, debido a que la leche materna protege contra la diarrea por EPEC. Se ha demostrado que tanto el calostro como la leche materna inhiben la adherencia de EPEC a células HEp-2 in vitro [Palmeira et al., 2005].

Para prevenir la infección por EPEC se debe promover la lactancia materna, hasta los seis meses de edad. Es recomendable sustituir el biberón por la taza o vaso lo más pronto posible. Si la leche materna es ordeñada se debe colocar en un recipiente estéril y se recomienda que este a temperatura ambiente solo por lapsos breves [Romero, 2002].

En las maternidades se debe mantener juntos a la madre y al hijo; y solo si existe una contraindicación médica clara, se podrá separarlos. Si la madre o el hijo tienen alguna infección de las vías digestivas, deben permanecer juntos y aislarlos de los demás pacientes sanos. En espacios de atención especial, se debe distanciar a los lactantes contaminados de los prematuros. Se tiene que contar con el equipo individual de cada lactante, incluido un termómetro, que se guardará en la propia cuna. No deben emplearse cunas para colocar o transportar a más de un niño a la vez [Heymann, 2005].

EPEC ocasiona brotes de diarrea en hospitales como en comunidades. En países en vías de desarrollo son esenciales las mejoras en saneamiento básico

y mantener normas estrictas de bioseguridad en los hospitales [WHO, 2008]. Lavarse las manos después de atender a cada lactante y cumplir normas de higiene en los locales que albergan a los pequeños ayudaría a prevenir brotes causados por esta bacteria [Cantillo, 2005].

CAPÍTULO 3: METODOLOGÍA

1. Objetivo general

- Caracterizar fenotípica y molecularmente los aislamientos clínicos de *Escherichia coli* enterotoxigénica y enteropatogénica provenientes de muestras fecales de niños menores de 3 años.

2. Objetivos específicos

- Identificar la presencia de ETEC en los aislamientos clínicos de muestras fecales mediante la detección de genes de producción de toxinas: LT, STh, STp.
- Identificar la presencia de EPEC en los aislamientos clínicos de muestras fecales mediante la detección del gen de la intimina (*eae*) y del pili (*bfp*).
- Describir las características clínicas y socioeconómicas de los pacientes positivos por ETEC y EPEC.

4. Diseño

Se propuso un diseño observacional descriptivo transversal, con visitas diarias a los centros de salud escogidos en Tegucigalpa y Comayagüela. Se utilizó la metodología de encuesta para recolectar información de indicadores y variables relacionados a los objetivos del estudio.

5. Ubicación

La investigación se llevó a cabo en el Hospital de Especialidades del Instituto Hondureño de Seguridad Social, Hospital Escuela y el Centro de Salud Alonso Suazo, escogido a conveniencia, teniendo en cuenta el número de casos.

6. Población de estudio

La población estudiada fueron los niños menores de 3 años de edad, que acudieron con un cuadro de diarrea aguda a los centros de salud mencionados. Un cuadro de diarrea aguda se definió como la ocurrencia de tres o más evacuaciones líquidas o semilíquidas en las últimas 24 horas y con menos de catorce días de duración.

7. Tamaño de la muestra

Para una muestra representativa de Comayagüela y Tegucigalpa se aplicó la siguiente fórmula, que es utilizada en poblaciones finitas [Sampieri, 2006].

Donde:

n = es el tamaño de la muestra

Z = es el valor de la desviación normal, igual a 1.96 para un nivel de confianza del 95%.

N= es el universo, cuando se conoce la población.

p = Probabilidad a favor.

q= Probabilidad en contra

e = Error de confianza 0.05.

$$n = \frac{Z^2 pq N}{Ne^2 + Z^2 pq}$$

$$n = \frac{1.96^2 (0.10)(0.90) (211654)}{211654 (0.05)^2 + 1.96^2 (0.10)(0.90)}$$

$$n = 138$$

Para el cálculo de muestra se utilizó la prevalencia mínima entre EPEC y ETEC la cual es de 10% [Ochoa, 2010]. En cuanto el universo utilizado en la fórmula fue tomado de las consultas reportadas en el 2008 a nivel central por la Secretaria de Salud Pública. Aunque se tomaron 135 muestras de heces, no todas cumplían con la definición de caso por ser mayores de tres años, resultando una muestra final de 117.

8. Duración del estudio

La búsqueda de casos con diarreas agudas se extendió por un período de tiempo que incluyó los meses de octubre del 2010 a junio del 2011 y de febrero a abril del 2012, comprendiendo tanto la estación seca como húmeda. Los análisis fenotípicos de las muestras se realizaron paralelamente, mientras que en los meses de junio a agosto se realizaron los análisis moleculares de las muestras. Para la tabulación y aplicación de las pruebas estadísticas se consideraron los meses de septiembre y octubre del 2012.

9. Criterios de selección

Se realizaron procesos de socialización del proyecto con el personal médico y de enfermería de los centros involucrados poniendo a su disposición la información y proporcionando la información bibliográfica que solicitasen.

Se invitó a participar en la investigación a todo niño menor de 3 años que cumpliera con la definición de caso, cuyos padres ó encargado otorgaran el consentimiento informado por escrito y completaran la encuesta epidemiológica respectiva (anexo III), los niños que participaron en el estudio debían ser menores de tres años sin patologías congénitas ni enfermedades inmunológicas.

Para tal efecto, se contó con el apoyo del personal médico y de enfermería de los centros seleccionados, además del investigador involucrado. Se les expresó a los padres ó encargados del niño que los datos que proporcionaban serían y son manejados con estricta confidencialidad y que la participación era completamente libre y voluntaria.

10. Recolección de la muestra

De manera previa o simultánea a la toma de la muestra se aplicó el cuestionario epidemiológico al padre o al encargado para recabar información sobre datos clínicos relevantes sobre la diarrea del niño, situación económica, vivienda, saneamiento, agua de consumo, entre otros.

Se recolectó la muestra en una bolsita plástica, que se adaptó a los glúteos del niño en caso de que fuera muy acuosa, o directamente en un frasco de boca ancha cuando la consistencia de la muestra lo permitía. Las muestras diarreicas

en bolsas plásticas se depositaron en un frasco de vidrio adecuado para su transporte.

Una vez finalizado este proceso, se colocó la muestra en una hielera para mantenerla entre 2-4 °C y se transportó inmediatamente a los laboratorios del Programa de Maestría en Enfermedades Infecciosas y Zoonóticas, en la Escuela de Microbiología de la UNAH donde se procesaron las muestras para la búsqueda de *Escherichia coli*. En el laboratorio de Biología Molecular, se clasificaron los aislamientos de *Escherichia coli* como ETEC o EPEC aplicando metodologías moleculares.

11. Detección y caracterización de ETEC y EPEC en muestras de heces

11. a Aislamientos e identificación de *E.coli*

Utilizando guantes y en una campana de bioseguridad, se examinó la muestra para cultivo, se rotuló y se anotó en un libro dedicado para este fin. Se registró la consistencia, si existía sangre macroscópica o moco. Se rotularon las placas Petri de agar MacConkey (medio selectivo para bacterias Gram negativas) con fecha y código, se inoculó siguiendo el procedimiento estándar, y se incubó por 18 a 24 horas a 35°C.

Una porción de cada muestra se colocó en crioviales rotulados debidamente, y se congeló a -20°C. El resto se descartó siguiendo los procedimientos de bioseguridad.

Después del período de incubación se revisaron las placas inoculadas, se seleccionaron aquellas colonias típicas de forma circular, color rojo con un halo de precipitación, no mucoides. Estas colonias se sometieron a confirmación mediante pruebas bioquímicas.

Las colonias que se identificaron bioquímicamente como *E.coli* se seleccionaron y almacenaron en condiciones adecuadas para su conservación hasta la realización de la identificación molecular (anexo IV).

11. b Extracción de ADN

Se utilizó el método de Boom para la extracción de ADN en las muestra positivas de *E. coli*. Este método emplea partículas de sílica para la purificación de los ácidos nucleicos. La extracción se realizó a partir del crecimiento de las cepas en caldo soya tripticasa, que tenían de 18- 24 horas de crecimiento. Se utilizaron los Buffer L6 y L2 que contenían tiocianato de guanidinio para romper las células y dejar libres los ácidos nucleicos que se unieron a la sílica, posteriormente se realizaron lavados con etanol y acetona para precipitar el ADN. Finalmente los ácidos nucleicos se secaron en un bloque térmico y fueron eluidos en un nuevo

tubo de PCR. Una vez extraídas las muestras, se colocaron a -20°C hasta el momento en que se amplificaron [Boom et al., 1990].

11. c PCR Múltiplex

Se implementaron dos PCR múltiplex. La primera PCR tenía como propósito amplificar los genes intimina y pili formador de penachos de EPEC; la segunda PCR tuvo como objetivo detectar los genes que codifican las toxinas lábil, estable humana y estable porcina de *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), a partir de colonias lactosa-positivas aisladas de heces en agar MacConkey.

Las muestras se analizaron primero para detectar EPEC por PCR, se usaron los iniciadores: eae Forward, eae Reverse, a una concentración de 1.2 μM para amplificar un fragmento de 376 pares de bases (pb) y los iniciadores bfp Forward y bfp Reverse a una concentración de 0.4 μM para amplificar un fragmento de 367 pb. La mezcla consistió de 3 μl de ADN en un volumen final de 25 μl de la mezcla de reacción. La concentración final del buffer fue de 1X, de los dinucleotidos 0.2 mM, el MgCl_2 se llevó a una concentración de 1.8 mM y la polimerasa se dispuso a una concentración de 0.03 U/ μl (anexo V).

La PCR se corrió en el termociclador Perkin Elmer, donde los parámetros que se utilizaron en la amplificación fueron: para la desnaturalización inicial, un ciclo a

una temperatura de 94° C, por 4 minutos, luego 35 ciclos con desnaturalización a 94°C por 20 segundos, hibridación a 55°C por 30 segundos y extensión a 72°C por 10 segundos, la extensión final a 72°C por 7 minutos 1 ciclo, concluyendo con la temperatura de mantenimiento a 4°C. Los productos de la PCR fueron analizados por electroforesis en geles de agarosa al 2% con tinción de bromuro de etidio.

Se sometieron todas las muestras a un segundo PCR para detectar ETEC. Se usaron los iniciadores LT Forward LT Reverse para amplificar un fragmento de 234 pb, los iniciadores STp Forward y STp Reverse para amplificar un fragmento de 166 pb y los iniciadores STh Forward STh Reverse para amplificar un fragmento de 64 pb, todos a una concentración de 2.0 µM. La mezcla consistió de 4 µl de ADN en un volumen final de 50 µl de la mezcla de reacción. El buffer se utilizó a una concentración de 1X, los dinucleotidos a una concentración de 0.1 mM mientras que la concentración del MgCl₂ en un principio fue de 0.45 mM la cual tuvo que aumentarse a 0.8 mM, ya que no se obtenían los resultados deseados, la polimerasa que se colocaba al final se utilizó a una concentración de 0.03 U/µl (anexo V).

La PCR se realizó al igual que EPEC en el termociclador Perkin Elmer, donde los parámetros que se utilizaron en la amplificación fueron: para la desnaturalización inicial, un ciclo a una temperatura de 94° C, por 4 minutos, luego 39 ciclos con desnaturalización a 94°C por 20 segundos, hibridación a

55°C por 30 segundos y extensión final 72°C por 10 min, extensión final a 72°C por 7 minutos un ciclo concluyendo con la temperatura de mantenimiento a 4°C. Los productos de la PCR fueron analizados por electroforesis en geles de agarosa al 2.5% con tinción de bromuro de etidio.

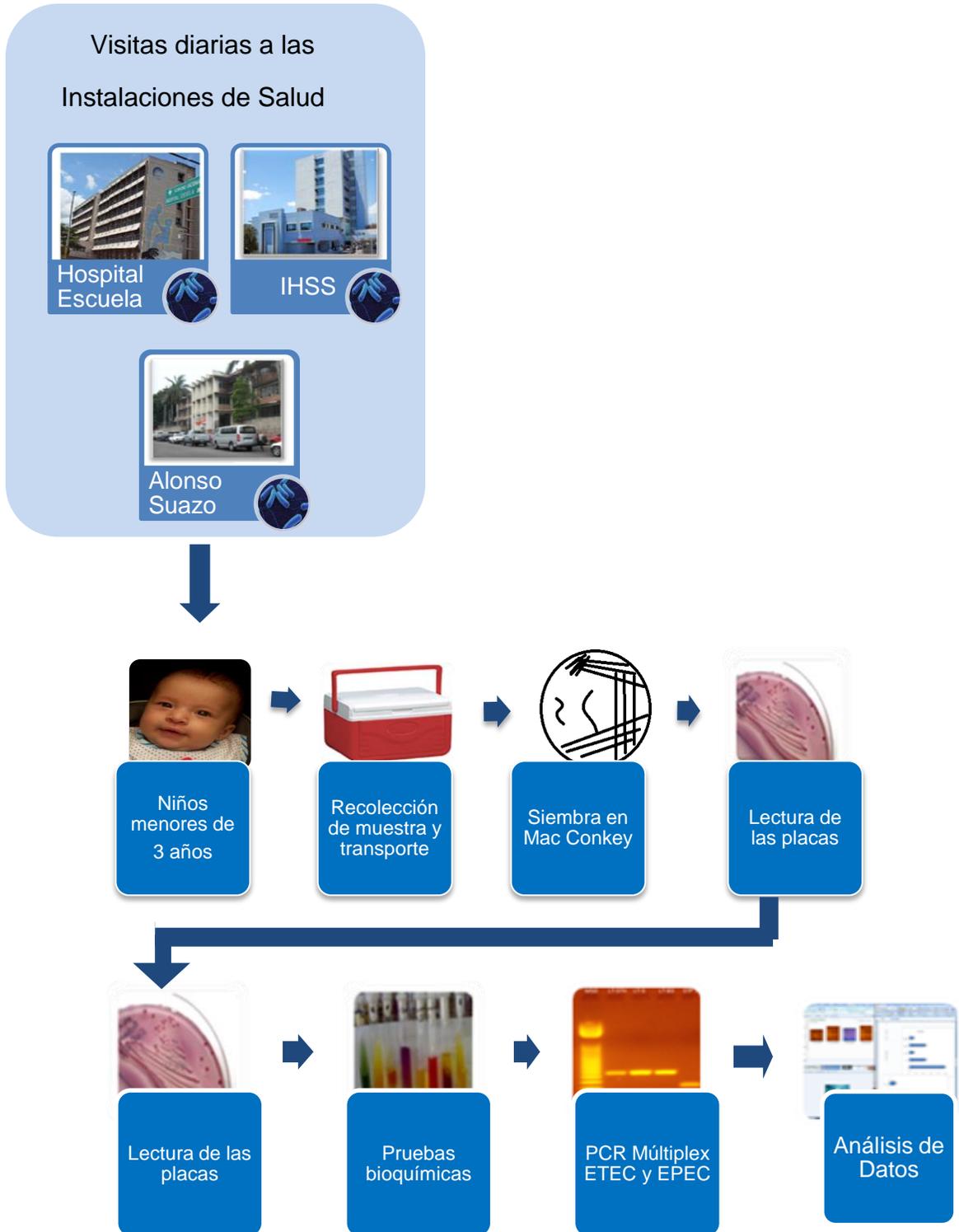
11. Análisis de Datos

Los datos obtenidos de los participantes se organizaron en un libro de registro y en el programa Microsoft Excel 2007. Igualmente los resultados de laboratorio y de las encuestas se ingresaron en el programa de EpiInfo para su respectiva tabulación.

Ambos programas estadísticos Epi-info y Microsoft Excel 2007 se utilizaron para calcular los resultados obtenidos en las encuestas, donde se consideraron medidas de tendencia central, como promedios y frecuencias.

Igualmente se aplicó la prueba estadística “t” de student, para evaluar las características clínicas y socioeconómicas de los pacientes. Con esta prueba se analizó si el grupo de casos positivos de ETEC y EPEC tenía diferencia significativa con respecto al grupo de casos negativos por ETEC y EPEC.

12. Flujo de Trabajo



13. Consideraciones Éticas

El protocolo de investigación se sometió al Comité de Ética de Investigación (CEI) del IHSS para su correspondiente aprobación. Se elaboró un consentimiento informado para explicar claramente a los padres de los niños participantes que el riesgo a someterse es mínimo debido a que es una técnica no invasiva (anexo VI). Se manifestó el compromiso de privacidad de los datos y en qué consistía el estudio.

14. Consideraciones de Bioseguridad

Escherichia coli es un microorganismo infeccioso que se clasifica en el grupo 2 de riesgo para los niveles de bioseguridad en los laboratorios (anexo VII y VIII).

El grupo de riesgo 2 representa un riesgo individual moderado y un riesgo poblacional bajo, por lo que se siguieron técnicas microbiológicas apropiadas (TMA).

Se validaron los procedimientos operativos estándares para la recolección y manejo de muestras. Los cultivos viables se identificaron siguiendo los principios de Bioseguridad Nivel 2, fundamentalmente se trabajó en la cabina de bioseguridad (Clase II tipo A2). Se utilizó un equipo de protección personal para

dicho nivel (guantes, y gabacha), como se recomienda en el Manual de Bioseguridad Laboratorio Clínico de la Dra. Ada Zelaya [Zelaya, 2009].

CAPÍTULO 4: RESULTADOS

1. Muestras recolectadas

Se recolectaron 117 muestras de pacientes que cumplieron los criterios de inclusión establecidos en la metodología. Todos los participantes del estudio eran niños menores de tres años, que presentaron tres o más evacuaciones acuosas durante 24 horas que asistían al Instituto Hondureño de Seguridad Social, Hospital Escuela, y Centro de salud Alonso Suazo. La recolección se realizó entre los meses de octubre del 2010 y abril del 2012.

Los participantes del estudio se distribuyeron en 45 niñas (38%) y 72 niños (62%). El rango de edad de los niños, comprendía una mínima de 2 meses y una máxima de 36 meses con un promedio de edad de los participantes de 20 meses. En la siguiente gráfica se observa el número de muestras captadas por grupo etario y género (Figura 10).

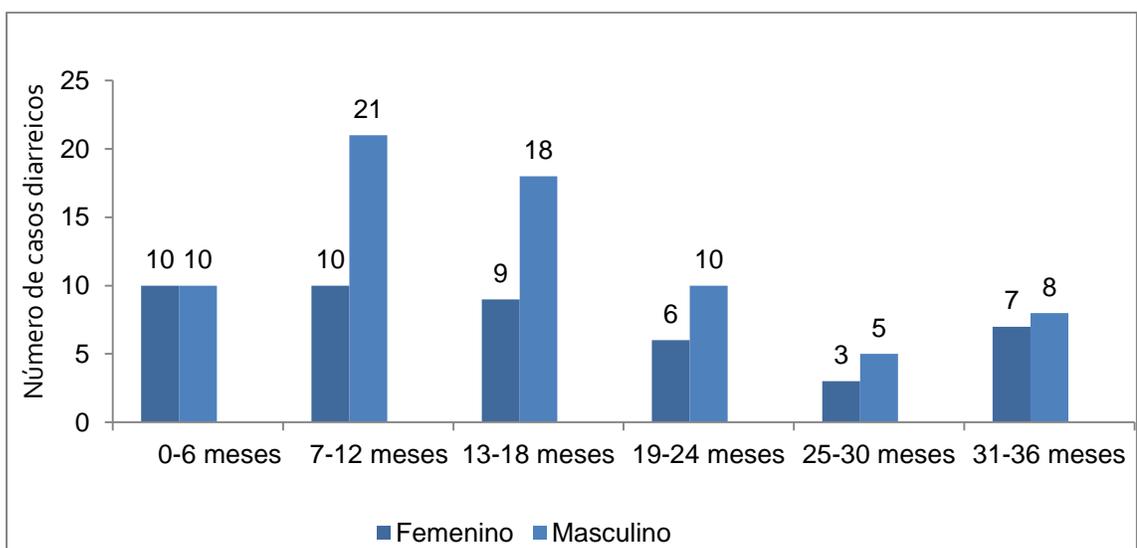


Figura 10. Distribución de según el grupo etario y género de las muestras captadas.

2. Resultados fenotípicos de las muestras captadas

De las 117 muestras, en 94 se aisló *E. coli* que corresponde a un 80%. En el resto de las muestras se detectaron otras bacterias (16%) y en un 4% no se identificaron colonias lactosa positivas en el medio selectivo de Mac-Conkey (Figura 11).

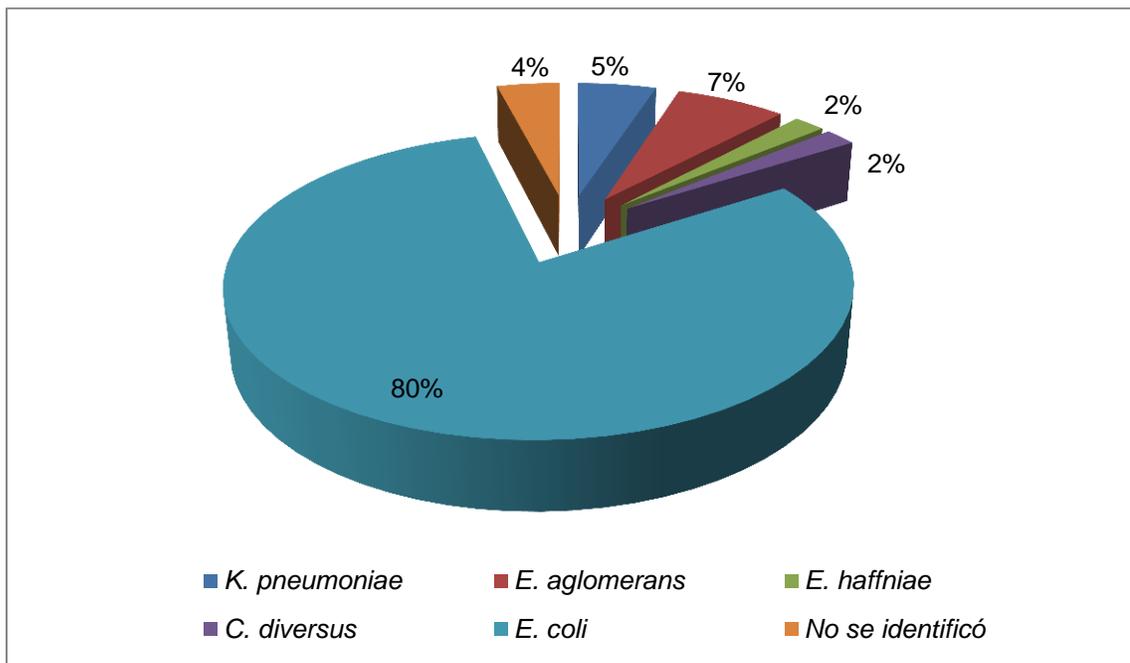


Figura 11. Aislamientos bacterianos a partir de las muestras fecales de niños menores de tres años.

3. Resultados moleculares de las muestras captadas

Una vez realizado el análisis fenotípico se procedió a investigar molecularmente las muestras positivas por *E. coli*. Estas muestras primero se sometieron a una PCR multiplex para la detección de ETEC, pero antes se desarrolló un PCR control con cepas positivas (Figura 12).

Las cepas detectadas como ETEC representaron un 15% de los 94 aislamientos de *E. coli*, los cuales corresponden a 14 casos (Figura 13). Se encontró en un aislado (7%) los genes que codifican para ambas toxinas, mientras que en 4 casos se detectó solamente el gen de la toxina STh (29%) y en 9 de los casos se identificó el gen de la toxina termolábil (64%).

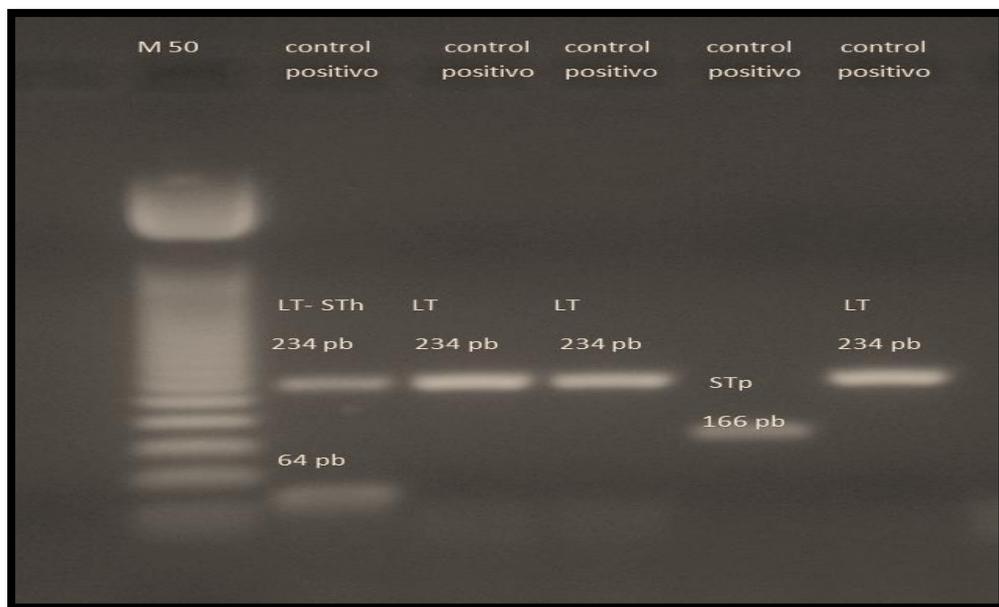


Figura 12. PCR para ETEC. La detección de un fragmento de 234 pb se considera positiva para LT mientras que la detección de un fragmento de 64 pb se considera positiva para STh y la de un fragmento de 166 pb se considera positiva para STp. Carril 1: corresponde a control positivo para LT-STh, carriles 2, 3 y 5: corresponde a control positivo para LT, carril 4: corresponde a control positivo para STp. El marcador de peso molecular que se utilizó fue 50 pb.

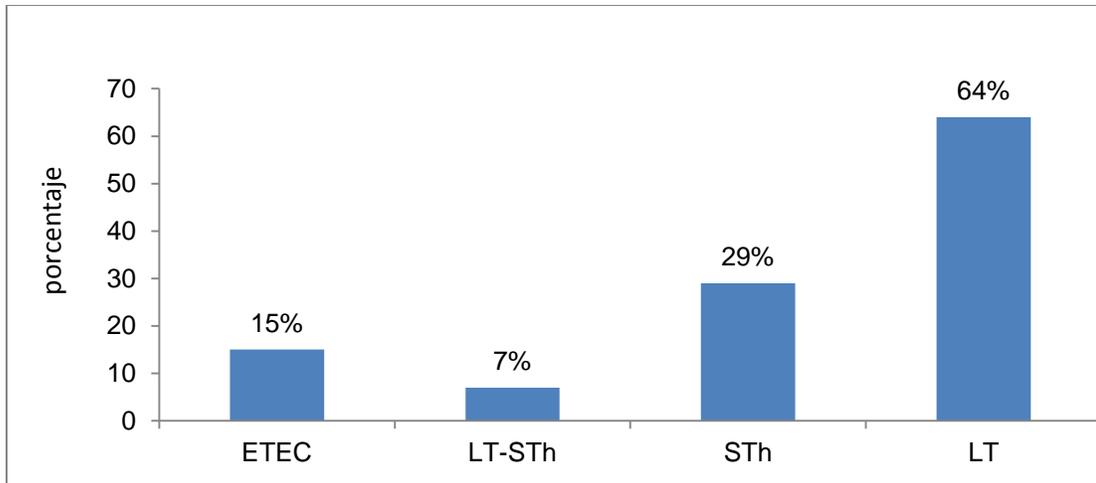


Figura 13. Frecuencia de ETEC y respectivo porcentaje de las diferentes cepas encontradas.

Al igual que en ETEC se realizó un PCR control de EPEC con cepas positivas (Figura 14). EPEC se detectó en un 5%, que corresponde a cinco casos del total de aislamientos de *E. coli*. Se identificaron cepas atípicas; que poseen el gen intimina y cepas típicas; que contienen el gen intimina y el gen *bfp*.



Figura 14. PCR para EPEC. La detección de un fragmento de 376 pb es considerado positivo para *eae* y la detección de un fragmento de 367 pb es considerado positivo para

bfp. Carril 2: corresponde a control positivo para eae y bfp. Carril 3 y 4: controles negativos para EPEC.

En cuatro de los casos se identificaron cepas atípicas (80%) y en tan solo un caso (20%) se detectó una cepa típica (Figura 15). En conjunto ETEC y EPEC se reportó en un 20% de los aislados de *E.coli*.

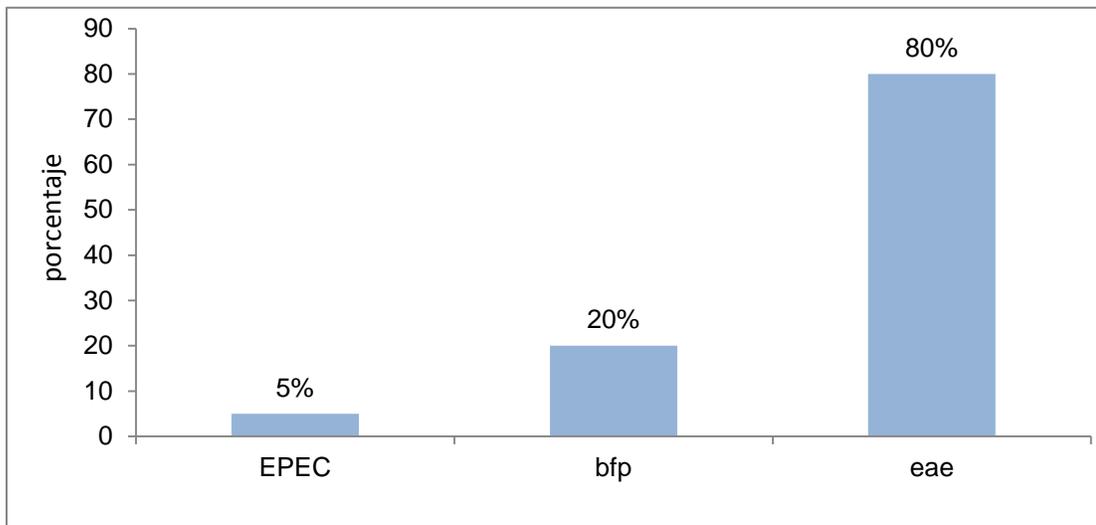


Figura 15. Frecuencia de EPEC y respectivo porcentaje de las diferentes cepas encontradas.

El promedio de edad de los pacientes positivos por ETEC y EPEC fue de un año y medio. Hubo más frecuencia de ETEC en el grupo etario de 13 a 18 meses. En cuanto a EPEC fue menos dominante teniendo una máxima de dos pacientes por grupo etario (Figura 16).

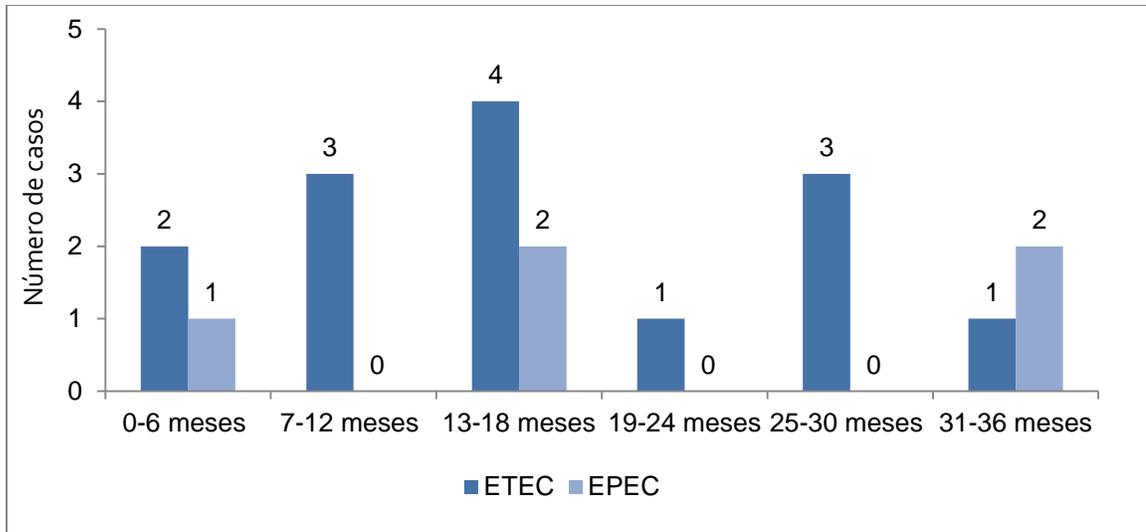


Figura 16. Distribución de los casos positivos ETEC y EPEC según grupo etario.

En la figura 17 se observa el número de casos diarreicos captados por mes, en el cual se aprecia que junio es el mes donde se reporta la mayor cantidad de muestras diarreicas mientras que en los meses de invierno como ser octubre, noviembre y diciembre se obtiene una baja en la captación de muestras.

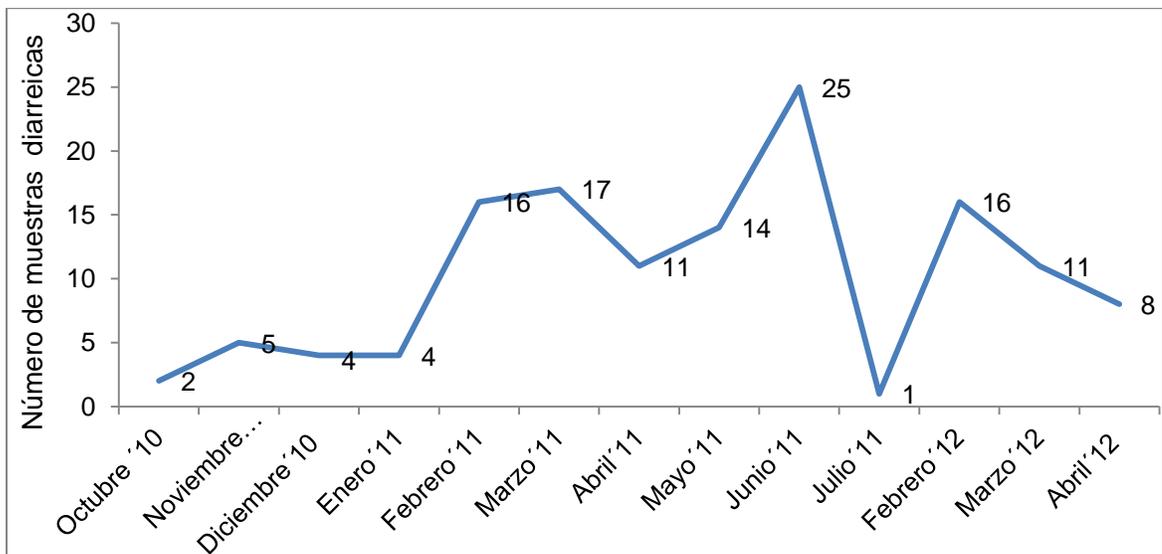


Figura 17. Distribución mensual de muestras captadas en el estudio.

ETEC y EPEC no presentaron una estacionalidad marcada. En la siguiente gráfica se observa una distribución casi homogénea entre los meses de octubre 2010 y Abril del 2012 (Figura 18). Durante el mes de abril 2011, el aislamiento de EPEC arrojó solamente dos casos, mientras que en los meses de junio 2011 y marzo 2012 ETEC se reportó con un máximo de tres pacientes positivos cada mes.

La presencia de la toxina LT se detectó en los aislados de los meses de febrero, abril, mayo y junio; mientras que la detección de la toxina STh se limitó a los meses de marzo y junio. La única muestra en que se detectaron aislados con genes para ambas toxinas LT-STh se recolectó en el mes de marzo. En cuanto a EPEC, el gen *intimina* se detectó en los meses de marzo, abril y noviembre, y en el mes de abril se reportó la única cepa atípica del estudio.

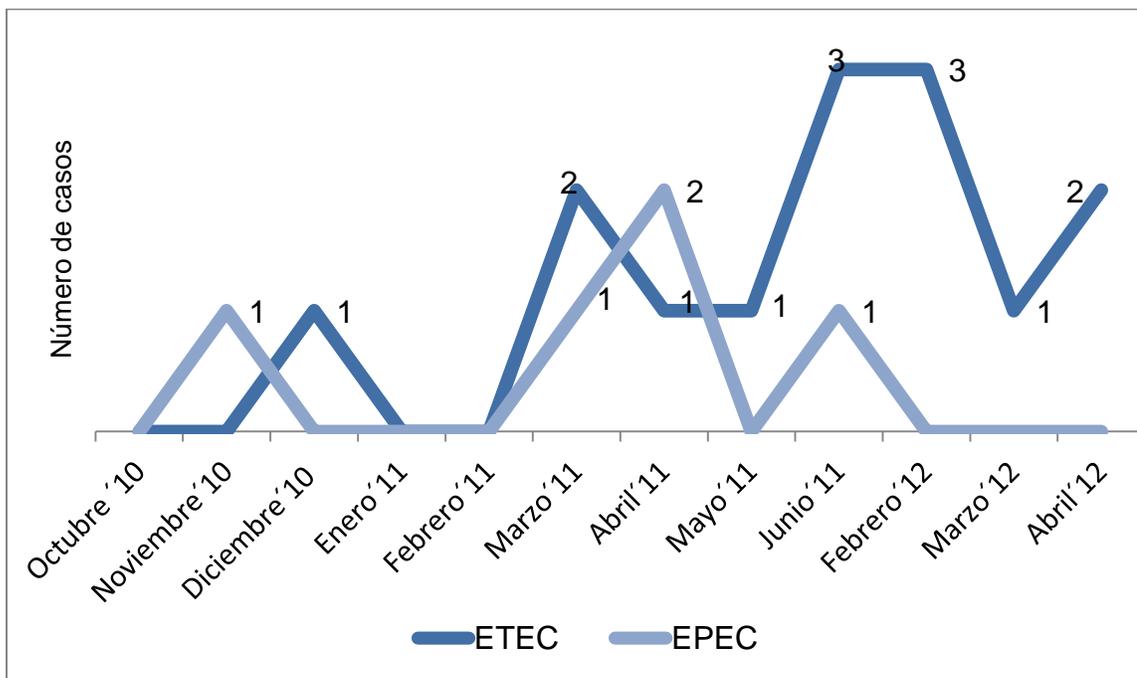


Figura 18. Distribución de casos positivos ETEC y EPEC según el mes de año de captación.

4. Características clínicas de los pacientes captados

Los casos positivos para ETEC y EPEC manifestaron vómito en 14 casos (74%). Aquellos casos en que se reportó diarrea pero fueron negativos para ETEC y EPEC (casos negativos) los pacientes presentaron vómito en 54 casos (55%), (Figura 19). La fiebre se observó en sólo un caso de EPEC (20%) mientras que en ETEC se observó en la mitad de los casos. Esta característica clínica en los casos negativos se reportó en un 30%. La deshidratación se presentó en la mitad de los casos positivos de ETEC y en una quinta parte de los casos positivos de EPEC (Figura 19).

Se aplicó la prueba “t” de student, para valorar si había diferencia significativa entre los casos positivos y los casos negativos con respecto a la sintomatología. La norma de esta prueba consiste en la siguiente decisión: si el valor absoluto es mayor que el valor de referencia se rechaza la hipótesis nula, por tanto hay diferencia significativa entre las dos poblaciones ($|V.A| > V.R = t_{\alpha}$).

Según los grados de libertad y el nivel de confianza del estudio, el valor de referencia fue de 1.6602. En la sintomatología no hubo diferencia significativa; en cuanto al vómito entre casos positivos y negativos el $|V.A|$ fue de 0.77, para la fiebre el $|V.A|$ fue de 0.65, siendo la deshidratación la que mayor $|V.A|$ obtuvo con 0.84, pero no se acercó al valor de referencia.

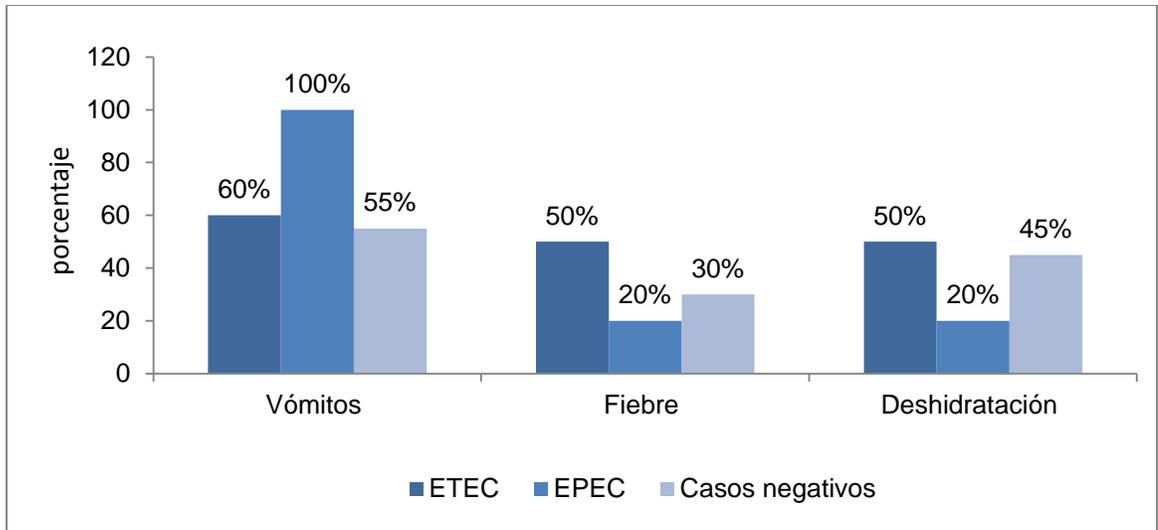


Figura 19. Características clínicas de los pacientes positivos y negativos captados en el estudio.

En 4 pacientes positivos: tres de ETEC y uno de EPEC, vivían con un familiar que también tenía diarrea.

5. Características socioeconómicas

En general los pacientes, tanto casos positivos como negativos, ingieren en mayor porcentaje agua purificada. El agua clorada es consumida en menor grado por los casos negativos y el agua hervida por los casos positivos (Figura 20). En este último evento se aplicó la prueba “t”, donde el /V.A/ fue de 0.2 siendo menor que el valor de referencia (1.6602).

En los niños encontrados positivos para EPEC y ETEC la alimentación fue variada, la lactancia exclusivamente materna se daba en tan solo un caso, la leche en polvo se brindaba en un 63% y la combinación de la leche materna con

la leche en polvo en 32%. En un 80% los niños positivos por ETEC/EPEC ingieren comida sólida.

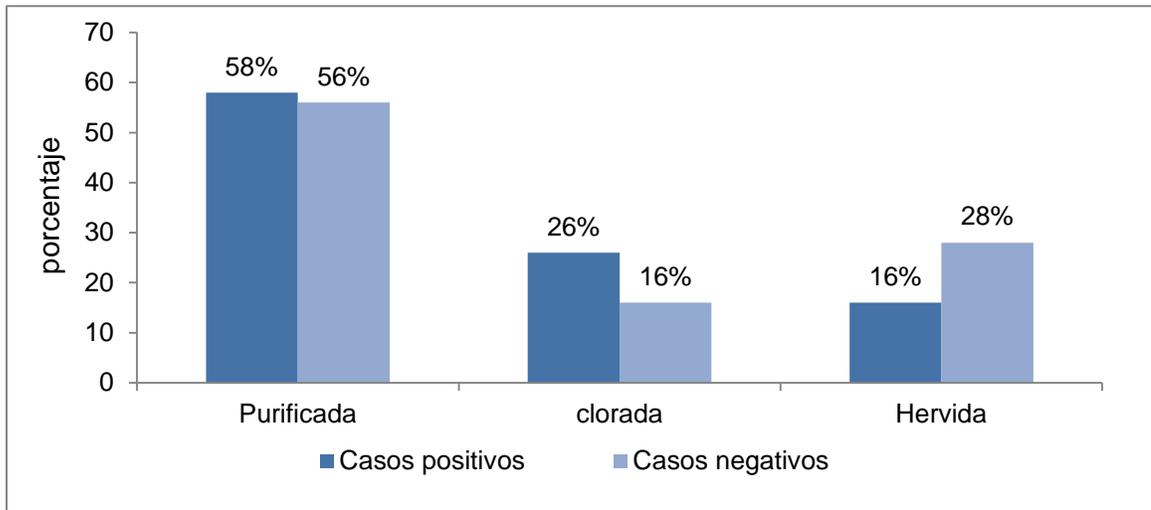


Figura 20. Método seleccionado por los participantes para tratar el agua que ingieren.

Hubo mayor frecuencia al acceso de agua potable por parte de los participantes con un 90% en los casos positivos y un 85% en los casos negativos mientras que un pequeño porcentaje, obtiene el agua de pozo y cisterna (Figura 21).

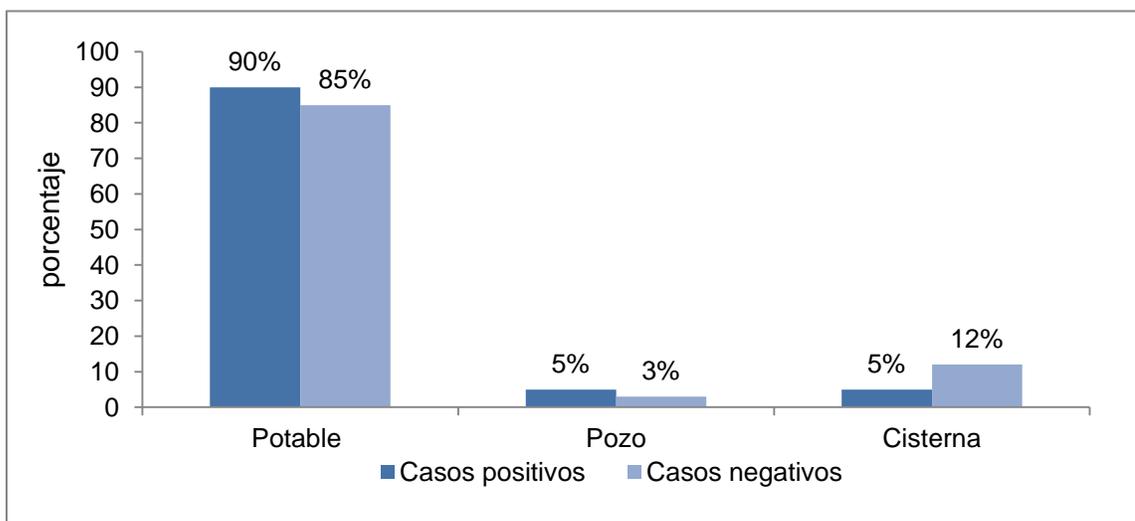


Figura 21. Fuentes de agua para el consumo.

Respecto a la procedencia de los alimentos, fue frecuente que los participantes obtuvieran sus provisiones en el supermercado. Aproximadamente la mitad de los participantes acuden al mercado y se abastecen en menor cantidad acudiendo a la tienda de venta de alimentos del barrio (Figura 22).

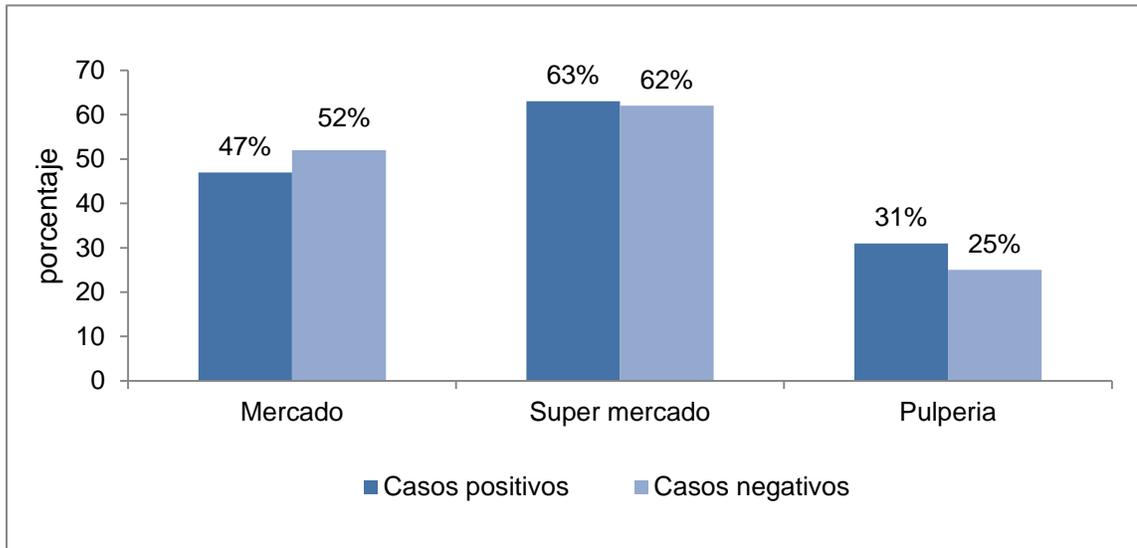


Figura 22. Tipos de establecimiento de compra de los alimentos por parte de los encuestados.

Respecto a las características de la vivienda se evaluaron dos variables: (1) el tipo de piso y (2) la disposición de excretas. En 47% de los casos positivos para ETEC y EPEC, los encuestados manifestaron tener un piso de ladrillo; un 26% referían tener piso de cemento; mientras que 21% decían tener cerámica. El piso de tierra se reportó solo en 1 (5%) encuestado (Figura 23).

Según el valor de referencia de "t" (1.6602), en la variable del piso de la vivienda entre casos positivos y negativos no hubo diferencia significativa, ya que el valor absoluto fue menor (0.069).

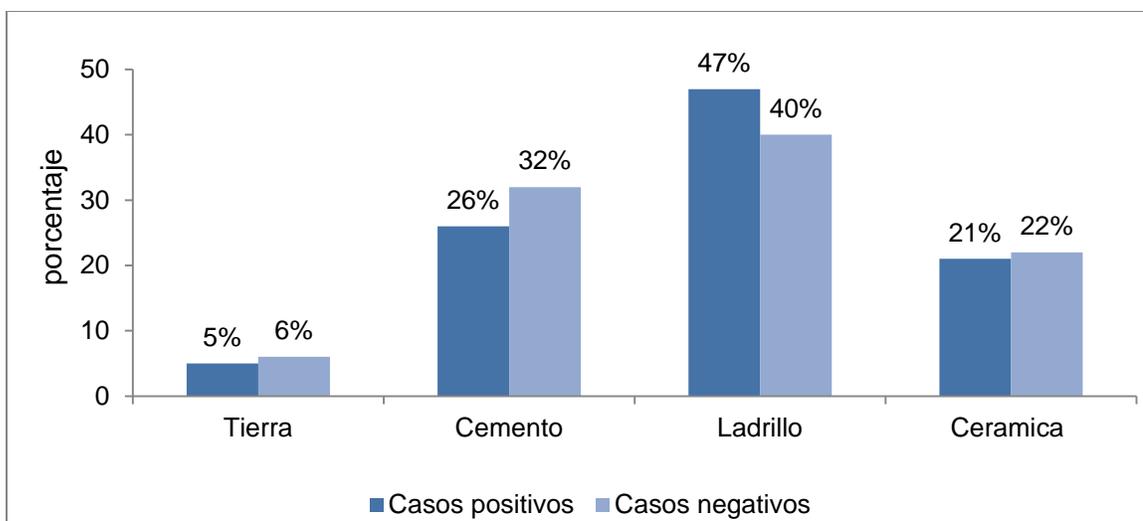


Figura 23. Tipos de pisos de las viviendas referidas por los encuestados.

Entre los casos positivos, ninguno de los encuestados refirió la defecación al aire libre como sistema usado para eliminar las excretas fecales. Setenta y nueve por ciento, de los participantes decía poseer servicio sanitario, y 21% decía tener letrina. Datos similares se reportaron entre los pacientes negativos, no obstante en este grupo de población se reportó 2% de defecación al aire libre (Figura 24).

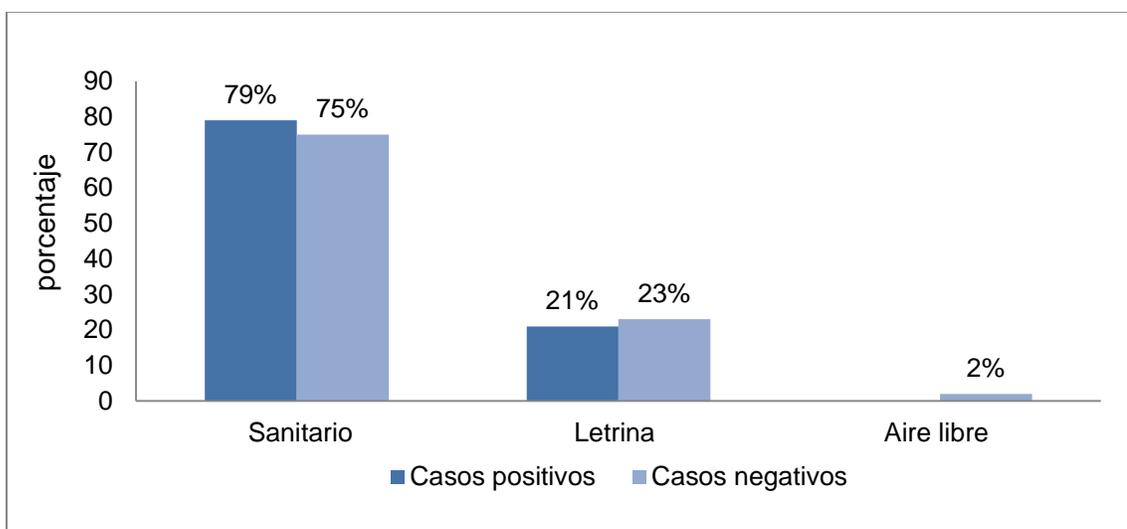


Figura 24. Disposición de excretas en las viviendas de pacientes positivos y negativos.

Al aplicar la prueba estadística “t” a la variable “disposición de excretas”, no mostró diferencia significativa entre los casos positivos y negativos con un /V.A/ de 0.344.

Noventa por ciento de los encuestados que resultaron positivos para ETEC y EPEC manifestaron que el manejo de la basura de sus viviendas era a través del tren de aseo. Solamente un encuestado reportó el sistema de la quema de basura, y en otro caso la disposición en un solar baldío.

CAPÍTULO 5: DISCUSIÓN

En los últimos años, gracias a la progresiva incorporación de nuevas tecnologías de detección, un número creciente de patógenos bacterianos y virales han sido asociados a la enfermedad diarreica aguda mediante la identificación y caracterización de genes de patogenicidad y virulencia. Sin embargo, el protagonismo de cada una de estos agentes puede variar según las características socioeconómicas de los pacientes estudiados.

ETEC y EPEC son importantes serogrupos patogénicos de *E. coli* causantes de diarrea en países en desarrollo como Honduras, donde no existe un diagnóstico de rutina para su identificación pese al riesgo que representan para los niños menores de 3 años. En la literatura se encuentran pocos estudios publicados sobre etiología de diarreas en Honduras, en donde el objetivo haya sido la búsqueda de los serogrupos mencionados. Uno de ellos fue realizado en 1979 en el IHSS por Bendeck y colaboradores [Bendeck et al., 1983] en el cual se investigó la presencia de EPEC y el otro estudio se realizó en 1990 por Figueroa y colaboradores [Figueroa et al., 1990] en el que se investigó ETEC; en ninguno de estos dos estudios se utilizaron métodos moleculares para la identificación de dichos patógenos, lo cual dificulta obtener una información más completa sobre la capacidad patogénica de las cepas aisladas. Además estas investigaciones son poco actuales por lo que era necesario realizar una investigación que nos indicara el tipo de cepas patógenas circulantes y con qué frecuencia aparecen como causantes de diarrea. El presente trabajo es el primero en su tipo en nuestro país que aplica la técnica de PCR para detectar ETEC y EPEC y

demuestra que éstos son agentes etiológicos frecuentes de gastroenteritis en niños menores de 3 años.

Del total de aislamientos de *E. coli* (n= 94), 15% (n= 14) correspondieron a ETEC, porcentaje que demuestra que cepas de ETEC circulan en la población infantil de Tegucigalpa y Comayagüela. Por otro lado, en dos estudios realizados en la región centroamericana se encontraron prevalencias de ETEC ligeramente superiores a nuestros resultados: 19.5% y 20.5% en Guatemala y Nicaragua, respectivamente [Lemus, 2006; Vilchez et al., 2009]. Mientras que en otro estudio realizado en Nicaragua en 1983 reportaron 28% de ETEC [Mayatepek et al., 1993], en Honduras en 1990 se reportó un 21.7% en la investigación de Figueroa y colaboradores [Figueroa et al., 1990]. En estos dos últimos estudios se aprecia la reducción de ETEC en ambos países en comparación con las investigaciones actuales mencionadas anteriormente.

Los perfiles de toxinas de ETEC: STh, LTy STh-LT tienen prevalencias variadas en diferentes países. De acuerdo a nuestros resultados la toxina LT se identificó con mayor frecuencia detectándose en 9 de los casos (64%), la toxina STh se detectó en cuatro casos (29%) y en un caso se identificaron ambas toxinas (7%). En Nicaragua en el 2009 se reportó un resultado similar con un 77% toxina LT [Vilchez et al., 2009]. En México y Guatemala se reportaron con mayor frecuencia aislados con genes para STh-LT con un 57% y 50% respectivamente [Lemus, 2006; Qadri et al., 2005]. Mientras que en Bangladesh y Egipto, la toxina STh fue la más frecuente con un 50% y 58% respectivamente [Qadri et al., 2000a; Rao et al., 2003]. En nuestros resultados no se detectó STp ya que su principal

reservorio son los animales y no los humanos. En la distribución geográfica de las diferentes cepas de ETEC participan los CFs, ya que se ha observado que éstos varían de una región a otra y algunos CFs se expresan exclusivamente según la cepa productora de toxina.

En los resultados del presente estudio, del total de aislamientos de *E. coli* (94), 5% (5 casos) correspondieron a EPEC. En los países donde se ha investigado *E. coli* patogénica, ETEC es menos frecuente que EPEC. En este estudio se observó la misma tendencia encontrándose en un 5% con una diferencia con respecto a ETEC de 10%. Lo mismo ocurrió en el estudio realizado en Nicaragua donde EPEC se reportó en un 16% con una diferencia de 4% con respecto a ETEC [Vilchez et al., 2009].

Aunque ETEC es más frecuente que EPEC en la mayoría de los estudios no siempre se presenta esta situación. En México se publicó en el 2008 un artículo donde se identificaron 32 muestras positivas para *E. coli* patogénica causante de diarrea, y el 50% correspondían a EPEC mientras que ETEC se detectó en menor grado con un 37.5% [Estrada-Garcia et al., 2009].

Las cepas típicas que tienen el gen *eae* y el *bfp* de EPEC son más virulentas que las cepas atípicas que solo tiene el gen *eae*, y la frecuencia de las mismas en diferentes países suele ser muy variada [Afset et al., 2004; Trabulsi et al., 2002]. En el presente estudio se identificaron en su mayoría cepas atípicas en cuatro casos (80%) y en tan sólo un caso se detectó una cepa típica (20%). Estos resultados coinciden con estudios en Nicaragua y México donde fue más

frecuente la identificación de cepas atípicas que típicas [Estrada-Garcia et al., 2009]. Otros estudios realizados con muestras de Australia y Brasil reportan con mayor frecuencia cepas atípicas [Orlandi et al., 2006; Robins-Browne et al., 2004], mientras que en un estudio hecho en Bangladesh, las cepas típicas son más usuales en aislamientos de *E. coli* que las cepas atípicas [Albert et al., 1995].

Según la literatura en países desarrollados los primeros brotes fueron de cepas típicas pero actualmente son frecuentes los aislamientos de cepas atípicas [Trabulsi et al., 2002]. Por lo que el resultado de este desplazamiento de cepas típicas por cepas atípicas en los países desarrollados puede relacionarse con mejoras a las condiciones sanitarias y el crecimiento de las ciudades, mientras que en países en vías de desarrollo no está muy claro el comportamiento de estas dos cepas.

Nuestros resultados fueron muy similares con los resultados del estudio realizado en 1979 en el IHSS donde solo se aisló una cepa típica, por lo que no se refleja a través del tiempo un desplazamiento de las cepas típicas por parte de las cepas atípicas, ya que en ambos estudios fueron más frecuentes las cepas atípicas. Aunque la semejanza de estos resultados puede deberse a que los escenarios donde se realizaron ambos estudios fueron similares.

En cuanto al rango de edad 13-18 meses mostró mayor número de muestras positivas para ETEC (21%, n= 4), este resultado es similar al de un estudio que tomó muestras de Egipto en el 2003. En dicho trabajo se reporta que ETEC, en

el rango de edad de 12-17 meses obtuvo 21%, pero de 6-11 meses fue donde se obtuvo mayor frecuencia con 26% [Rao et al., 2003]. También en México, se encontró que la mayoría de muestras positivas para *E. coli* enteropatógena estuvieron dentro del rango de 6-12 meses de edad (81.3%) y los participantes entre 12-18 meses de edad representaban el 17.5% [Estrada-García et al., 2009].

Según nuestros resultados, el aislamiento de EPEC no mostró ninguna correlación con la edad, con dos casos en cada uno de dos rangos: de 13-18 meses y de 31-36 meses, el que no se aprecie una tendencia relacionada con la edad puede resultar del bajo número de muestras positivas para EPEC. Es importante destacar que en los resultados obtenidos, EPEC no se limitó a los niños menores de dos años como se cita en la literatura [Heymann, 2005]. Factores culturales pueden estar influyendo en la infección de EPEC en niños mayores de dos años, como la de prestar mayor atención a los recién nacidos, pero a medida que ellos crecen las precauciones higiénicas se van reduciendo.

En general del total de las muestras el grupo etario más afectado por diarrea es el comprendido entre los 7-12 meses, con un 26% del total; seguido por el grupo de 13-18 meses con un 23%. En el estudio de Lemus, 2006 en ciudad de Guatemala se obtuvieron resultados similares donde el 31% de los participantes tenían entre 6 a 12 meses y al igual que el presente trabajo, un 23% de los participantes tenían la edad de 13 a 18 meses. En la distribución de los participantes por género, el sexo masculino estuvo representado con 72 niños (62%) del total de casos de diarrea mientras que el sexo femenino obtuvo menos

participación con 45 niñas (38%). Estas cifras también coinciden con los resultados de ciudad Guatemala que incluyeron 47 niños (56%) y 37 niñas (44%) [Lemus, 2006].

En el presente estudio fue muy importante la caracterización fenotípica antes de realizar las pruebas moleculares para la detección de ETEC y EPEC, porque nos permitió descartar aquellas muestras en donde no creció *E. coli*. En el 80% de los cultivos se aisló *E. coli* y en el restante 20% se identificaron otras enterobacterias, como *K. pneumoniae*, *E. agglomerans*, *C. diversus*, *E. haffniae*.

Cuando los recursos no son una limitante, los investigadores optan por someter el total de las muestras directamente a las pruebas moleculares a la par de otras pruebas como la serotipificación de microorganismos, o en el caso particular de EPEC, técnicas de adherencia sobre células epiteliales HEp-2.

Del total de las muestras diarreicas (n=117) la mayoría fueron recolectadas en el mes de junio (26%), lo cual es similar al estudio de Bendeck de 1979 en el IHSS donde se captaron 24 muestras en el mes de julio. En ambos estudios se apreció una baja de casos de diarrea aguda en los meses de lluvia: octubre, noviembre y diciembre. Estos meses coinciden cuando hay mayor regularidad en el servicio de agua potable en las colonias urbanas de escasos recursos, que es donde se recolectó la mayoría de las muestras: colonia Venezuela, La Esperanza, Villa Nueva, La Peña, La Travesía, La Era, entre otras. Debido a que la diarrea es causada por microorganismos como: bacterias, virus y protozoos, estos aprovechan el agua como vehículo para la transmisión de la enfermedad,

por lo que el almacenamiento inadecuado de este líquido durante la época de escasez del mismo, puede dar como resultado la contaminación de este recurso causando, diarrea en los usuarios.

Respecto a los perfiles de toxinas de ETEC: LT, STh y LT-STh, en su mayoría se reportaron entre los meses de febrero y junio. Sólo hubo un caso de detección del gen LT en diciembre, mostrando una tendencia de identificarse la mayoría en meses cálidos. Por lo que si se observa una estacionalidad en las cepas positivas para ETEC. Estos datos coinciden con lo mencionado en la literatura, donde se manifiesta mayor frecuencia de aislamientos de las cepas ETEC en el verano [Heymann, 2005; Qadri et al., 2005].

EPEC se reportó en marzo, abril, junio y un caso aislado en noviembre, la única cepa típica que se detectó fue en el mes de abril, por lo que al igual que ETEC se observa una estacionalidad en las cepas EPEC encontradas. Las diferentes cepas de EPEC y ETEC muestran una tendencia de reportarse la mayoría durante la estación seca, lo que concuerda con lo citado en la literatura [Heymann, 2005; Romero, 2002]. El aumento de diarreas por ETEC y EPEC en época seca puede estar vinculado con la escasez de agua potable en este periodo, predisponiendo a la población menor de tres años a padecer esta infección.

En algunos estudios la sintomatología de ETEC es más severa que la de EPEC, esta situación se repite en el presente trabajo aunque esto puede ser el resultado del pequeño número de muestras positivas para EPEC, lo que puede

influir en el análisis de los resultados. La sintomatología que reportaron los pacientes con EPEC fue vómito en los cinco casos y en tan sólo uno de ellos se presentó fiebre que corresponde a un 20%. En cuanto a ETEC, el vómito se presentó en un 60% que corresponde a nueve casos, y la fiebre se presentó en 7 niños, que corresponden a un 50% de los casos. Hay que tener en cuenta que ningún síntoma reveló una diferencia significativa con respecto a los casos negativos, según la prueba estadística aplicada.

Referente a estos cuadros clínicos presentados por los casos positivos de ETEC, en su mayoría fueron considerados moderados, seguidos de casos graves y en menor cantidad se reportaron casos leves. La única toxina STh-LT que se detectó en el estudio provenía de un caso moderado. Por su lado EPEC al igual que ETEC provenía en su mayoría de casos moderados pero sólo un caso procedía de un cuadro clínico grave y a diferencia de ETEC no se reportaron casos leves. La única cepa típica de EPEC reportada en el estudio se obtuvo de un caso moderado. El que no exista una diferencia significativa en la sintomatología entre los casos positivos y negativos, y que se presenten diversos cuadros clínicos, nos indica que es difícil conocer la etiología de la diarrea basándonos solamente en los síntomas del paciente por lo que es muy importante el diagnóstico de laboratorio para brindar una terapia adecuada.

La salud no sólo depende de la biología humana, también es consecuencia de las determinantes sociales. Según un informe publicado por la OMS (2008) las inequidades sanitarias son resultado de la situación en que la población crece, vive, trabaja y envejece, como también del tipo de sistemas que se utilizan para

combatir la enfermedad. Asimismo, las condiciones en que la gente vive y muere están determinadas por fuerzas políticas, sociales y económicas [OMS, 2008]. Por lo anterior se consideró importante describir algunas características socioeconómicas de los participantes, que pudieron haber influido en la transmisión de ETEC y EPEC.

Tomando en cuenta que el vehículo de transmisión de ETEC y EPEC es principalmente por agua y alimentos contaminados, se indagó sobre, cómo se obtenían estos suministros en los hogares de los participantes.

El agua que consumían los participantes en su mayoría era agua purificada tanto para casos negativos como positivos por diarrea. En cuanto al tipo de agua de consumo clorada o hervida sí hubo diferencia entre los dos grupos ya que el agua clorada fue mayor en los casos positivos y fue menos frecuente que hirvieran el agua con respecto a los casos negativos. Sin embargo estos resultados a pesar de mostrar algunas diferencias, no son significativas al aplicar la prueba estadística.

Los niños que resultaron positivos por ETEC y EPEC ingerían comida sólida en un 80%, lo que pudo ser una puerta de entrada para estos microorganismos, si los alimentos que consumían no estaban debidamente procesados. La obtención de estos alimentos tanto para casos positivos como negativos, provenían en su mayoría del supermercado, la mitad de los participantes los adquirían en el mercado y la quinta parte lo compraba en la tienda de venta de alimentos del barrio. Con mayor frecuencia estos niños consumían leche en polvo (63%), en

menor grado se combinaba la leche materna con la leche en polvo (32%) y en tan sólo un caso la alimentación era exclusivamente materna. Es importante que para futuros estudios de *E. coli* patogénica, se plantee en la encuesta una interrogante sobre el momento en que se le deja de brindar la leche materna al niño o si nunca se le proporcionó y de esta forma poder profundizar sobre la protección que aseguran algunos autores brinda dicha lactancia [Blake et al., 1993]. La OMS recomienda la lactancia materna durante los primeros seis meses de vida para prevenir enfermedades y evitar implicaciones en el desarrollo del niño. En nuestros resultados hubieron dos niños en los cuales se detectó ETEC, y a los que simplemente se les proporcionaba lactancia artificial teniendo tan sólo 3 meses de edad, lo que pudo predisponerlos a la infección.

En cuanto el acceso al agua potable la mayoría de los participantes disponían de este recurso, un porcentaje pequeño de los involucrados en el estudio debían comprar el agua a una cisterna u obtenerla de pozo, no sabemos con cuanta regularidad llega a las casas y qué tipo de almacenamiento emplean, lo que puede influir en la transmisión tanto para ETEC como de EPEC.

Los resultados en las características de las viviendas en los casos positivos fueron muy similares a los de los casos negativos y en la aplicación de la prueba estadística no hubo diferencia entre estos dos. En ambos grupos el tipo de piso de las viviendas era de ladrillo, seguido del cemento y cerámica, en menor grado se reportó el piso de tierra. La disposición de excretas al igual que el tipo de piso obtuvo resultados que coinciden con los casos negativos, como ser la utilización de sanitario en la mayoría de los casos y el uso de la letrina fue menos frecuente

utilizada en una quinta parte aproximadamente en ambos grupos, la defecación al aire libre solo se reportó en 2 de los casos negativos. En estas características también se aplicó la prueba “t”, para ver si existía alguna diferencia reveladora entre el grupo de casos positivos y el grupo de casos negativos, en la cual ninguna de estas características representó una diferencia significativa entre ambos grupos. Esto puede ser debido a que las diarreas tengan en común diversas fuentes de infección, por lo que las mejoras a las condiciones de vida solucionarían no solo la transmisión de ETEC y EPEC sino también reduciría la difusión de otros patógenos causantes de diarreas.

Existen otros serogrupos patogénicos de *E. coli* que son causantes de diarrea por lo que es necesario realizar otros estudios donde no sólo se investigue ETEC y EPEC sino también otros patotipos importantes para poder comparar y analizar, cuál de estos ocupa mayor atención. Además es esencial ejecutar estudios en muestras ambientales en los lugares donde más se reportan las diarreas para poder tomar medidas estrictas de higiene y ambientales que ayuden a prevenir la enfermedad a través de la educación.

CAPÍTULO 6: CONCLUSIONES

Se detectó tanto ETEC como EPEC por los métodos moleculares previstos, lo que resultó en un 19% de los aislamientos de *E. coli* provenientes de muestras fecales de niños menores de tres años. ETEC predominó más con un 15% mientras que EPEC fue menos frecuente con un 5%.

Se alcanzó a identificar todas las toxinas de ETEC con excepción de la toxina STp. La toxina TL se detectó en mayor porcentaje con un 64%, seguido de la toxina STh con un 29% y con un 7% ambas toxinas. Aunque EPEC fue menos frecuente que ETEC se identificaron ambas cepas, típicas y atípicas en un 20 y 80% respectivamente.

En Honduras, este es el primer estudio a nivel molecular de ETEC y EPEC en muestras diarreicas, donde se demuestra que cepas de ambos patotipos circulan en la zona urbana de Tegucigalpa y Comayagüela.

La falta de un diagnóstico diferenciado en la rutina clínica hace pasar desapercibidos algunos agentes bacterianos, poniendo a los infantes en desventaja en cuanto a la protección en la salud. Además la carencia de un diagnóstico de rutina no permite el adecuado manejo de la enfermedad según el agente patógeno que esté causando la diarrea.

El presente estudio será de utilidad en investigaciones futuras que se enfoquen en estos dos serogrupos de *E. coli*. En el caso particular de ETEC, es importante continuar con la investigación de los factores de colonización en las cepas encontradas y de esta forma coadyuvar a los esfuerzos mundiales para la elaboración de una vacuna.

CAPÍTULO 7: RECOMENDACIONES

Es importante seguir profundizando sobre los patógenos bacterianos causantes de diarreas, por lo que se recomienda investigar los demás serogrupos de *E.coli* patogénica y conocer cuáles de estos circulan tanto en zonas urbanas como rurales del país.

Se recomienda que para futuras investigaciones se aumente el nivel de confianza del estudio, y para esto se debe aumentar el número de muestras, por lo que se sugiere que se incluyan mayor número de instalaciones de salud, donde se cuente con el apoyo de personal tanto médico como de laboratorio para optimizar la colección de las muestras y el proceso de las mismas.

Es de vital importancia implementar metodologías de diagnóstico para la caracterización de ETEC y EPEC a nivel de Salud Pública ya que el diagnóstico oportuno y eficaz de la infección por ambos patógenos es un paso esencial para el pronóstico de la enfermedad.

E. coli es un microorganismo de la biota normal del intestino, por consiguiente también se encuentra en el ambiente, debido a lo anterior sería de utilidad realizar estudios de vigilancia en muestras ambientales y poder monitorear si las mismas cepas que se encuentran en el ambiente son las mismas que causan la diarrea.

Debido al considerable porcentaje reportado por ETEC en el presente estudio, se sugiere seguir investigando sobre las cepas circulantes y factores de colonización que estas expresan tanto en zonas urbanas como rurales, de esta forma se estaría colaborando con estudios internacionales enfocados en la elaboración de una vacuna que prevenga infecciones por este patógeno.

Los factores sociales repercuten en la salud de la población; el acceso a una vivienda digna, agua potable y servicios de saneamiento adecuado, permiten disminuir el riesgo de infectarse por estos patógenos al igual que otros agentes causantes de enfermedades. Por consiguiente la inversión en los servicios de salud sería menor si se mejorara la calidad de vida de las personas.

Nuestros resultados manifiestan la necesidad de mejorar la vigilancia de las infecciones gastrointestinales producidas por bacterias, por lo que se motiva a seguir investigando sobre la etiología de las diarreas aplicando otros diseños de estudios que permitan realizar asociaciones con determinadas variables.

Para futuros estudios se sugiere evaluar mediante la encuesta aspectos que ayuden a ejecutar un análisis más profundo mediante factores específicos de riesgo como el medio que utilizan de almacenaje de agua potable y con cuanta regularidad tienen acceso a la misma, además analizar posibles factores protectores como la lactancia materna

Se recomienda practicar en los hogares hábitos de higiene que reduzcan el riesgo de padecer infecciones por ETEC o EPEC, como ser: lavado de alimentos previo a su preparación, lavado de manos después de colocar el pañal del niño o después de ir al baño. Igualmente involucrarse en actividades que ayuden a conservar un entorno saludable como es, un buen manejo de los desechos sólidos que se generan en el hogar

La educación juega un papel importante en la prevención de enfermedades transmitidas por estos microorganismos, por lo que es esencial realizar campañas formativas desde muy temprana edad que instruyan sobre los beneficios que conlleva tener buenas prácticas de higiene en el hogar y conductas amigables con el ambiente.

CAPÍTULO 8: REFERENCIAS

- Afset JE, Bevanger L, Romundstad P, Bergh K. 2004. Association of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) with prolonged diarrhoea. *J Med Microbiol* 53(Pt 11):1137-1144.
- Albert MJ, Faruque SM, Faruque AS, Neogi PK, Ansaruzzaman M, Bhuiyan NA, Alam K, Akbar MS. 1995. Controlled study of *Escherichia coli* diarrheal infections in Bangladeshi children. *J Clin Microbiol* 33(4):973-977.
- Bando SY, Trabulsi LR, Moreira-Filho CA. 2007. Genetic relationship of diarrheagenic *Escherichia coli* pathotypes among the enteropathogenic *Escherichia coli* O serogroup. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 102(2):169-174.
- Bandyopadhyay S, Mahanti A, Samanta I, Dutta TK, Ghosh MK, Bera AK, Bhattacharya D. 2011. Virulence repertoire of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) from diarrhoeic lambs of Arunachal Pradesh, India. *Trop Anim Health Prod* 43(3):705-710.
- Begum YA, Talukder KA, Nair GB, Qadri F, Sack RB, Svennerholm AM. 2005. Enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from surface water in urban and rural areas of Bangladesh. *J Clin Microbiol* 43(7):3582-3583.
- Bell C, Kyriades A. 2000. *E. coli*. II, editor. Zaragoza, España
- Bendeck A, Larios ME, Zaldivar V. 1983. Estudio de la etiología de las diarreas infantiles en Honduras. *Revista Pediátrica* VOL. 9 - No. 1 - 2.
- Black RE, Morris SS, Bryce J. 2003. Where and why are 10 million children dying every year? *Lancet* 361(9376):2226-2234.
- Blackburn D, Husband A, Saldana Z, Nada RA, Klena J, Qadri F, Giron JA. 2009. Distribution of the *Escherichia coli* common pilus among diverse strains of human enterotoxigenic *E. coli*. *J Clin Microbiol* 47(6):1781-1784.
- Blake PA, Ramos S, MacDonald KL, Rassi V, Gomes TA, Ivey C, Bean NH, Trabulsi LR. 1993. Pathogen-specific risk factors and protective factors for acute diarrheal disease in urban Brazilian infants. *J Infect Dis* 167(3):627-632.
- Bolin I, Wiklund G, Qadri F, Torres O, Bourgeois AL, Savarino S, Svennerholm AM. 2006. Enterotoxigenic *Escherichia coli* with STh and STp genotypes is associated with diarrhea both in children in areas of endemicity and in travelers. *J Clin Microbiol* 44(11):3872-3877.
- Boom R, Sol CJ, Salimans MM, Jansen CL, Wertheim-van Dillen PM, van der Noordaa J. 1990. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J Clin Microbiol* 28(3):495-503.
- Campellone KG, Giese A, Tipper DJ, Leong JM. 2002. A tyrosine-phosphorylated 12-amino-acid sequence of enteropathogenic *Escherichia coli* Tir binds the host adaptor protein Nck and is required for Nck localization to actin pedestals. *Mol Microbiol* 43(5):1227-1241.
- Campos LC, Franzolin MR, Trabulsi LR. 2004. Diarrheagenic *Escherichia coli* categories among the traditional enteropathogenic *E. coli* O serogroups--a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 99(6):545-552.
- Cantillo A. 2005. *Manual de Bioseguridad* 2 ed. Fundación Universitaria Juan N Copas.
- Clarke SC, Haigh RD, Freestone PP, Williams PH. 2003. Virulence of enteropathogenic *Escherichia coli*, a global pathogen. *Clin Microbiol Rev* 16(3):365-378.

- Cleary J, Lai LC, Shaw RK, Straatman-Iwanowska A, Donnenberg MS, Frankel G, Knutton S. 2004. Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) adhesion to intestinal epithelial cells: role of bundle-forming pili (BFP), EspA filaments and intimin. *Microbiology* 150(Pt 3):527-538.
- Cohen MB, Nataro JP, Bernstein DI, Hawkins J, Roberts N, Staat MA. 2005. Prevalence of diarrheagenic *Escherichia coli* in acute childhood enteritis: a prospective controlled study. *J Pediatr* 146(1):54-61.
- Cravioto A, Reyes RE, Trujillo F, Uribe F, Navarro A, De La Roca JM, Hernandez JM, Perez G, Vazquez V. 1990. Risk of diarrhea during the first year of life associated with initial and subsequent colonization by specific enteropathogens. *Am J Epidemiol* 131(5):886-904.
- Dorsey FC, Fischer JF, Fleckenstein JM. 2006. Directed delivery of heat-labile enterotoxin by enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Cell Microbiol* 8(9):1516-1527.
- DuPont HL, Ericsson CD, Farthing MJ, Gorbach S, Pickering LK, Rombo L, Steffen R, Weinke T. 2009. Expert review of the evidence base for self-therapy of travelers' diarrhea. *J Travel Med* 16(3):161-171.
- Ericsson CD. 2003. Travellers' diarrhoea. *Int J Antimicrob Agents* 21(2):116-124.
- Esser C, Ahmadinejad N, Wiegand C, Rotte C, Sebastiani F, Gelius-Dietrich G, Henze K, Kretschmann E, Richly E, Leister D, Bryant D, Steel MA, Lockhart PJ, Penny D, Martin W. 2004. A genome phylogeny for mitochondria among alpha-proteobacteria and a predominantly eubacterial ancestry of yeast nuclear genes. *Mol Biol Evol* 21(9):1643-1660.
- Estrada-Garcia T, Lopez-Saucedo C, Thompson-Bonilla R, Abonce M, Lopez-Hernandez D, Santos JI, Rosado JL, DuPont HL, Long KZ. 2009. Association of diarrheagenic *Escherichia coli* Pathotypes with infection and diarrhea among Mexican children and association of atypical Enteropathogenic *E. coli* with acute diarrhea. *J Clin Microbiol* 47(1):93-98.
- Faruque AS, Malek MA, Khan AI, Huq S, Salam MA, Sack DA. 2004. Diarrhoea in elderly people: aetiology, and clinical characteristics. *Scand J Infect Dis* 36(3):204-208.
- Ferrera A, Enríquez L. 2008. Enterotoxigenic *E. coli*'s contamination in drinking water within peri-urban households in Tegucigalpa, Honduras--Advances. *Escuela de Microbiología, Universidad Nacional Autónoma de Honduras, Tegucigalpa, Honduras.*
- Figueroa M, Poujol E, Cosenza H, Kaminsky R, . 1990. Etiología de las Diarreas Infantiles en tres comunidades hondureñas, *Revista Médica Hondureña*, 58 pag, 212-220
- Frech SA, Dupont HL, Bourgeois AL, McKenzie R, Belkind-Gerson J, Figueroa JF, Okhuysen PC, Guerrero NH, Martinez-Sandoval FG, Melendez-Romero JH, Jiang ZD, Asturias EJ, Halpern J, Torres OR, Hoffman AS, Villar CP, Kassem RN, Flyer DC, Andersen BH, Kazempour K, Breisch SA, Glenn GM. 2008. Use of a patch containing heat-labile toxin from *Escherichia coli* against travellers' diarrhoea: a phase II, randomised, double-blind, placebo-controlled field trial. *Lancet* 371(9629):2019-2025.
- Geyer A, Crewe-Brown HH, Greeff AS, Fripp PJ, Steele AD, Van Schalkwyk TV, Clay CG. 1993. The microbial aetiology of summer paediatric gastroenteritis at Ga-Rankuwa Hospital in South Africa. *East Afr Med J* 70(2):78-81.
- Ghanekar Y, Chandrashaker A, Visweswariah SS. 2003. Cellular refractoriness to the heat-stable enterotoxin peptide is associated with alterations in levels of the differentially glycosylated forms of guanylyl cyclase C. *Eur J Biochem* 270(18):3848-3857.
- Ghosal A, Bhowmick R, Banerjee R, Ganguly S, Yamasaki S, Ramamurthy T, Hamabata T, Chatterjee NS. 2009. Characterization and studies of the cellular interaction of native

- colonization factor CS6 purified from a clinical isolate of enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Infect Immun* 77(5):2125-2135.
- Ghosal A, Bhowmick R, Nandy RK, Ramamurthy T, Chatterjee NS. 2007. PCR-based identification of common colonization factor antigens of enterotoxigenic *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol* 45(9):3068-3071.
- Gupta SK, Keck J, Ram PK, Crump JA, Miller MA, Mintz ED. 2008. Part III. Analysis of data gaps pertaining to enterotoxigenic *Escherichia coli* infections in low and medium human development index countries, 1984-2005. *Epidemiol Infect* 136(6):721-738.
- Gutierrez-Cazarez Z, Qadri F, Albert MJ, Giron JA. 2000. Identification of enterotoxigenic *Escherichia coli* harboring longus type IV pilus gene by DNA amplification. *J Clin Microbiol* 38(5):1767-1771.
- Heymann D. 2005. El control de las enfermedades transmisibles OPS, translator. II, editor. Washington,DC: American Public Health Association.
- INE. 2004. Encuesta de Condiciones de Vida, 2004 (ENCOVI), citado en Respuestas escritas del gobierno de honduras relativas a la lista de cuestiones (crc/c/hnd/q /3) formuladas por el comité en relación con el examen del tercero informe periódico de honduras (crc/c/hnd/3). Honduras.
- Isidean SD, Riddle MS, Savarino SJ, Porter CK. 2011. A systematic review of ETEC epidemiology focusing on colonization factor and toxin expression. *Vaccine* 29(37):6167-6178.
- Jarvis KG, Giron JA, Jerse AE, McDaniel TK, Donnenberg MS, Kaper JB. 1995. Enteropathogenic *Escherichia coli* contains a putative type III secretion system necessary for the export of proteins involved in attaching and effacing lesion formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(17):7996-8000.
- Jiang ZD, Lowe B, Verenkar MP, Ashley D, Steffen R, Tornieporth N, von Sonnenburg F, Waiyaki P, DuPont HL. 2002. Prevalence of enteric pathogens among international travelers with diarrhea acquired in Kenya (Mombasa), India (Goa), or Jamaica (Montego Bay). *J Infect Dis* 185(4):497-502.
- Kaper JB, Nataro JP, Mobley HL. 2004. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol* 2(2):123-140.
- Kenny B, DeVinney R, Stein M, Reinscheid DJ, Frey EA, Finlay BB. 1997. Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) transfers its receptor for intimate adherence into mammalian cells. *Cell* 91(4):511-520.
- Khatib LA, Tsai YL, Olson BH. 2002. A biomarker for the identification of cattle fecal pollution in water using the LTIIa toxin gene from enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol* 59(1):97-104.
- Kosek M, Bern C, Guerrant RL. 2003. The global burden of diarrhoeal disease, as estimated from studies published between 1992 and 2000. *Bull World Health Organ* 81(3):197-204.
- Lemus. 2006. *Escherichia coli* enterotoxigénica, toxinas y factores de colonización intestinal en población preescolar que consulta por diarrea deshidratante en dos Centros Hospitalarios de la Ciudad de Guatemala. Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia:92.
- Lilius EM, Marnila P. 2001. The role of colostral antibodies in prevention of microbial infections. *Curr Opin Infect Dis* 14(3):295-300.
- Lopez-Saucedo C, Cerna JF, Villegas-Sepulveda N, Thompson R, Velazquez FR, Torres J, Tarr PI, Estrada-Garcia T. 2003. Single multiplex polymerase chain reaction to detect diverse loci associated with diarrheagenic *Escherichia coli*. *Emerg Infect Dis* 9(1):127-131.

- Lothigius A, Sjoling A, Svennerholm AM, Bolin I. 2010. Survival and gene expression of enterotoxigenic *Escherichia coli* during long-term incubation in sea water and freshwater. *J Appl Microbiol* 108(4):1441-1449.
- Mayatepek E, Seebass E, Hingst V, Kroeger A, Sonntag HG. 1993. Prevalence of enteropathogenic and enterotoxigenic *Escherichia coli* in children with and without diarrhoea in Esteli, Nicaragua. *J Diarrhoeal Dis Res* 11(3):169-171.
- MINSA-NIC. 2004. Boletín Epidemiológico Ministerio de Salud, Nicaragua. <http://www.minsa.gob.ni/vigepi/html/boletin/2004/semana47/editorial47.pdf>.
- Nair GB, Takeda Y. 1998. The heat-stable enterotoxins. *Microb Pathog* 24(2):123-131.
- Nataro JP, Kaper JB. 1998. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev* 11(1):142-201.
- Nicoll A. 2000. Integrated management of childhood illness in resource-poor countries: an initiative from the World Health Organization. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 94(1):9-11.
- Nougayrede JP, Fernandes PJ, Donnenberg MS. 2003. Adhesion of enteropathogenic *Escherichia coli* to host cells. *Cell Microbiol* 5(6):359-372.
- Ochoa T. 2010. Alcances sobre la situación epidemiológica de las *E. coli* diarreogénicas aisladas de niños peruanos. Instituto de Medicina Tropical Alexander von Humboldt, Universidad Peruana Cayetano Heredia.
- OMS. 2008. Subsanan la desigualdad en una generación. Informe final de la Comisión sobre Determinantes Sociales de la Salud. Ginebra.
- OPS. 2009. Perfil del sistema nacional de salud Honduras. Monitoreo y análisis de los procesos de reforma. Washington : Organización Panamericana de la Salud, 2009
- Orlandi PP, Magalhaes GF, Matos NB, Silva T, Penatti M, Nogueira PA, Silva LH. 2006. Etiology of diarrheal infections in children of Porto Velho (Rondonia, Western Amazon region, Brazil). *Braz J Med Biol Res* 39(4):507-517.
- Palmeira P, Carbonare SB, Amaral JA, Tino-De-Franco M, Carneiro-Sampaio MM. 2005. Colostrum from healthy Brazilian women inhibits adhesion and contains IgA antibodies reactive with Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *Eur J Pediatr* 164(1):37-43.
- Peabody CR, Chung YJ, Yen MR, Vidal-Ingigliardi D, Pugsley AP, Saier MH, Jr. 2003. Type II protein secretion and its relationship to bacterial type IV pili and archaeal flagella. *Microbiology* 149(Pt 11):3051-3072.
- Petri WA, Jr., Miller M, Binder HJ, Levine MM, Dillingham R, Guerrant RL. 2008. Enteric infections, diarrhea, and their impact on function and development. *J Clin Invest* 118(4):1277-1290.
- Pierce NF, Kaper JB, Mekalanos JJ, Cray WC, Jr. 1985. Role of cholera toxin in enteric colonization by *Vibrio cholerae* O1 in rabbits. *Infect Immun* 50(3):813-816.
- Puerta-García M-R. 2010. Actualización en Enterobacterias. Unidad de Enfermedades Infecciosas, Servicio de Medicina Interna Complejo Hospitalario Universitario de Albacete.
- Qadri F, Das SK, Faruque AS, Fuchs GJ, Albert MJ, Sack RB, Svennerholm AM. 2000a. Prevalence of toxin types and colonization factors in enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated during a 2-year period from diarrheal patients in Bangladesh. *J Clin Microbiol* 38(1):27-31.
- Qadri F, Giron JA, Helander A, Begum YA, Asaduzzaman M, Xicohtencatl-Cortés J, Negrete E, Albert MJ. 2000b. Human antibody response to longus type IV pilus and study of its prevalence among enterotoxigenic *Escherichia coli* in Bangladesh by using monoclonal antibodies. *J Infect Dis* 181(6):2071-2074.

- Qadri F, Saha A, Ahmed T, Al Tarique A, Begum YA, Svennerholm AM. 2007. Disease burden due to enterotoxigenic *Escherichia coli* in the first 2 years of life in an urban community in Bangladesh. *Infect Immun* 75(8):3961-3968.
- Qadri F, Svennerholm AM, Faruque AS, Sack RB. 2005. Enterotoxigenic *Escherichia coli* in developing countries: epidemiology, microbiology, clinical features, treatment, and prevention. *Clin Microbiol Rev* 18(3):465-483.
- Qadri F, Wenneras C, Ahmed F, Asaduzzaman M, Saha D, Albert MJ, Sack RB, Svennerholm A. 2000c. Safety and immunogenicity of an oral, inactivated enterotoxigenic *Escherichia coli* plus cholera toxin B subunit vaccine in Bangladeshi adults and children. *Vaccine* 18(24):2704-2712.
- Rao MR, Abu-Elyazeed R, Savarino SJ, Naficy AB, Wierzba TF, Abdel-Messih I, Shaheen H, Frenck RW, Jr., Svennerholm AM, Clemens JD. 2003. High disease burden of diarrhea due to enterotoxigenic *Escherichia coli* among rural Egyptian infants and young children. *J Clin Microbiol* 41(10):4862-4864.
- Rendon MA, Saldana Z, Erdem AL, Monteiro-Neto V, Vazquez A, Kaper JB, Puente JL, Giron JA. 2007. Commensal and pathogenic *Escherichia coli* use a common pilus adherence factor for epithelial cell colonization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(25):10637-10642.
- Rivera-Jacinto M, Rodriguez-Ulloa C, López-Orbegoso J. 2009. Fecal contamination in green vegetables that are sold in markets of Cajamarca city, Peru. *Rev peru med exp salud publica* v26 n1
- Rivero MA, Passucci JA, Rodriguez EM, Parma AE. 2010. Role and clinical course of verotoxigenic *Escherichia coli* infections in childhood acute diarrhoea in Argentina. *J Med Microbiol* 59(Pt 3):345-352.
- Riverón R. 1999. Fisiopatología de la Diarrea Aguda. *Rev Cubana Pediatr* 71(2):86-115.
- Riveros M, Barletta F, Cabello M, Durand D, Mercado EH, Contreras C, Rivera FP, Mosquito S, Lluque A, Ochoa TJ. 2011. [Adhesion patterns in diffusely adherent *Escherichia coli* (DAEC) strains isolated from children with and without diarrhea]. *Rev Peru Med Exp Salud Publica* 28(1):21-28.
- Robins-Browne RM, Bordun AM, Tauschek M, Bennett-Wood VR, Russell J, Oppedisano F, Lister NA, Bettelheim KA, Fairley CK, Sinclair MI, Hellard ME. 2004. *Escherichia coli* and community-acquired gastroenteritis, Melbourne, Australia. *Emerg Infect Dis* 10(10):1797-1805.
- Rockabrand DM, Shaheen HI, Khalil SB, Peruski LF, Jr., Rozmajzl PJ, Savarino SJ, Monteville MR, Frenck RW, Svennerholm AM, Putnam SD, Sanders JW. 2006. Enterotoxigenic *Escherichia coli* colonization factor types collected from 1997 to 2001 in US military personnel during operation Bright Star in northern Egypt. *Diagn Microbiol Infect Dis* 55(1):9-12.
- Rodas C, Iniguez V, Qadri F, Wiklund G, Svennerholm AM, Sjoling A. 2009. Development of multiplex PCR assays for detection of enterotoxigenic *Escherichia coli* colonization factors and toxins. *J Clin Microbiol* 47(4):1218-1220.
- Rodriguez G-A, M. 2002. Principal characteristics and diagnosis of the pathogenic groups of *Escherichia coli*. *Salud Publica de Mexico* 44:464.
- Romero HB, editor. 2002. *Síndrome Diarreico Infeccioso*. Mexico D.F: Medica panamericana. 96 p.
- Rowland MG. 1986. The Gambia and Bangladesh: the seasons and diarrhoea. *Dialogue Diarrhoea*(26):3.
- Rudin A, Olbe L, Svennerholm AM. 1996. Monoclonal antibodies against fimbrial subunits of colonization factor antigen I (CFA/I) inhibit binding to human enterocytes and protect

- against enterotoxigenic *Escherichia coli* expressing heterologous colonization factors. *Microb Pathog* 21(1):35-45.
- Sack RB. 2011. The discovery of cholera - like enterotoxins produced by *Escherichia coli* causing secretory diarrhoea in humans. *Indian J Med Res* 133:171-180.
- Sampieri. 2006. *Metodología de la Investigación*. McGraw-Hill 4 ed:460 pag.
- Samuel S, Vadivelu J, Parasakthi N. 1997. Characteristics of childhood diarrhea associated with enterotoxigenic *Escherichia coli* in Malaysia. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 28(1):114-119.
- Schultsz C, Pool GJ, van Ketel R, de Wever B, Speelman P, Dankert J. 1994. Detection of enterotoxigenic *Escherichia coli* in stool samples by using nonradioactively labeled oligonucleotide DNA probes and PCR. *J Clin Microbiol* 32(10):2393-2397.
- Secretaria-Salud. 2009. Boletín informativo sobre estadística de la diarrea, 2009. Honduras.
- Shaheen HI, Abdel Messih IA, Klena JD, Mansour A, El-Wakkeel Z, Wierzba TF, Sanders JW, Khalil SB, Rockabrand DM, Monteville MR, Rozmajzl PJ, Svennerholm AM, Frenck RW. 2009. Phenotypic and genotypic analysis of enterotoxigenic *Escherichia coli* in samples obtained from Egyptian children presenting to referral hospitals. *J Clin Microbiol* 47(1):189-197.
- Shaheen HI, Kamal KA, Wasfy MO, El-Ghorab NM, Lowe B, Steffen R, Kodkani N, Amsler L, Waiyaki P, David JC, Khalil SB, Peruski LF, Jr. 2003. Phenotypic diversity of enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) isolated from cases of travelers' diarrhea in Kenya. *Int J Infect Dis* 7(1):35-38.
- Shaw RK, Daniell S, Ebel F, Frankel G, Knutton S. 2001. EspA filament-mediated protein translocation into red blood cells. *Cell Microbiol* 3(4):213-222.
- Steinsland H, Valentiner-Branth P, Gjessing HK, Aaby P, Molbak K, Sommerfelt H. 2003a. Protection from natural infections with enterotoxigenic *Escherichia coli*: longitudinal study. *Lancet* 362(9380):286-291.
- Steinsland H, Valentiner-Branth P, Grewal HM, Gaastra W, Molbak KK, Sommerfelt H. 2003b. Development and evaluation of genotypic assays for the detection and characterization of enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 45(2):97-105.
- Svennerholm AM, Holmgren J. 1995. Oral vaccines against cholera and enterotoxigenic *Escherichia coli* diarrhea. *Adv Exp Med Biol* 371B:1623-1628.
- Tauschek M, Gorrell RJ, Strugnell RA, Robins-Browne RM. 2002. Identification of a protein secretory pathway for the secretion of heat-labile enterotoxin by an enterotoxigenic strain of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(10):7066-7071.
- Touchon M, Hoede C, Tenaillon O, Barbe V, Baeriswyl S, Bidet P, Bingen E, Bonacorsi S, Bouchier C, Bouvet O, Calteau A, Chiapello H, Clermont O, Cruveiller S, Danchin A, Diard M, Dossat C, Karoui ME, Frapy E, Garry L, Ghigo JM, Gilles AM, Johnson J, Le Bouguenec C, Lescat M, Mangenot S, Martinez-Jehanne V, Matic I, Nassif X, Oztas S, Petit MA, Pichon C, Rouy Z, Ruf CS, Schneider D, Tourret J, Vacherie B, Vallenet D, Medigue C, Rocha EP, Denamur E. 2009. Organised genome dynamics in the *Escherichia coli* species results in highly diverse adaptive paths. *PLoS Genet* 5(1):e1000344.
- Trabulsi LR, Keller R, Tardelli Gomes TA. 2002. Typical and atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. *Emerg Infect Dis* 8(5):508-513.
- Turner SM, Scott-Tucker A, Cooper LM, Henderson IR. 2006. Weapons of mass destruction: virulence factors of the global killer enterotoxigenic *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett* 263(1):10-20.
- UNICEF/COPANAPLAM. 2000. Avances en el cumplimiento de las metas de la cumbre mundial en favor de la infancia. INFORME FINAL DE UNICEF Y COPANAPLAM, Febrero 2000.

- Valvatne H, Steinsland H, Sommerfelt H. 2002. Clonal clustering and colonization factors among thermolabile and porcine thermostable enterotoxin-producing *Escherichia coli*. *APMIS* 110(9):665-672.
- Varela. 2007. *Escherichia coli* enteropatógeno clásico (EPEC) asociado a casos de diarrea en niños usuarios del Hospital Pereira Rossell. Aspectos clínicos y características de las cepas involucradas. *Uruguayan medical journal* 23.
- Vidal JE, Canizalez-Roman A, Gutierrez-Jimenez J, Navarro-Garcia F. 2007. [Molecular pathogenesis, epidemiology and diagnosis of enteropathogenic *Escherichia coli*]. *Salud Publica Mex* 49(5):376-386.
- Vilchez S, Reyes D, Paniagua M, Bucardo F, Mollby R, Weintraub A. 2009. Prevalence of diarrhoeagenic *Escherichia coli* in children from Leon, Nicaragua. *J Med Microbiol* 58(Pt 5):630-637.
- Wennergren C, Erling V. 2004. Prevalence of enterotoxigenic *Escherichia coli*-associated diarrhoea and carrier state in the developing world. *J Health Popul Nutr* 22(4):370-382.
- WHO. 1987. -World Health Organization- Programme for control of diarrheal diseases; Manual for laboratory investigations of acute enteric infections. .
- WHO. 2008. The treatment of diarrhoea: a manual for physicians and other senior health workers. Washington, D.C.: World Health Organization & AIEPI.
- Wong AR, Pearson JS, Bright MD, Munera D, Robinson KS, Lee SF, Frankel G, Hartland EL. 2011. Enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: even more subversive elements. *Mol Microbiol* 80(6):1420-1438.
- Yatsuyanagi J, Saito S, Miyajima Y, Amano K, Enomoto K. 2003. Characterization of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strains harboring the *astA* gene that were associated with a waterborne outbreak of diarrhea in Japan. *J Clin Microbiol* 41(5):2033-2039.
- Zelaya A, editor. 2009. Manual de Bioseguridad Laboratorio Clínico. Tegucigalpa

ANEXOS

ANEXO I

Características bioquímicas de *Escherichia coli*

Bioquímica	Reacción o Enzima	<i>E. coli</i>
Citrato	Utilización del citrato	negativo
Urea	Ureasa	negativo
Fenil	desaminación de la fenilalanina	negativo
Lisina	Lisina descarboxilasa	positivo
Arabinosa	Fermentación/ oxidación de arabinosa	variable
Dulcitol	Utilización del dulcitol	variable
Indol	producción de Indol	positivo
Ornitina	Ornitina descarboxilasa	variable
Glucosa	Fermentación de glucosa	positivo
Lactosa	Fermentación/ oxidación de la lactosa	positivo
H ₂ S	Producción de H ₂ S	negativo

ANEXO II

SERTIPOS Y SEROGRUPOS MÁS COMUNES DE *ESCHERICHIA COLI* CAUSANTE DE DIARREA

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

ETEC *E. coli* enterotoxigénica
 EIEC *E. coli* enteroinvasiva
 NT: no tipificable. EPEC *E. coli* enteropatógena

EAEC *E. coli* enteroagregativa
 R: rugosa
 STEC *E. coli* productora de toxina shiga

Modificado de: Bopp C *et al*, Eslava C *et al*,2 Nataro J *et al*4 y World Health Organization Guadalupe Rodríguez-Angeles, M *et al*. 2002

ANEXO III

FICHA DE RECOLECCION DE DATOS

Unidad de Salud: Centro de Salud Alonso Suazo () Centro de Alonso Suazo () Hospital Escuela ()

Nombre _____ Expediente _____

Fecha actual _____ Fecha de nacimiento _____ Edad: _____ (años) _____ (meses)

Sexo: M () F ()

Domicilio: _____

Fecha de inicio de la diarrea _____ No. de evacuaciones al día _____

Evacuaciones con sangre: NO () SI () Vómitos: NO () SI () No. de vómitos al día _____ Fiebre NO () SI () Temperatura máxima _____ °C No cuantificada ()

Deshidratación: NO () SI () Choque () Hospitalización NO () SI () Centro _____

Manejo: Sales de rehidratación oral NO () SI () En casa () En centro de salud ()

En hospital () Hidratación endovenosa NO () SI () Centro _____

Alimentación: Lactancia materna exclusiva NO () SI () No aplica ()

Lactancia artificial: NO () SI () No aplica () Lactancia mixta NO () SI () No aplica ()

Persona que cuida al niño(a): madre () padre () abuela () tía () vecina () empleada ()

Vivienda. Disposición de excretas: Servicio sanitario () Letrina () Defecación al aire libre ()

Basura: Tren de aseo () Queman la basura () Botan la basura en solar baldío ()

Agua: Potable () Pozo () Compra a Cisterna ()

Ingiere: Agua purificada () Agua clorada () Agua hervida () Ningún tratamiento ()

Anexo IV

Procedimiento: Aislamiento e Identificación de *Escherichia coli*

1. Evaluar el tamaño de la muestra, enviarla en contenedores de transporte adecuado. Etiquetarla debidamente acompañada de su respectivo formulario de proyecto.

Utilizar una libreta para registrar el número que se le asigno a la muestra y las características propias de esta.

2. La muestra de heces se sembraran en Mac Conkey el cual es un medio selectivo para bacterias Gram negativas, los cultivos se incubaran a una temperatura de 35°C en un tiempo de 18 a 24 horas.

3. Lectura de las placas: las colonias que se identifiquen como *Escherichia coli* tendrán una morfología; circular de color rojo con un halo turbio no mucoso.

Realizar las siguientes pruebas bioquímicas para confirmar la presencia de *Escherichia coli*: Urea de Christensen, Fenilalanina, Citrato de Simmons, Lisina, Caldo arabinosa, Caldo Dulcitol, MIO y Kligler.

4. Lectura de las bioquímicas siguiendo el cuadro del Anexo 1 de este Documento.

5. Las cepas que resulten positivas para *Escherichia coli* se inocularan en PBS para su conservación.

8. Descartar el material contaminado siguiendo el Procedimiento Operativo Estándar elaborado para tal efecto.

I. Referencias

- Poujol. 1995. Microbiología Clínica. Primera Edición. Tegucigalpa Honduras. Pag.247.
Vilchez, S. 2011. Caracterización Molecular y Tipificación Bioquímica de E. coli Patogénicas. León Nicaragua.

Anexo V

Procedimiento para la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) multiplex para la detección de EPEC y ETEC

Preparación del MASTER MIX o mezcla maestra para EPEC

Reactivo	CONCENTRACION	µl/tubo	Total Tubos	Vol. Total
10 X Buffer	10 X			
DNTPs	2.5 mM			
Primer 1: eae F	100 mM			
Primer 2: eae R	100 mM			
Primer 3: bfp F	100 mM			
Primer 4: bfp R	100 Mm			
Agua HPLC				
MgCl ₂	50 mM			
TAQ	5 U/ml			
Volumen Mezcla				
Volumen Muestra				
Volumen Total				

Primers utilizados para los genes a detectar de EPEC

SECUENCIA DEL PRIMER EPEC	PESO MOLECULAR
Primer 1: eae F CATTATGGAACGGCAGAGGT-	eae: 376 pb
Primer 2: eae R ATCTTCTGCGTACTGCGTTCA-	
Primer 3: bfp F AATGGTGCTTGCGCTTGCTGC-	bfp: 367 pb
Primer 4: bfp R GCCGCTTTATCCAACCTGGTA-	

Preparación del MASTER MIX o mezcla maestra para ETEC

Reactivo	Concentración	µl/tubo	Total Tubos	Vol. Total
10 X Buffer	10 X	5		
DNTPs	2.5 mM	2		
Primer 1: ST forw kb	100 mM	1		
Primer 2: ST Gr	100 mM	1		
Primer 3: STP F1	100 mM	1		
Primer 4: STP R2	100 mM	1		
Primer 5: LT kb forw	100 mM	1		
Primer 6: LT kbrev	100 mM	1		
Agua HPLC		33.9		
MgCl ₂	50 mM	0.8		
TAQ	5 U/ml	0.3		
Volumen Mezcla		48		
Volumen Muestra		2		
Volumen Total		50		

Primers utilizados para los genes a detectar de ETEC

SECUENCIA DEL PRIMER ETEC	PESO MOLECULAR
Primer 1: ST F -AGTGGTCCTGAAAGCATG-	STh: 64 pb
Primer 2: ST R -TACAAGCAGGATTACAACAC-	
Primer 3: STP F -TCTTTCCCCTCTTTTAGTCAG-	STp: 166 pb
Primer 4: STP R ACAGGCAGGATTACAACAAAG-	
Primer 5: LT F -ACGGCGTTACTATCCTCTC-	LT: 274 pb
Primer 6: LT R -TGGTCTCGGTCAGATATGTG-	

- Se calcula el número total de tubos de muestras y se agrega un control negativo del cuarto blanco y un control positivo. Este es el factor por el que se multiplica el volumen por tubo para obtener el volumen por reactivo a agregar para preparar la mezcla maestra. Esta mezcla maestra se prepara en el cuarto blanco, en un Eppendorf de 1.5 mL, dentro de la campana de flujo laminar, con el filtro encendido, midiendo rápida y precisamente cada ingrediente. Se usa un bloque congelado a -20°C ó a -70°C , pero al sentir que el bloque se descongela se debe usar hielo picado. Debe trabajarse rápido para prevenir que se hibridicen entre sí mismos los iniciadores y se mire una ancha banda de primers dimerizados. El proceso de amplificación lleva alrededor de 3 horas.

PREPARACIÓN GEL

1. Para la preparación del gel se deben preparar 150 mL de TBE 0.5 X (15 mL de TBE 5X + 135 mL de Agua destilada estéril).
2. El gel a utilizar debe ser de 2% de agarosa. Pesar 3 gramos de Agarosa Sigma y disolverlo en los 150 mL de TBE 0.5X.
3. Colocar en el microondas por alrededor de 2 minutos, agitar constantemente. Disolver todos los cristales.
4. Esperar a que se enfríe un poco aproximadamente 65°C y agregar 5 μl de bromuro de etidio 10 mg/ml.
5. Verter en un molde. Esperar que se solidifique y meter en el refrigerador. Quitar lentamente los peines para no romper los posos ni levantar el gel.

INOCULACIÓN DEL GEL

1. Sumergir el gel en el buffer de corrida (TBE 0.5X) a manera de cubrir bien los posos.

2. Colocar primero el marcador de peso molecular (100 pb). Se utilizan 5 μ l de marcador + 4 μ l de buffer de carga.
3. De cada muestra servir 20 μ l de producto + 4 μ l de buffer de carga.
4. Al terminar de servir las muestras colocar nuevamente el marcador de peso molecular.
5. Conectar a la fuente de poder con un voltaje de 32 mA por 2 horas.

TOMA DE FOTOGRAFIA

1. Al pasar las dos horas se coloca el gel en su molde sobre el transiluminador y se enciende la luz UV.
2. Se observan las bandas y si los controles positivos y negativos se observan bien y se puede calcular el peso molecular de las bandas observadas, se procede a tomar una foto con el cono y la cámara Cannon.
3. Al encender la cámara puede centrarse la foto y se ajusta al mayor tamaño posible.
4. Una vez tomada la foto se pasa a la computadora para documentar el resultado del experimento.

ANEXO VI

CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPAR COMO VOLUNTARIO EN EL ESTUDIO DE INVESTIGACION

“PATOGENOS ENTERICOS ASOCIADOS A DIARREAS EN NIÑOS MENORES DE 3 AÑOS”

INVESTIGADORA PRINCIPAL

Dra. Lourdes Madrid, Profesor, Escuela de Microbiología, Universidad Nacional Autónoma de Honduras
Dra. Annabelle Ferrera, Profesor, Escuela de Microbiología, Universidad Nacional Autónoma de Honduras

Maestría en Enfermedades Infecciosas y Zoonóticas, Escuela de Microbiología, Universidad Nacional Autónoma de Honduras, UNAH

PARA PROTEGER LOS DERECHOS Y EL BIENESTAR DE LAS PERSONAS QUE PODRÍAN PARTICIPAR, ESTE ESTUDIO HA SIDO APROBADO POR EL COMITÉ DE ÉTICA DE INVESTIGACIÓN DE LA MAESTRÍA EN ENFERMEDADES INFECCIOSAS Y ZONÓTICAS DE LA FACULTAD DE CIENCIAS DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE HONDURAS

Nombre del Participante: _____ Código: _____

Entiendo que mi hijo(a) menor de edad ha sido invitado/as participar en el estudio de investigación titulado “**PATOGENOS ENTERICOS ASOCIADOS A DIARREAS EN NIÑOS MENORES DE 3 AÑOS**”.

Yo doy testimonio que los entrevistadores me han explicado en detalle todos los aspectos del estudio en forma verbal y escrita en la carta de invitación del estudio arriba mencionado.

Yo aquí doy testimonio que he aceptado esta invitación a participar en el estudio y/o he aceptado en nombre de mi hijo(a) menor. Yo he tomado esta decisión basado en la información que he recibido y/o leído. Yo he tenido la oportunidad de recibir los detalles adicionales que he querido sobre el estudio y entiendo que puedo hacer preguntas en el futuro.

Yo entiendo que mi participación es LIBRE Y VOLUNTARIA; que puedo rehusar a contestar algunas preguntas, dar información o muestra de heces en cualquier momento del estudio y aunque inicialmente decida participar, yo puedo cambiar de parecer más adelante y puedo retirarme del estudio en cualquier momento, sin consecuencias negativas para mí o mi familia.

Yo entiendo que los investigadores me contactarán en un centro asistencial tal como me lo informaron en la carta de invitación y que me harán preguntas personales, sobre mi salud, y mi historia pasada en relación a diarreas y daré una muestra de heces de mi hijo a los investigadores la cual será analizada en el laboratorio de la escuela de microbiología de la UNAH, para saber cuál es la causa de la diarrea.

Yo entiendo que si tengo más preguntas sobre el estudio, puedo contactar a la Doctora Annabelle Ferrera llamando al número de teléfono: 232-5836 o visitándola en la Escuela de Microbiología, UNAH localizado en el Edificio CB 4to piso, Boulevard Suyapa, Tegucigalpa.

Yo entiendo que recibiré una copia firmada del formato de consentimiento para mi propio registro.

Divulgación de la información de los registros médicos:

Yo _____ aquí autorizo la divulgación de la información de mis registros médicos a los investigadores que hacen parte del estudio “**PATOGENOS ENTERICOS ASOCIADOS A DIARREAS EN NIÑOS MENORES DE 3 AÑOS**” para el propósito de la investigación.

Yo he leído y entendido la información contenida en éste documento.

Yo acepto voluntariamente participar en este estudio de investigación.

Nombre del Participante

Firma del Participante

Fecha

Persona Autorizada que Acepta la Participación

Firma de la Persona Autorizada que Acepta la Participación

Fecha

ANEXO VII

Hoja de Bioseguridad de *Escherichia coli* Enterotoxigénica

MATERIAL SAFETY DATA SHEET - INFECTIOUS SUBSTANCES

SECTION I - INFECTIOUS AGENT

NAME: *Escherichia coli*, enterotoxigenic

SYNONYM OR CROSS REFERENCE: ETEC, traveller's diarrhea, gastroenteritis

CHARACTERISTICS: Gram negative rod; motile, aerobic; produces a heat labile enterotoxin (LT) and a heat stabile enterotoxin (ST)

SECTION II - HEALTH HAZARD

PATHOGENICITY: Self-limiting cholera-like disease in infants and adults; profuse watery diarrhea without blood or mucous; abdominal cramping, vomiting, acidosis, prostration, malaise and dehydration can occur; fever may or may not be present; symptoms usually lasts fewer than 5 days

EPIDEMIOLOGY: Usually sporadic, particularly in underdeveloped countries; may cause common source outbreaks; one of two major leading causes of diarrhea in children in developing countries; has become the leading bacterial cause of gastroenteritis outbreaks on cruise ships; accounts for 40-60% of all cases of traveller's diarrhea

HOST RANGE: Humans, livestock, most mammals; species specific, no known non - human hosts for human ETEC

INFECTIOUS DOSE: 100,000,000 organisms to 10,000,000,000 organisms (10^8 to 10^{10}) by ingestion

MODE OF TRANSMISSION: Fecal-oral route; poor sanitation; fecal contamination of food, water or fomites; poor personal hygiene

INCUBATION PERIOD: 24-72 hours

COMMUNICABILITY: Communicable for duration of fecal excretion (several weeks)

SECTION III - DISSEMINATION

RESERVOIR: Humans, animals; ETEC infections are largely species specific; humans constitute the reservoir for strains causing diarrhea in humans

ZOONOSIS: No

VECTORS: None

SECTION IV - VIABILITY

DRUG SUSCEPTIBILITY: Sensitive to wide spectrum of antibiotics; quinolones first choice treatment worldwide

DRUG RESISTANCE: tetracyclines, trimethoprim-sulfamethorazole approximately 40%

SUSCEPTIBILITY TO DISINFECTANTS: Susceptible to many disinfectants - 1% sodium hypochlorite, 70% ethanol, glutaraldehyde, iodines, phenolics, formaldehyde

PHYSICAL INACTIVATION: Inactivated by moist heat (121° C for at least 15 min) and dry heat (160-170° C for at least 1 hour)

SURVIVAL OUTSIDE HOST: Dust 4 to 27 days; feces - up to 84 days; fingertip - 45 min; soil - up to 84 days

SECTION V - MEDICAL

SURVEILLANCE: Monitor for symptoms; confirm bacteriologically

FIRST AID/TREATMENT: Electrolyte fluid therapy (oral or IV); antibiotics may be administered in very severe cases

IMMUNIZATION: oral vaccine under development

PROPHYLAXIS: Short term antibiotic therapy with TMP-SMX or doxycycline for travellers going to high-risk areas with no safe food or water

SECTION VI - LABORATORY HAZARDS

LABORATORY-ACQUIRED INFECTIONS: 2 reported cases of laboratory infections with *E. coli*

SOURCES/SPECIMENS: Feces; contaminated food, water, fomites

PRIMARY HAZARDS: Ingestion

SPECIAL HAZARDS: None

SECTION VII - RECOMMENDED PRECAUTIONS

CONTAINMENT REQUIREMENTS: Biosafety level 2 practices, containment equipment and facilities for activities involving cultures and infected clinical materials

PROTECTIVE CLOTHING: Laboratory coat; gloves when contact with infectious materials is unavoidable

OTHER PRECAUTIONS: Good personal hygiene and frequent handwashing

SECTION VIII - HANDLING INFORMATION

SPILLS: Allow aerosols to settle; wearing protective clothing, gently cover spill with absorbent paper towel and apply 1% sodium hypochlorite, starting at perimeter and working towards the centre; allow sufficient contact time (30 min) before clean up

DISPOSAL: Decontaminate before disposal; steam sterilization, chemical disinfection

STORAGE: In sealed containers that are appropriately labelled

SECTION IX - MISCELLANEOUS INFORMATION

Date prepared: January, 2001

Prepared by: Office of Laboratory Security, PHAC

Although the information, opinions and recommendations contained in this Material Safety Data Sheet are compiled from sources believed to be reliable, we accept no responsibility for the accuracy, sufficiency, or reliability or for any loss or injury resulting from the use of the information. Newly discovered hazards are frequent and this information may not be completely up to date.

ANEXO VIII

Hoja de Bioseguridad de *Escherichia coli* Enteropatógena

MATERIAL SAFETY DATA SHEET - INFECTIOUS SUBSTANCES

SECTION I - INFECTIOUS AGENT

NAME: *Escherichia coli*, enteropathogenic

SYNONYM OR CROSS REFERENCE: EPEC, attaching and effacing *E. coli* (AEEC), enteroadherent *E. coli* (EAEC), acute diarrhea, infantile diarrheal disease

CHARACTERISTICS: Gram negative rod; motile, aerobic; non - enterotoxin producing and non - enteroinvasive; serogroups possess an antigenic adherence factor (bundle-forming pili BFP); serotyping to determine somatic and flagellar antigens

SECTION II - HEALTH HAZARD

PATHOGENICITY: Intestinal disease accompanied by watery diarrhea, fever, cramps and vomiting; bloody stool in some cases; serious disease in infants

EPIDEMIOLOGY: Associated with outbreaks of acute diarrheal disease in newborn nurseries; occurs sporadically as well; EPEC no longer an important cause of infant diarrhea in North America and Europe; major agent of infant diarrhea in many developing countries (South America, South Africa, Asia), infants < 1 year old

HOST RANGE: Humans, especially infants < 2 years, most mammals (livestock)

INFECTIOUS DOSE: highly infectious for infants, does unknown, presumably low; Adults by Ingestion - 100,000,000 organisms to 10,000,000,000 organisms (10^8 to 10^{10})

MODE OF TRANSMISSION: Fecal contamination of food, water or fomites; fecal-oral spread; may be spread to infants during delivery or by contaminated hands; poor hygiene and poor sanitation

INCUBATION PERIOD: 12-72 hours (9-12 hrs in adult volunteer studies)

COMMUNICABILITY: Communicable period not known, but presumably for the duration of fecal excretion, which may be prolonged several weeks

SECTION III - DISSEMINATION

RESERVOIR: Infected persons, often asymptomatic; animals

ZOONOSIS: Yes - direct or indirect contact with infected animals and wastes

VECTORS: None

SECTION IV - VIABILITY

DRUG SUSCEPTIBILITY: Susceptible to ampicillin, TMP-SMX

SUSCEPTIBILITY TO DISINFECTANTS: Susceptible to many disinfectants - 1% sodium hypochlorite, 70% ethanol, iodines, phenolics; glutaraldehyde, formaldehyde

PHYSICAL INACTIVATION: Inactivated by moist heat (121° C for at least 15 min) and dry heat 160-170° C for at least 1 hour

SURVIVAL OUTSIDE HOST: Dust 4 to 27 days; feces - up to 84 days; fingertip - 45 min; soil - up to 84 days

SECTION V - MEDICAL

SURVEILLANCE: Monitor for symptoms; confirm bacteriologically, serologically

FIRST AID/TREATMENT: Electrolyte fluid therapy (oral or IV); antibiotics may be administered in very severe cases

IMMUNIZATION: None

PROPHYLAXIS: Not usually administered

SECTION VI - LABORATORY HAZARDS

LABORATORY-ACQUIRED INFECTIONS: 2 reported cases of laboratory infections with *E. coli*

SOURCES/SPECIMENS: Feces

PRIMARY HAZARDS: Ingestion

SPECIAL HAZARDS: None

SECTION VII - RECOMMENDED PRECAUTIONS

CONTAINMENT REQUIREMENTS: Biosafety level 2 practices, containment equipment and facilities for activities involving cultures and infected clinical materials

PROTECTIVE CLOTHING: Laboratory coat; gloves when contact with infectious materials is unavoidable

OTHER PRECAUTIONS: Good personal hygiene and frequent handwashing

SECTION VIII - HANDLING INFORMATION

SPILLS: Allow aerosols to settle; wearing protective clothing, gently cover spill with absorbent paper towel and apply 1% sodium hypochlorite, starting at perimeter and working towards the centre; allow sufficient contact time (30 min) before clean up

DISPOSAL: Decontaminate before disposal; steam sterilization, chemical disinfection

STORAGE: In sealed containers that are appropriately labelled

SECTION IX - MISCELLANEOUS INFORMATION

Date prepared: January, 2001

Prepared by: Office of Laboratory Security, PHAC

Although the information, opinions and recommendations contained in this Material Safety Data Sheet are compiled from sources believed to be reliable, we accept no responsibility for the accuracy, sufficiency, or reliability or for any loss or injury resulting from the use of the information. Newly discovered hazards are frequent and this information may not be completely up to date.

Copyright ©
Health Canada, 2001