

**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA**

***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**

Informe de Tesis

Presentado por

Omar Estuardo Lemus

Para optar al título de

Químico Biólogo

Guatemala, Marzo 2006

JUNTA DIRECTIVA

M.Sc. Gerardo Leonel Arroyo Catalán	Decano
Licda. Jannette Sandoval Madrid de Cardona	Secretaria
Licda. Gloria Elizabeth Navas Escobedo	Vocal I
Licda. Liliana Vides de Urizar	Vocal II
Licda. Beatriz Eugenia Batres de Jiménez	Vocal III
Br. Juan Francisco Carrascoza Mayen	Vocal IV
Br. Susana Elizabeth Aguilar Castro	Vocal V

ACTO QUE DEDICO

A Dios.

A mi madre Leticia Lemus, mi esposa Sofía y mi hijo Sebastián, con todo mi amor.

A mi familia, especialmente a mis abuelitas Marta y Uca.

A mis tíos y tías Luis Adolfo, Eduardo, Nany, Susa, Negry y José Antonio, por su cariño y apoyo constante.

A mis primos, especialmente a Manuel Antonio y Guillermo José.

A mis amigos, especialmente a Boris, Sergio, Amory, Luis Adolfo, Jackeline, Pepe, Renata, Miriam, Scarlette, Jorge, Carlos Manuel, Leonora, Sebastián y Chisco.

AGRADECIMIENTOS

A la M.Sc. Olga R. Torres y el M.Sc. Rafael Pratdesaba por su orientación y asesoría en el desarrollo de la investigación.

A la Dra. Ann-Marie Svennerhölml por el apoyo técnico recibido.

A la Licda. Wanda Gonzalez por su orientación técnica.

A el Lic. Martín Gil y a el Lic. Osberth Morales por su valiosa asesoría.

Al Instituto de Nutrición de Centro América y Panamá – INCAP – en cuyos laboratorios se efectuó la presente investigación.

Al Hospital Roosevelt y el Instituto Guatemalteco de Seguridad Social.

A la Universidad de San Carlos de Guatemala, mi alma mater.

A la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, sus autoridades, personal docente y administrativo.

A los pacientes y sus familias.
Su valiosa colaboración permitió concretar este estudio.

ÍNDICE

	Página
I. RESUMEN	1
II. INTRODUCCIÓN	3
III. ANTECEDENTES	
A. Enfermedad diarreica	5
B. <i>E. coli</i> diarreogénicas	7
C. <i>E. coli</i> enterotoxigénica	8
1. Toxina termolábil	8
2. Toxina termoestable	9
3. Factores de colonización intestinal	11
4. Patogenicidad	12
5. Manifestaciones clínicas	15
6. Epidemiología	16
7. Inmunidad	18
8. Diagnóstico	21
9. Tratamiento	24
IV. JUSTIFICACIÓN	26
V. OBJETIVOS	27
VI. HIPÓTESIS	28
VII. MATERIALES Y MÉTODOS	
A. Universo	29
B. Muestra	29

C.	Recursos	
1.	Humanos	30
2.	Físicos	30
D.	Métodos	
1.	Toma de muestra de pacientes	35
2.	Coprocultivo	37
3.	Examen parasitológico	38
4.	Examen para rotavirus y adenovirus	39
5.	Determinación de toxina lábil y toxina estable	39
6.	Determinación de factores de colonización	45
E.	Diseño de la investigación	48
VIII. RESULTADOS		
A.	Pacientes muestreados	49
B.	Hallazgos de laboratorio	50
C.	<i>Escherichia coli</i> enterotoxigénica	52
D.	Variables ambientales y socioeconómicas asociadas a la infección por ETEC	54
IX. DISCUSIÓN DE RESULTADOS		56
X. CONCLUSIONES		59
XI. RECOMENDACIONES		61
XII. REFERENCIAS		62
XIII. ANEXOS		71

I. RESUMEN

Escherichia coli enterotoxigénica (ETEC) es uno de los más importantes agentes causales de diarrea a nivel mundial. Se ha demostrado que la infección por ETEC es susceptible de prevenirse mediante la inmunización por vía oral, exponiendo la mucosa intestinal del individuo a los antígenos presentes en cepas circulantes en la región donde se aplica la vacuna.

Antes de emplear en Guatemala una vacuna que proteja contra la infección por ETEC se hace necesario investigar la prevalencia del microorganismo en casos severos de diarrea deshidratante, así como su perfil antigénico. Se sabe que ETEC causa enfermedad mediante la liberación de dos enterotoxinas en la mucosa intestinal, a la cual se adhiere mediante fimbrias o factores de colonización intestinal o FC. La descripción de estas sustancias en cepas nativas mediante ensayos de laboratorio constituye a la vez la descripción de los antígenos de ETEC susceptibles de utilizarse como inmunógenos en Guatemala.

El presente estudio se efectuó evaluando la presencia de ETEC en población preescolar que consultara por diarrea deshidratante a los servicios del Hospital Roosevelt y la unidad periférica del IGSS en la zona 11 de la Ciudad de Guatemala a lo largo de 12 meses. De las muestras de los pacientes se aislaron colonias de *E. coli* que luego se analizaron mediante ELISA para investigar la expresión de toxinas. Todas aquellas cepas positivas para una o ambas toxinas (termolábil o LT y termoestable o ST) se analizaron para detectar factores de colonización intestinal mediante un ensayo tipo Dot-Blot con anticuerpos monoclonales específicos.

De un total de 84 niños y niñas muestreados se aisló y confirmó ETEC en el 19.05% de los pacientes. Solamente Rotavirus precedió a ETEC en importancia, detectándose en el 20.24% de los niños. Microorganismos como *Adenovirus*, *Cryptosporidium parvum*, *Shigella* sp., *Cyclospora cayetanensis* y *Campylobacter* sp, entre otros, fueron detectados en menor proporción aunque siguen siendo importantes agentes causales de diarrea.

Las cepas de ETEC expresaban toxinas y factores de colonización intestinal en forma parecida a los aislamientos efectuados en otras regiones del mundo. Los FC encontrados fueron: CFA/I, CS1, CS2, CS3, CS17 y PCFO-166. La comparación de cada inmunoensayo junto a cepas control permitió efectuar confirmaciones bajo un estricto control de calidad.

El hallazgo de enterotoxinas de ETEC en la quinta parte de la muestra con diarrea deshidratante, así como la expresión de FC con capacidad inmunogénica es fundamental para estudios posteriores, en los que se someta el uso de la vacuna oral en la prevención de diarrea por ETEC. Cabe mencionar que la toxina lábil de ETEC utilizada en vacunaciones reportadas recientemente ha demostrado brindar protección cruzada contra la infección por *Vibrio cholerae*, al existir mucha similitud entre la toxina estable y la sub-unidad beta de la toxina del cólera.

De acuerdo a los resultados obtenidos se recomienda en primer lugar continuar la investigación de ETEC en otras zonas urbanas y al interior de la República de Guatemala para describir a nivel nacional la prevalencia de diarrea causada por ETEC. A la vez se recomienda proyectar la investigación y el uso de una vacuna oral que posea en su fórmula las toxinas lábil y estable de ETEC y los antígenos CFA/I, CS1, CS2, CS3, CS17 y PCFO-166 con el fin de producir una respuesta inmune que prevenga la enfermedad diarreica por este microorganismo.

La inmunización artificial exitosa contra ETEC permitiría reducir el espectro de agentes causales de diarrea así como el tiempo de enfermedad y convalecencia de la población en riesgo. Esto contribuiría además a que la población guatemalteca esté biológicamente mejor preparada ante esta y otras enfermedades, mejorando su calidad de vida y aumentando su productividad en beneficio común.

II. INTRODUCCIÓN

La enfermedad diarreica continúa siendo una de las principales causas de morbilidad y mortalidad infantil a nivel mundial. La prevención de las infecciones gastrointestinales requiere del manejo sanitario del agua y alimentos, así como las mínimas medidas de higiene y servicios básicos en el hogar. Sin embargo en Guatemala un gran porcentaje de la población no tiene acceso a la infraestructura sanitaria necesaria (1, 2). La población infantil guatemalteca de escasos recursos llega a sufrir de 8 a 11 episodios de diarrea anuales y uno de estos se complica como diarrea persistente (3, 4). Los niños que padecen episodios recurrentes de diarrea en alguna etapa crítica de su crecimiento pueden ver afectado su desarrollo físico e intelectual, con consecuencias graves para la población afectada (5 - 7).

Escherichia coli enterotoxigénica (ETEC) es un microorganismo infeccioso que se ha identificado como el agente causal de aproximadamente cuatrocientos millones de episodios de diarrea y cerca de setecientas mil muertes anuales de niños en edad preescolar a nivel mundial (1). Las diarreas asociadas a ETEC son principalmente de carácter deshidratante, ocurriendo con mayor frecuencia en niños que inician la alimentación complementaria al interrumpir la lactancia materna exclusiva (1, 8, 9). ETEC produce enfermedad mediante la acción de una o dos toxinas producidas y liberadas a nivel intestinal, con distinta susceptibilidad al calor, denominadas toxina termolábil (LT) y toxina termoestable (ST) (8). Adicionalmente produce fimbrias o adhesinas denominadas factores de colonización intestinal, que permiten la adhesión del microorganismo a la mucosa intestinal facilitando su actividad (10, 11).

Aunque la prevención de la diarrea por vacunas está en etapa de desarrollo, existe evidencia reciente de la capacidad humana de generar una respuesta inmune ante la infección por ETEC luego de proporcionar dosis repetidas de una vacuna oral a voluntarios de distintas partes del mundo (13-16). Dicha vacuna contiene como principales componentes los factores de virulencia descubiertos en este

microorganismo. En su composición se incluyen las enterotoxinas estable y lábil y los principales factores de colonización intestinal descubiertos a la fecha (12).

El presente estudio fue efectuado en pacientes de edad preescolar que consultaron por diarrea deshidratante a la emergencia del hospital Roosevelt y la unidad periférica del IGSS en la zona 11 de la ciudad capital de Guatemala a lo largo de trece meses (cubriendo una estación lluviosa). Los padres o encargados de los niños accedieron voluntariamente a participar firmando un consentimiento informado, luego de explicarles el propósito de la investigación. Se investigó la presencia de cepas de *E. coli* enterotoxigénica, caracterizando los aislamientos según el tipo de toxinas y factores de colonización expresados.

El objetivo principal del estudio fue describir la enfermedad diarreica asociada con ETEC, así como la producción de toxinas y factores de colonización intestinal en las cepas aisladas de la muestra.

Estos datos determinaron lo importante de las infecciones por ETEC en la población estudiada, cuya prevalencia en pacientes con diarrea deshidratante severa ascendió al 19.05%. Este informe constituye un aporte técnico para documentar el potencial beneficio de utilizar la vacuna en Guatemala luego de describir su presencia y composición en la población.

III. ANTECEDENTES

A. Enfermedad diarreica

A nivel mundial la diarrea continúa siendo una de las principales causas de muerte en niños de edad preescolar. A pesar de conocerse sus causas principales, las acciones preventivas no siempre se ejecutan de manera integral (1, 2). El acceso a condiciones sanitarias básicas como agua potable, jabón, lavado de manos adecuado, una correcta disposición de las excretas, drenajes y la preparación higiénica de alimentos son los elementos que componen la primera línea de prevención de la enfermedad diarreica (2, 17, 18). Debido al poco avance en estos indicadores de desarrollo, las vacunas contra agentes de diarrea tales como *Shigella*, *Rotavirus* y *Escherichia coli* enterotoxigénica son consideradas por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como prioritarias (19, 20).

En Guatemala la prevalencia total de diarreas, reportada por la Encuesta Nacional de Salud Materno Infantil para el año 1999, fue de 13.3% (21). De acuerdo con el informe de UNICEF/CONAPLAM, la prevalencia de diarreas en Guatemala durante meses lluviosos en 1999 fue de 28% del total de niños menores de cinco años muestreados (22). Los datos de las Semanas Epidemiológicas del Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social coinciden en reportar una mayor incidencia de diarreas durante la estación lluviosa en los meses de marzo a septiembre, con casos menos frecuentes durante el resto del año (23). Es conocido que la población guatemalteca de escasos recursos, tanto de sectores urbanos como rurales, es quien padece más episodios de diarrea (2, 3). La mayoría de los episodios de diarrea en la población infantil de países en desarrollo ocurren durante los primeros cinco años de vida, sin embargo los procesos diarreicos más severos y prolongados se registran antes de cumplir los tres años. Es durante este período que es crucial la alimentación adecuada del niño y que no sufra de infecciones repetidas, pues se determina su capacidad futura para el trabajo y la vida (3, 5, 24).

En Guatemala, el niño que crece en un ambiente desfavorable puede sufrir de 8 a 11 episodios de diarrea por año (4, 25). El once por ciento de estos episodios evoluciona a diarrea persistente, definida como un proceso diarreico con más de 14 días de duración (3). Considerando la frecuencia con que la enfermedad se repite en los niños, se puede estimar que antes de cumplir los 5 años, ellos pasan más de cien días al año enfermos (26). Estos datos de diarrea persistente son similares a los encontrados en otros países en desarrollo como Brasil, Perú, Bolivia, Bangladesh y varias naciones de Africa, en donde no es raro observar hasta 10 u 11 episodios de diarrea durante el primer año de vida, y al menos uno de ellos se convierte en diarrea persistente, acumulando más de 80 días al año padeciendo enfermedad diarreica causada por más de un agente infeccioso (3, 4, 17, 26, 27).

Las consecuencias en el desarrollo adecuado de las capacidades físicas e intelectuales del niño son evidentes, especialmente al considerar la energía invertida durante el tiempo que duran la infección y la convalecencia. En muchos casos, por razones culturales, la recuperación nutricional necesaria no se efectúa. Además la motivación y capacidad de concentración de cualquier preescolar enfermo se reduce dramáticamente si la brusca deficiencia nutricional secundaria a la infección, y su inadecuado tratamiento, afectan al niño en una etapa crítica del desarrollo mental. El impacto es mayor si se trata de una desnutrición protéico calórica (5 - 7, 28).

Las infecciones gastrointestinales son causadas por el ingreso de agentes infecciosos al tracto gastrointestinal, a través del consumo de alimentos o líquidos contaminados, por el contagio directo feco-oral debido a mala higiene o la ausencia de servicios sanitarios adecuados y cualquier situación que exponga a una fuente de contaminación fecal (2, 24). El agente infeccioso coloniza distintos sectores del intestino. La diarrea, es decir, la emisión de heces líquidas, es la respuesta del cuerpo a la infección y en algunos casos, es la consecuencia del metabolismo del agente infeccioso (24).

Entre los agentes causantes de diarrea en el niño preescolar figuran rotavirus y adenovirus 40 y 41, cepas diarreogénicas de *E. coli* como *E. coli* enterotoxigénica, numerosos parásitos como *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium parvum* y *Cyclospora cayetanensis*, especies de *Shigella*, *Salmonella*, *Vibrio cholerae*, *Campylobacter jejuni*, entre otros (3, 24, 29).

B. E. coli diarreogénicas

El intestino humano resguarda una gran variedad de microorganismos, principalmente bacterias que han encontrado allí las condiciones ideales para desarrollarse sin dañar al hospedero. A nivel intestinal las cepas de *Escherichia coli* son las más frecuentemente aisladas de cultivos aeróbicos de heces humanas pues forman parte de la microbiota intestinal normal del hombre (8). *Escherichia coli* es la especie típica del género *Escherichia*, perteneciente a la familia Enterobacteriaceae compuesta por bacilos Gram negativo que crecen bien en agar sangre de carnero y agar MacConkey (8).

Escherichia coli puede presentarse en la naturaleza en variedades distinguibles entre sí, desde cepas no patógenas y parte normal de la microbiota intestinal hasta verdaderos patógenos, incluyendo organismos oportunistas, como en la infección urinaria. De manera que *E. coli* puede causar infección intestinal y extraintestinal tanto en individuos sanos como inmunocomprometidos, pues es un grupo heterogéneo de microorganismos poseedores de un amplio espectro de interacciones con sus hospederos humanos (8, 30).

Las cepas enteropatógenas de *E. coli* se subdividen en varios grupos de acuerdo a sus propiedades y virulencias. En general, una *E. coli* diarreogénica debe cumplir con los siguientes aspectos: a) colonizar un sitio de la mucosa intestinal, b) evadir de alguna manera las defensas del hospedero, c) multiplicarse en el sitio colonizado, d) causar el daño al hospedero mediante mecanismos específicos (8).

La presencia de fimbrias o pilis de adherencia a superficies es una propiedad asociada a una gran cantidad de microorganismos y virtualmente a todas las cepas de *E. coli*, incluyendo las variedades no patogénicas. Sin embargo, ciertas cepas diarreagénicas de *E. coli* poseen fimbrias de unión específica a las membranas de los enterocitos que incrementan su habilidad de colonización intestinal, es decir que permiten la adherencia a la mucosa del intestino delgado, un sitio normalmente libre de microorganismos (8, 10, 11).

Una vez ocurrida la colonización, la patogenicidad que se produzca es muy variable y depende marcadamente de la estrategia de cada cepa, por ejemplo: a) producción de enterotoxinas, b) invasión tisular, c) adherencia íntima con interacción a la membrana. La versatilidad del genoma de *E. coli* es conferida principalmente por dos configuraciones genéticas: plásmidos de virulencia e islas cromosómicas de patogenicidad. Existen cinco tipos reconocidos de *E. coli* diarreogénicas: *E. coli* enteropatógena (EPEC), *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC) y *E. coli* enteroadherente (EAEC) (8).

C. Escherichia coli enterotoxigénica (ETEC)

Como ETEC se clasifican aquellas cepas de *E. coli* productoras de una o dos enterotoxinas con diferente susceptibilidad térmica (termolábil o termoestable), codificadas en plásmidos. El microorganismo se sirve de fimbrias específicas llamadas factores de colonización intestinal para invadir la mucosa del intestino delgado en la cual inicia la producción y liberación de una o ambas toxinas cuya acción en la mucosa induce un estado secretorio permanente, no invasivo ni inflamatorio (8, 10 - 12).

1. Toxina termolábil (LT)

Es una enterotoxina muy relacionada con la toxina del cólera. La toxina lábil consiste en toxinas oligoméricas similares en un 80% a la secuencia protéica de la holotoxina de la subunidad B de la toxina del cólera y ambas poseen la misma actividad enzimática y los mismos efectos en ensayos en animales y cultivos

celulares. La identidad del receptor primario de ambas toxinas difiere únicamente en el residuo His 13, conservando el resto de la secuencia (31 - 33). Ambas difieren en el proceso de elaboración y secreción por el microorganismo, en la respuesta específica del linfocito T ayudador (CD - 4) en el hospedero y en su codificación genética (8, 30, 31).

Existen dos serogrupos mayoritarios: LT I y LT II, sin reacción cruzada entre ambos. LT I es la única asociada con patogenicidad en humanos y animales (8, 31, 32). LT I es una toxina oligomérica de 80 kiloDaltons (kDa), compuesta de una subunidad A de 28 kDa y cinco subunidades B idénticas entre sí, de 11.5kDa cada una. Las subunidades B se disponen en un arreglo de anillo o aro, uniéndose fuertemente al gangliósido GM1 y débilmente al gangliósido GD1b y ciertas glucoproteínas intestinales similares. La subunidad A es la responsable de la actividad enzimática de la toxina lábil, puede escindirse en dos subunidades, A1 y A2 enlazadas por un puente disulfuro. Estos mecanismos son similares a los de la toxina del cólera, pero menos pronunciados, por producirse menor cantidad de toxina en ETEC que en *V. cholerae* (8, 30) (Anexo 1).

Existen variantes de la LT asociadas a patogenicidad en humanos (LTh) y a porcinos (LTp). Sin embargo existen reportes que consideran que, en algunos ambientes como Egipto, la LT no se asocia con enfermedad diarreica (8, 34). Los genes que codifican las LT en *E. coli* enterotoxigénica residen en plásmidos que también pueden contener genes codificando la toxina termoestable (TE o ST) y/o factores de colonización intestinal (8, 31, 35).

2. **Toxina termoestable (ST)**

En contraste respecto a las toxinas lábiles, que son estructuras oligoméricas grandes, la toxina termoestable es de menor tamaño; consiste en un péptido de 48 aminoácidos que contiene dos puentes disulfuro, ubicados entre los residuos 10 y 48 y los residuos 21 y 36, cruciales para la actividad biológica de la toxina y su estabilidad térmica (32).

La investigación de su estructura mediante resonancia magnética nuclear ha reportado dos configuraciones de hélice entre los residuos 10 y 22 y los residuos 38 al 44. La estructura helicoidal 10-22 deja expuestos varios residuos con grupos funcionales polares, que han sido asociados con la toxicidad de la ST. Los residuos hidrofóbicos en las caras opuestas de las hélices 10-22 y 38-44 hacen contacto con el extremo C-terminal de la toxina. Otra región hidrofóbica, que inicia en el residuo 21 y concluye en el 36, da lugar a un gancho que expone dos residuos Arg 29 y Asp 30, supuestamente responsables de la inducción de actividad secretoria intestinal (32).

Existen dos tipos de Toxina estable, la ST-h o ST-a, reportada en cepas aisladas en humanos y la ST-p o ST-b, encontrada principalmente en cerdos. La ST-h es producida por ETEC y otras bacterias Gram-negativo, incluyendo a *Yersinia enterocolitica* y *Vibrio cholerae* no-O1. ST-h tiene una similitud protéica del 50% con la toxina estable 1 de la E. coli enteroadherente (8). La ST-h madura es un péptido de 18 a 19 aminoácidos con una masa molecular de 2kDa. Ambas variantes pueden encontrarse en cepas de ETEC aisladas de humanos y son casi idénticas en los 13 residuos necesarios y suficientes para actividad enterotóxica; de los 13 residuos, 6 son cisteínas que forman tres enlaces disulfuro intramoleculares, sin embargo se ha reportado que la ST-h es la única toxina capaz de causar enfermedad en humanos (8, 36). En el caso de Guatemala, la toxina estable porcina si se asocia con enfermedad diarreica en niños del altiplano central (Torres O., INCAP, comunicación personal).

La tóxina estable humana (ST-h) es inicialmente producida como un precursor de 72 aminoácidos que es escindida por peptidasas en un péptido de 53 aminoácidos. Esta forma es transportada al periplasma, donde se forman los enlaces disulfuro. Una proteasa aún no definida procesa la pro-ST-h hasta la toxina madura de 18 a 19 aminoácidos, que luego es liberada por difusión a través de la membrana externa. El aspecto más importante de su estructura es el extremo C-terminal, poseedor de una secuencia altamente conservada que incluye seis cisteínas que forman tres puentes disulfuro intramoleculares, requeridos tanto para

la unión con el receptor como para la actividad biológica y le confieren su termoestabilidad (8, 32, 37).

El receptor principal de la ST-h es una enzima en la membrana apical de las células epiteliales intestinales. El receptor guanilato ciclasa (GC-C) no es el único capaz de unirse a la toxina estable pero es el único identificado y confirmado a la fecha (8).

3. Factores de colonización intestinal

Escherichia coli posee fimbrias y flagelos peritricos al igual que el resto de microorganismos relacionados. Mientras los flagelos consisten esencialmente en proteínas con función estructural y/o contráctil, las fimbrias son generalmente más cortas y delgadas que los flagelos, aunque con similar composición proteica. En algunas bacterias existen propiedades de virulencia asociadas a la presencia de ciertos tipos de fimbrias. *Escherichia coli* enterotoxigénica posee fimbrias que utiliza como factores de adherencia al epitelio intestinal mediante las cuales coloniza el intestino (8, 10, 38).

Al examinarse al microscopio electrónico, las cepas de ETEC muestran sus flagelos peritricos normales y numerosas fimbrias con múltiples morfologías en la misma bacteria. Se han caracterizado numerosos factores de colonización o fimbrias, aunque muchas de estas deben aún identificarse y solamente se presume su existencia (8, 10, 11)

Un obstáculo muy grande para el desarrollo de vacunas es la heterogenicidad antigénica derivada de la expresión múltiple de antígenos fímbricos, la mayoría codificados en plásmidos que también codifican las toxinas lábil y estable (8, 10, 11, 20, 30, 35, 37)

ETEC presenta cierta especificidad en la asociación de fimbrias con hospedero, por ejemplo, las cepas de ETEC que expresan el antígeno K99 son patógenas para cerdos, ovejas y carneros, mientras que las cepas que expresan el antígeno K88

únicamente causan enfermedad en cerdos. Para los humanos existe el arreglo específico de antígenos denominados factores de colonización o CFA (por sus siglas en inglés: Colonization Factor Antigen). La terminología de los factores de colonización es confusa e inconsistente, sin embargo se han acordado denominaciones útiles basadas en el orden de descripción inicial, precedida de las siglas CSA (abreviatura del inglés: Coli Surface Antigen). Los factores de colonización pueden subdividirse por sus características morfológicas en: rígidos, bastones flexibles, bastones muy flexibles o de tipo alambre (8, 38, 39) (Anexo 2).

El primer factor de colonización descrito fue denominado CFA/I, del cual se ha confirmado su importancia en la patogenicidad de ETEC así como su papel en la obtención de inmunidad en humanos (11, 39). CFA/II fue descubierto después, encontrándose que estaba compuesto de otras dos proteínas distintas: exclusivamente compuesto de CS3 o junto a CS1 o CS2. Otros importantes factores de colonización descritos son: CFA/III, CFA/IV, CS4, CS5, CS6, CS7, CS17, PCFO159 y PCFO166, para los cuales ya se han producido anticuerpos monoclonales que se emplean en su determinación en laboratorio (11, 38-42).

4. Patogenicidad

La infección por ETEC se adquiere a través de la vía oral por agua y alimentos contaminados, de la misma manera en que se adquieren otros agentes causantes de diarrea (2, 3, 17, 23). La patogenicidad de ETEC radica en su capacidad de colonizar la mucosa intestinal mediante los factores de colonización y a la vez producir una o ambas enterotoxinas (8). La colonización de la mucosa intestinal ocurre antes o simultáneamente a la liberación de las toxinas, sin embargo ETEC no es un microorganismo invasivo, sino que se multiplica sobre las microvellosidades intestinales en cuya vecindad libera las toxinas inductoras del estado secretorio que origina la diarrea. Cuando ETEC expresa factores de colonización se incrementa su virulencia, ya que la mayoría de dichos factores promueven la adhesión de ETEC al intestino (8, 11, 39) (Anexo 3)

Los sitios de unión de la toxina lábil de ETEC y la toxina del cólera con la mucosa intestinal son idénticos en estructura y composición, con la única excepción del residuo His13. Debido a su elevada homología estructural y funcional probablemente existe una relación evolutiva. De acuerdo con varios autores, la gran similitud estructural entre la toxina lábil y la toxina del cólera es suficiente para extrapolar las observaciones de sus mecanismos de acción (8, 31, 33).

Durante la infección, la toxina lábil se une a la membrana de la célula hospedera, luego es internalizada por endocitosis y translocada a través de la célula en un proceso que involucra transporte vesicular trans-Golgi. El blanco celular de la toxina es la adenilato – ciclasa, localizada en la membrana basolateral de la célula epitelial polarizada intestinal (8, 31). El péptido A1 de la toxina lábil posee actividad ADP-ribosiltransferasa y actúa transfiriendo un ADP-ribosil del NAD a la subunidad alfa de la proteína de unión GTP $G_s\alpha$ presente en la célula, la cual estimula la actividad de adenilato-ciclasa. La actividad de la ADP-ribosiltransferasa sobre la subunidad $G_s\alpha$ resulta en la activación permanente de la adenilato-ciclasa, lo cual eleva los niveles intracelulares de AMP cíclico (AMPc). La proteína cinasa dependiente de AMPc es en consecuencia activada, llevando a la fosforilación anormalmente elevada de los canales de cloruro ubicados en las membranas apicales de las células epiteliales. El canal de cloruro activado mayoritariamente por la LT y la toxina del cólera es el mismo canal que está ausente o defectuoso en la fibrosis quística, el regulador de conducción transmembranoso de la fibrosis quística, RCTF o CFTR (31) (Anexo 4).

El resultado neto de este proceso es la estimulación de la secreción de iones Cl^- de las células secretorias y la inhibición de la absorción de NaCl en el extremo de las vellosidades celulares. El aumento en la concentración de iones en el lumen intestinal acarrea agua de manera pasiva a través de rutas paracelulares, resultando en una diarrea osmótica similar a la que se presenta en la infección por *V. cholerae*. La diarrea provocada puede llegar a ser extremadamente debilitante y en algunos casos fatal si no se recibe tratamiento; aunque existen casos muy leves (5, 8, 24, 25, 28, 31).

Otros mecanismos probables de la actividad de la toxina lábil son probablemente mediados por:

a. **Prostaglandinas:**

Las toxinas podrían estimular la síntesis y liberación de metabolitos del ácido araquidónico como prostaglandinas y leucotrienos, que estimulan el transporte de electrolitos y la motilidad intestinal.

b. **Sistema nervioso entérico:**

Dicho sistema regula la motilidad intestinal y la secreción de iones. Tanto la serotonina como el polipéptido vasoactivo intestinal, capaces de estimular la secreción en las células epiteliales intestinales, son liberadas en el intestino delgado humano luego de recibir exposición a la toxina del cólera.

c. **Interleucina – 6:**

Este tercer posible mecanismo podría involucrar una respuesta inflamatoria intestinal moderada, debida a la exposición a la toxina lábil y a la toxina del cólera. Esta última es capaz de estimular la producción de la citocina interleucina – 6 activando el sistema inmune entérico y en potencia se generarían metabolitos del ácido araquidónico que estimularían la secreción (8, 31).

La toxina estable, a diferencia de la lábil, se compone de una corta secuencia de aminoácidos, entre los cuales la cisteína es uno de los principales (32, 35). Los abundantes puentes de disulfuro presentes en la molécula a raíz de la elevada cantidad de cisteína son los que confieren la termorresistencia a la toxina, mientras que cierto arreglo de grupos hidrofóbicos e hidrofílicos en las dos hélices peptídicas de la toxina son los responsables de la unión al receptor guanilato-ciclase (GC-C); para luego estimular la actividad de la GC que conlleva la elevación de los niveles de cGMP intracelular. Como resultado final se estimula la secreción de cloruros y/o la inhibición de la absorción de cloruro de sodio resultando en una secreción intestinal de líquido (32). Los pasos intermedios involucrados aún no son claros, sin embargo se sabe que al final, el canal de cloruros se activa secretándose iones cloruro a la

luz intestinal. Otros mecanismos propuestos que expliquen la actividad de la toxina estable involucran a las prostaglandinas, el calcio y el SNE (8, 32) (Anexo 5).

La ubicación intestinal de los receptores de ambas toxinas tiene implicaciones importantes. En contraste con los 15 a 60 minutos requeridos por la LT para translocarse y activar el complejo adenilato-ciclasa basolateral, la ST actúa mucho más rápido debido a la localización apical de su receptor (8) (Anexo 5).

5. Manifestaciones clínicas

La diarrea causada por ETEC ocurre con una intensidad que varía de leve a severa, es decir que los pacientes sufren de diarrea solamente o acompañada de fiebres, náusea, vómitos y grados de deshidratación que aumentan conforme la infección es más virulenta (3, 8, 25, 27, 40, 41). Los procesos diarreicos severos tienen como consecuencia una deshidratación fuerte debida a la inapetencia secundaria a la náusea del paciente, sin embargo no son muy frecuentes. Los casos leves se manifiestan como pocas deposiciones líquidas y casi ninguna molestia adicional y requieren como tratamiento la reposición de líquidos por vía oral (9, 24, 41). Sin embargo en los casos severos se debe evaluar la pérdida de masa corporal debida a la deshidratación antes de indicar el volumen de líquido a reponer. En casi la totalidad de los casos, la diarrea es auto-limitante, requiriéndose únicamente la reposición constante de líquidos por vía oral para compensar las pérdidas por la diarrea y los vómitos (24, 28, 41).

Es notable la asociación que las infecciones por ETEC productora de toxina estable (ST) tienen sobre el retardo en el crecimiento. En Guatemala, estudios no publicados por el Dr. J. R. Cruz determinaron una fuerte asociación entre episodios de diarrea por ETEC – ST y retardo en talla para edad en niños de Santa María de Jesús, Sacatepéquez (Torres O., INCAP, comunicación personal).

La inmunosupresión incrementa la severidad de cualquier patología. Al debilitarse el sistema inmune del paciente se ven aumentadas la intensidad y

frecuencia de las diarreas así como el daño ejercido al enfermo. Otra consecuencia de esto son las infecciones múltiples, incluso por agentes etiológicos no convencionales (25, 45). En estos pacientes la incompetencia inmunitaria predispone a padecer infecciones oportunistas causadas por microorganismos distintos de ETEC, rotavirus, *Shigella* spp. o *Campylobacter* spp. Aunque la inapetencia y la debilidad son comunes al proceso diarreico sin importar el agente infeccioso, la fase aguda y la convalecencia de las infecciones múltiples en pacientes inmunocomprometidos se tornan más prolongadas (4-7, 25-29, 46).

6. Epidemiología

Las cepas de ETEC están asociadas con dos patologías o eventos clínicos característicos: la diarrea del destete o del inicio de alimentación complementaria, y la diarrea del viajero (8, 9, 39, 43, 46-49). El patrón epidemiológico de la enfermedad causada por ETEC está sujeto a la combinación de los siguientes factores: a) la inmunidad de mucosas ante la infección por ETEC que se desarrolla en aquellas personas expuestas previamente al microorganismo, b) individuos asintomáticos portadores de una considerable cantidad de ETEC virulento en las heces; y c) la infección requiere dosis infectivas altas para desarrollarse en hospederos susceptibles. Estos tres aspectos crean una situación en la cual las regiones con abundantes casos de diarrea por ETEC mantienen una fuerte contaminación ambiental en general y, por lo tanto, la mayoría de los infantes de dichas áreas padecerán episodios por ETEC durante el inicio de la alimentación complementaria. El porcentaje de casos de diarrea infantil esporádica endémica debidos a ETEC registrados a nivel mundial varía del 10 al 38% (8, 50-52).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha estimado que *E. coli* enterotoxigénica causa aproximadamente 400 millones de episodios de diarrea y cerca de 700,000 muertes de niños en edad pre-escolar, cada año (1). Las personas afectadas son principalmente aquellas de escasos recursos que residen en países en vías de desarrollo como Bangladesh, Egipto, Nicaragua, México, Nigeria, Tailandia, Indonesia, Nepal, India, Argentina; e incluso se ha descrito a ETEC como agente causal de diarrea deshidratante en miembros de fuerzas armadas

estadounidenses operativas en países en desarrollo. La OMS además ha recomendado la búsqueda de vacunas contra ETEC con el objeto de prevenir el retardo en talla en países en desarrollo (8, 19, 20, 29, 36, 47-52).

ETEC se ha asociado con el 27% de episodios de diarrea en niños que inician la alimentación complementaria, mientras que en las área peri-urbanas ETEC se ha encontrado en el 16% de niños con diarrea aguda y en el 3.8% de controles sanos, aunque existen datos que indican una mayor cantidad de portadores asintomáticos, llegando a 13.3% e incluso 19% de los controles asintomáticos estudiados en latinoamérica (3, 8, 9, 25, 27, 48, 51, 52).

Los niños en edad escolar y los adultos usualmente presentan una baja incidencia de infección sintomática de ETEC. Los aislamientos de ETEC productora de ST, ST o ST/LT combinadas varían de acuerdo con las regiones estudiadas; ETEC-LT se ha reportado entre un 13 hasta 57% de los aislamientos, ETEC-ST se ha encontrado entre un 8 a 54% de los aislamientos, y ETEC productora de ambas toxinas se encuentra en menores proporciones, que van del 7% al 26% (47-49). Los factores de colonización intestinal están ampliamente distribuidos, reportándose su presencia desde un 23% hasta un 94% de los aislamientos de ETEC en sitios de América Latina, Asia, Norteamérica, Europa, y Oriente Medio, sin embargo, las variaciones dependen mucho de los métodos empleados en cada investigación (8-11, 36, 39, 50-54).

En las áreas rurales de Guatemala, ETEC productora de toxina lábil y/o toxina estable se asoció con el 8.9% de casos de diarrea aguda en niños mayores de un año. Es interesante resaltar que ETEC productora de ST se encontró en el 14.1% de casos de diarrea persistente en niños de cero a tres años de edad de áreas rurales pobres de Guatemala (3, 4, 25). Sin embargo, en estos estudios realizados en nuestro país no se estudiaron los factores de colonización presentes.

Resultados preliminares de un estudio en curso actualmente en Guatemala, indican que el 47% de los casos positivos para ETEC se asocian con toxina lábil, un 33% con toxina estable y un 20% con toxina estable y lábil. Los factores de colonización (FC) más abundantes son CS6, encontrado en un 34% de los aislamientos positivos para FC, CS3 (14.5%) asociado con el CS1 (10.9%), CS5 (10.9%, presente en algunos aislamientos con CS6), CS17 (9.1%); y en menor porcentaje CS7 (5.5%), CFA I (5.5%). Por último CFA III, CS2, CS4, PCFO166 y PCFO159 con muy pocos aislamientos que en total alcanzan un 9.1% (González W., INCAP, comunicación personal).

A pesar de la similitud de la toxina del cólera con la enterotoxina lábil de ETEC, la infección por *Vibrio cholerae* no es responsable de tanta morbilidad como la infección por ETEC, debido a la amplia distribución de ETEC en el ambiente de casi todo el mundo (8, 31). *V. cholerae* se ha asociado con brotes epidémicos que han alcanzado magnitudes pandémicas, a diferencia de ETEC que se presenta con regularidad y a lo largo del tiempo en las mismas poblaciones en que se ha padecido el cólera, además de encontrarse regularmente en personas sin síntomas diarreicos, considerados portadores asintomáticos, pero que aportan una carga mórbida muy elevada (4, 8, 25, 27, 49-52).

El reporte de que se necesiten grandes cantidades de *E. coli* enterotoxigénica para producir una infección apunta a la prevención sanitaria, como la cloración del agua o la desinfección solar en áreas rurales, como una forma sencilla de prevenir la infección al reducir el total de la carga microbiana. Sin embargo, dentro de los hogares que reciben el agua ya sanitizada, debe existir un adecuado manejo de la misma (16, 30, 46, 47, 55).

7. Inmunidad

El intestino delgado posee una membrana mucosa de gran superficie, especializada en la captación de los nutrientes asimilables del quimo vertido por el estómago. En el lumen intestinal abundan diversos tipos de microorganismos ante los cuales se ejerce suficiente control. El sistema inmune en este órgano se

compone de tres distintos arreglos celulares: las placas de Peyer, que consisten en folículos linfoides ubicados en la mucosa y que se extienden hasta la submucosa intestinal, especialmente en el íleo; los linfocitos de la lámina propia, básicamente linfocitos B, secretores de IgA y los linfocitos intraepiteliales, ubicados en los espacios basolaterales del lumen (56, 57).

La frecuente observación de una mayor incidencia y severidad de diarreas en población infantil, especialmente menores de cinco años, comparada con jóvenes o adultos, ha sugerido el desarrollo paulatino de inmunidad luego de cada proceso infeccioso. En consecuencia, una estrategia útil es evitar que en los primeros meses ocurran episodios de diarrea o que se tornen severos, minimizando así el debilitamiento extremo del niño y al mismo tiempo permitiendo que desarrolle los anticuerpos necesarios. En las personas originarias de naciones industrializadas que visitan países en vías de desarrollo la diarrea del viajero ocurre sin importar la edad de la persona infectada, pues la susceptibilidad del individuo a la infección depende de haber estado expuesto al microorganismo en el pasado. La severidad del proceso diarreico siempre es más preocupante en niños que en personas mayores (4-8, 26, 43, 44, 51, 52).

La toxina lábil de ETEC se comporta en gran parte como inmunógeno por su gran tamaño, a diferencia de la toxina estable que escapa del sistema inmune sin provocar una respuesta inmune útil. La similitud de la toxina lábil con la toxina del cólera supone una protección cruzada ante la infección por las dos especies. Los factores de colonización también son detectados por el sistema inmune para producir anticuerpos específicos. Dicha respuesta inmune generalmente consiste en anticuerpos anti-toxina y anti-fimbrias detectados a nivel sérico e intestinal en personas que han padecido episodios de diarrea por ETEC (8, 12-14, 54, 56, 57). La toxina estable no se ha asociado a la producción de una respuesta inmune, su tamaño tan pequeño le permite pasar de manera desapercibida ante el sistema inmunológico. De allí que las cepas productoras de toxina estable exclusiva causen infecciones repetidas. En Santa María de Jesús, Sacatepequez, se han documentado hasta 33 episodios de diarrea, con intervalos de al menos 3 días sin síntomas, en un niño de 36 meses de edad (INCAP datos no publicados).

Durante los últimos años se ha investigado la utilidad y seguridad de una vacuna que prevenga la diarrea causada por ETEC. Los estudios han demostrado que es posible inducir respuestas inmunes diversas en voluntarios, tanto en niños como adultos de ambos sexos, luego de recibir dosis de la vacuna. Dicha vacuna contiene los principales factores de colonización de ETEC y sus toxinas, el microorganismo muerto y la subunidad B de la toxina del cólera (8, 12-16, 34, 54, 57-59). Actualmente se están realizando ensayos clínicos controlados en Guatemala. Lamentablemente en las pruebas de Egipto, Israel y Guatemala, la vacuna con microorganismos muertos no ha sido eficaz en todas las pruebas clínicas (15, 16)

Se han detectado respuestas inmunes óptimas que han protegido de manera significativa a diversos grupos de voluntarios que han sido expuestos a ETEC luego de haber recibido la vacuna. Las respuestas inmunes se han medido en base a anticuerpos IgA, IgG e IgM en suero, actividad específica de células M en distintas porciones de intestino delgado humano, cantidad de anticuerpos IgA en lavados intestinales y otras variantes (8, 12-16, 34, 54, 57-59).

Las respuestas inmunes de los voluntarios que han recibido previamente la vacuna muestran indicadores celulares y humorales con supuesto efecto protector anti ETEC, específicamente a partir de la primera y segunda dosis de la vacuna; mientras que luego de una tercera dosis algunos indicadores muestran incluso una disminución en la respuesta inmune (14, 44, 54, 57, 58). En estos individuos se ha demostrado una protección consistente ante la exposición con ETEC virulento (34, 57, 58).

Numerosos estudios han demostrado también la protección brindada por la leche materna ante la ocurrencia de diarrea. Aquellos niños que han recibido únicamente leche materna durante los primeros meses han manifestado obtener una protección significativa ante episodios severos de diarrea por ETEC, *Campylobacter* sp. y otros procesos infecciosos; dicha protección concluye al suspenderse la lactancia materna e iniciarse la alimentación complementaria (3, 9, 24, 46, 60-65).

Asimismo, la susceptibilidad ante infecciones gastrointestinales se incrementa al iniciarse la alimentación complementaria mientras paulatinamente se suspende la lactancia materna exclusiva (9, 62-64). En el área rural se ha demostrado una mayor ocurrencia de episodios diarreicos al iniciarse la alimentación complementaria durante o antes del tercer mes de vida, a diferencia de los lactantes que reciben alimentos distintos de la leche materna luego del cuarto a sexto mes de vida (3, 4, 9, 25, 46). La causa del problema ha sido la contaminación casi permanente de los alimentos preparados en el hogar y que el niño con lactancia materna exclusiva jamás llega a recibir, sin embargo al iniciar la alimentación complementaria recibe de sus alimentos una gran carga microbiana frecuentemente acompañada de enteropatógenos, produciéndose sus primeros episodios de diarrea (9, 17, 46, 62-66).

La protección de la leche materna ante la infección gastrointestinal del lactante se atribuye tanto a inmunoglobulinas como a componentes no inmunoglobulínicos. La inmunoglobulina A (IgA) secretoria ha demostrado su capacidad protectora ante la infección por *Campylobacter* sp., y ETEC productor de toxina lábil, mientras que las fracciones no inmunoglobulínicas han brindado una protección bastante específica, ya que limita la adherencia intestinal de ETEC mediada por CFA I y II (60-64). Las extensas pruebas del factor protector de la IgA presente en la leche materna sugieren recomendar la continuación de la lactancia normal durante la diarrea, hasta la fecha convencionalmente empleada de 6 meses de lactancia.

8. **Diagnóstico:**

La definición más aceptada de diarrea concuerda con las siguientes manifestaciones clínicas: un incremento en dos o más veces el número normal de deposiciones, las cuales, de acuerdo a la impresión del paciente o madre de familia, se han tornado más blandas o líquidas en las últimas 24 horas. El origen infeccioso de la diarrea solo puede descartarse mediante un examen de heces que investigue agentes parasitarios, bacterianos y virales. Con fines prácticos se define a la diarrea

como la ocurrencia de tres o más deposiciones líquidas en un período de 24 horas (24).

E. coli enterotoxigénica puede detectarse luego de efectuar un cultivo de heces en agar MaConkey, del cual se aíslan y preservan colonias típicas de *E. coli* para investigar en ellas la presencia de toxinas y factores de colonización o bien los genes que están asociados con su producción, de acuerdo a metodologías previamente descritas (8, 11, 38, 40, 50, 53).

La presencia de infecciones por *E. coli* enterotoxigénica ha sido descrita en distintas localidades empleando las mismas herramientas básicas. La investigación de serogrupos O y H es de cierta utilidad para descartar la presencia de cepas enterohemorrágicas, asociadas a la combinación de antígenos O157 y H7. Sin embargo, con ETEC existen muchas combinaciones de serogrupos que coinciden con la presencia de una o dos de las toxinas y uno o más factores de colonización. Para la detección de ETEC se hace más fácil la determinación directa de sus toxinas o los genes relacionados y no el descarte de una gran variedad de serogrupos haciendo correlaciones que permitan sospechar de ETEC como agente causal (8, 11, 40, 41). La toxina lábil puede detectarse por medio de un inmunoensayo que aprovecha su afinidad específica por el gangliósido GM1 presente en la membrana epitelial del intestino delgado y otras células del cuerpo (8, 31, 66, 67).

El análisis inicia con el aislamiento y conservación de al menos cinco colonias de *E. coli* seleccionadas del coprocultivo inicial por las características morfológicas y bioquímicas de las colonias lactosa positivo. El procedimiento permite detectar cuál de las cinco colonias produce toxinas. La técnica es un ELISA directo previamente descrito, que investiga colonias de *E. coli* cultivadas en agar MacConkey y subcultivadas individualmente en caldo Luria Bertani (LB) dentro de pozos de placas de ELISA recubiertos de gangliósido GM1 (40, 67). Las bacterias productoras de toxina lábil se fijan al GM1, luego un anticuerpo anti TL se une a los pozos con bacterias productoras de TL. Seguidamente se adiciona el conjugado, un anticuerpo anti IgG marcado con la enzima peroxidasa. Luego el revelador o substrato de la enzima

(H₂O₂) junto con o-fenilendiamina (OPD). La descomposición del peróxido induce el cambio de color del OPD en la región de los 350 nm (40, 67).

Antes de 20 minutos, los pozos de la placa inoculados con cepas productoras de toxina lábil tendrán un color amarillo-naranja, mientras los pozos con cepas negativas permanecerán transparentes (40, 67).

La toxina estable se detecta mediante un ELISA inhibición a partir del mismo crecimiento bacteriano en caldo LB de los pozos en la placa de LT. La toxina ST, así como la sub unidad B de la toxina del cólera (CTB), presentan la misma afinidad por el GM1 que se ha descrito para la toxina lábil. Para el ELISA ST se transfieren cuidadosamente 50µL del crecimiento de *E. coli* de caldo LB de cada pozo de la placa LT hacia su equivalente en una nueva placa recubierta de GM1, en donde inmediatamente se adiciona la subunidad B de la toxina del cólera (ST-CTB). En los pozos que contengan bacterias productoras de ST se producirá una inhibición de la unión con el GM1, debido a la competencia entre la ST y el ST-CTB, mientras que en los pozos con bacterias no productoras de ST ocurrirá la unión inmediata del ST-CTB con el GM1 al no ocurrir inhibición competitiva. Al añadir anticuerpos anti ST a los pozos, estos anticuerpos se unirán exclusivamente al ST-CTB que se encuentre unido al GM1 en los pozos con bacterias negativas para ST (40).

El conjugado y el revelador evidencian la positividad de las cepas de manera opuesta a la placa ST. Por lo tanto la imagen obtenida en el ELISA de las colonias positivas para ST es la inversa de la imagen en las placas positivas para LT; es decir, que los pozos amarillos son negativos y los incoloros son positivos (40).

Las colonias positivas para al menos una de las toxinas son confirmadas con el mismo procedimiento básico, modificándose únicamente el patrón de inoculación en las placas LT confirmatorias. Cada colonia positiva en el tamizaje se preserva en agar nutritivo a partir de la caja de agar MacConkey de donde se tomó la colonia inoculada en la placa de tamizaje. Las colonias positivas en agar nutritivo son subcultivadas en agar MacConkey el día previo de inocular las placas de

confirmación. Cada colonia es inoculada en un pozo con caldo LB, también en un segmento de una caja con agar CFA con sales biliares y una caja con agar CFA sin sales biliares, para la expresión de factores de colonización intestinal. Las colonias positivas en el ELISA confirmatorio son tomadas del agar CFA para suspenderlas en PBS previo a ser analizadas mediante un Dot-Blot para factores de colonización (40).

El Dot-Blot emplea tiras de nitrocelulosa previamente bloqueadas con PBS y albúmina bovina sérica. Sobre ellas se depositan pequeñas cantidades de suspensión de cada colonia a investigar a la par de cepas control. Cada tira es bañada de anticuerpos monoclonales (Mab) específicos para cada factor de colonización, de manera que se preparan tantas tiras como anticuerpos anti CFA se prueban. La unión del anticuerpo con las colonias depositadas en la tira se evidencia con la unión de un nuevo anticuerpo anti-Mab-CFA marcado con una enzima. La producción de color luego de añadir el revelador es suficiente para el registro de la presencia de dicho factor de colonización en la cepa estudiada (38-40).

9. Tratamiento

El hallazgo de *E. coli* en cultivo de heces de menores de seis meses de edad con diarrea se ha considerado patológico mientras que luego de los seis meses a un año se considera microbiota normal intestinal (3, 8, 30). Debido a que los ensayos para diferenciar las distintas cepas de *E. coli* diarreogénicas no están disponibles en la mayoría de centros asistenciales, el tratamiento de la diarrea aguda con fiebre que se presume sea causada por *E. coli* siempre consiste en antibióticos seleccionados por su patrón de susceptibilidad. Sin embargo, la efectividad de la terapia antimicrobiana en la infección por ETEC difícilmente reduce la duración de un proceso que surge abruptamente y tiende a ser autolimitante en casi la totalidad de los casos. Por esto, de acuerdo a la OMS, el tratamiento con antibióticos no es recomendable (3, 24, 27, 44).

La diarrea causada por ETEC deshidrata al paciente en diversos grados. La rehidratación empleada en muchos centros asistenciales se sistematiza en

respuesta a dichos niveles de deshidratación en tres planes: A, B y C, que corresponden a la rehidratación preventiva, la rehidratación por vía oral y por último la rehidratación rápida por vía intravenosa en pacientes con choque hipovolémico, respectivamente (44).

En la rehidratación preventiva o plan A, se administran bebidas y alimentos ricos en líquido, no necesariamente soluciones de rehidratación oral como en el plan B. En el plan B, la solución que el paciente recibe se compone de agua y sales de rehidratación oral: cloruro de sodio, citrato trisódico dihidratado, cloruro de potasio y glucosa, en las proporciones recomendadas por la OMS y UNICEF. La osmolaridad de la solución descrita alcanza los 311 mmol/L, semejante a la del plasma humano, sin embargo existen estudios que no descartan la utilidad de soluciones hiposmolares (aproximadamente 224 mmol/L) y que contengan sucrosa en lugar de glucosa para el tratamiento de la deshidratación severa en niños con marasmo. La ventaja reportada se fundamenta en que la sucrosa se subdivide en glucosa, asimilada en el yeyuno; y fructosa, captada tanto en el yeyuno como en el íleon, ambos monosacáridos absorbidos por difusión facilitada junto con el sodio (44, 65, 68, 69).

Las diarreas causadas por una o ambas enterotoxinas tienden a ser de tipo moderado, la deshidratación sin embargo, puede alcanzar el nivel de choque hipovolémico. Al mismo tiempo que se administra rehidratación con suero oral o intravenoso, los neonatos o preescolares lactantes deben continuar recibiendo lactancia materna en la cantidad que sean capaces de aceptar (9, 48, 56, 61-64).

IV. JUSTIFICACIÓN

La diarrea aguda y sus complicaciones continúan siendo una de las principales causas de morbi-mortalidad en población infantil guatemalteca. La prevención de las enfermedades gastrointestinales y las graves secuelas de las infecciones mal tratadas gira principalmente alrededor de las mejoras en educación y condiciones sanitarias básicas, sin embargo los esfuerzos en Guatemala parecen ser insuficientes (4-7, 9, 21-25).

La gran cantidad de agentes causales de diarrea complican el panorama preventivo, pues el diagnóstico específico requiere distinguir entre más de 18 microorganismos, o al menos entre los más prevalentes (3). Aunque la prevención primaria o el tratamiento de la diarrea no difiera tanto entre agentes causales como en la intensidad de la deshidratación, la inmunización es distinta para cada caso y el éxito en el desarrollo de vacunas requiere investigación específica (19, 20, 37, 47, 48).

La Organización Mundial de la Salud ha recomendado la investigación de vacunas contra la diarrea, específicamente aquellas que prevengan contra *Vibrio cholerae*, *Escherichia coli* enterotoxigénica, *Shigella flexneri* y *Salmonella typhi*, así como para rotavirus. Los aspectos a cubrir para la creación de una vacuna anti ETEC requieren de la definición adecuada de una respuesta inmune ante antígenos de ETEC, el desarrollo, estandarización y validación de indicadores inmunológicos humanos correlacionados con la protección por el uso de la vacuna y el desarrollo de pruebas clínicas en voluntarios (1, 14-16, 19, 20, 34, 47, 54, 56, 57). Previo a esto es indispensable conocer el papel de las toxinas y los principales factores de colonización de ETEC como agentes causales de diarrea en población guatemalteca. Con estos datos puede estimarse el potencial beneficio del uso de la vacuna oral cuya composición se ajuste al perfil antigénico de este importante patógeno circulante en la población.

V. OBJETIVOS

A. Objetivo general

Determinar la prevalencia e impacto clínico de la diarrea causada por *E. coli* enterotoxigénica en niños guatemaltecos que presenten diarrea de moderada a severa y acuden a los servicios de la Pediatría del Hospital Roosevelt y la Unidad Periférica del IGSS zona 11 durante un período de 12 meses.

B. Objetivos específicos

1. Conocer los tipos de enterotoxinas más frecuentemente encontradas en *E. coli* enterotoxigénica aislados en niños guatemaltecos que presentan diarrea de moderada a severa.
2. Conocer los factores de colonización más frecuentemente asociados a enfermedad diarreica causada por ETEC.

VI. HIPÓTESIS

El presente estudio no requiere de hipótesis por ser de tipo descriptivo.

VII. MATERIALES Y MÉTODOS

A. Universo

Pacientes menores de cinco años de edad, que consultan a los servicios hospitalarios de la Ciudad Capital por diarrea deshidratante.

B. Muestra

Se investigaron pacientes menores de cinco años de edad que consultan a los servicios de la Emergencia de Pediatría del Hospital Roosevelt y la Consulta Externa de la Policlínica del IGSS zona 11 durante el período comprendido del mes de junio del 2001 al mes de julio del 2002, cumpliendo con los siguientes criterios de inclusión:

1. Ser menores de 59 meses de edad
2. Presentar diarrea moderada a severa definida como tres o más deposiciones líquidas en las últimas 24 horas y que presenten al menos uno de los siguientes síntomas adicionales: náusea, vómitos, dolor abdominal o calambres, anorexia y fiebre.
3. Presentarse a los servicios hospitalarios en ausencia total de tratamiento con antibióticos en las dos semanas previas a la consulta.
4. Consentimiento por escrito del padre de familia o encargado legal del niño para participar en el estudio (Anexo 6).
5. Se obtenga una muestra de heces.

C. Recursos

1. Humanos

Br. Omar Estuardo Lemus (Tesisista).

Licda. Olga R. Torres de Matute (Asesora).

Lic. Rafael Antonio Pratdesaba Zea (Asesor).

Licda. Wanda Patricia Gonzalez (Colaboradora).

Dr. Louis A. Bourgeois, Universidad de Johns Hopkins (Colaborador).

Dra. Ann-Mari Svennerholm, Universidad de Gotenburgo (Colaboradora).

2. Físicos

a. Materiales

i. Equipo:

- Agitador magnético.
- Agitador vortex.
- Asas de Nicromo.
- Autoclave.
- Balanza semianalítica Mettler Toledo PB1502-S.
- Bandeja para coloraciones.
- Campana bacteriológica.
- Centrífuga para tubos de fondo cónico.
- Cestas de tinción de láminas.
- Computadora personal con software Microsoft® Office y Microsoft® Excel, Microsoft Corporation 1997.
- Congelador a -20°C.
- Congelador a -70°C.
- Espátula de metal.
- Espectrofotómetro Behring EL 311 lector de placas de ELISA a 350nm.
- Estufa eléctrica con rotor magnético.
- Gradillas metálicas.
- Gradillas plásticas para eppendorf.
- Hielera.

- Impresora Epson LX 810.
- Incubadoras a 37°C y a 42°C.
- Macropipeteador.
- Mechero Bunsen.
- Microscopio óptico con objetivos 4x 10x 40x 100x.
- Pinzas de acero.
- Pipeta multicanal de 12 puntas, 50-200uL.
- Pipetas automáticas 10-200uL, 100-1000uL.
- Refrigerador.
- Rotor horizontal IKA KS 260 Basic.

ii. Cristalería:

- Beakers de 10, 25, 40, 50, 100 y 250mL.
- Botellas de 500 y 1000mL con tapón de rosca.
- Embudo para filtración con membrana MILIPORE.
- Erlenmeyers de 25, 50, 500 y 1000mL.
- Kitazato de 1000mL.
- Tubos de ensayo 16x125 mm.
- Tubos de ensayo de 10x130 mm.
- Tubos de fondo cónico.
- Viales de dos dracmas.
- Viales de un dracma.

iii. Materiales de laboratorio:

- Garrafón plástico NALGENE de 18 L.
- Guantes de latex UNISEAL ProDerma. 0246C97.S.S.A.
- Hisopos de madera y algodón.
- Medio de transporte Cary Blair, Copan Diagnostics Inc. H022V.
- Jabón líquido para manos.
- Marcadores indelebles.
- Papel bond tamaño carta.

- Cajas de petrí de 57 cm², Phoenix Biomedical.
- Campy Pak Plus. BBL Beckton Dickinson, 271045.
- Etanol al 70%.
- Cloro al 3%.
- Pissetas plásticas de 250 mL.
- Servilletas de papel.
- Contenedor plástico con válvula Nalgene de 12L.
- Cubreobjetos.
- Portaobjetos.
- Standard de McFarland 0.5.
- Tips azules y amarillos.
- Viales Eppendorf.
- Viales plásticos de 5mL con tapón de rosca.
- Tubos de fondo cónico con tapón de rosca.
- Filtros HA, poro de 0.45um. MILIPORE, Cat No. HAWG 047S3.
- Bandeja de incubación, BIO-RAD cat. No. 1703902.
- Membrana de nitrocelulosa de 0.45 um, BIO-RAD/Sartorius/Millipore/MSI.
- Papel parafilm.
- Papel parafinado.
- Pipetas serológicas estériles de 5mL, 10mL y 25mL.
- Placas de ELISA estériles de fondo plano (NUNC no. de catálogo 26920 A/S, Roskilde, Denmark o equivalentes) con tapaderas.
- Unidades de filtro desechables, 0.45um, SIGMA F-1512.

iv. Medios de cultivo:

- Agar Base Columbia, DIFCO 279240.
- Agar MacConkey, DIFCO 278850.
- Agar Mueller Hinton, DIFCO 225250.
- Agar Nutritivo, DIFCO 213000.
- Agar SS, DIFCO 274500.
- Agar TCBS, DIFCO 265020.

- Agar XLD, DIFCO 278850.
- Agua Peptonada, DIFCO 218071.
- Caldo Luria Bertani, DIFCO 244620.
- Caldo Selenito, DIFCO 227540.
- Caldo Trypticase Soya, DIFCO 211825.
- Cary Blair, COPAN Diagnostics Inc. H022V rev 1298.
- Casaminoacids, DIFCO 0230-17-3.
- LIA Agar, DIFCO 284920.
- Sales Biliares, OXOID L55.
- TSI Agar, DIFCO 226540.

v. Anticuerpos:

- Conjugado de IgG de cabra, anti ratón con peroxidasa (Jackson, Catálogo No. 115035062).
- Anticuerpo Monoclonal anti LT (Mab LT) 39:13:1 (IgG1) sobrenadante de cultivo (Lote No. 18-02-98).
- Anticuerpo Monoclonal anti ST (Mab ST) 1:3 (IgG1), sobrenadante de cultivo (lote No. 24-04-96).

vi. Reactivos y colorantes:

- Ácido clorhídrico 0.5M y 6M.
- Agua desmineralizada.
- Albúmina bovina, SIGMA A-4503.
- Citrato trisódico dihidratado, Fisher Scientific. BP 327-500.
- Cloruro de manganeso.
- Cloruro de sodio, Merck 6404.
- Dihidrocloruro de o-fenilendiamina (OPD), SIGMA-ALDRICH. SP7288.
- Dihidrofosfato de sodio monohidratado, Merck 1164170.
- Gangliósido GM1.
- Glicerina al 87%, Merck 1.0494.1000.
- H₂O₂ (peróxido de hidrógeno) 30%, Merck 7209.

- Hidrofosfato disódico anhidro, Merck 6586.
- Hidróxido de sodio 0.1M, 1M.
- Peróxido de hidrógeno al 30%, Merck 1.07210.1000.
- Reactivo de desarrollo de color para HRP (4-cloro-1-naftol), BIO-RAD Cat. No. 1706534.
- Sulfato de magnesio.
- Tween 20, SIGMA P-1379.
- Acetato de etilo.
- Alcohol-acetona para Gram.
- Alcohol ácido Kinyoun.
- Azul de metileno.
- Carbol fucsina.
- Cristal violeta.
- Formalina salina al 10%.
- Lugol para heces.
- Zafranina.

vii. Cepas de referencia:

Tabla No. 1. Cepas de referencia y toxinas producidas.

Cepa de <i>E. coli</i>		Toxina Producida
<i>E. coli</i>	ST 64111	ST
<i>E. coli</i>	286 C2	LT
<i>E. coli</i>	VM 75688	ST, LT
<i>E. coli</i>	E 34420 C	Ninguna toxina

Tabla No. 2. Cepas de referencia, factores de colonización producidos y anticuerpos monoclonales específicos.

Cepas de <i>E. coli</i>	Factor de colonización (CF)	Anticuerpo monoclonal (Mab)
<i>E. coli</i> 258909-3	CFA/I	CFA/I 1:6 (950922)
<i>E. coli</i> E 1392-75	CS1, CS3	CS1 12:4 (940516)
<i>E. coli</i> 278485-2	CS2, CS3	CS2 10:3 (940422)
<i>E. coli</i> E 1392-75	CS1, CS3	CS3 10:2 (960607)
<i>E. coli</i> 11881/9	CS4, CS6	CS4 4:6 (940422)
<i>E. coli</i> VM 75688	CS5, CS6	CS5 4:5 (960607)
<i>E. coli</i> E 29101 A	CS7	CS7 5:2 (960911)
<i>E. coli</i> E 20738 A	CS17	CS17 8:1 (960923)
<i>E. coli</i> 350 C1A	PCF0159	PCF0159 5:1 (960911)
<i>E. coli</i> E 7476 A	PCF0166	PCF0166 1:6 (960909)
<i>E. coli</i> E 34420 A	CFA/III	CFA/III 3:3 (931103)

D. Métodos

1. Toma de muestra de pacientes

Se seleccionaron pacientes menores de 60 meses de edad, que consultasen por diarrea deshidratante a los servicios del Hospital Roosevelt y a la Clínica Periférica del IGSS en la zona 11, tomando muestras de aquéllos en quienes se cumplieran los criterios de inclusión siguientes:

- Ser menor de 60 meses de edad
- Presentarse al hospital por padecer diarrea deshidratante de al menos 24 horas de evolución con por lo menos tres episodios previos de diarrea.
- No haber tomado antibióticos en la última semana.
- Proporcionar una muestra de heces.

- Que los padres o encargados del niño firmaran el consentimiento informado para participar en el estudio brindando la muestra y respondiendo a la entrevista (Anexo 6).

El padre o encargado del paciente recibió información del estudio, se le explicó el propósito del mismo brindándole el consentimiento y el formulario para su lectura o se leyó en presencia de un testigo. Se solicitó su colaboración con una muestra de heces del menor y los datos básicos necesarios para el análisis de la población muestreada. Luego de obtenerse el consentimiento informado y al responder el cuestionario, se tomaron las muestras de heces que se transportaron en cadena de frío a los laboratorios de Microbiología del INCAP de la siguiente manera:

- Se preservaron 2 hisopos cargados de la muestra depositados en el medio de transporte Cary-Blair.
- Se preservaron aproximadamente 2 gramos de la muestra en un vial con 3cc de solución preservante de formalina, acetato de sodio, ácido acético en proporción 1:1:1 (SAF) para conservar estructuras parasitarias que pudieran estar presentes en la muestra.
- Se preservaron aproximadamente 2 gramos de la muestra en un vial con buffer de fosfatos para estudiar posteriormente la presencia de rotavirus y adenovirus.

Las muestras se identificaron cuidando la confidencialidad del paciente, registrando las iniciales del paciente y un número correlativo que se anota también a la ficha epidemiológica y el consentimiento informado. Los hisopos cargados con muestra de heces preservada en medio de transporte Cary-Blair se refrigeraron hasta su traslado a los laboratorios de Microbiología y Virología del INCAP en donde se efectuó un coprocultivo para descartar enteropatógenos tales como *Shigella*, *Salmonella*, *Yersinia*, *Campylobacter*, y aislar colonias de *E. coli*. Los viales con muestra de heces preservada en SAF se almacenaron a temperatura ambiente hasta preparar y teñir los frotis necesarios, los viales con muestra de

heces preservada en PBS se congelaron previo a investigar la presencia de rotavirus y adenovirus.

2. Coprocultivo

a. Día uno

Se anotó el número correlativo de cada muestra en las cajas de agar y tubos de caldo de enriquecimiento necesarios. Un hisopo con muestra tomado de Cary-Blair se inoculó en la superficie de una caja de petri con agar MacConkey, una de agar XLD y se depositó en un vial con APA (agua peptonada alcalina), el segundo hisopo inoculó una caja de agar TCBS y una caja de agar Butzler, y un vial con caldo Selenito.

Las muestras inoculadas en los medios sólidos se diseminaron con asa de nicromo flameada para la obtención de colonias bacterianas aisladas. Se inoculó una caja de agar Butzler con una cepa control de *Campylobacter jejuni* diseminándola con asa flameada. Los medios de cultivo MacConkey, XLD y TCBS y los caldos de enriquecimiento APA y Selenito se incubaron a 37°C durante 18 a 24 horas en aerobiosis, dejando desenroscados los tapones de APA y Selenito para establecer las condiciones aeróbicas de incubación.

Las cajas de agar Butzler se incubaron a 42°C por 48 horas en condiciones ambientales de microaerofilia (10% CO₂, 5% O₂, 85% N₂) producida con el equipo Campy Pak Plus (BBL, Becton Dickinson) utilizando Jarras Gaspak a las que se les había removido el catalizador de platino, o bolsas de polietileno debidamente selladas.

b. Día dos

Se evaluó el crecimiento en las cajas de MacConkey, XLD y TCBS, anotando en un cuaderno las observaciones. Se preservaron al menos cinco colonias típicas de *E. coli* a partir del MacConkey inoculando un vial con agar nutritivo y uno con caldo tripticasa soya (CTS) por cada colonia picada de manera separada. Las

colonias lactosa negativo (transparentes en MacConkey), xilosa negativo (transparentes en XLD) y H₂S positivo (coloreadas de negro en XLD) se estudiaron inoculándolas en tubos de medio TSI y LIA para identificarse mediante las reacciones específicas de las colonias sospechosas.

Las colonias sacarosa positivo (amarillo fuerte) del TCBS se inocularon a agar Mueller-Hinton. Se inoculó otra caja de TCBS con dos asadas (aprox 50uL) de la superficie del vial con APA y una caja de SS con el hisopo inmerso en el Selenito. Ambas cajas y los viales de *E. coli* y los tubos de TSI y LIA se incubaron por las 18-24hrs. siguientes a 37° en aerobiosis.

c. **Dia tres**

Se evaluó el crecimiento en todos los medios inoculados, anotando las observaciones. Las colonias con imagen bioquímica de *Shigella* o *Salmonella* fueron confirmadas por aglutinación preservándose debidamente identificadas junto a las colonias de *E. coli* aisladas de la misma muestra. Las colonias sacarosa positivo cultivadas en Müller Hinton se procesaron para descartar la presencia de *Vibrio cholerae* mediante serología y bioquímica. Las colonias de *Campylobacter* sp., reconocidas por ser colonias húmedas de color gris pálido y leve crecimiento confluyente, se procesaron para su confirmación con la prueba del hipurato y susceptibilidad al Ácido Nalidíxico.

Las colonias de *E. coli* inoculadas en agar nutritivo fueron selladas y almacenadas a temperatura de refrigeración (4-8°C). Los viales con colonias inoculadas en CTS (1mL) fueron adicionadas con 1mL de CTS con un 30% de glicerol para obtener una concentración final del 15% de glicerol, congelándose debidamente sellados a -70°C en cajas identificadas con el nombre del estudio. Las cepas patógenas se preservaron con el mismo método, a -70°C.

3. **Examen parasitológico**

Las muestras de heces preservadas en SAF se concentraron mediante centrifugación para la preparación de frotis a partir del sedimento. Se prepararon

tres láminas por muestra, para efectuar tinciones con las técnicas de hematoxilina férrica y Kinyoun modificado. Se montaron además frotis en lugol, registrándose todas las observaciones en un cuaderno.

4. **Examen para rotavirus y adenovirus:**

Las muestras preservadas en PBS se estudiaron mediante inmunocromatografía de un paso, que determina antígenos de rotavirus y adenovirus 40-41 con anticuerpos específicos inmovilizados sobre la tira reactiva (RIDA Quick, Rotavirus/Adenovirus Combo, No. 1002; R-Biopharm, Alemania).

5. **Determinación de toxina lábil (LT) y toxina estable (ST)**

a. **Día uno**

Las cepas de *Escherichia coli* previamente almacenadas en agar nutritivo o CTS-15% glicerol fueron resembradas a una caja de agar MacConkey. Luego de diseminar con asa flameada para obtener colonias aisladas, se incubaron a 37°C durante la noche. Las cajas se almacenaron a + 4-8°C por no más de dos semanas antes de realizar el ELISA para LT/ST y el ensayo específico de dot blot para Factores de Colonización (Anexo 7).

La preparación y utilización de las placas de ELISA desde el inicio hasta el momento de su inoculación con las cepas a estudiar se efectuó bajo condiciones estériles y utilizando guantes de látex como medida de bioseguridad. Inicialmente se agregaron 100 µl de solución de gangliósido GM1, 1 µg/ml diluído 1:400 en PBS estéril, a cada pozo de las placas de ELISA. Se prepara una placa para investigar toxina lábil y otra placa para investigar toxina estable por cada diez muestras con cinco colonias de *E. coli* preservadas. Las placas preparadas se cubrieron con una tapadera previamente desinfectada con etanol al 70% y se dejaron incubando a temperatura ambiente durante la noche o a 37°C durante cuatro horas. Las placas fueron almacenadas a + 4-8°C hasta por dos semanas antes de su uso.

b. Día dos

Se identificó una placa como "LT". Se lavaron cuidadosamente los pozos cubiertos con GM1 dos veces con PBS estéril utilizando una piseta desinfectada previamente con etanol al 70%. Se bloquearon los pozos con la adición de 200µL de PBS con 0.1% de albúmina bovina sérica estéril (0.1% BSA-PBS), incubando a 37°C por 30 minutos. A continuación se lavaron los pozos una vez con PBS estéril agregando luego 100 µl de caldo Luria Bertani suplementado con lincomicina, 45µg/ml y glucosa, 2.5 mg/ml.

Se inocularon las cuatro cepas de referencia, empleando la punta de palillos de madera estériles para tocar dos colonias aisladas de cada cepa y aplicarla al caldo Luria Bertani en los pozos de la placa de ELISA indicados en el esquema. Se dejaron sin inocular los pozos B10 y B11 para funcionar como control de esterilidad del caldo Luria Bertani durante la incubación. Luego se inoculó una colonia individual de cada agar MacConkey, de acuerdo al esquema, utilizando un palillo de madera estéril para picar una colonia aislada y aplicarla en el pozo respectivo. Se excluyeron las columnas 1 y 12 y las filas A y H de la placa de ELISA, ya que las lecturas de absorbancia en estos pozos dan un fondo excesivo. Los pozos comprendidos entre las columnas 2 y 11 y las filas B y G fueron los pozos de trabajo (40) (Anexo 7).

Se cubrió la placa con una tapadera desinfectada previamente con etanol al 70% y luego se envolvió en una bolsa plástica para prevenir la evaporación. Se incubó con agitación de 150-200 rpm durante la noche a 37°C.

c. Día tres

Se registró la turbidez observada en los diferentes pozos como crecimiento, excluyendo los resultados de los pozos que carecieran de crecimiento visible. Las placas se descartaron si los pozos del control negativo de LB presentaban crecimiento bacteriano, así como si se observaba crecimiento bacteriano en las columnas 1 y 12 y las filas A y H. Se identificó una nueva placa recubierta con GM1 como placa "ST". Se lavaron los pozos de la placa ST dos veces con PBS. Se

bloquearon con 200 μ l/pozo de 0.1% BSA PBS a 37°C por 30 minutos. Se lavaron las placas para ST una vez con PBS, luego se agregó 100 μ l de una solución recién preparada de conjugado recombinante ST-CTB, diluído 1:400 en PBS, a cada pozo de la placa ST, incubándose a temperatura ambiente por 60 minutos.

Luego se lavaron las placas de ST tres veces con PBS. Se transfirieron 50 μ l de los cultivos de la noche anterior de las placas de LT a los pozos correspondientes de las ST, agregándoles inmediatamente 50 μ L del anticuerpo monoclonal anti-SE (Mab ST 1:3) diluído 1:400 en 0.1% BSA PBS. Las placas fueron agitadas gentilmente y luego incubadas sin agitación a temperatura ambiente por 90 minutos.

Se lavaron las placas de ST tres veces con PBS adicionado con un 0.05% de Tween 20 (PBS Tween 0.05%) Los lavados de las placas se descartaron y esterilizaron por ser fluidos infecciosos. Se agregaron 100 μ l/pozo del anticuerpo monoclonal anti-LT (Mab LT 39:13:1), diluído 1:100 en 0.1% BSA PBS Tween 0.05%, incubando a temperatura ambiente por 90 minutos.

Se lavaron las placas LT y ST tres veces con PBS Tween 0.05%. Se agregaron 100 μ L/pozo de conjugado anti-Ig de ratón diluído 1:3000 en 0.1% BSA PBS Tween 0.05%, incubando luego a temperatura ambiente por 90 minutos. Se preparó el sustrato o revelador con buffer de citrato de sodio 0.1M pH 4.5, el cual debe almacenarse en refrigeración y debe utilizarse a temperatura ambiente. Luego del tiempo de incubación de las placas, éstas fueron lavadas tres veces con PBS-Tween y luego se agregaron 100 μ l/pozo de la solución de sustrato, preparado con 20mL del buffer de citrato, 20mg de o-fenilendiamina (OPD) y 8 μ L de peróxido de hidrógeno al 30% adicionado inmediatamente antes de su uso. Las placas se incubaron a temperatura ambiente. Se observó el apareamiento de coloración amarilla en los pozos positivos de la placa LT y negativos de la placa ST. Luego de transcurridos 20 minutos las absorbancias de las placas fueron medidas en el lector de ELISA Behring EL330, utilizando el programa de lectura a 450nm. La impresión en papel de las lecturas de absorbancias de cada pozo constituyó el registro primario de los resultados.

i. Cálculo de placas LT

El fondo o blanco está definido como la absorbancia promedio a 450nm encontrada en los pozos con cepas control LT negativo, los cuales no deberían presentar color alguno. Se consideraron como pozos positivos todos aquellos que presentaran una coloración amarilla a naranja; y un resultado positivo fue aquel con un valor superior al punto de corte, considerado éste como el promedio de la absorbancia a 450nm del fondo + 0.1. Por ejemplo, si el promedio de absorbancias de las cepas control LT negativo alcanzó un valor de 0.062, los resultados positivos serían aquellos con lecturas superiores a 0.162. Se anotó en la impresión original el valor del fondo o blanco y del punto de corte obtenido para las muestras positivas.

ii. Cálculos para las placas ST

El fondo o blanco para las placas ST está definido como la absorbancia promedio a 450nm de los pozos con cepas control ST negativas, cuya coloración es amarilla a naranja fuerte, de manera opuesta a lo observado en la placa LT. Se obtuvo el IC50 o punto de corte, considerado como el 50% de la absorbancia promedio de las cepas control ST negativas, de acuerdo con la fórmula siguiente:

$$IC50 = \frac{A_{450 \text{ nm promedio de las cepas } E. coli \text{ E 34420 C y } E. coli \text{ 286 C2}}}{2}$$

Los resultados positivos fueron aquellos con lecturas iguales o menores al IC50 o punto de corte obtenido. Por ejemplo, si el promedio de absorbancias de las cepas control ST negativo alcanzó un valor de 0.404, el IC50 será de 0.202 y los resultados positivos serán aquellos con lecturas iguales o inferiores a 0.202. En la impresión original de las lecturas de la placa fue anotado el valor del fondo o blanco y del punto de corte para muestras positivas.

iii. Validez de la prueba

Para considerar válidas las pruebas, se observó y anotó la presencia de crecimiento bacteriano exclusivamente en los pozos inoculados con cepas control y colonias de muestras. Los resultados de toxina labil y estable para las cepas control se compararon con la siguiente tabla:

Cepa de <i>E. coli</i>	ST	LT
ST 64111	+ (I) ¹	- (I)
286 C2	- (A-N) ²	+ (A-N)
VM 75688B	+ (I)	+ (A-N)
E 34420 C	- (A-N)	- (I)

1 (I) Incoloro

2 (A-N) Color amarillo - naranja.

iv. Interpretación y registro de resultados

Se observó y registró la presencia de crecimiento visible en todas las cepas control y las provenientes de muestras clínicas. Las cepas que no produjeran crecimiento en el caldo Luria Bertani fueron analizadas nuevamente a partir de las colonias originales preservadas en congelación.

ST positivo: Se consideraron positivas todas aquellas colonias en las cuales se obtuviese un valor de absorbancia a 450 nm con el IC 50% de inhibición de la absorbancia obtenida con los controles negativos para ST.

LT positivo: Se consideraron positivas todas aquellas colonias en las cuales el valor de absorbancia a 450 nm fue de 0.1 por encima del fondo. Las cepas con A450nm entre 0.1 y 0.15 por encima del fondo se consideraron en el límite de la producción de toxinas y fueron analizadas nuevamente para su confirmación.

Una muestra fecal se consideró positiva para ETEC si después del tamizaje al menos una de las cinco colonias de *E. coli* preservadas fue

positiva en el ensayo con anticuerpos monoclonales específicos para ST y/o LT.

En cada ensayo se tamizaje, el reporte impreso del lector de ELISA se constituyó en la fuente de documentación para los resultados de tamizaje de toxinas de ETEC. En este documento se anotaron los cálculos del punto de corte, anotando la fecha del procedimiento y la firma del responsable. Asimismo, los resultados se anotaron en una base de datos diseñada para el efecto.

En cualquier placa de ELISA, si las cepas de referencia no hubiesen dado los resultados esperados, tanto las cepas control como las muestras serían reexaminadas. De igual manera, todas las muestras que no crecieran en el pozo de ELISA fueron repetidas posteriormente, y si no se hubiera obtenido crecimiento, se recuperaría la cepa del vial con la colonia congelada a -70°C . Se procedió así con todas las cepas que brindan lecturas entre 0.1 y 0.15 por encima del fondo.

v. Confirmación de resultados

Todas las cepas positivas para una o ambas toxinas se reensayaron para su confirmación en un procedimiento similar al de tamizaje. En este paso la única diferencia es el esquema de inoculación de las colonias en los pozos de la placa de confirmación. La inoculación de cepas a confirmar en los pozos de la placa de confirmación fueron inoculadas simultáneamente en cajas de petri con agar CFA y CFA con sales biliares para el desarrollo de colonias de *E. coli* que expresen sus factores de colonización intestinal (Anexo 8).

vi. Análisis posteriores

En toda colonia positiva para una o ambas toxinas en el ensayo de confirmación se evaluó la existencia de factores de colonización intestinal.

6. **Determinación de factores de colonización intestinal**

Las colonias de *E. coli* positivas para ETEC en tamizaje, se reensayaron en el ELISA de confirmación. Cada colonia que se inoculó en un pozo de ELISA de confirmación fué inoculada simultáneamente en una caja de agar CFA con y sin bilis, sin diseminar con asa flameada para obtener crecimiento masivo. Luego de ser inoculadas, las placas de ELISA para confirmación fueron procesadas de la misma manera que en el tamizaje. Las cajas de CFA con y sin bilis se incubaron también a 37°C durante la noche (Anexo 9).

Todas las colonias con resultados positivos confirmatorios para una o ambas toxinas fueron preservadas a partir del crecimiento masivo obtenido del agar CFA con y sin bilis para investigar factores de colonización. Dichas colonias se seleccionaron del agar CFA con y sin bilis para preparar aproximadamente 100µL de suspensiones de bacterias en PBS, que alcanzaran una turbidez de tres a siete de MacFarland (aprox 1-2x10⁹ bact/ml; A 600 nm = 0.8-1.6 en un espectrofotómetro Shimadzu). Por cada colonia positiva en confirmación se elaboraron dos suspensiones, una de la colonia tomada del agar CFA con bilis y otra de la colonia tomada del agar CFA sin bilis.

Las tiras de nitrocelulosa (NC) se procesan utilizando guantes de látex y pinzas en todo momento, evitando el contacto con la grasa de la piel de las manos. Se trazó un esquema de cuadrícula (5x5 mm) marcándola a presión sobre la NC dibujando la cuadrícula con un lápiz en una hoja de papel filtro apoyada sobre el pliego de NC de donde se cortaron las tiras. Las tiras se cortaron siguiendo el trazo cuadrículado para que a lo largo de la tira fueran visibles los segmentos de cuadrados de 5 mm de lado. Se preparó una tira por cada factor de colonización a ensayar. Se cortó la NC con longitud suficiente para la aplicación del número de suspensiones bacterianas preparadas, tanto de las muestras como el control respectivo (5mm o una cuadrícula por gota de suspensión), así como un espacio de 10 a 15 mm para rotular con bolígrafo el factor de colonización a investigar (Anexo 9).

a. **Día uno**

Las tiras de NC se remojaron en PBS permitiendo que secan por 5-30 minutos. Se utilizó bolígrafo de punto fino para rotular el extremo de cada tira con las siglas del factor de colonización a estudiar. Se aplicaron 2 μ L de la suspensión de bacterias en PBS (aprox 1-2x10⁹ bact/mL) como un punto pequeño sobre la NC usando una micropipeta. Luego de aplicar la última suspensión a las tiras y permitir que secan por cinco minutos, las tiras podían guardarse refrigeradas a +4 - 8°C por 1 semana.

Las membranas se bloquearon en solución al 0.1% de BSA PBS por 20 minutos a temperatura ambiente (18-25°C) sobre un rotor de plataforma, con agitación lenta (aprox 15 rpm). Se utilizaron bandejas de incubación para las tiras de NC y un recipiente plástico cuadrado. Un volumen aproximado de 0.25ml líquido/cm² es suficiente para cubrir las tiras.

Se descartó la solución de 0.1% BSA PBS y se agregó un volumen igual de solución de anticuerpos específicos (consistentes en diluciones 1:50 de un fluido de cultivo del anticuerpo monoclonal, excepto para CS6 que es 1:30) diluidos en BSA-PBS al 0.1% con 0.05% de Tween 20 por al menos dos horas (o durante la noche) en una cámara húmeda a temperatura ambiente, en el rotor.

b. **Día dos**

Las tiras se lavaron tres veces por cinco minutos con PBS Tween 0.05%. Seguidamente se agregó a cada tira el conjugado enzimático diluido en 1% BSA-PBS-0.05% Tween 20 (e. g. IgG de cabra, anti-ratón conjugada con HRP) en dilución 1:2000. Se incubó por dos horas en una cámara húmeda, sobre el rotador.

Se lavó tres veces por cinco minutos con PBS Tween 0.05% y una vez con PBS. La presencia de factores de colonización se evidencia ante la unión de los anticuerpos y la unión del conjugado, cuya enzima reacciona con el substrato. Se adicionó el substrato de la enzima HRP a las tiras de NC, utilizando 4-cloro-1-naftol-H₂O₂ en buffer de citrato trisódico. Se incubó por aproximadamente 15 minutos

observando el aparecimiento de puntos negros o azulados de las cepas control. Las membranas se lavaron cuidadosamente con agua de chorro, dejando secar a temperatura ambiente por al menos treinta minutos. Las membranas pueden palidecer luego de un tiempo, así que se tomó una fotocopia o fotografía de las membranas para constituirse en el registro permanente del resultado.

El aparecimiento de puntos negros, azulados o grises sobre las tiras de nitrocelulosa representa reacciones positivas. Se comparó la intensidad del color de las muestras con la intensidad de los controles positivos en cada tira.

Para que las pruebas fuesen válidas, todas las cepas control debían dar resultados positivos para los factores de colonización asignados. Si cualquiera de las cepas control positivas brindaba resultados discrepantes la prueba debía repetirse para todas las muestras.

E. Diseño de la investigación

1. Tipo de estudio

Es un estudio descriptivo, transversal, para determinar la prevalencia e impacto clínico de la diarrea por *Escherichia coli* enterotoxigénica, la presencia de toxinas lábil (LT) y estable (ST) y factores de colonización intestinal (FC) en aislamientos bacterianos de muestras de pacientes pediátricos que consultan al Hospital Roosevelt y la Unidad Periférica del I.G.S.S. en la zona 11 de la Ciudad Capital.

2. Tipo de muestreo

Es un muestreo no probabilístico por conveniencia, destinado a la selección de un mínimo de 60 de pacientes con las características clínicas asociadas con la diarrea causada por *Escherichia coli* enterotoxigénica reportadas en otros estudios.

3. Análisis de resultados

Los resultados obtenidos fueron registrados en una hoja electrónica en Microsoft Excel (Microsoft Corporation, derechos reservados 1997). La información fue analizada mediante el programa STATA 6.0 (Stata Corporation, derechos reservados 1984-1999), utilizando regresión logística para comparar la ocurrencia de la infección por ETEC junto a cada variable evaluada en la ficha epidemiológica de los pacientes muestreados, a saber:

- a. Determinar la prevalencia, en porcentaje, de ETEC productora de toxina lábil, estable o ambas; y factores de colonización
- b. Determinar asociaciones entre la presencia o ausencia de ETEC-LT, ST y FC, con las distintas variables socioeconómicas, nutricionales y clínicas de los pacientes a muestrear.

VIII. RESULTADOS

A. Pacientes muestreados

El estudio contempló la búsqueda activa de casos de diarrea deshidratante en pacientes menores de 60 meses de edad que consultasen a la emergencia del Hospital Roosevelt y la unidad periférica del IGSS de la zona 11 en la Ciudad de Guatemala. En el transcurso de 13 meses de muestreo, desde junio de 2001 hacia julio de 2002, fue posible incluir en el estudio a ochenta y cuatro (84) infantes que presentaban cuadro de diarrea deshidratante de moderada a severa.

Cuarenta y siete niños (47, 56%) y treinta y siete niñas (37, 44%) originarios de la Ciudad de Guatemala o sus alrededores se presentaron a consulta y cumplieron los criterios de inclusión y exclusión definidos. La media de edad fue de 14.3 meses, el 76.2% (64/84) de los niños era mayor de seis meses de edad (Tabla No. 3).

Tabla No. 3
Distribución etárea de la población preescolar muestreada

Intervalos de Edad (meses)	Niños	Niñas	Total
0 a 6	14	6	20
7 a 12	13	13	26
13 a 18	11	8	19
19 a 24	4	2	6
25 a 30	2	3	5
31 a 36	3	3	6
37 a 42	0	0	0
42 a 48	0	2	2
49 a 53	0	0	0
54 a 60	0	0	0
Total	47	37	84

Fuente: Ficha Epidemiológica HR-IGSS

La participación de todos los casos se obtuvo mediante el consentimiento por escrito de los padres quienes proporcionaron los datos importantes del niño y su enfermedad; además de una muestra de heces analizada para investigar la presencia de agentes infecciosos de origen bacteriano, viral y/o parasitario.

B. Hallazgos de laboratorio

En el 66.67% (56/84) de los niños se encontró al menos un agente causal de diarrea. En el 23.8% (20/84) de los niños fue posible detectar a más de un agente infeccioso. ETEC fue el más importante pues se encontró en nueve casos, uno de ellos junto a *C. cayetanensis* y *Giardia lamblia* (infección triple), dos casos junto a Rotavirus, dos junto a *Cryptosporidium parvum*, dos con *Cyclospora cayetanensis*; (infección triple) y un caso junto a *E. histolytica* y otro con *G. lamblia*.

Otra infección triple la causó Adenovirus junto a *S. sonnei* y *B. hominis*. Adenovirus se detectó en otro par de infecciones junto a *S. flexneri* y *C. parvum* en cada caso. Rotavirus se detectó en cinco infecciones múltiples distintas de las dos junto a ETEC así: dos casos junto a Adenovirus, dos con *B. hominis* y otro con *C. jejuni*. Las tres combinaciones de *S. flexneri* y *C. jejuni*, *C. parvum* y *C. cayetanensis* y *H. nana* junto a *B. hominis* suman los restantes veinte casos de infección múltiple. (Tabla No. 4).

Tabla No. 4

Infecciones por uno o más patógenos encontrados en el estudio.

No. de patógenos por paciente	No. (%) de niños infectados		
	Hombres	Mujeres	Total
1	20 (23.8)	16 (19.05)	36 (42.86)
2	11 (13.1)	7 (8.33)	18 (21.43)
3	1 (1.19)	1 (1.19)	2 (2.38)
4 o más	0 (0)	0 (0)	0 (0)
0 (sin hallazgos)	15 (17.9)	13 (15.5)	28 (33.33)
Total	47 (55.95)	37 (44.05)	84 (100)

Los principales microorganismos involucrados y su prevalencia se enumeran así: Rotavirus 20.24% (17/84), *Escherichia coli* enterotoxigénica (ETEC) 19.05% (16/84) y Adenovirus 10.71% (9/84).

Considerando las infecciones múltiples, los restantes agentes infecciosos se encontraron en el 34.52% de los pacientes distribuyéndose así: *Shigella* spp. 7.14% (6/84), *Cryptosporidium parvum* 7.14% (6/84), *Cyclospora cayetanensis* 5.95% (5/84), *Campylobacter* spp. 4.76% (4/84) y *Giardia lamblia* 2.38% (2/84). *Salmonella* sp, *Hymenolepis nana*, *Endolimax nana*, *Entamoeba histolytica-dispar*, *Aeromonas* sp y *Ascaris lumbricoides* infectaban a un solo niño cada uno (1.19%), completando el 7.14% (6/84). El restante 33.33% (28/84) de los niños no presentaba patógeno alguno. (Tabla No.4 y No.5).

Tabla No. 5
Hallazgos de laboratorio en los pacientes muestreados

Hallazgo	No. de aislamientos*	Porcentaje (N=84)
Rotavirus	17	20.24
ETEC	16	19.05
Adenovirus 40-41	9	10.71
<i>Shigella flexneri</i>	5	5.95
<i>Cyclospora cayetanensis</i>	5	5.95
<i>Campylobacter jejuni</i>	3	3.57
<i>Cryptosporidium parvum</i>	6	7.14
<i>Giardia lamblia</i>	2	2.38
<i>Salmonella</i> spp.	1	1.19
<i>Campylobacter coli</i>	1	1.19
<i>Aeromonas</i> sp.	1	1.19
<i>Ascaris lumbricoides</i>	1	1.19
<i>Hymenolepis nana</i>	1	1.19
<i>Endolimax nana</i>	1	1.19
<i>Shigella sonnei</i>	1	1.19
<i>Entamoeba histolytica - dispar</i>	1	1.19
Sin hallazgos de laboratorio	28	33.33

* El hallazgo de infecciones múltiples eleva el total de datos de esta columna por encima del número total de pacientes muestreados (N=84).

Fuente: Datos Experimentales, Proyecto ETEC-HR-IGSS

C. Escherichia coli enterotoxigénica, toxinas y factores de colonización intestinal

ETEC fue 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, la mitad de estos casos eran niños que no habían cumplido el primer año de vida (Tabla No. 6).

Tabla No. 6

Distribución etárea de la infección por ETEC

Edad (meses)	Pacientes positivos para ETEC (Número y porcentaje)
0 a 6	3 (18.8)
7 a 12	5 (31.3)
13 a 18	4 (25.0)
19 a 24	1 (6.3)
25 a 30	1 (6.3)
31 a 36	2 (12.5)
37 a 42	0 (0.0)
43 a 50	0 (0.0)

Fuente: Ficha Epidemiológica Proyecto ETEC-HR-IGSS

Las cepas poseían o expresaban una o ambas toxinas. El 37.5% (6/16) expresaba la toxina termoestable (ST), el 12.5% (2/16) expresaba la toxina termolábil (LT) y el restante 50% (8/16) expresaba ambas toxinas.

En el 68.8% (11/16) de las cepas de *Escherichia coli* enterotoxigénica aisladas fue posible detectar factores de colonización intestinal (FC), mientras que en el restante 31.3% (5/16) de las cepas no se detectó ningún FC (Tabla No. 7).

Tabla No. 7

Toxinas y factores de colonización intestinal detectados en el estudio.

Factores de Colonización	Cepas productoras de toxinas y FC			TOTAL
	ETEC ST No (%)	ETEC LT No (%)	ETEC ST-LT No (%)	
CFA - I	3 (18.75%)	0 (0)	4 (25.0)	7 (43.75)
CS1, CS2, CS3	0 (0)	0 (0)	2 (12.5)	2 (12.5)
CS17	0 (0)	0 (0)	1 (6.25)	1 (6.25)
PCF 0166	1 (6.25)	0 (0)	0 (0)	1 (6.25)
Subtotal	4 (25%)	0 (0)	7 (43.75%)	11 (68.75)
Subtotal sin FC	2 (12.5)	2 (12.5)	1 (6.25)	5 (31.25)
TOTAL	6 (37.5)	2 (12.5)	8 (50)	16 (100)

Fuente: Datos Experimentales Proyecto ETEC-HR-IGSS

Los Factores de Colonización Intestinal (FC) investigados fueron CFA-I, CS1, CS2, CS3, CS4, CS5, CS6, CS7, CS17, y PCFO159, PCFO166 y CFA/III. Las cepas LT no expresaron ningún FC, a diferencia de las cepas ST positivas y las ST-LT positivas en las cuales si fue posible detectarlos. De seis cepas ST positivas dos no expresaron factores de colonización, tres expresaron CFA - I y una PCFO166. De ocho cepas ST-LT positivas una no expresó ningún factor, cuatro fueron CFA-I, dos presentaban el conjunto de factores CS1-CS2-CS3 y una expresó el factor CS17 (Tabla No. 7).

De los 12 factores de colonización, el más encontrado fue CFA-I, en un 43.75% (7/16) de las cepas de *E. coli* enterotoxigénica aisladas. En orden descendiente estaban CS1, CS2 y CS3 con el 12.5% (2/16), CS17 con 6.25% (1/16) y PCFO166 con 6.25% (1/16). No se encontraron cepas productoras de los restantes factores de colonización estudiados. Todas las cepas control reaccionaron de manera adecuada durante el ensayo dot-blot para factores de colonización.

D. Variables ambientales y socioeconómicas asociadas a la infección por ETEC

La encuesta formulada a los pacientes y sus responsables pretendió encontrar evidencia de variables biológicas, clínicas y socioeconómicas asociadas a la infección por ETEC. Dichas variables fueron analizadas mediante regresión logística y se identifican al pie del Cuadro No. 1 como la columna con eventos de la A a la M (Tabla No. 8).

La asociación entre las variables de la A a la M y el hallazgo de ETEC en cualquier niño de la muestra nos lo indican el valor P y el Intervalo de Confianza (IC). Para cada puntaje P menor a 0.05, dicha variable se encontraría asociada de manera estadísticamente significativa con ETEC en la población de la cual se obtuvo la muestra. Para cada IC menor a 1, dicha variable se convertiría en un factor protector contra ETEC, mientras que un IC mayor a 1 sería un factor agresor (Tabla

Tabla No. 8

Regresión logística del evento ETEC y las variables A - M para 84 observaciones

Chi2(13) de la R. Logística

Probabilidad > chi2

Pseudo R2

ETEC	Odds Ratio	Error St.	z	P> z	[Inter. de Conf. 95%]
A	1.8511	1.6089	0.708	0.479	0.3370 10.1688
B	1.9156	2.4993	0.498	0.618	0.1485 24.7111
C	1.7681	1.2852	0.784	0.433	0.4254 7.3491
D	0.3051	0.3572	-1.014	0.311	0.0308 3.0264
E	0.7193	0.5538	-0.428	0.669	0.1591 3.2524
F	1.5081	1.4860	0.417	0.677	0.2186 10.4031
G	0.4625	0.5446	-0.655	0.513	0.0460 4.6483
H	0.4738	0.4397	-0.805	0.421	0.0769 2.9208
I	1.5482	1.3375	0.506	0.613	0.2848 8.4169
J	0.5027	0.4495	-0.769	0.442	0.0871 2.9004
K	0.4255	0.3732	-0.974	0.33	0.0763 2.3738
L	0.3438	0.3101	-1.184	0.237	0.0587 2.0138
M	0.9175	0.6138	-0.129	0.898	0.2473 3.4042

A) diarrea con más de un día de duración, B) más de 3 evac. por día, C) deshidratación moderada a severa, D) moco en heces, E) sangre en heces, F) 2 o más síntomas adicionales, G) severidad general, H) lactancia materna, I) alimentación complementaria antes de 4 m. de edad, J) familiares enfermos dentro del hogar, K) algún nivel educativo del encargado, L) agua potable entubada en el hogar, M) presencia de animales dentro del hogar.

No. 8).

De acuerdo al análisis anterior, ninguna variable medida en la muestra de 84 niños se convirtió en una variable asociada a ETEC de manera estadísticamente significativa pues todos los puntajes P son mayores a 0.05. El intervalo de confianza de todas las variables es amplio, por ello no es posible inferir si la variable es un factor agresor o protector dentro de la población. Sin embargo, puede afirmarse que una muestra de mayor tamaño podría reducir los intervalos de confianza para las variables medidas, incrementando la sensibilidad de la encuesta y aumentando la probabilidad de encontrar asociaciones estadísticamente significativas.

IX. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

En términos generales la prevención de la enfermedad diarreica se ve limitada por las condiciones sanitarias y hábitos de higiene en el hogar, la falta de educación y acceso a información y la abundancia de agentes causales ante los cuales debe enfrentarse el sistema inmune del individuo. La descripción de los agentes infecciosos involucrados y sus antígenos, y su asociación con variables ambientales y socioeconómicas contribuye a la delimitación de soluciones concretas al problema.

De allí que el presente estudio investigara la prevalencia de patógenos en pacientes con diarrea deshidratante, estudiando a profundidad a *Escherichia coli* enterotoxigénica por ser reconocido como un microorganismo de alta prevalencia en Guatemala.

Al igual que otros agentes infecciosos, ETEC se transmite por vía feco-oral e infecta de manera indistinta a individuos de ambos sexos. Sin embargo, la mayor cantidad de niños que niñas en la muestra de este estudio (varones 55.95% vrs niñas 44.05%) coincide con lo observado en numerosas investigaciones anteriores. Los autores atribuyen esta tendencia a que durante la infancia los niños tienen mayor libertad para jugar y salir a la calle que las niñas, experimentando con ello un mayor contacto con ambientes contaminados (5, 8, 70).

Incluyendo a ETEC, durante el estudio fueron detectados 16 distintos microorganismos en el 66.67% de los pacientes. La Tabla No. 3 muestra un total de aislamientos superior al número de preescolares del estudio, la diferencia la constituyen veinte pacientes con infecciones múltiples (23.8%). La detección de una gran cantidad y variedad de agentes infecciosos se facilitó al construir una muestra compuesta exclusivamente de pacientes con enfermedad gastrointestinal exentos de tratamiento antimicrobiano alguno, a diferencia de otros estudios que monitorean tanto a pacientes sanos como enfermos (26, 27, 36, 48, 50).

Rotavirus y adenovirus fueron investigados por inmunocromatografía de un solo paso para la detección de antígeno en heces. El elevado porcentaje de detección en la muestra indica que siguen siendo los principales agentes causales de diarrea en preescolares como lo reporta Tamara Velásquez en 1992 (26.5% de pacientes con diarrea aguda) y Remei Gordillo en 1996 (36% de pacientes con diarrea aguda) (71, 72). Otros enteropatógenos como *Shigella spp.*, *Campylobacter spp.*, *Salmonella sp.*, *Aeromonas sp.*, se encuentran en una proporción menor a los patógenos virales y junto al resto de agentes infecciosos reflejan el nivel de fecalismo en la población.

Cryptosporidium parvum (7.14%) y *Cyclospora cayetanensis* (5.95%) se encontraron en cantidad importante y con relativa facilidad empleando la tinción de alcohol-ácido-resistencia de Kinyoun modificada para heces. Es notable el hallazgo de un solo caso de *Entamoeba histolytica – dispar*, protozoo que no fue observado en preparaciones de solución salina ni lugol, sino hasta utilizar la tinción de Hematoxilina Férrica. *Ascaris lumbricoides*, *Endolimax nana* e *Hymenolepis nana* se detectaron por microscopía convencional, sin encontrarse más de un caso por cada uno.

En un 33.33% de los preescolares no fue posible detectar agente causal alguno. Sin embargo, debe considerarse que otros patógenos no investigados, como Norovirus y Astrovirus, pueden estar presentes en estos niños (25-27, 29, 45, 73).

ETEC se constituyó en el principal agente infeccioso bacteriano en pacientes con diarrea deshidratante. Las cepas de *Escherichia coli* fueron detectadas por su habilidad de sintetizar toxina lábil, estable o ambas. Al mismo tiempo, el 68.75% de las cepas poseían o expresaban factores de colonización, de los cuales CFA/1 fue el principal factor de colonización, seguido de CS1 CS2 y CS3, CS17 y PCFO166.

El perfil antigénico de las cepas de ETEC detectadas en esta muestra posee pocas diferencias con los reportes de otras regiones del mundo (8, 41). Es pertinente señalar que la investigación de FC en las cepas de ETEC se diseñó con

el fin de encontrar aquellos para los cuales se hubiera descrito capacidad inmunogénica y a la vez fueran de amplia distribución (8).

Se ha descrito en otros estudios la curiosa ausencia de FC en cepas de ETEC productoras exclusivamente de toxina lábil (8, 11, 41, 53). En el presente estudio también se observó el mismo fenómeno, pues de las 16 cepas de ETEC, dos cepas expresaban LT y ninguna de ellas expresó FC, ocho cepas fueron ST-LT (siete con FC y una sin FC) y seis cepas fueron ST (4 con FC y dos sin FC) (Tabla No. 7).

Con el objetivo de aislar abundantes cepas de *E. coli* productora de toxinas para investigar la presencia de factores de colonización intestinal, se establecieron criterios de inclusión y exclusión que permitieran enrolar pacientes cuyas características hacen sospechar una infección por ETEC. Esto se reflejó en la obtención de una muestra relativamente homogénea pues las distintas variables clínicas y socioeconómicas registradas en la ficha epidemiológica no mostraban mayores diferencias entre pacientes con ETEC y sin ETEC. Sin embargo, las variables H) lactancia materna, J) familiares enfermos en el hogar, K) nivel educativo de la madre o encargado y L) acceso a agua dentro del hogar, presentan un intervalo de confianza de menor amplitud que otras variables. Al ejecutar un muestreo de mayor dimensión estos factores podrían convertirse en variables directamente asociadas a la presencia de ETEC (Tabla No. 8).

El impacto clínico de la infección por ETEC preescolares es apreciable puesto que los pacientes infectados constituyeron casi la quinta parte de una muestra integrada por menores que consultaron por diarrea deshidratante de moderada a severa. Todos casos de infección por ETEC requirieron atención hospitalaria, ocurrieron en menores de 36 meses de edad, y la mitad de los casos eran pacientes menores de un año de vida.

X. CONCLUSIONES

1. *Escherichia coli* enterotoxigénica fue el principal agente infeccioso de origen bacteriano encontrado en la muestra, asociado con diarrea deshidratante severa que requirió atención hospitalaria, detectándose en el 19.05% de los preescolares enrolados en el estudio.
2. *E. coli* enterotoxigénica es el segundo agente causal de diarrea deshidratante más importante en la muestra, su detección involucra la investigación de enterotoxinas en colonias aisladas de *Escherichia coli* mediante inmunoensayo ligado a enzimas.
3. Por primera vez se describe el hallazgo de ETEC, sus toxinas y los principales factores de colonización intestinal (FC) en población atendida en centros hospitalarios de la Ciudad de Guatemala. Se detectaron seis FC en las cepas de ETEC: CFA/I, CS1, CS2, CS3, CS17 y PCFO166, mediante la técnica del Dot-Blot sobre membrana de nitrocelulosa.
4. Los antígenos fímbricos de *E. coli* enterotoxigénica detectados en la muestra fueron: CFA-I, CS1, CS2, CS3, CS17 y PCFO166. Dichos FC se detectaron en cepas de ETEC productora de toxina estable y cepas productoras de toxina estable y lábil, no así en cepas productoras exclusivamente de toxina lábil.
5. Los antígenos de ETEC detectados en la muestra coinciden con la composición de la vacuna oral empleada con éxito en la prevención de la infección por este agente infeccioso en otras partes del mundo.
6. El uso de una vacuna oral compuesta por las toxinas lábil y estable de ETEC, así como de sus antígenos: CFA/1, CS1, CS2, CS3, CS17 y PCFO166 en población preescolar de Guatemala podría prevenir la infección por ETEC en hasta un 19% de la población.

7. Además de ETEC, rotavirus y adenovirus 40-41 continúan siendo importantes agentes causales de diarrea deshidratante en la población preescolar de Guatemala, superando en prevalencia a otros agentes infecciosos encontrados en menor número.
8. El impacto de la diarrea deshidratante causada por ETEC es más importante en los primeros dos años de vida del niño, afectando principalmente a los menores de 12 meses de edad. Esto coincide con la interrupción de la lactancia materna exclusiva y la transición hacia la alimentación complementaria.
9. Los criterios de inclusión y exclusión aplicados al muestreo permitieron analizar información clínica y de laboratorio de preescolares infectados en varios casos con más de un agente infeccioso. Sin embargo, el reducido número de muestra no ofrece suficiente información para asociar de manera estadísticamente significativa el hallazgo de ETEC con variables socioeconómicas.

XI. RECOMENDACIONES

1. Profundizar en el conocimiento de la infección por *Escherichia coli* enterotoxigénica en población preescolar y adulta de Guatemala, realizando estudios de este tipo con mayores muestreos, considerando población de área urbana y rural con el fin de aplicar herramientas estadísticas de mayor poder.
2. Viabilizar estudios en población guatemalteca utilizando la vacuna oral contra ETEC, compuesta de ambas toxinas y los factores de colonización CFA/I, CS1, CS2, CS3, CS17 y PCFO-166, evaluando la respuesta inmune de los voluntarios del estudio, la posterior susceptibilidad a la infección por este microorganismo y cualquier efecto secundario atribuible a la inmunización.
3. Sociabilizar en el Sector de Salud Pública la importancia epidemiológica de la infección de preescolares por ETEC así como la posibilidad de ser prevenida con éxito mediante inmunización oral.

XII. REFERENCIAS

1. WHO. Weekly Epidemiology Reports. 1999. WHO Weekly Epidemiology Reports.
2. Luján R. Indicadores comunitarios de agua y saneamiento en relación con diarrea y estado nutricional de niños menores de 5 años de edad. 2001. Mesa redonda "Implicaciones de la contaminación del agua para consumo humano", en el XII Congreso Centroamericano de Microbiología" Guatemala, Guatemala. Comunicación personal.
3. Cruz JR, et al. Epidemiology of persistent diarrhea among Guatemalan rural children. 1992. Acta Paediatrica. Supl. 381, p 22-26.
4. Cruz JR, et al. Clinical and microbial aspects of acute and persistent diarrhea in Guatemalan rural children. 1994. Publicación INCAP E-2429.
5. Martorell R, et al. Efecto de las diarreas sobre el retardo en crecimiento físico de niños guatemaltecos. 1976. Archivos Latinoamericanos de Nutrición XXVII. Publicación INCAP E-919, p 311-324.
6. Engle P, et al. Efecto de la desnutrición sobre el desarrollo mental. 1973. Seminario sobre la Org. de Servicios para el Ret. Mental. Publ. Cient. No. 293. Biblioteca INCAP.
7. Klein RE, Habicht JP, Yarbrough C. Effects of Protein-Calorie malnutrition and mental development. 1971. Advances in Pediatrics. Vol. 18, p 75-91.
8. Nataro JP, Kaper JB. Diarrheagenic *Escherichia coli*. 1998. Clinical Microbiology Reviews. Vol. 18, No. 11, p 142-201.
9. Sack DA, et al. Breastfeeding and the risk of life - threatening enterotoxigenic *Escherichia coli* diarrhea in Bangladeshi infants and children. 1997. Pediatrics. Vol. 100, No 6. p e2.

10. Evans DG, et al. Plasmid-controlled colonization factor associated with virulence in *Escherichia coli* enterotoxigenic for humans. 1975. Infection and Immunity. Vol. 12, No. 3, p 656-657.
11. Cassels F, Wolf MK. Colonization Factors of Diarrheagenic *Escherichia coli* and their intestinal receptors. 1995 Journal of Indian Microbiology. Vol. 15, No. 3, p 214-226.
12. Evans DG, et al. Administration of purified colonization factor antigens (CFA/I, CFA/II) of enterotoxigenic *Escherichia coli* to volunteers. Response to challenge with virulent enterotoxigenic *Escherichia coli*. 1984. Gastroenterology. Vol. 87, p 934-940.
13. Forrest BD. Indirect measurement of intestinal immune responses to an orally administered attenuated bacterial vaccine. 1992. Infection and Immunity. Vol. 60, No. 5, p 2023-2029.
14. Weeneras C, et al. Antibody secreting cells in human peripheral blood after oral immunization with an inactivated enterotoxigenic *Escherichia coli* vaccine. 1992. Infection and Immunity. Vol. 60, No. 7, p 2605-2611.
15. Savarino SJ, et al. Safety and immunogenicity of an oral, killed enterotoxigenic *Escherichia coli*-cholera toxin B subunit vaccine in Egyptian adults. 1998. The Journal of Infectious Diseases. Vol. 177, p 796-799.
16. Savarino SJ, et al. Oral, inactivated, whole cell enterotoxigenic *Escherichia coli* plus cholera toxin B subunit vaccine: Results of the initial evaluation in children. 1999. The Journal of Infectious Diseases. Vol. 179, 107-114.
17. Esrey SA. Water, waste, and well being: a multicountry study. 1996. American Journal of Epidemiology. Vol. 143, Issue 6, p 608-623.
18. Stanton BF, Clemens JD. An educational intervention for altering water-sanitation behaviors to reduce childhood diarrhea in urban Bangladesh. II. A randomized trial to assess the impact of the intervention on hygienic behaviors

- and rates of diarrhea. 1987. American Journal of Epidemiology. Vol. 125, Issue 2, p 292-301.
19. Technical Review Group WHO, Vaccine Research and Development. Report of the Technical Review Group Meeting, 1998. 1998. Cap. 2, p 62-66.
 20. Ivanoff B. Vaccine Research & Development: Diarrhoeal diseases. 1999. Vaccines, Immunization and Biologicals, World Health Organization. WHO Int. Web Page. Updated on March 3th, 1999.
 21. Instituto Nacional de Estadística. Encuesta Nacional de Salud Materno Infantil. ENSMI 98-99.
 22. UNICEF/COPANAPLAM. Avances en el cumplimiento de las metas de la cumbre mundial en favor de la infancia. INFORME FINAL DE UNICEF Y COPANAPLAM, Febrero 2000. Diarrea e Infecciones Respiratorias Agudas. Cuadro 7 y 8.
 23. MSPAS. Semanas Epidemiológicas año 2001. Semanas Epidemiológicas.
 24. Scrimshaw, N.S., et al. Diarrhea and nutrient requirements. 1983. New York Plenum Press.
 25. Cruz JR, et al. Etiología de la diarrea aguda en infantes de áreas marginales de Guatemala. 1986. En Memorias del VI Congreso Nacional de Microbiología. Publicación INCAP E-1199.
 26. Guerrant RL, et al. A prospective study of persistent diarrhea among children in an urban Brazilian slum. Patterns of occurrence and etiologic agents. 1990. American Journal of Epidemiology. Vol. 132, No. 1, p 144-156.
 27. Kanashiro HC, et al. Incidence and etiology of infantile diarrhea and major routes of transmission in Huascar, Peru. 1989. American Journal of Epidemiology. Vol. 129, Issue 4, p 785-799.

28. Mahalanabis D, et al. Water and electrolyte losses due to cholera in infants and small children: A recovery balance study. 1970. *Pediatrics*. Vol. 45, No. 3 p 374-385.
29. Cruz JR, et al. Astrovirus-associated diarrhea among Guatemalan ambulatory rural children. 1992. *Journal of Clinical Microbiology*. Vol. 30, No. 5, p 1140-1144.
30. Murray PR, et al. Enterobacteriaceae. 1995. *Manual of Clinical Microbiology*. Sixth Edition. ASM Press, Washington, p 443-447, 450-452.
31. Spangler BD. Structure and function of cholera toxin and the related *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. 1992. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. Vol. 56, No. 4, p 622-647.
32. Sukumar M, et al. The structure of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin -b by nuclear magnetic resonance and circular dichroism. 1995. *Protein Science*. Vol. 4, No. 9, p 1718-1729.
33. Merrit EA, et al. Crystal structure of cholera toxin B-pentamer bound to receptor GM1 pentasaccharide. 1998. *Protein Science*. Vol. 3 Issue 2. p 166-175.
34. Savarino SJ, et al. Induction of systemic antifimbria and antitoxin antibody responses in Egyptian children and adults by an oral, killed enterotoxigenic *Escherichia coli* plus cholera toxin B subunit vaccine. 2001. *Infection and Immunity*. Vol. 69, No. 5, p 2853-2857.
35. Blattner FR, et al. The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. 1997. *Science*. Sept 5, 277(5331), p 1453-1474.
36. Sommerfelt H, et al. Cohort Study of Guinean Children: Incidence, Pathogenicity, Conferred Protection, and Attributable Risk for Enteropathogens during the First 2 Years of Life. 2003. *Journal of Clinical Microbiology*. Vol. 41, No. 9, p. 4238-4245

37. Capric B, Gariépy J. Structural characterization of functionally important regions of the ETEC ST-1b. 1991. *Biochemistry*. Vol. 30, p 4803-4809.
38. Hoque AT, et al. Evaluation of conventional media for detection of colonization factor antigens for enterotoxigenic *Escherichia coli*. 1993. *Journal of Clinical Microbiology*. Vol. 31, No. 8, p 2163-2166.
39. Echeverría P, et al. Coli surface antigens associated with enterotoxigenic *Escherichia coli* strains isolated from persons with traveler's diarrhea in Asia. 1997. *Journal of Clinical Microbiology*. Vol. 35, No 6, p 1639-1641.
40. Viboud GI, Binsztein N, Svennerholm AM. Characterization of monoclonal antibodies against putative colonization factors of enterotoxigenic *Escherichia coli* and their use in an epidemiological study. 1993. *Journal of Clinical Microbiology*. Vol. 31, No. 3, p 558-564.
41. Wolf MK. Occurrence, distribution and associations of O and H serogroups, colonization factor antigens, and toxins of enterotoxigenic *Escherichia coli*. 1997. *Clinical Microbiology Reviews*. Vol. 10, No 4, p 569-584.
42. Sommerfelt H, et al. A new putative fimbrial colonization factor, CS19, of human enterotoxigenic *Escherichia coli*. 1997. *Infection and Immunity*. Vol. 65, p 507-513.
43. Ryder RW, et al. Infantile diarrhea produced by heat-stable enterotoxigenic *Escherichia coli*. 1976. *The New England Journal of Medicine*. Vol. 295, No. 16, p 849-853.
44. Mota-Hernández F, et al. Trastornos hidroelectrolíticos e hidratación oral en diarreas. 1995. *Boletín Médico del Hospital Infantil de México*. Vol. 52, No. 8, p 490-498.
45. Ludert JE, et al. Enteric virus infections and diarrhea in healthy and human immunodeficiency virus - infected children. 2000. *Journal of Clinical Microbiology*. Vol. 38, No. 8, p 2873-2877.

46. Mondal SK, et al. Occurrence of diarrhoeal diseases in relation to infant feeding practices in a rural community in West Bengal, India. 1996. *Acta Paediatrica*. Vol. 85, p 1159-1162.
47. Pertolita H, et al. Prevention of traveller's diarrhoea by oral B-subunit/whole-cell cholera vaccine. 1991. *Lancet*. No. 338: 1285-1289.
48. John Albert M, et al. Case-control study of enteropathogens associated with childhood diarrhea in Dhaka, Bangladesh. 1999. *Journal of Clinical Microbiology*. Vol. 37, No. 11, p 3458-3464.
49. Hyams KC, et al. Diarrheal disease during Operation Desert Shield. 1991. *The New England Journal of Medicine*. Vol. 325, No. 20, p 1423-1428.
50. Binsztein N, et al. Prospective cohort study of enterotoxigenic *Escherichia coli* infections in argentinean children. 1999. *Journal of Clinical Microbiology*. Vol. 37, No. 9, p 2829-2833.
51. Hallander H, et al. Analysis of incidence of infection with enterotoxigenic *Escherichia coli* in a prospective cohort study of infant diarrhea in Nicaragua. 1997. *Journal of Clinical Microbiology*. Vol. 35, No. 6, p 1404-1410.
52. Peruski LF, et al. Phenotypic diversity of enterotoxigenic *Escherichia coli* strains from a community-based study of pediatric diarrhea in periurban Egypt. 1999. *Journal of Clinical Microbiology*. Vol. 37, No. 9, p 2974-2978.
53. Qadri F, et al. Prevalence of toxin types & colonization factors in ETEC isolated during a 2-year period from diarrheal patients in Bangladesh. 2000. *Journal of Clinical Microbiology*. Vol. 38, No. 1, p 27-31.
54. Jetborn M, Ahrén C, Svennerholm AM. Dose-dependent circulating immunoglobulin a antibody-secreting cell and serum antibody responses in swedish volunteers to an oral inactivated enterotoxigenic *Escherichia coli* vaccine. 2001. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*. Vol. 8, No. 2, p 424-428.

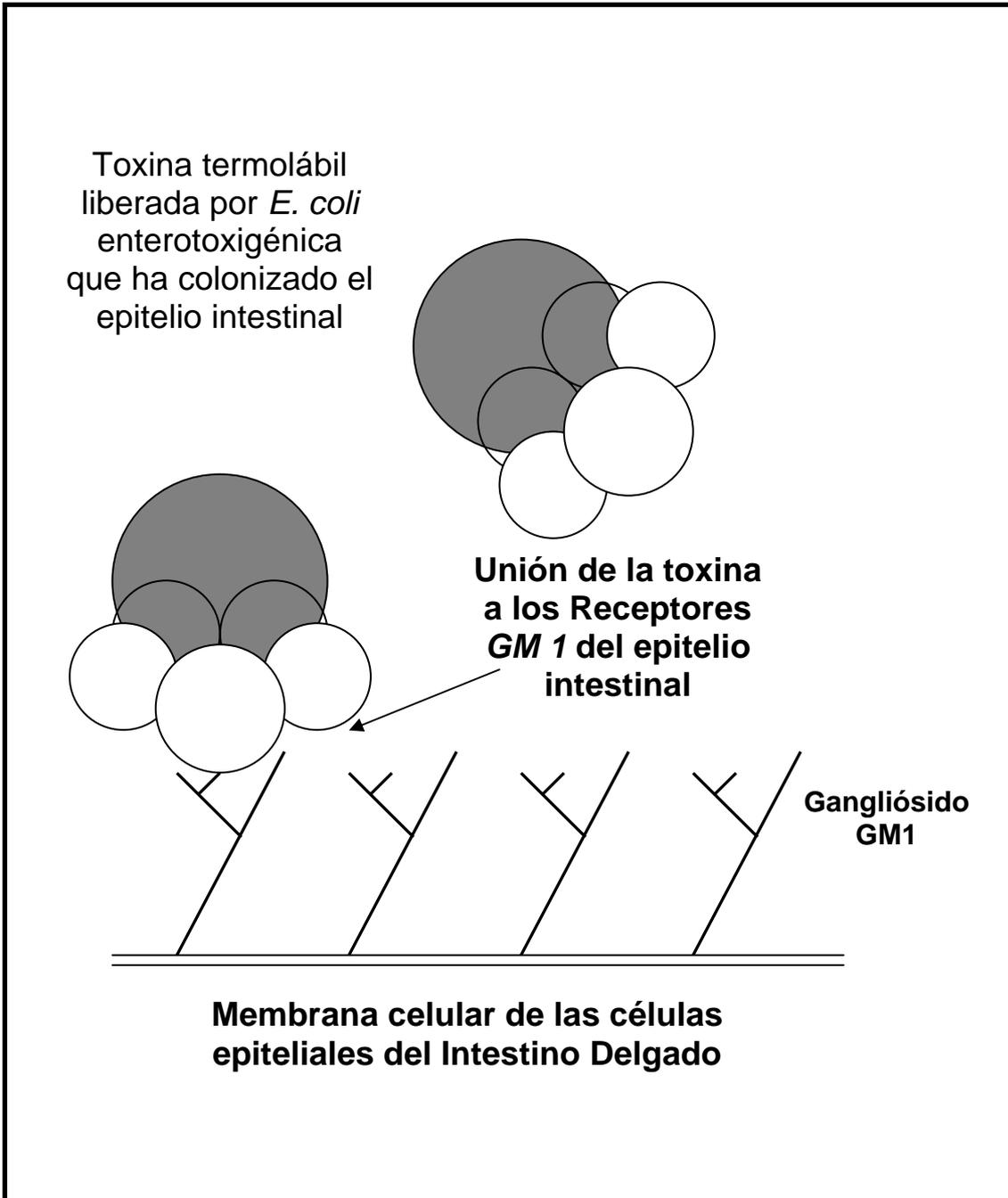
55. Conroy RM, et al. Solar disinfection of drinking water protects against cholera in children under 6 years of age. 2001. Archives of Disease in Childhood. Vol. 85, p 293-295.
56. Neutra MR, et al. Epithelial M cells, gateways for mucosal infection and immunization. 1996. Cell. Vol. 86, No. 3, p 345-348.
57. Wenneras C, et al. Intestinal immune responses in patients infected with enterotoxigenic *Escherichia coli* and in vaccinees. 1999. Infection and Immunity. Vol. 67, No. 12, p 6234-6241.
58. Cohen D, et al. Safety and immunogenicity of two different lots of the oral, killed enterotoxigenic *E. coli* - cholera toxin B subunit vaccine in israeli young adults. 2000. Infection and Immunity. Vol. 68, No. 8, p 4492-4497.
59. Turvill JL, et al. Tissue and luminal 5-HT levels in cholera toxin and *E. coli* heat labile toxin induced secretion. 1995. Gastroenterology (en "Nataro y Kaper, Diarrheagenic *E. coli* CMR 98"). Vol. 108:A333.
60. Cruz JR, et al. Breast milk anti-*Escherichia coli* heat-labile toxin IgA antibodies protect against toxin-induced infantile diarrhea. 1988. Acta Paediatrica Scand. Supl. 77 p 658-662.
61. Torres O, Cruz JR. Protection against *Campylobacter* diarrhea: role of milk IgA antibodies against bacterial surface antigens. 1993. Acta Paediatrica. 82: 835-838.
62. Ashkenazi S, Mirelman D. Noimmunoglobulin fraction of human milk inhibits the adherence of certain enterotoxigenic *Escherichia coli* strains to guinea pig intestinal tract. 1987. Pediatric Research. Vol. 22, p 130-134.
63. Tacket CO, et al. Protection by milk immunoglobulin concentrate against oral challenge with enterotoxigenic *Escherichia coli*. 1988. The New England Journal of Medicine. Vol. 318, No. 19, p 1240-1243.

64. Clemens JD, et al. Breast feeding as a determinant of severity in shigellosis. Evidence of protection throughout the first three years of life in Bangladeshi children. 1986. American Journal of Epidemiology. Vol. 123, Issue 4, p 710-720.
65. Faruque ASG, et al. Breast feeding and oral rehydration at home during diarrhoea to prevent dehydration. 1992. Archives of Disease in Childhood. Vol. 67, No. 8, p 1027-1029.
66. Sack, DA, et al. Microtiter assay for detection *Campylobacter* spp. and *Helicobacter pylori* with surface gangliosides wich bind cholera toxin. 1998. Journal of Clinical Microbiology. Vol. 36, No. 7. p 2043-2045.
67. Svennerholm A-M, et al. PCR vrs EIA for detection of enterotoxins of ETEC. 2000. NETROPICA.
68. Faruque ASG, et al. Hypoosmolar sucrose oral rehydration solutions in accute diarrhoea: a pilot study. 1996. Acta Paediatrica. 85: 1247-1248.
69. Mondal C, et al. Double blind, randomised controlled clinical trial of hypo - osmolar oral rehydration salt solution in dehydrating acute diarrhoea in severely malnourished (marasmic) children. 2001. Archives of Disease in Childhood. Vol. 84, p 237-240.
70. Weintraub A, et al. Diarrhea caused by Rotavirus in children less than 5 years of age in Hanoi, Vietnam. 2004. Journal of Clinical Microbiology. Vol. 42, No. 12, p 5745-5750.
71. Velásquez, TI. Prevalencia de rotavirus en niños de 0 a 3 años de edad con diarrea aguda, diagnosticados por el Método de Elisa y microscopía electrónica en el departamento de Pediatría del Hospital San Juan de Dios. Septiembre 1992. Tesis ad gradum Química Biológica, Vol 67-1992. USAC.
72. Gordillo Mata, MR. Prevalencia de Rotavirus en niños de 0 a 5 años de edad con diarrea aguda, que acuden a una clínica y laboratorio privados, diagnosticados por el método de Elisa y microscopía electrónica. Junio 1996. Tesis ad gradum Química Biológica, Vol 92-1996. USAC.

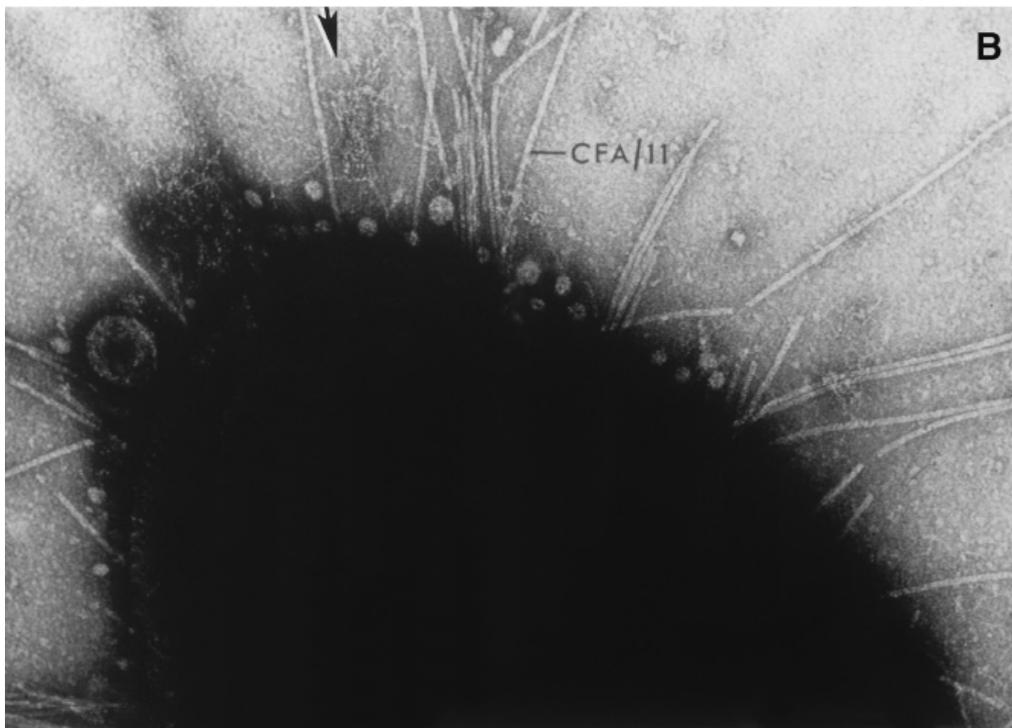
73. Schwab KJ, et al. Prevalence of Norovirus among visitors from the United States to Mexico and Guatemala who experience traveler's diarrhea. 2005. *Journal of Clinical Microbiology*. Vol. 43, p. 1112-1117.

XIII. ANEXOS

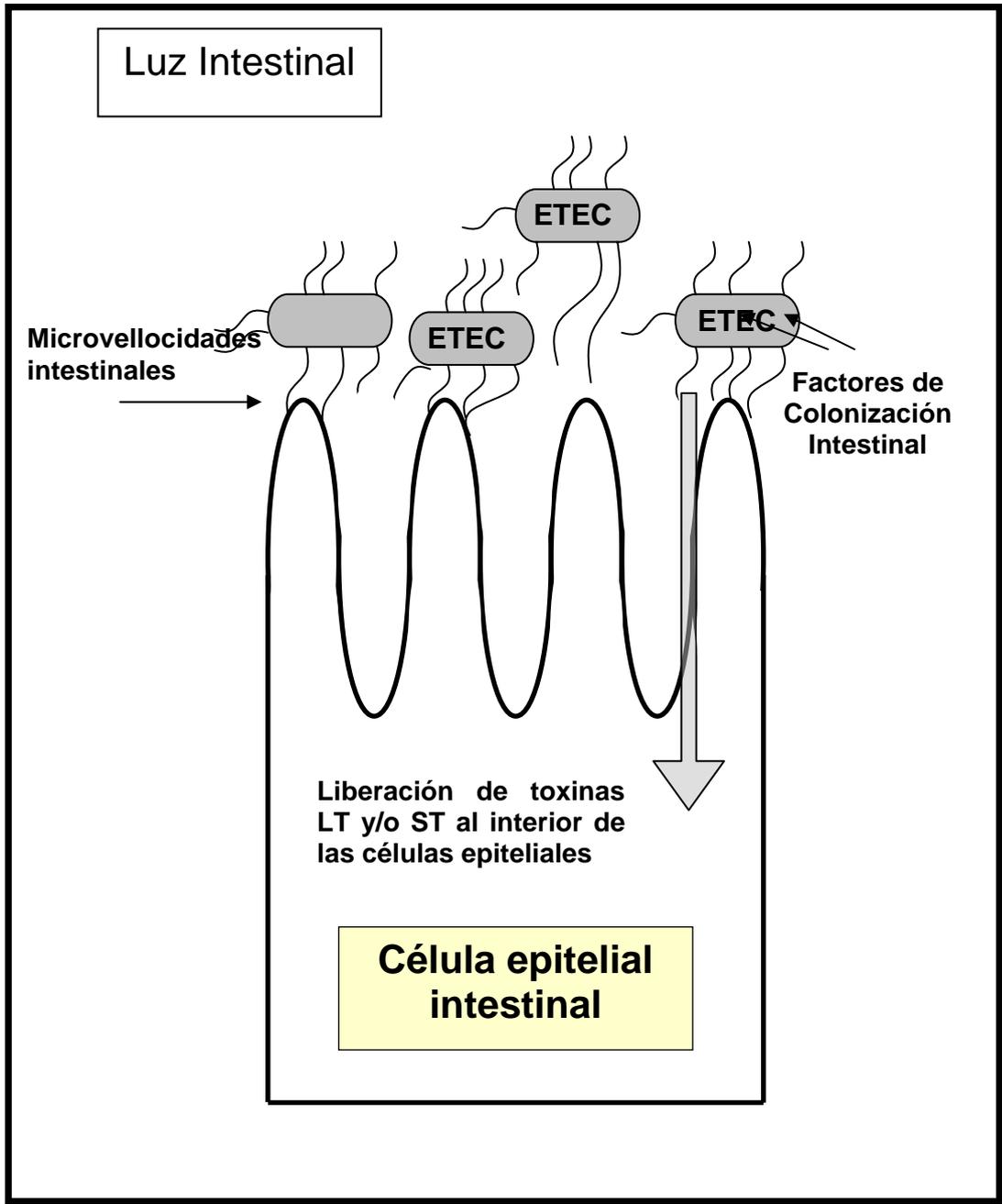
Anexo 1. Estructura de la Toxina Lábil, esquema de la unión de la toxina lábil al gangliósido GM1. (Basado en Spangler BD. 1992. MMB Reviews)



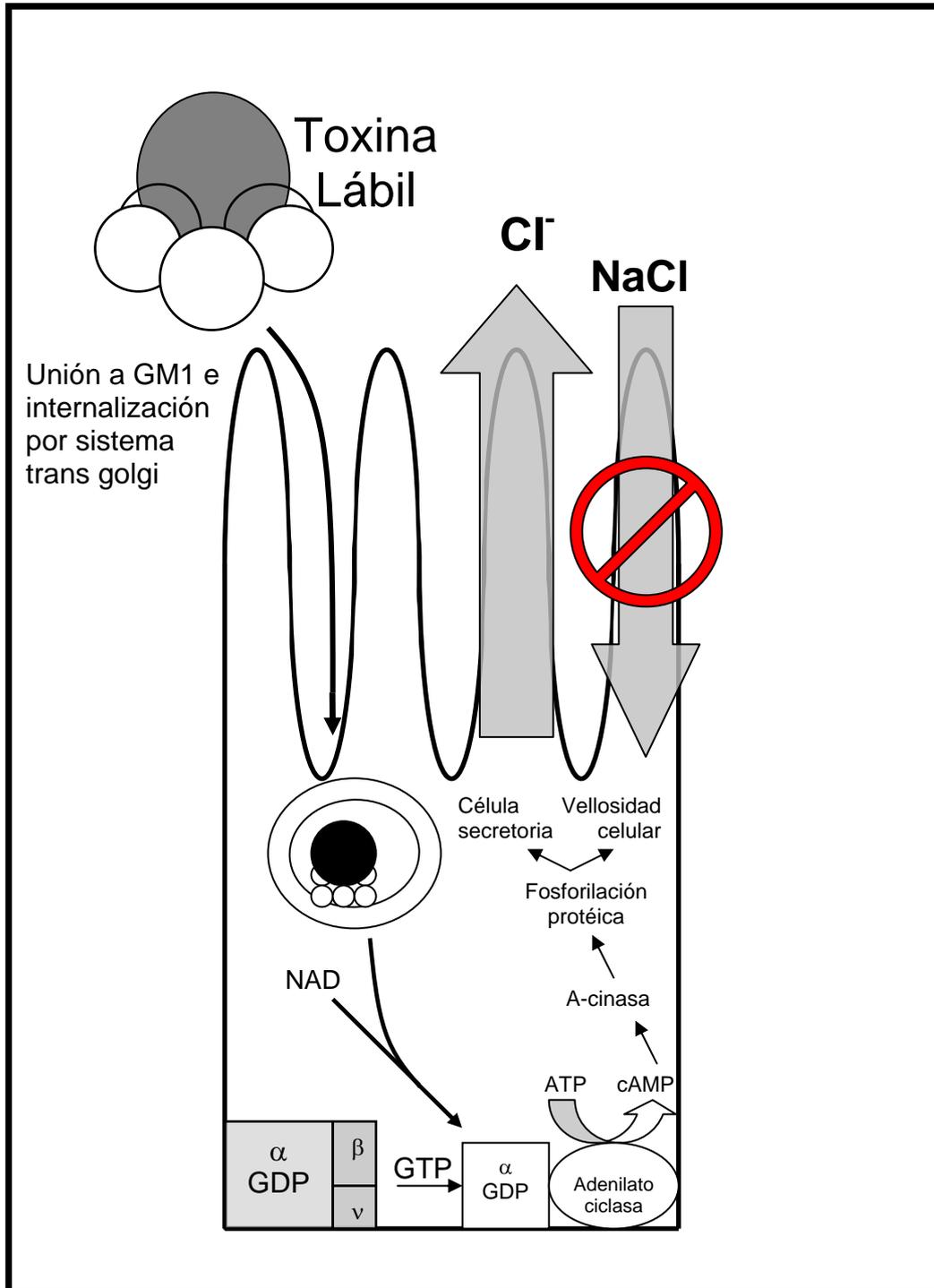
Anexo 2. Micrografía electrónica de *Escherichia coli* con factores de colonización intestinal. (A y B tomadas de Nataro y Kapper, 1998, CMR)



Anexo 3 Esquema de la adherencia intestinal de ETEC al epitelio intestinal mediante factores de colonización (FC) y liberación de toxinas e inducción del estado secretorio, sin invasión celular. (Tomado de Nataro y Kapper, CMR 1998)

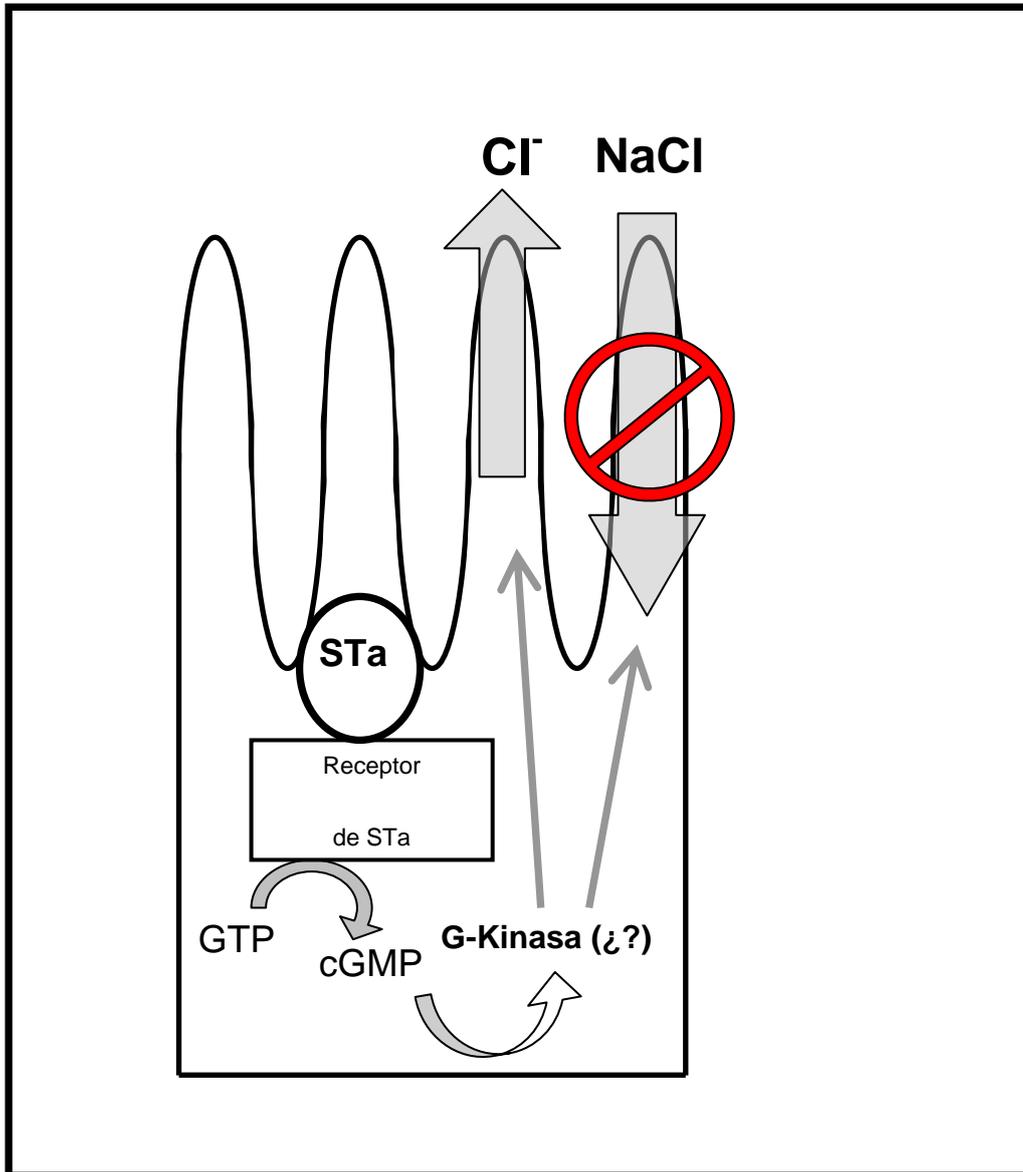


Anexo 4. Mecanismo de acción de la toxina lábil en la célula epitelial intestinal.
La toxina activa permanentemente la adenilato ciclasa, la que incrementa los niveles celulares del AMP cíclico, liberando cloruro en exceso y bloqueando la recepción de cloruro de sodio (Tomado de Nataro y Kapper, CMR 1998)



Anexo 5. Mecanismo de acción de la toxina estable en la célula epitelial intestinal.

La unión de la toxina al receptor Guanilato-ciclasa estimula la actividad de ésta enzima, elevando los niveles de GMP cíclico intracelular. Como resultado se estimula la secreción de iones cloruro y se inhibe la absorción de cloruro de sodio, estableciéndose el estado secretorio intestinal (Tomado de Nataro y Kapper, CMR 1998).



Anexo 6. Consentimiento Informado, Hoja Filtro y Ficha Epidemiológica.

***E. coli* enterotoxigénica, toxinas y factores de colonización intestinal en pacientes pediátricos del Hospital Roosevelt e IGSS.**

Nombre del paciente:					
Pregunta filtro	Posibles respuestas		Pregunta filtro	Posibles respuestas	
1) Diarrea presente hoy?	Si _____	No _____	2) Deshidratación H.E. presente?	Si _____	No _____
3) Edad menor a 60 meses?	Si _____	No _____	4) Usó antibióticos en las últimas 2 semanas	Si _____	No _____

SI LAS RESPUESTAS A LAS PREGUNTAS 1, 2 Y 3 SON AFIRMATIVAS Y LA RESPUESTA A LA PREGUNTA No. 4 ES NEGATIVA, EL PACIENTE PUEDE INGRESAR AL ESTUDIO

ASIGNE UN NÚMERO CORRELATIVO QUE ACOMPAÑE TODA LA DOCUMENTACIÓN DEL PACIENTE DURANTE SU ESTADÍA EN EL HOSPITAL ASÍ COMO LA IDENTIFICACIÓN DE LAS MUESTRAS QUE SE TOMEN:

MUESTRA	No. (ETEC-HR-IGSS)
2 CARY BLAIR	
1 PBS	
1 SAF	

CRITERIOS DE INCLUSIÓN

Podrán ingresar al estudio aquellos pacientes que llenen los siguientes criterios de inclusión:

1. Ser menores de 60 meses de edad
2. Presentar diarrea moderada a severa definida como tres o más deposiciones líquidas en 24 horas y que presenten al menos uno de los siguientes síntomas adicionales: náusea, vómitos, dolor abdominal o calambres, anorexia, fiebre.
3. Ausencia total de tratamiento con antibióticos en las últimas dos semanas (incluido el Tinidazol).
4. Se pueda obtener una muestra de heces
5. El padre de familia o encargado del niño firme un consentimiento informado en el que acepta el enrolamiento del paciente en el estudio.

CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

Serán excluidos del estudio aquellos pacientes que:

1. Tengan diarrea leve, que no requiera de TRO
2. Hayan estado con tratamiento con antibióticos en las últimas dos semanas
3. Sea imposible la obtención de material fecal fresco durante su observación.

FORMULARIO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

“*Escherichia coli* enterotoxigénica, toxinas y factores de colonización intestinal en pacientes que consultan por diarrea deshidratante a la pediatría de dos centros asistenciales de la Ciudad Capital” (ETEC-HR-IGSS)

El Hospital Roosevelt de la Ciudad Capital de Guatemala y la unidad periférica del IGSS en la zona 11, con la colaboración de el Instituto de Nutrición de Centro América y Panamá, INCAP, están llevando a cabo un estudio sobre la diarrea deshidratante en niños guatemaltecos de 6 a 59 meses de edad que acuden a este centro asistencial.

Este estudio pretende conocer qué causa la diarrea de su niño y por eso queremos solicitar una muestra de heces de su hijo(a) que en estos momentos se encuentra enfermo(a); y que nos conteste algunas preguntas para estudiar a fondo su mal. **Únicamente se tomará una porción pequeña de las heces fecales de su hijo(a) con la intención de encontrar qué microbio le esta enfermado.** Aunque no todos los resultados de la investigación se obtengan antes que el médico recete el tratamiento de su niño, la información que se obtenga servirá a los médicos de estos hospitales para diagnosticar y curar de mejor forma a otros niños enfermos de Guatemala.

Yo _____ (nombre del padre o encargado), estoy de acuerdo en participar en este estudio. Entiendo que se guardará la confidencialidad de mi participación por lo que **la información personal que yo proporcione no será del conocimiento de otras personas. He leído o me han explicado que me harán preguntas para determinar las causas de la diarrea de mi hijo (hija), las cuales responderé libremente.**

Entiendo que **mi participación es voluntaria** y que **estoy en entera libertad de no participar si no lo deseo** y que con esto no perderé el derecho a ser atendido(a) en este u otros hospitales ni recibiré ningún castigo o cobro. También **se que al firmar este documento no adquiero ningún compromiso con los investigadores excepto dar una muestra de heces de mi hijo y responder con sinceridad el cuestionario.** Entiendo que puedo resolver dudas respecto a esta enfermedad con cualquier persona involucrada en el estudio.

FECHA: _____

Nombre del paciente:

Día/mes/año

nombres y apellidos completos

Padre de familia o
encargado

legal:

Nombres y apellidos

Firma o impresión digital del padre o encargado

Firma del testigo

Nombre del entrevistador

Firma del entrevistador

Iniciales del paciente y número
correlativo

FICHA CLINICA. ETEC HR-IGSS-INCAP
Cuestionario de información epidemiológica del paciente
ingresado al estudio ETEC-HR-IGSS.

SE OBTUVO UNA MUESTRA DE HECES? SI _____

Número Correlativo

Datos Generales		
	PREGUNTA	RESPUESTAS
1	FECHA DE LA ENCUESTA	__ - __ - ____ dia mes año
2	NOMBRE DEL NIÑO: _____	
3	TELEFONO _____	
4	GENERO (1. Masculino 2. Femenino)	
5	DIRECCION _____ COLONIA _____ ZONA _____	
6	EDAD _____ - Meses - Años	__ __ __ __
7	FECHA DE NACIMIENTO	__ - __ - ____ dia mes año
8	PESO (kg)	____.____
9	TALLA (cm)	____.____
Datos de Diarrea		
10	TIENE DIARREA?: (1. Sí 0. No)	_____
11	CUANTOS DIAS HA TENIDO DIARREA?	_____
12	No. DE EVACUACIONES POR DIA (hacer referencia al día anterior):	_____
12 A	Consistencia de las heces fecales (1. Semi-sólidas 2. Blandas 3. Líquidas 4. Disentéricas)	_____
12 B	Signos de deshidratación 1. Leves (condición del niño* normal, ojos normales, mucosas normales, sed* normal, turgor de la piel normal, pulso radial* normal, no pérdida de peso) 2. Moderados por lo menos dos signos clave* presentes (condición del niño irritable/poco activo, ojos hundidos, mucosas secas, sediento, turgor de la piel reducido) 3. Severa (letargia, incapaz de beber, pulso radial ausente o incontable)	_____
13	DIARREA CON (1. SANGRE 2. MOCO)	_____

Signos y síntomas presentes	
14	NÁUSEA (1. SI 0. NO)

15	VOMITOS (1. SI 0. NO)	_____
16	DOLOR ABDOMINAL (1. SI 0. NO)	_____
17	FIEBRE (1. SI 0. NO)	_____
18	ANOTE LA TEMPERATURA ACTUAL (°C)	_____
Antibióticos		
19	HA ESTADO EN TRATAMIENTO CON ANTIBIOTICOS EN LAS ULTIMAS DOS SEMANAS (1. SI 0. NO)	_____
20	ANOTE EL NOMBRE DEL ANTIBIOTICO	_____
Alimentación		
21	TOMO LECHE MATERNA (1. SI 0. NO)	_____
22	HASTA QUE EDAD SE LE DIO DE MAMAR meses años	_____
23	ADEMAS DE LECHE MATERNA EL NIÑO: Toma pacha (1. SI 0. NO)	_____
24	INGIRIO SOLIDOS ANTES DE LOS CUATRO MESES DE EDAD (1. SI 0. NO)	_____
25	EL NIÑO COME FUERA DE CASA (1. SI 0. NO)	_____
26	ESTERILIZAN LAS PACHAS (1. SI 0. NO)	_____
27	CÓMO ESTERILIZAN LAS PACHAS	_____
28	ACTUALMENTE LA DIETA DEL NIÑO INCLUYE PECHO (1. SI 0. NO) PACHA (1. SI 0. NO)	_____
29	ALIMENTOS SOLIDOS VEGETALES (1. SI 0. NO) CARNE (1. SI 0. NO) POLLO (1. SI 0. NO) LACTEOS (1. SI 0. NO)	_____ _____ _____ _____
Datos de la Familia		
30	EL NIÑO VIVE CON Sus dos padres (1. SI 0. NO) Solo la madre (1. SI 0. NO) Solo el padre (1. SI 0. NO) Abuelos (1. SI 0. NO) Otro familiar (1. SI 0. NO) Especifique _____ Otros (1. SI 0. NO) Especifique _____	_____ _____ _____ _____ _____ _____
31	EXISTEN OTROS MIEMBROS DE LA FAMILIA O PERSONAS CERCANAS AL NIÑO(A) QUE PRESENTEN SINTOMAS SIMILARES (1. SI 0. NO) Especifique _____	_____

32	DONDE SE CUIDA AL PACIENTE DURANTE EL DIA Hogar (1. SI 0. NO) Guarderia (1. SI 0. NO) Colegio (1. SI 0. NO) Casa familiar (1. SI 0. NO) DIRECCION: _____	_____ _____ _____ _____
33	SI EL LUGAR DONDE CUIDAN AL NIÑO ES DIFERENTE DE DONDE VIVE, QUIEN PREPARA LA ALIMENTACION (1. En el hogar 2. En donde lo cuidan)	
34	QUIEN CUIDA AL NIÑO Mamá (1. SI 0. NO) Servicio Doméstico (1. SI 0. NO) Niñera (1. SI 0. NO) Maestra (1. SI 0. NO) Familiar (1. SI 0. NO)	_____ _____ _____ _____ _____
35	ULTIMO GRADO QUE CURSO LA PERSONA QUE TIENE A CARGO EL CUIDADO DEL NIÑO(A) DURANTE EL DIA: _____	
36	RAZA DE LA PERSONA QUE TIENE A CARGO EL CUIDADO DEL NIÑO (A) (1. INDIGENA 2. LADINA)	_____
Servicio de agua potable y aspectos ambientales.		
37	TIENE SERVICIO DE AGUA POTABLE DONDE LO CUIDAN: (1. SI 0. NO)	_____
38	Todo el día (1. SI 0. NO)	_____
39	TIENE SERVICIO DE AGUA POTABLE DONDE VIVE (1.SI 0.NO)	_____
40	Todo el día (1. SI 0. NO)	_____
41	EN QUE AREA DE LA CASA O DEL SITIO DONDE VIVE EL NIÑO, PASA ESTE LA MAYOR PARTE DEL TIEMPO: _____	
42	TIENEN ANIMALES EN CASA ? 1. Ninguno 2. Perros 3. Gatos 4. Aves 5. Otros: _____	_____ _____ _____ _____
43	NOMBRE DE LA PERSONA QUE RESPONDIO A ESTA ENCUESTA _____	
44	PARENTESCO CON EL PACIENTE 1. Ninguno 2. Padre 3. Madre 4. Hermano 5. Tío-tía 6. Abuelo-a 7. Otro: _____	_____ _____ _____ _____ _____ _____

ETEC-HR-IGSS, Examen físico y revisión por sistemas.

EXAMEN FISICO

Peso_____ (kg) Estatura _____ mt. _____ cm. Fec. Card. _____ Frec. Resp. _____

Temp. rectal (°C) _____ P/A _____ Déficit P/T _____ T/E _____

CC: _____ DHE Leve ____ Moderada ____ Severa ____ (marcar una)

REVISION POR SISTEMAS

SISTEMA	Normal	Observaciones
Ojos	_____	_____
Oídos	_____	_____
Naríz	_____	_____
Garganta	_____	_____
Cardiovascular	_____	_____
Pulmonar	_____	_____
Gastrointestinal	_____	_____
Neurológico	_____	_____
Muscular	_____	_____
Piel – mucosas	_____	_____
Trastornos conductuales	_____	_____

ETEC-HR-IGSS Hoja de evolución del paciente.

EVOLUCIÓN DEL PACIENTE

EVOLUCIÓN DÍA 0 (Ingreso al servicio)

– Marque con una X en el cuadro correspondiente

DHE leve DHE moderada DHE severa Sin diarrea

– Anote los valores solicitados en el cuadro respectivo

episodios de diarrea Peso Temp rectal

Tratamiento: _____

Observaciones: _____

EVOLUCIÓN DÍA 1

– Marque con una X en el cuadro correspondiente

DHE leve DHE moderada DHE severa Sin diarrea

– Anote los valores solicitados en el cuadro respectivo

episodios de diarrea Peso Temp rectal

Tratamiento: _____

Observaciones: _____

EVOLUCIÓN DÍA 2

– Marque con una X en el cuadro correspondiente

DHE leve DHE moderada DHE severa Sin diarrea

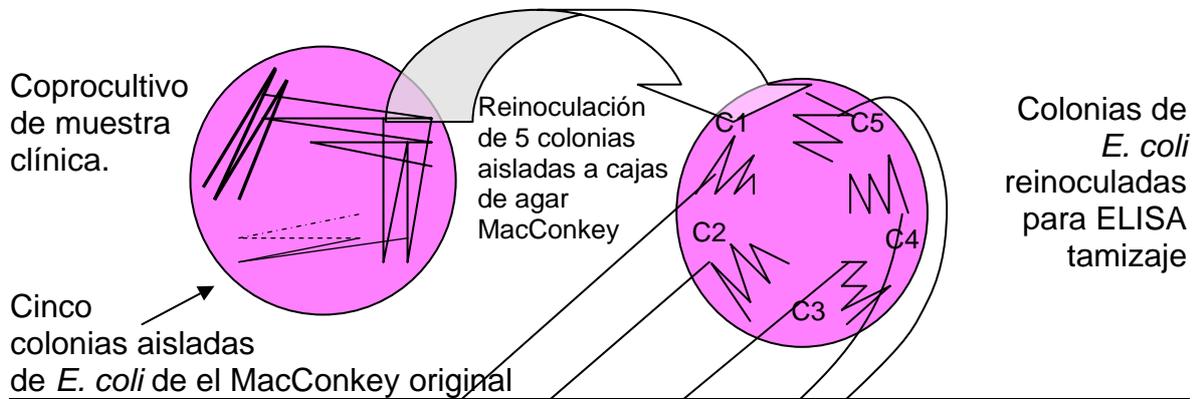
– Anote los valores solicitados en el cuadro respectivo

episodios de diarrea Peso Temp rectal

Tratamiento: _____

Observaciones: _____

Anexo 7. Esquema de inoculación de la placa de ELISA tamizaje.
Resumen del Procedimiento Operativo Standard (Tomado de Svennerholm A-M, Procedimientos Operativos Standard ELISA tamizaje).



1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A											
B	ST +	ST +	LT +	LT +	ST+ LT +	ST + LT +	ST - LT -	ST - LT -	LB no bact	LB no bact	
C	M # C1	C2	C3	C4	C5	M # C1	C2	C3	C4	C5	
D	M # C1	C2	C3	C4	C5	M # C1	C2	C3	C4	C5	
E	M # C1	C2	C3	C4	C5	M # C1	C2	C3	C4	C5	
F	M # C1	C2	C3	C4	C5	M # C1	C2	C3	C4	C5	
G	M # C1	C2	C3	C4	C5	M # C1	C2	C3	C4	C5	
H											

Nota:

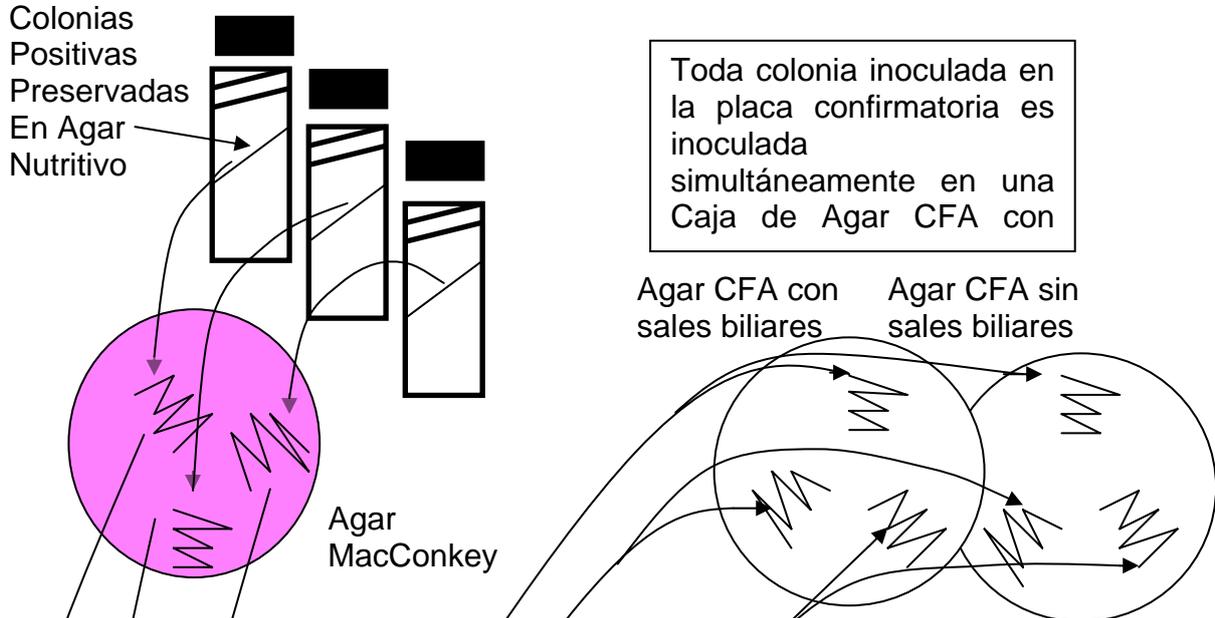
Las filas externas de la placa, A y H, así como las columnas 1 y 12 no son inoculadas, pues no llegan a tomarse lecturas de esos pozos al ofrecer sesgo por su disposición externa en la placa.

Los pozos B10 y B11 no son inoculados para constituirse en el control negativo de esterilidad del Caldo Luria Bertani.

M # Corresponde al número de muestra o paciente, con cinco colonias por muestra identificadas como C1, C2, C3, C4 y C5.

Las colonias con resultado positivo para LT o ST se preservan en Agar Nutritivo, a partir del reinóculo en MacConkey de donde se tomaron para inocular la placa.

Anexo 8. Esquema de inoculación de la placa de ELISA confirmación.
Resumen del Procedimiento Operativo Standard (Tomado de Svennerholm A-M, Procedimientos Operativos Standard ELISA tamizaje)..



1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A											
B	ST +	ST -	Mx #								
C	ST +	ST -	C1								
D	LT +	LB no	C2								
E	LT +	bact	C3								
F	ST +		Mx #								
G	LT +		C1								
H			C2								

Nota:

Las filas A y H, y las columnas 1 y 12 de la placa no se inoculan para evitar lecturas erróneas a la longitud de onda designada, por su ubicación externa la placa.

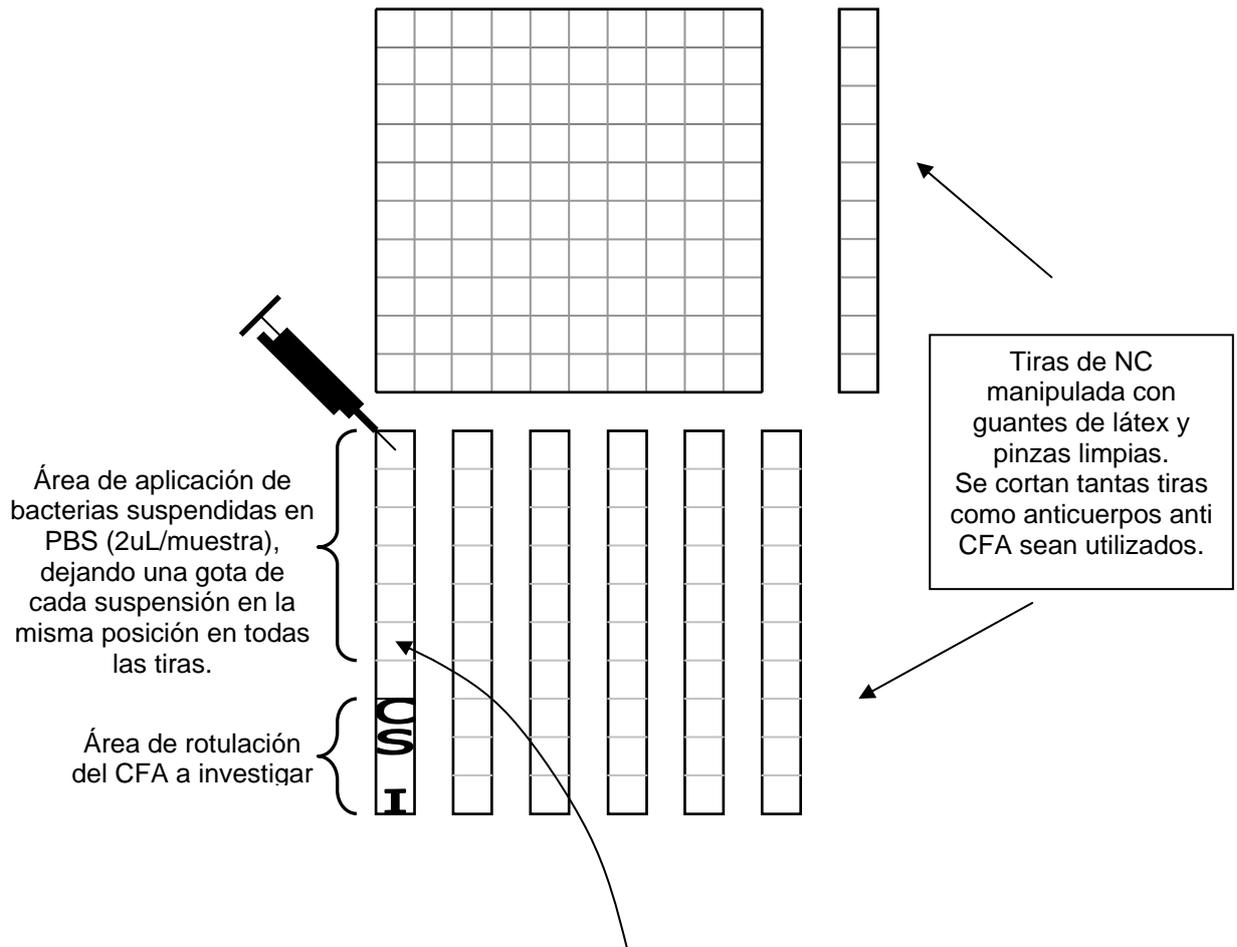
El pozo D3 no se inocula para ser en el control de esterilidad del Caldo Luria Bertani.

M # Corresponde al número de muestra o paciente, con cinco colonias por muestra identificadas como C1, C2 y C3.

Las colonias con resultado positivo para LT o ST son analizadas mediante un Dot-Blot que investiga la presencia de factores de colonización intestinal. Las colonias se preservan en PBS a partir del crecimiento masivo de cada colonia positiva sobre agar CFA con y sin bilis.

Anexo 9. Esquema de realización del Dot-Blot para investigar la presencia de Factores de Colonización Intestinal (Lemus O.).

Membrana de NitroCelulosa (NC) con cuadrícula marcada a presión dibujando con lápiz las líneas en un pliego de papel filtro disupesto sobre la membrana.



La primera gota de 2uL de suspensión de bacterias siempre corresponde a la cepa control positiva para el factor de colonización anotado en la tira. Esta cepa se aplica en la segunda cuadrícula más cercana al sitio de identificación de la tira y seguidamente las cepas a estudiar.

Br. Omar Estuardo Lemus
Autor

Licda. M.Sc. Olga Torres de Matute
Asesora

Lic. M.Sc. Rafael Pratdesaba Zea
Asesor

Lic. Osberth Morales
Revisor

Lic. Martín Gil
Revisor

Licd. Alba Marina Valdés de García
Directora

Lic. M.Sc. Gerardo Leonel Arroyo Catalán
Decano