



TITULO DE LA TESIS: "INTERES DE ESCHERICHIA  
COLI ENTEROTOXIGENICO EN LAS DIARREAS  
INFANTILES DE NUESTRO MEDIO "

AUTOR: AMPARO ESCRIBANO MONTANER

DIRECTORES: PROF. DR. JOAQUIN COLOMER SALA  
PROF. DR. JUAN GARCIA DE LOMAS

TRIBUNAL: Prof.Dr.D. JUAN BRINES SOLANES  
Prof.Dr.D. ENRIQUE HERNANDEZ GIMENEZ  
Prof.Dr.D. ADOLFO BENAGES MARTINEZ  
Prof.Dr.D. ROBERTO HERNANDEZ MARCO  
Prof.Dr.D. RAFAEL BORRAS SALVADOR

FECHA DE LA LECTURA: 29 - ENERO - 1986

CALIFICACION OBTENIDA: APTO "CUM LAUDEM"

D. JOAQUIN COLOMER SALA, Catedrático de Pediatría y Puericultura y D. JUAN GARCIA DE LOMAS BARRIONUEVO, Catedrático de Microbiología de la Universidad de Valencia,

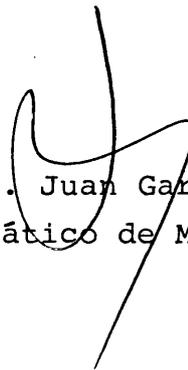
CERTIFICAN,

Que la Tesis Doctoral titulada "INTERES DE ESCHERICHIA COLI ENTEROTOXIGENICO EN LAS DIARREAS AGUDAS DE NUESTRO MEDIO", presentada por Doña Amparo Escribano Montaner para optar al Grado de Doctor en Medicina y Cirugía, ha sido realizada bajo nuestra dirección en los Departamentos de Pediatría y de Microbiología de esta Facultad y consideramos que reúne los requisitos necesarios para ser presentada para su lectura y defensa.

Y para que así conste, firmamos el presente en Valencia a tres de diciembre de mil novecientos ochenta y cinco.



Fdo: D. Joaquin Colomer Sala  
Catedrático de Pediatría



Fdo: D. Juan Garcia de Lomas  
Catedrático de Microbiología



"INTERES DE ESCHERICHIA COLI ENTEROTOXIGENICO  
EN LAS DIARREAS INFANTILES DE NUESTRO MEDIO"

Trabajo presentado por:  
AMPARO ESCRIBANO MONTANER,  
para optar al Grado de Doctor  
en Medicina y Cirugia por  
la Facultad de Medicina de  
la Universidad de Valencia.

UMI Number: U602916

All rights reserved

INFORMATION TO ALL USERS

The quality of this reproduction is dependent upon the quality of the copy submitted.

In the unlikely event that the author did not send a complete manuscript and there are missing pages, these will be noted. Also, if material had to be removed, a note will indicate the deletion.



UMI U602916

Published by ProQuest LLC 2014. Copyright in the Dissertation held by the Author.  
Microform Edition © ProQuest LLC.

All rights reserved. This work is protected against  
unauthorized copying under Title 17, United States Code.



ProQuest LLC  
789 East Eisenhower Parkway  
P.O. Box 1346  
Ann Arbor, MI 48106-1346

A Pepe por su cariño  
A David y Pau por su estímulo  
A todos los que me han ayudado

Cuando se repasa el camino que ha permitido a un clínico como yo introducirse y concluir una labor investigadora, como la que este trabajo resume, es inmediato tener presentes a todos los que con su dirección, consejo, ejemplo o estímulo han sido realmente los puntales de esa labor.

Por ello me es muy grato recordar como fue el profesor Dr. J. Colomer el que, a raíz de mi examen oral de Pediatría, introdujo el gusanillo de mi entusiasmo por esa especialidad, y como después ha ido agrandándolo día a día con su ánimo constante.

Como fue el profesor Dr. J. Brines el que me hizo vislumbrar la faceta docente e investigadora, introduciéndome casi "de la mano" en esa nueva etapa de mi formación, en la que siempre me ha servido de modelo.

Como ha sido el profesor Dr. J. García de Lomas el que me ha permitido concretar y desarrollar ese potencial acumulado, en un campo tan importante como la investigación aplicada, de tal forma que con su asesoramiento y apoyo he podido finalizar este periodo predoctoral.

Deseo por todo ello expresar a los tres mi gratitud, ofreciéndoles el resultado de mi esfuerzo como muestra de mi cariñoso y profundo reconocimiento.

No puedo tampoco dejar de mencionar a todos los que a lo largo de mis casi 3 años de trabajo, han contribuido a su conclusión, destacando especialmente a los profesores:

- J. Blanco y E. Gonzalez, de la Universidad de Santiago de Compostela, que pusieron en mis manos todos sus conocimientos sobre E. coli, aclarándome dudas y orientándome en el manejo de las técnicas.

- I. Orskov, de Statens Serum Institut, de Copenhague, por su delicadeza al corroborar nuestros resultados.

- R. Borrás, que ha planificado el estudio estadístico.

- J.M. Nogueira, J. Buesa, D. Crespo, por su ayuda en el laboratorio, así como a Ana Gómez y a todo el equipo de "cultivos celulares" por su constante colaboración.

Por último, gracias también a mis compañeros de Cuidados Intensivos de Pediatría, por su comprensión.

INDICE

1.- INTRODUCCION

	<u>Pag.</u>
1.1.- <u>PROBLEMA DE LAS DIARREAS INFECCIOSAS</u> <u>AGUDAS INFANTILES Y SU ETIOLOGIA</u>	
1.1.1.- Concepto de diarrea. Diarrea infecciosa . . . . .	2
1.1.2.- Epidemiología . . . . .	4
1.1.2.1.- Incidencia: morbilidad y mortalidad . . . . .	4
1.1.2.1.1.- Edad y formas de presentación	5
1.1.2.1.2.- Relación entre diarrea, malnutrición y agentes causales . . . . .	7
1.1.3.- Etiología . . . . .	9
1.1.3.1.- Avances en la investigación de nuevos patógenos . . . . .	9
1.1.3.2.- Agentes etiológicos actuales	11
1.1.3.3.- Tasas de prevalencia . . . . .	13
1.1.4.- Mecanismos patogénicos . . . . .	17
1.1.4.1.- Mecanismo toxigénico . . . . .	17
1.1.4.2.- Mecanismo invasivo . . . . .	20
1.2.- <u>DESCUBRIMIENTO DE ESCHERICHIA COLI Y SU</u> <u>ASOCIACION CON DIARREA AGUDA</u> . . . . .	24
1.2.1.- Concepto de E.C.E.P., E.C.E.T. y E.C.E.I. . . . .	35
1.3.- <u>ESCHERICHIA COLI ENTEROTOXIGENICO (E.C.E.T.)</u>	
1.3.1.- Propiedades enterotóxicas . . . . .	38

	<u>Pag.</u>
1.3.1.1.- Naturaleza y mecanismo de acción de la enterotoxina termolábil	39
1.3.1.2.- Naturaleza y mecanismo de acción de la enterotoxina termoestable	48
1.3.1.3.- Relación entre serotipos y ente- rotoxigenicidad . . . . .	53
1.3.1.4.- Detección de las enterotoxinas de <u>Escherichia coli</u> . . . . .	60
1.3.1.4.1.- Medios de cultivo . . . . .	60
1.3.1.4.2.- Factores que influyen en la producción de enterotoxina	64
1.3.1.4.3.- Conservación de los prepara- dos enterotóxicos y de E.C.E.T. . . . .	65
1.3.1.4.4.- Modelos experimentales para la detección de enterotoxinas	65
1.3.1.4.4.1.- Pruebas <u>in vivo</u> . . . . .	66
1.3.1.4.4.2.- Pruebas <u>in vitro</u> . . . . .	69
1.3.2.- Propiedades adhesivas. Factores colonización . . . . .	74
1.3.2.1.- Asociación entre adhesinas y serogrupos O . . . . .	78
1.3.2.2.- Relación entre la producción de enterotoxinas y antígenos de colonización . . . . .	80
1.3.2.3.- Capacidad hemaglutinante . . . . .	81
1.3.3.- Transmisión genética . . . . .	84
1.3.3.1.- Plásmidos Ent. . . . .	84
1.3.3.2.- Plásmidos CFA . . . . .	86
1.3.3.3.- Plásmidos R . . . . .	87
1.3.4.- Epidemiología de E.C.E.T. . . . .	88
1.3.4.1.- Diarrea en los países en vías de desarrollo . . . . .	89

	<u>Pag.</u>
1.3.4.2.- Diarrea del viajero . . . . .	91
1.3.4.3.- Diarrea en los países desarro- llados . . . . .	93
1.3.4.3.1.- Diarrea en la comunidad	93
1.3.4.3.2.- Brotes diarreicos en niños y adultos . . . . .	98
 1.4.- <u>ESCHERICHIA COLI ENTEROPATOGENO(E.C.E.P.)</u>	
1.4.1.- Concepto. Serogrupación . . . . .	103
1.4.2.- Aspectos epidemiológicos y pato- génicos . . . . .	106
1.4.3.- Mecanismos patogénicos . . . . .	108
1.4.3.1.- Adhesividad . . . . .	108
1.4.3.2.- Citotoxicidad . . . . .	111
 1.5.- <u>ESCHERICHIA COLI ENTEROINVASIVO(E.C.E.I.)</u>	116
 2.- <u>HIPOTESIS DE TRABAJO</u> . . . . .	121
 3.- <u>MATERIAL Y METODOS</u> . . . . .	125
3.1.- <u>MUESTRAS DE HECES ESTUDIADAS</u> . . . . .	126
3.1.1.- Procedencia de las heces . . . . .	126
3.1.1.1.- Características de los pacientes	126
3.1.1.2.- Características de las muestras recogidas . . . . .	127
3.1.2.- Recogida de las heces . . . . .	129
 3.2.- <u>INVESTIGACION DE LAS BACTERIAS ENTERO- PATOGENAS</u>	
3.2.1.- Procedimiento diagnóstico general	130

	<u>Pag.</u>
3.2.2.- Medios de cultivo . . . . .	133
3.2.2.1.- Medios de enriquecimiento . . .	133
3.2.2.1.1.-Medio de Muller-Kauffmann . .	133
3.2.2.1.2.- Medio de Leifson al selenito	134
3.2.2.1.3.- Agua peptonada alcalina .	134
3.2.2.1.4.- Agua hipersalina . . . . .	135
3.2.2.2.- Medios de aislamiento . . . . .	135
3.2.2.2.1.- Agar lactosado de MacConkey .	135
3.2.2.2.2.- Agar Salmonella-Shigella . .	136
3.2.2.3.- Medios utilizados para la identi-	
ficación . . . . .	137
3.2.2.3.1.- Investigación de la movilidad	137
3.2.2.3.2.- Enzimas respiratorios . .	138
3.2.2.3.2.1.- Catalasas . . . . .	138
3.2.2.3.2.2.- Citocromooxidasas . . .	138
3.2.2.3.2.3.- Prueba de inhibición	
enzimática . . . . .	139
3.2.2.3.3.- Metabolismo de los hidratos	
de carbono . . . . .	140
3.2.2.3.3.1.- Vía de degradación de los	
hidratos de carbono . .	140
3.2.2.3.3.2.- Fermentación butilen-	
glicola . . . . .	141
3.2.2.3.3.3.- Fermentación ácida-mixta	142
3.2.2.3.3.4.- Medio de Kliger . . . .	142
3.2.2.3.3.5.- Prueba de beta galactosi-	
dasa . . . . .	143
3.2.2.3.3.6.- Medio de manitol-movi-	
lidad . . . . .	144
3.2.2.3.3.7.- Medio base para azúcares	145
3.2.2.3.4.- Catabolismo de las sustancias	
nitrogenadas . . . . .	146
3.2.2.3.4.1.- Investigación de decar-	
boxilasas y dehidrolasas	146

	<u>Pag.</u>
3.2.2.3.4.2.- Proteolisis de la gelatina . . . . .	148
3.2.2.3.4.3.- Investigación de la ureasa . . . . .	148
3.2.2.3.4.4.- Producción de indol . . .	149
3.2.2.3.4.5.- Fenilalanin-desaminasa .	150
3.2.2.3.5.- Acción sobre las sales de ácidos orgánicos . . . . .	151
3.2.2.3.5.1.- Utilización del citrato .	151
3.2.2.3.5.2.- utilización del malonato	151
3.2.2.3.5.3.- Utilización del tartrato	152
3.2.2.3.5.4.- Utilización del mucato .	153
3.2.2.3.6.- Investigación de enzimas diversos . . . . .	154
3.2.2.3.6.1.- Nitrataza . . . . .	154
3.2.2.3.6.2.- Producción de sulfhídrico	155
3.2.2.3.6.3.- Tetrionato-reductasa .	155
3.2.3.- Diferenciación general de las enterobacteriaceas . . . . .	157
3.2.4.- Estudio general de las principales etiologías bacterianas de las gastroenteritis infantiles . . . . .	160
3.2.4.1.- Aislamientos de <u>Salmonella</u> . . .	160
3.2.4.1.1.- Identificación bioquímica de <u>Salmonella</u> . . . . .	160
3.2.4.1.1.1.- Primer estadio . . . . .	160
3.2.4.1.1.2.- Segundo estadio . . . . .	160
3.2.4.1.1.3.- Tercer estadio . . . . .	160
3.2.4.1.1.3.1.- Subgéneros de Kauffmann . . . . .	161
3.2.4.1.1.3.2.- Biotipos de <u>S. typhi</u>	161

	<u>Pag.</u>
3.2.4.1.2.- Estudio de la estructura antigénica . . . . .	161
3.2.4.1.2.1.- Descripción de los inmunoseros . . . . .	165
3.2.4.1.2.1.1.- Sueros polivalentes de orientación diagnóstica . . . . .	167
3.2.4.1.2.1.1.1.- Mezclas (aglutininas anti-O) . . . . .	167
3.2.4.1.2.1.1.2.- Mezclas flagelares (aglutininas anti-H) . . . . .	167
3.2.4.1.2.1.2.- Sueros monovalentes destinados al estudio de la fórmula antigénica . . . . .	168
3.2.4.1.2.1.2.1.-Sueros monovalentes anti-O . . . . .	168
3.2.4.1.2.1.2.2.- Sueros monovalentes anti-H . . . . .	168
3.2.4.1.2.1.3.- Sueros polivalentes anti-H para inversión de fases (método de Suen-Gard) . . . . .	168
3.2.4.1.2.2.- Pauta seguida para la investigación de la fórmula antigénica . . . . .	169
3.2.4.2.- Aislamiento de <u>Shigella</u> . . . . .	171
3.2.4.2.1.- Identificación bioquímica de <u>Shigella</u> . . . . .	171
3.2.4.2.2.- Determinación del subgrupo y serotipo . . . . .	171

	<u>Pag.</u>
3.2.4.3.- Aislamiento de <u>E. coli</u> . . . . .	180
3.2.4.3.1.- Identificación de <u>E. coli</u> . . . . .	180
3.2.4.3.1.1.- Estadío uno: Diagnóstico de familia . . . . .	180
3.2.4.3.1.2.- Estadío dos: Diagnóstico de tribu . . . . .	180
3.2.4.3.1.3.- Estadío tres: Diagnóstico de género . . . . .	180
3.2.4.3.1.4.- Estadío cuatro: Diagnós- tico de especie . . . . .	181
3.2.4.3.1.4.1.- Serogrupado presunti- vo . . . . .	181
3.2.4.3.1.4.2.- Confirmación del antígeno O . . . . .	183
3.2.4.3.2.- Conservación de las cepas de <u>E. coli</u> . . . . .	184
3.2.4.4.- Aislamiento de <u>Campylobacter</u> sp . . . . .	186
3.2.4.4.1.- Medios de cultivo . . . . .	186
3.2.4.4.2.- Identificación . . . . .	187
3.2.4.4.2.1.- Diagnóstico de género . . . . .	187
3.2.4.4.2.1.1.- Caracteres morfológi- cos y movilidad . . . . .	187
3.2.4.4.2.1.2.- Citocromo-oxidasa . . . . .	187
3.2.4.4.2.1.3.- Catalasas . . . . .	187
3.2.4.4.2.2.- Diagnóstico de especie . . . . .	188
3.2.4.5.- Aislamiento de <u>Yersinia enteroco-</u> <u>litica</u> . . . . .	190
3.2.4.5.1.- Medio de enriquecimiento . . . . .	190
3.2.4.5.2.- Medio de aislamiento . . . . .	190
3.2.4.5.3.- Identificación . . . . .	190
3.2.4.5.3.1.- Primer estadío . . . . .	190
3.2.4.5.3.2.- Segundo estadío . . . . .	191

	<u>Pag.</u>
3.2.4.5.3.3.- Tercer estadio . . . . .	191
3.2.4.5.3.4.- Cuarto estadio . . . . .	191
3.3- <u>ESTUDIO MICROBIOLÓGICO DE LAS ETIOLOGIAS</u> <u>PARASITARIAS DE LA GASTROENTERITIS</u> . . .	194
3.3.1.- Exámen macroscópico . . . . .	194
3.3.2.- Exámen microscópico . . . . .	194
3.3.2.1.- Exámen directo en fresco . . . . .	194
• 3.3.2.1.1.- Solución iodada . . . . .	195
3.3.2.2.- Exámen tras técnica de enriqueci- miento . . . . .	195
3.3.2.2.1.- Método de formol-eter (Método de Ritchie modificado) . . .	195
3.3.2.3.- Exámen directo tras fijación y tinción . . . . .	196
3.3.2.3.1.- Hematoxilina férrica de Heindenhain . . . . .	197
3.3.2.3.2.- Método de Ziehl-Neelsen modificado . . . . .	198
3.3.2.3.2.1.- Reactivos . . . . .	198
3.3.2.3.2.2.- Fijación . . . . .	199
3.4.- <u>ESTUDIO MICROBIOLÓGICO DE LAS ETIOLOGIAS</u> <u>VIRALES DE LA GASTROENTERITIS</u> . . . . .	200
3.4.1.- Muestras de heces estudiadas . . . . .	200
3.4.2.- Procesamiento de las heces . . . . .	200
3.4.2.1.- Investigación virológica global .	202
3.4.2.1.1.- Microscopía electrónica . .	202
3.4.2.1.1.1.- Método . . . . .	202
3.4.2.1.1.2.- Material y equipo neces- arios . . . . .	202
3.4.2.1.1.3.- Concentración de virus .	203

	<u>Pag.</u>
3.4.2.1.1.3.1.- Liphogel . . . . .	203
3.4.2.1.1.3.2.- Sulfato amónico . .	203
3.4.2.1.1.4.- Preparación de las rejillas de M.E. recubiertas con película de Formvar	204
3.4.2.1.1.5.- Tinción negativa . . . .	205
3.4.2.1.2.- Investigación diagnóstica de rotavirus por E.L.I.S.A. ("Enzyme-linked-immunosorbent assay") . . . . .	206
3.4.2.1.2.1.- Test de rotazyme . . . .	207
3.4.2.1.2.1.1.- Reactivos . . . .	207
3.4.2.1.2.1.1.1.- Preparación de la solución de sustrato de O.P.D	209
3.4.2.1.2.1.2.- Instrumentos . . . .	210
3.4.2.1.2.1.3.- Procedimiento . . . .	210
3.4.2.1.2.1.3.1.- Método visual . . . .	212
3.4.2.1.2.1.3.2.-Método fotométrico	212
3.4.2.1.2.1.3.2.1.- Determinación del valor límite . . . .	212
3.4.2.1.2.1.3.2.2.- Determinación de la zona gris (dudosa)	213
 3.5.- <u>METODOS PARA LA DETERMINACION DE LAS PROPIEDADES TOXICAS</u> . . . . .	 214
3.5.1.- Preparaciones enterotóxicas . . . .	214
3.5.1.1.- Medios de cultivo . . . . .	214
3.5.1.1.1.- Medios de crecimiento . . . .	214

	<u>pag.</u>
3.5.1.1.2.- Medio para la producción de enterotoxinas . . . . .	215
3.5.1.2.- Siembras . . . . .	215
3.5.1.3.- Separación de sobrenadantes . .	216
3.5.2.- Detección de enterotoxinas . . . . .	217
3.5.2.1.- Detección de enterotoxina termolábil . . . . .	217
3.5.2.1.1.- Cultivo de células adrenales de ratón ( $Y_1$ ) . . . . .	217
3.5.2.1.1.1.- Medios de cultivo . . .	217
3.5.2.1.1.2.- Mantenimiento de la línea celular . . . . .	218
3.5.2.1.1.3.- Preparación de las placas con células para la detección de enterotoxina termolábil . . . . .	220
3.5.2.1.1.4.- Detección de la enterotoxina termolábil (LT) . .	220
3.5.2.1.2.- Cultivo de células C.H.O. (Chinese hamster ovary) . .	222
3.5.2.1.2.1.- Medios de cultivo . . .	222
3.5.2.1.2.2.- Mantenimiento de la línea celular . . . . .	224
3.5.2.1.2.3.- Preparación de las placas con células para la detección de la enterotoxina termolábil . . . . .	224
3.5.2.2.- Detección de la enterotoxina VT .	225
3.5.2.2.1.- Medios de cultivo . . . . .	225
3.5.2.2.2.- Mantenimiento de la línea celular . . . . .	225
3.5.2.2.3.- Preparación de las placas para la detección de la enterotoxina VT . . . . .	226

	<u>Pag.</u>
3.5.2.3.- Detección de la enterotoxina termoestable (ST) . . . . .	227
3.5.2.3.1.- Prueba del ratón lactante . .	227
3.5.2.3.1.1.- Obtención y características de los animales . . .	227
3.5.2.3.1.2.- Preparación del material de inoculación . . . . .	229
3.5.2.3.1.3.- Inoculación del sobrenadante del cultivo . . .	230
3.5.2.3.1.4.- Evaluación del efecto enterotóxico . . . . .	233
3.5.3.- Cepas control . . . . .	237
3.5.4.- Análisis estadístico de los datos obtenidos . . . . .	239
3.5.4.1.- Métodos paramétricos . . . . .	239
3.5.4.1.1.- Medidas de tendencia central	239
3.5.4.1.2.- Medidas de dispersión . . .	239
3.5.4.1.3.- Medidas de forma . . . . .	240
3.5.4.1.4.- Comparación de grupos de datos independientes . . . .	241
3.5.4.1.4.1.- Muestras pequeñas . . .	241
3.5.4.1.4.1.1.- Prueba de Snedecor .	241
3.5.4.1.4.1.2.- Prueba de Student-Fisher . . . . .	241
3.5.4.1.4.2.- Muestras grandes . .	242
3.5.4.1.5.- Estimación de las propiedades de la media ( $\bar{X}$ ) . . . . .	242
3.5.4.1.5.1.- Intervalo normal (I.N.) .	242
3.5.4.1.6.- Relación entre dos caracteres cuantitativos . . . . .	243
3.5.4.1.6.1.- Cálculo de la recta de regresión . . . . .	243

	<u>Pag.</u>
3.5.4.1.6.2.- Cálculo del coeficiente de correlación . . . . .	244
3.5.4.2.- Métodos no paramétricos . . . . .	245
3.5.4.2.1.- Ley de Chi <sup>2</sup> . . . . .	245
3.5.4.2.2.- Estimación de una proporción: Intervalo de probabilidad . . . . .	246
 4.- <u>RESULTADOS</u> . . . . .	 248
 4.1.- <u>CARACTERISTICAS GENERALES DE LOS PACIEN-</u> <u>TES ESTUDIADOS</u> . . . . .	 249
 4.2.- <u>EVALUACION DE LAS PRUEBAS CONVENCIONALES</u> <u>DE ENTEROTOXIGENICIDAD DE ESCHERICHIA</u> <u>COLI</u>	
4.2.1.- Actividad de las toxinas LT y VT sobre cultivos <u>in vitro</u> de células eucariotas (Y <sub>1</sub> , C.H.O. y Vero) . . . . .	261
4.2.2.- Actividad de la enterotoxina ST en ratones lactantes (I.M.T.). Valora- ción estadística . . . . .	268
 4.3.- <u>AISLAMIENTOS DE E. COLI SIN ENTEROTOXINAS</u> <u>DETECTABLES</u>	
4.3.1.- Incidencia de <u>E. coli</u> con serotipos enteropatógenos clásicos (E.C.E.P.) . . . . .	281
4.3.2.- Aislamientos de <u>E. coli</u> no enteropa- tógeno ni enterotoxigénico . . . . .	283
4.3.2.1.- Como microorganismo único . . . . .	283
4.3.2.2.- Como integrante de la flora fecal habitual . . . . .	285

	<u>Pag.</u>
4.3.2.3.- Asociado a otros patógenos enté- ricos . . . . .	285
4.3.2.3.1.- Virus asociados . . . . .	286
4.3.2.3.2.- Bacterias asociadas . . . . .	289
4.3.2.3.3.- Asociación con virus y bacte- rias . . . . .	289
4.3.2.3.4.- Parásitos asociados . . . . .	290
 4.4.- <u>RESULTADOS DE LAS PRUEBAS DE DETECCION DE LA TOXINA VT EN LOS E. COLI ESTUDIADOS</u> .	 291
 4.5.- <u>AISLAMIENTOS DE E. COLI ENTEROTOXIGENICOS (E.C.E.T.)</u> . . . . .	 291
4.5.1.- Incidencia de E.C.E.T. productores de toxina termolábil (L.T.) . . . . .	292
4.5.1.1.- Características de la cepa LT(+)	292
4.5.1.2.- Características del paciente . .	293
4.5.2.- Incidencia de E.C.E.T. productores de toxina termoestable (ST) . . . . .	293
4.5.2.1.- Características de las cepas ST (+) . . . . .	295
4.5.2.2.- Asociación con otros patógenos .	305
4.5.2.3.- Características de los pacientes	305
 4.6.- <u>INCIDENCIA GLOBAL DE PATOGENOS ENTERICOS</u>	
4.6.1.- Virus . . . . .	311
4.6.2.- Bacterias enteropatógenas . . . . .	319
4.6.2.1.- <u>Salmonella</u> sp . . . . .	320
4.6.2.2.- <u>Shigella</u> . . . . .	321
4.6.2.3.- <u>Campylobacter jejuni</u> . . . . .	322
4.6.3.- Parásitos . . . . .	322

	<u>Pag.</u>
5.- <u>DISCUSION</u> . . . . .	323
5.1.- <u>POBLACION ESTUDIADA</u> . . . . .	324
5.2.- <u>EVALUACION DE LAS PRUEBAS DE ENTERO- TOXIGENICIDAD</u> . . . . .	327
5.2.1.- Actividad de las toxinas LT, VT y ST <u>in vitro</u> . . . . .	327
5.2.2.- Actividad de la toxina ST <u>in vivo</u> . .	331
5.3.- <u>INCIDENCIA DE E. COLI ENTEROTOXIGENICO EN LAS DIARREAS AGUDAS INFANTILES DE NUESTRO MEDIO</u> . . . . .	336
5.4.- <u>INCIDENCIA DE E. COLI ENTEROPATOGENO</u> . .	343
5.5.- <u>VALORACION DE LA ETIOLOGIA GLOBAL</u> . . . .	346
5.5.1.- Virus . . . . .	352
5.5.2.- <u>Salmonella</u> . . . . .	354
5.5.3.- Otros patógenos . . . . .	355
6.- <u>CONCLUSIONES</u> . . . . .	356
7.- <u>BIBLIOGRAFIA</u> . . . . .	361

1.- INTRODUCCION

1.1.- PROBLEMA DE LAS DIARREAS INFECCIOSAS AGUDAS  
INFANTILES Y SU ETIOLOGIA

1.1.1.- Concepto de diarrea. Diarrea infecciosa

Aunque no exista una definición universalmente aceptada de diarrea aguda (MATA *et al.* 1984), y sea difícil llegar a ella, como señala HENDRICKSE en una discusión planteada acerca de estos problemas (HARRIES, 1976), con el término DIARREA, hacemos referencia a los trastornos del aparato gastro-intestinal, que por afectación de la motilidad, absorción o/y secreción, provocan evacuación de heces de consistencia menor o/y frecuencia mayor de lo normal (CONNOR y BARRET-CONNOR, 1967). En términos pragmáticos podría definirse como una malabsorción hidroelectrolítica (LOW-BEER y READ, 1972), consecutiva a la rotura del ciclo enterosistémico del agua (DESJEUX *et al.* 1979).

Cuando se supone o comprueba que el factor desencadenante es la infección del intestino, se denomina diarrea infecciosa (CONNOR y BARRET-CONNOR, 1967; SILVERMAN y ROY, 1983).

A pesar del reconocimiento precoz de la shigelosis, salmonellosis, giardiasis o amebiasis, como entidades clínicas distintas, ha sido difícil aceptar que los restantes procesos diarreicos pudieran ser de naturaleza infecciosa. A ello contribuye la dificultad

para adscribir, en una gran parte de casos, a un determinado patógeno como agente causal, siendo frecuente encontrar más de un microorganismo (ELLIS et al.1984), o aislar otros, no catalogados como agentes etiológicos reconocidos (MATA et al.1984).

Sin embargo, los epidemiologistas, pediatras y microbiólogos han defendido siempre el origen infeccioso (bacteriano y viral), de la mayor parte de las diarreas de la infancia, apoyándose en las siguientes observaciones:

- La diarrea es prevalente en los lugares donde las condiciones sanitarias, e higiene personal son deficientes (SOUTH,1971; ROHDE y NORTHROP,1976; MATA,1983a).

- Las personas de mayor edad se ven afectadas con menor intensidad y frecuencia que los lactantes y niños pequeños, lo que sugiere la adquisición de inmunidad y resistencia por parte del hésped (MATA et al. 1983).

- La diarrea aguda se comporta en la comunidad de forma análoga a otras enfermedades infecciosas (MATA et al.1983).

### 1.1.2.- Epidemiología

#### 1.1.2.1.- Incidencia: morbilidad y mortalidad

La diarrea aguda es la causa más frecuente de trastorno hidroelectrolítico durante el periodo de lactancia y niñez (HARRIS,1972). En los países en vía de desarrollo, constituyen un problema endémico que se ve agravado por brotes epidémicos estacionales, siendo en estos países, junto a la malnutrición, la mayor responsable de sus elevadas tasas de mortalidad infantil (HARRIS,1972; RODHE y NORTHRUP,1976). Sin embargo, la magnitud del problema varía ampliamente, descendiendo a medida que mejoran los factores socioeconómicos que favorecen su presentación, y que se conocen y previenen los trastornos hidroelectrolíticos que provocan. Buen ejemplo de ello es la equiparación existente hoy, entre las tasas de morbilidad y de mortalidad por diarrea en los países con bajo nivel de desarrollo, respecto a las de la ciudad de New York a comienzos de siglo, cuando las condiciones de esta ciudad eran tan deficientes, como la que presentan actualmente la mayor parte de las naciones del tercer mundo (CONNOR y BARRET-CONNOR 1967; GORDON,1971; MATA,1983a).

Para hacernos una idea de la trascendencia de estos hechos, ROHDE y NORTHRUP (1976), estimaron que en el año 1975, se produjeron 500 millones de episodios diarreicos en niños menores de 5 años de edad, en Asia, Africa y Latino-América, de los cuales fueron mortales 1 al 4%, lo que da la cifra de 5 a 18 millones de niños fallecidos por esta causa.

Por otra parte, la relación de estos acontecimientos no ha de llevarnos a considerar a la enfermedad diarreica como una patología restringida a países pobres, siendo importante recordar que la diarrea ocupa el sexto lugar entre las diez primeras causas de muerte, en las edades comprendidas entre 1 y 4 años, en 21 estados de E.E.U.U. y en 27 países de Europa (WHO,1974; RODHE y NORTHROP,1976), y que es la responsable del 3 al 5% de las admisiones hospitalarias pediátricas en los países industrializados (SILVERMAN y ROY,1983). En cuanto a su morbilidad, cabría tener presente:

- La importancia mundial de la diarrea viral en los últimos años, afectando por igual a países tan lejanos entre sí como E.E.U.U., Reino Unido, Australia o Japón (STEINHOFF,1980; WHO Scientific working group, 1980b; DUPONT,1984).

- La extensión de la séptima pandemia de cólera a Africa, Europa e incluso Nueva Zelanda, durante los años 1971-1972 (GOODGAME y GREENOUGH,1975), que puso en evidencia la limitada protección geográfica de esta "enfermedad tropical".

- La presentación epidémica de nuevas formas malignas de disentería bacilar, o

- Los graves brotes epidémicos en instituciones (guarderías o salas de hospitalización pediátricas) (RYDER et al.1976b; KUDOH et al.1977; GROSS y ROWE, 1984), o en lugares comunes de encuentro (ROSENBERG et al.1977), que siguen siendo un peligroso problema en los países industrializados, a pesar de su alto nivel socio-económico.

#### 1.1.2.1.1.- Edad y formas de presentación

Si analizamos la edad de mayor inciden-

cia, así como la forma de manifestarse la enfermedad, existen también diferencias entre los países con alto o bajo nivel socio-económico. En los primeros, y quizás también en las áreas urbanas de los países subdesarrollados, suelen afectarse con mayor frecuencia, los niños menores de 6 meses, e incluso los menores de 3 meses (HARRIES,1976), y aunque la morbilidad es muy alta todavía, la enfermedad suele ser moderada o leve (SILVERMAN y ROY,1983), no precisando generalmente asistencia hospitalaria (BELLANTI,1983a). Las complicaciones más importantes suelen ser la deshidratación hipernatrémica, a causa probablemente de la relativa inmadurez funcional de los riñones a esta edad, o al tipo de alimentación que reciben, (artificial/hiperconcentrada)(HARRIES,1976).

En los países subdesarrollados, y en áreas rurales o/y pobres, la mayor parte de los casos de diarrea ocurren en niños de más de 6 meses de edad, produciéndose el pico máximo al cesar la lactancia materna, a lo largo del segundo año de vida. Los procesos suelen ser graves, precisando hospitalización, y el 90-95% de los niños que presentan deshidratación sufren un proceso hipo o isonatrémico, (HARRIES,1976). La explicación podría estar, en las altas dosis infectivas a que están expuestos los niños en esos ambientes con escasa higiene y saneamiento (MATA et al.1984), que ejercen su máxima influencia en el momento del destete, cuando además de ser privados de la protección pasiva inmunitaria que ella comporta, (MILLER y HORZEL,1974; HANSON et al.1975; CLEARY et al.1983; LODINOVA-ZADNIKOVA y TLASKALOVA-HOGENOVA,1983), pasan a depender de alimentos y agua probablemente contaminados (BLACK et al.1983a).

#### 1.1.2.1.2.- Relación entre diarrea, malnutrición y agentes causales

Se ha demostrado una íntima correlación entre malnutrición e infección (KOSTER,1983), lo que explica la mayor susceptibilidad de los malnutridos a las infecciones intestinales (BLACK et al.1983b).

En el niño malnutrido, aumenta la intensidad, frecuencia y duración de la diarrea (HARRIES,1976; RODHE y NORTHRUP,1976; BOLLAG,1980 y MATA,1983), y a su vez, ésta desencadena una forma aguda e inmediata de malnutrición: La pérdida de líquidos y electrolitos (F.E.M.= fluid electrolyte malnutrition), y otra forma más insidiosa: La malnutrición calórico-protéica (P.E.M.= protein energy malnutrition), que se ve favorecida por la disminución del consumo de alimentos, que llega a ser del 20 al 50%, durante periodos más o menos prolongados; por la malabsorción de nutrientes a consecuencia del efecto lesivo de los microorganismos sobre la mucosa intestinal (BLACK,1983b; MATA,1983b), o por las alteraciones metabólicas que conlleva (KLISH,1983).

Además, dependiendo del agente causal, las consecuencias son distintas. Los niños con enfermedad diarreica selectiva, relativamente benigna producida por Escherichia coli enterotoxigénico (ECET) o por rotavirus, no recuperan la pérdida de peso ocasionada por la diarrea hasta 2 semanas después de la enfermedad, habiéndose demostrado, en una comunidad de Bangladesh, que ECET es el único patógeno que demostró tener un efecto negativo significativo sobre el control de peso bimensual de estos niños (BLACK et al.1983b y 1984). La diarrea por Shigella, afectó sin embargo el crecimien-

to longitudinal anual, (BELLANTI,1983b). En ambas etiologías, un gran número de episodios duraron más de 10 o incluso 20 días.

Por todo ello, el conocimiento de la causa de la diarrea es crucial desde el punto de vista clínico y epidemiológico (RODHE y NORTHRUP,1976; PANIKER et al.1982). El control de la diarrea debida a E. coli o Shigella, por ejemplo, disminuiría la morbilidad un 40%, mejoraría el crecimiento del niño, y reduciría la malnutrición (BLACK et al.1983b).

### 1.1.3.- Etiología

#### 1.1.3.1.- Avances en la investigación de "nuevos" patógenos

Hasta hace unos 10 años, a pesar del continuo interés en el conocimiento de los agentes etiológicos en esta patología infantil, sólo podían demostrarse agentes específicos en 10 al 25% de las diarreas investigadas (IRONSIDE et al.1970; RODHE y NORTHROP,1976; SACK, 1983).

Desde entonces, esta situación ha cambiado. La década de los setenta ha supuesto un gran avance en este campo, pues no sólo han sido descritos nuevos organismos, sino que se han aclarado diversos mecanismos patogénicos, incluyendo la liberación de toxinas. Se ha descubierto el papel de los rotavirus, (STEINNOFF, 1980; WHO Scientific working group,1980b; BLACKLOW y CUKOR,1981; FLEWETT,1984), y adenovirus (KIDD et al. 1981; YOLKEN,1983), y se han redescubierto otros microorganismos como las enterobacterias toxigénicas, Campylobacter (SKIRROW,1977; BUTZLER y SKIRROW,1979; KARMALI y FLEMING,1979; HEBERT et al.1982; Editorial Lancet, 1983a), Aeromonas (GRACEY et al.1982), y Cryptosporidium (NAVIN y JURANEK,1984), de tal forma que actualmente podrían diagnosticarse etiológicamente el 80% de los pacientes diarreicos (SACK,1983; ELLIS et al.1984), aunque todavía esto, sólo puede ser así en los laboratorios altamente tecnificados.

Recientemente han podido observarse al microscopio electrónico (M.E.) partículas semejantes a las

de rotavirus, indistinguibles de ellos, procedentes de diarreas humanas. Son virus que no pueden ser detectados por E.L.I.S.A., y que han sido designados como pararotavirus (RODGER et al. 1982; TAO et al. 1984; EIDEN et al. 1985). Lo mismo ha ocurrido, con partículas semejantes morfológicamente al virus BREDA de los terneros, que han sido publicados, hace aproximadamente un año, como un posible nuevo género viral (BEARDS et al. 1984), que junto a los calicivirus-like y otras partículas, abren nuevas posibilidades de definición a algunas diarreas inespecíficas (MATA et al. 1984).

Del mismo modo, ha sido identificado un plásmido de alto peso molecular, relacionado con la invasividad de E. coli y Shigella, que a su vez era transportado por cepas de Klebsiella aislados en niños de "alto riesgo", hospitalizados en Costa Rica con graves infecciones (MATA et al. 1984).

Una nueva prueba del cambio en la valoración epidemiológica, la encontramos en la investigación de agentes implicados en la contaminación alimentaria. Son microorganismos que proliferan muy bien en los alimentos destinados a los lactantes recién destetados, y que constituyen una peligrosa fuente potencial de diarrea, a la que apenas se había prestado atención (MATA, 1983a). Ello ha permitido encontrar gran número de bacterias originadas en los propios alimentos (Bacillus cereus, Clostridium perfringens)(SCHNEIDER, 1984), o procedentes del hombre, a través de la contaminación directa o indirecta (E. coli, Staphylococcus aureus) (BRADLEY et al. 1977; BLACK et al. 1983a).

También parecen haber recobrado interés, los estudios sobre la patogenia de Clostridium difficile

en el niño, y su mecanismo toxigénico (STARK y LEE,1982; WELCH y MARKS,1982), dada la polémica creada entre su posible inocuidad, ante el hallazgo habitual en las heces, en los niños menores de 1 año de edad, sin relación con enfermedad (STARK y LEE,1982), y su relación con cuadros graves de enterocolitis necrosantes o colitis pseudomembranosas inducidas por antibióticos (WELCH y MARKS,1982).

Lo mismo ha ocurrido con los parásitos, que no habían sido considerados como una causa importante de diarrea, al existir varios estudios sobre casos graves hospitalizados con resultados repetidamente negativos, y que vuelven a reconsiderarse en la actualidad. (W.H.O. Scientific group,1980a). Hoy, habrá que añadir a la lista de parásitos clásicos, Criptosporidium (NAVIN y DURANEK,1984), y Plasmodium falciparum (MATA et al. 1984).

#### 1.1.3.2.- Agentes etiológicos actuales

Recogiendo los resultados de todas las investigaciones enumeradas, los agentes etiológicos de la diarrea aguda infecciosa son los siguientes (MATA, 1983a y MATA et al.1984):

VIRUS: Rotavirus, para-rotavirus  
Adenovirus no cultivables  
Adenovirus cultivables  
Agentes SRV (Small round virus)(Norwalk,Hawai, Montgomery)  
Enterovirus (E.C.H.O., Coxsackte)  
Coronavirus (?)  
Astrovirus, Calicivirus (?)  
Virus Breda (?)

BACTERIAS: Escherichia coli enterotoxigénico (ST y LT)

Escherichia coli enteropatogénico

Escherichia coli enteroinvasivo

Otra bacteria portadora del plásmido 140-MD (?)

Shigella sp

Salmonella sp

Vibrio cholerae

Vibrio parahaemolyticus

Campylobacter fetus jejuni

Aeromonas hydrophila

Edwardsiella tarda

Yersinia enterocolitica

Arizona, Plesiomonas

Clostridium perfringens

Clostridium difficile

Staphylococcus aureus

Bacillus cereus

PARASITOS: Giardia lamblia

Entamoeba histolytica

Dientamoeba fragilis

Balantidium coli

Cryptosporidium muri

Isospora belli

Plasmodium falciparum

PROTOZOOS: Trichuris trichiura

Strongyloides Stercolaris. S. fulleborni

Trichinella spiralis

Necator americanus. Ancylostoma duodenale

Capillaria phillippinensis

Schistosoma mansoni. S. japonicum.

S. intercalatum

### 1.1.3.3.- Tasas de prevalencia

Las tasas de prevalencia de cada uno de estos agentes varían dependiendo del tipo de población estudiada (edad, condiciones socio-económicas, sanitarias, etc.)(RUIZ-PALACIOS,1983). En la TABLA 1, RUIZ-PALACIOS (1983) recopila distintos datos etiológicos, obtenidos de diarreas comunitarias en niños menores de 2 años de edad, tanto en países en vías de desarrollo como desarrollados. En ella podemos ver, que la frecuencia de los distintos microorganismos es similar, cuando se comparan poblaciones con semejantes condiciones sanitarias, independientemente de su localización geográfica.

Escherichia coli enterotoxigénico, rotavirus y Campylobacter representan más de la mitad de las causas de diarrea en los países subdesarrollados, mientras que rotavirus, Shigella y Salmonella, son los que predominan en los países industrializados.

A diferencia de lo que sucede en la comunidad, 30 al 70% de los niños con diarrea admitidos en el hospital, independientemente del país donde se ubiquen, son infectados por rotavirus (KAPIKIAN et al.1979; BLACKLOW y CUKOR,1981; VESIKARI et al.1981; BRYDEN et al.1982; PANIKER et al.1982; SIERRA et al.1982; CHAMPSAUR et al.1984; ELLIS et al.1984).

En conjunto, podemos considerar a los rotavirus como los patógenos más frecuentes en la diarrea infantil, tanto en situaciones endémicas como epidémicas (W.H.O. Scientific working group,1980b; DUPONT,1984; FLEWETT,1984).

Entre las diarreas parasitarias, Giardia lamblia es la causa más extendida (WOLFE,1979), habiendo

TABLA 1

AGENTES ETIOLÓGICOS DE LA DIARREA AGUDA EN NIÑOS MENORES DE 2 AÑOS  
(frecuencia en porcentaje)(RUIZ-PALACIOS,1983)

	<u>PAISES EN VIAS DE DESARROLLO</u>			<u>PAISES DESARROLLADOS</u>	
	<u>BANGLADESH</u>	<u>BRASIL</u>	<u>MEJICO</u>	<u>CANADA</u>	<u>E.E.U.U.</u>
<u>Escherichia coli</u>	20	22	21	1	4
Rotavirus	11	19	18	11	10
<u>Campylobacter</u> sp	N.I.	11	15	N.I.	N.I.
<u>Shigella</u> sp	15	8	5	11	25
<u>Salmonella</u> sp	N.E.	-	1	1.4	2
<u>Giardia lamblia</u>	N.E.	6.7	2	N.I.	4
<u>Yersinia enterocolitica</u>	N.E.	-	2	N.I.	N.I.
<u>Entamoeba histolytica</u>	N.E.	2	2	N.I.	-
<u>Aeromonas</u> sp	N.E.	1	1	N.I.	N.I.
	BLACK <u>et al.</u> 1981	GUERRANT 1977	RUIZ- PALACIOS 1983	GURWITH y WILLIAMS 1977	PICKERING <u>et al.</u> 1978

N.I.: no investigado

N.E.: no especificado

sido incriminada recientemente como causa común de infecciones nosocomiales en países desarrollados (WOLFE, 1979; THOREN,1983b; TURNER,1983).

En cuanto a los agentes bacterianos, Campylobacter fetus está siendo reconocido como uno de los enteropatógenos más importantes, relacionándolo con el 2 a 8% de los episodios agudos de diarrea (WHO Scientific working group,1980c; RUIZ-PALACIOS,1983), Salmonella prevalece como primera en frecuencia en los países con buen desarrollo socio-económico (KANTOR,1981), lo que puede obedecer a la utilización más frecuente en ellos de alimentos preparados comercialmente, con mayores posibilidades de contaminación por manipulación (W.H.O. Scientific working group,1980c), aunque también se manifiesta en forma de brotes nosocomiales, difíciles de controlar, en maternidades o unidades pediátricas (W.H.O. Scientific working group,1980c; ROWE y GROSS, 1984).

Shigella sp. predomina en cambio, en países con malas condiciones higiénico-sanitarias, observándose que cuando estas condiciones mejoran, aumentan los casos de Shigella sonnei y disminuyen los de Shigella flexnerii (W.H.O. Scientific working group,1980c; ROWE y GROSS,1984).

Respecto a Escherichia coli, actualmente se sabe que es uno de los microorganismos que con mayor frecuencia causan diarrea infantil (GUERRANT et al.1975; RUDOY y NELSON,1975; SACK,1975; DONTA et al.1977; EVANS et al.1977b; GANGAROSA y MERSON,1977; GURWITH et al. 1978; KLIPSTEIN et al.1978; MAKI et al.1980; W.H.O. Scientific working group,1980a; ALBOUY et al.1981; LEK-SOMBOON et al.1981; ROTHBAUM et al.1981; EDELMAN y LEVI-

NE,1983; TOLEDO et al.1983; GROSS y ROWE,1984), produciendo también en el adulto, dos formas de diarrea bien diferenciadas, la colérica (GORBACH et al.1971; SACK et al.1971; FINKELSTEIN et al.1976), y la del viajero (ROWE et al.1970 y 1983; SHORE et al.1974; GORBACH et al.1975; W.H.O. Scientific working group,1980a; ECHEVARRIA et al.1981; GORBACH y HOSKINS,1981; COOK,1983). La diarrea colérica se localiza en áreas geográficas donde el cólera es endémico, mientras que la del viajero, la sufren los habitantes de países desarrollados durante sus primeros días de estancia en zonas tropicales y países subdesarrollados, siendo E. coli responsable del 20 al 30% de los casos (GORBACH y HOSKINS,1981; ROWE et al.1983).

#### 1.1.4.- Mecanismos patogénicos

Todos estos microorganismos pueden ser clasificados a su vez, de acuerdo a su mecanismo de acción (TABLA 2)(SACK,1983; SILVERMAN y ROY,1983):

a) Toxigénico, basado en la liberación de enterotoxinas en la luz del intestino delgado, sin lesión del epitelio intestinal (BANWELL y SHERR,1973).

b) Invasivo, basado en la penetración del microorganismo a través de la mucosa, lesionando la misma y multiplicándose en el interior de los enterocitos, dando lugar a una enteritis inflamatoria aguda (LABREC et al.1964; GIANELLA et al.1973; ROUTH et al.1974).

La forma de actuar de cada uno de ellos, así como los signos o síntomas que los caracterizan, quedan compendiados en la TABLA 3 (SILVERMAN y ROY,1983;GRACEY, 1984).

##### 1.1.4.1.- Mecanismo toxigénico

Las bacterias toxigénicas necesitan ser ingeridas por boca en gran número para producir enfermedad ( $10^{5-10}$  organismos)(KEUSCH,1980). Deben vencer la barrera ácida del estómago y adherirse a la mucosa del intestino delgado, por medio de fimbrias (CANDY,1980). Allí se multiplican, alcanzando altas concentraciones ( $10^{6-8}$  organismos/gramo de tejido), y liberan enterotoxinas (BANWELL y SHERR,1973), que se fijan sobre receptores específicos a las células intestinales. Tanto la fijación, como las reacciones bioquímicas que desencadenan, han sido bien estudiadas en la enterotoxina co-

TABLA 2

MICROORGANISMOS ENTEROPATÓGENOS. MECANISMOS PATOGÉNICOS  
(SACK, 1983, modificado)

<u>ENTEROTOXIGENICOS</u>	<u>INVASORES</u>	<u>MECANISMOS DESCONOCIDOS</u>
<u>VIBRIO CHOLERA</u> 01	<u>SHIGELLA</u> sp	<u>VIBRIO PARAH</u> EMOLYTICUS
<u>VIBRIO CHOLERA</u> no 01 (NAG)	<u>SALMONELLA</u> sp	<u>AEROMONA</u> HYDROPHILA
<u>ESCHERICHIA</u> COLI	<u>ESCHERICHIA</u> COLI	<u>GIARDIA</u> LAMBLIA
<u>CLOSTRIDIUM</u> PERFRIGENS A	<u>STAPHYLOCOCCUS</u> AUREUS	
<u>BACILLUS</u> CEREUS	<u>YERSINIA</u> ENTEROCOLITICA	
<u>STAPHYLOCOCCUS</u> AUREUS	<u>CAMPYLOBACTER</u> FOETUS JEJUNI	
<u>CLOSTRIDIUM</u> DIFFICILE	<u>ENTAMOEB</u> A HISTOLYTICA	
	<u>CLOSTRIDIUM</u> PERFRIGENS C	
	<u>CRYPTOSPORIDIUM</u> MURIS	
	VIRUS	

TABLA 3

PATOGÉNESIS Y SIGNOS CLÍNICOS ASOCIADOS CON DIARREA INFECCIOSA

ORGANISMOS	LOCALIZACION	PRINCIPAL EFECTO SOBRE MUCOSA INTESTINAL	PATOGENESIS	S. CLINICO
<u>Vibrio cholerae</u> <u>E. coli</u> (ECEP) <u>Clostridium perfringens</u> A y D <u>Shigella dysenteriae</u> I	Intestino delgado	Adherencia	Secreción de líquidos y electrolitos por acción de enterotoxinas sobre nucleótidos cíclicos	Diarrea secretora
<u>Shigella</u> sp <u>E. coli</u> (ECEP) <u>Yersinia enterocolítica</u> <u>Campylobacter jejuni</u>	Principalmente colon Colon Intestino delgado y grueso Principalmente Intestino delgado	Penetración y proliferación en los enterocitos	Inflamación y destrucción de la mucosa	Fiebre. Diarrea con sangre y moco
Virus	Intestino delgado	Daño al microvilli A veces invasión y citotoxicidad	Destrucción enterocitos que son sustituidos por enteroblastos	Fiebre. Diarrea raramente con sangre
<u>Salmonella</u> sp	Intestino delgado y grueso	Penetración en submucosa	Infiltración inflamatoria de la lámina propia	Frecuentemente diarrea secretora Menos frecuente, colitis.
<u>Escherichia coli</u> (ECEP)	Intestino delgado y grueso	Adherencia	? No destruye la mucosa No producción toxinas	Diarrea profusa sin sangre, ni moco.

SILVERMAN y ROY (1983); GRACEY (1984)

lérica (representativa de este grupo), (MEEROF, 1978; KEUSCH, 1981a), toxina termolábil, similar a la de E. coli (DALLAS y FALKOW, 1979), cuyo mecanismo de acción y características serán descritas detalladamente en un apartado posterior.

Esta enterotoxina va a provocar una activación de la secreción del enteroblasto y una disminución de la permeabilidad pasiva del enterocito, (DESJEUX et al. 1979), lo que dará lugar al acúmulo de grandes cantidades de líquido rico en electrolitos, en la luz del intestino, que si excediera la capacidad absorptiva del resto del tracto intestinal produciría la diarrea acuosa (FIELD, 1974; KEUSCH, 1981a; SILVERMAN y ROY, 1983).

Este efecto final sobre la célula intestinal, es producida también por la enterotoxina termoestable de E. coli, aunque por vías distintas (SACK et al. 1975b; KEUSCH, 1981b), como se explicará ampliamente después.

#### 1.1.4.2.- Mecanismo invasivo

El mecanismo de acción de los microorganismos invasivos es menos conocido que el anterior (GIANELLA et al. 1973; DESJEUX et al. 1979) puesto que los patógenos representativos de este grupo parecen ser responsables al mismo tiempo de la producción de una diarrea secretora, y de un síndrome disenteriforme (DESJEUX et al. 1979), en respuesta a una lesión directa de la mucosa intestinal (generalmente colon) (HORNICK, 1981b), y a un defecto de reabsorción de agua y sodio, a consecuencia de un fenómeno activo, estimulado por la adenilciclase (DESJEUX et al. 1979).

Estos microorganismos (cuyos elementos repre-

sentativos serían Salmonella o Shigella), son también ingeridos por boca, requiriendo generalmente un inóculo menor que los enterotoxigénicos. Tras vencer el medio ácido del estómago y atravesar el intestino delgado, colonizan en el ileo terminal o en el intestino grueso, invadiendo allí la mucosa (ROUTH et al.1974; HORNICK, 1981a). Se desconoce qué factores facilitan esta penetración (GIANELLA et al.1973; DESJEUX et al.1979), aunque en algunos organismos, como Yersinia (Editorial lancet, 1984), la capacidad invasiva se asocia a la presencia de plásmidos.

Tras la invasión, se desencadena una intensa reacción inflamatoria (GIANELLA et al.1973; ROUTH et al.1974), que provoca la eliminación de pus, y a veces de sangre, en las heces diarreicas, características típicas del síndrome disenteriforme (HORNICK,1981b). Algunos organismos (sobre todo Salmonella) pueden pasar ocasionalmente al torrente circulatorio y causar bacteriemia (HORNICK,1981a), sobre todo en lactantes, a causa de su menor competencia inmunológica, siendo en estos casos asintomática, precoz y transitoria (KEUSCH,1980).

Sin embargo, el mecanismo descrito, no es suficiente para explicar la diarrea acuosa que se presenta como otra forma de manifestación de la enfermedad (GIANELLA et al.1973; KEUSCH,1980), la cual podría estar producida por:

- liberación de prostaglandinas desde el foco inflamatorio (ROUTH et al.1974; HORNICK,1981a), que estimularían indirectamente el sistema AMPc-adenilciclasa, permitiendo la secreción activa de líquidos y electrolitos (HORNICK,1981b).

- o por liberación de enterotoxinas desenca-

denando una acción similar a la descrita anteriormente (KEUSCH et al.1972; ROUTH et al.1974; CHARNEY et al. 1976; HORNICK,1981a y KANTOR,1981).

La liberación de enterotoxinas ha podido ser demostrada en gran parte de las bacterias consideradas invasivas. Salmonella enteritidis (W.H.O. Scientific working group,1980c), Shigella dysenteriae tipo I (KEUSCH et al.1972; CHARNEY et al.1976) y Campylobacter (RUIZ PALACIOS,1983; RUIZ PALACIOS et al.1983), producen una enterotoxina termolábil, similar a la de V. cholerae que estimula la adenil-ciclase intestinal, aunque su papel en la enfermedad diarreica final es aún desconocido,(GIANELLA et al.1973; SACK,1983).

La toxina de S. dysenteriae es también neurotóxica para el ratón (KANTOR,1981; HORNICK,1981b) y citotóxica para las células HeLa en cultivo tisular (KEUSCH et al.1972). Campylobacter libera además otra toxina con efecto citolítico sobre las células VERO y sobre las células de ovario de hamster chino (Chinesse hamster ovary = C.H.O.)(RUIZ PALACIOS, 1983).

Yersinia enterocolitica en cambio, cuando crece a baja temperatura libera una enterotoxina termolábil semejante, sino idéntica, a la de E. coli (W.H.O.,1980c; OKAMOTO et al.1981), aunque su acción sobre las asas intestinales del ratón lactante se detecta más precozmente que la ejercida por la enterotoxina de E. coli (NUNES y RICCIARDI,1981).

Escherichia coli, como queda reflejado en la TABLA 2, puede ser clasificado en tres grandes grupos: enteropatógenos clásicos (E.C.E.P.), enterotoxigénicos (E.C.E.T.) y enteroinvasivos (E.C.E.I.). Los 3

poseen características propias que los diferencian entre sí, tanto respecto a sus antígenos superficiales, como a sus mecanismos de acción y al tipo de proceso diarreico que desencadenan (DUPONT et al.1971; GORBACH et al.1971; SOUTH,1971; EVANS et al.1975; ECHEVARRIA et al.1976; ORSKOV et al.1976; GURWITH et al.1977; ORSKOV y ORSKOV, 1977a; LEVINE et al.1978; MERSON et al.1979; MOON et al.1979; BETTELHEIM et al.1980; CARPENTER,1980; SILVA et al.1980; KEUSCH,1981b,c; THOREN,1983a).

En las últimas décadas, los estudios sobre los mecanismos patogénicos de E. coli han acaparado una parte importante de las publicaciones especializadas, y los avances en la investigación de esta bacteria, la han convertido en el prototipo ideal para profundizar en los aspectos genéticos, bioquímicos o inmunológicos implicados en la patogénesis humana.

1.2.- DESCUBRIMIENTO DE ESCHERICHIA COLI Y ASOCIACION  
CON DIARREA AGUDA

Aunque Escherichia coli fue aislado por primera vez en 1885 (ESCHERICH,1885), de heces de niños con enteritis, se pudo demostrar pronto que este organismo se encontraba también presente en las heces de niños sanos, por lo que fue considerado un huesped normal del intestino del hombre y de los mamíferos, y aceptado solamente como patógeno cuando se aislaba fuera del tracto gastro-intestinal. En este sentido, FISCHL (1909), aceptaba como únicos organismos causantes de infecciones intestinales a "las bacterias que no existen, o existen tan sólo en número escaso en el contenido intestinal".

Por estas fechas, y citados por este mismo autor, THIERCELIN, NOBECOURT, ESCHERICH y sus discípulos, FINKELSTEIN, PETRUSCHKY y KRIEBEL, consignan la frecuencia con que se encuentran cocos en cadena en las heces de los niños lactados artificialmente, y de los enfermos del aparato digestivo, así como la presencia de ellos en la leche de vaca mal conservada. Entre estos agentes, "Bacterium coli", se coloca en primer término entre los microorganismos probablemente causantes de las enfermedades gastro-intestinales, comprobándose que esta bacteria ubicuitaria prolifera fácilmente por encima de otras especies consideradas, más importantes etiológicamente, y alegando como pruebas de su patogenicidad, su virulencia en los animales, aglutinaciones, etc., pruebas que según FISCHL (1909) no resisten una crítica severa.

En 1897, LESAGE encuentra que el suero de niños con enteritis, aglutinaba a los aislamientos de E. coli obtenidos de otros niños afectados en la misma epidemia, pero no a los aislamientos de niños sanos.

ADAM, en 1923 primero, y en 1927 después, propone clasificar los coliformes obtenidos a partir de distintos focos diarreicos, según sus propiedades fermentativas frente a los azúcares (LAFOURCADE y GORIN, 1961). Señala que existe una estrecha relación entre la aparición de diarrea y la presencia en estas heces, de una variedad especial de colibacilos, que propone llamar por esta razón "dispepsia coli", (LAFOURCADE y GORIN, 1961; BRAUN, 1967; NETER, 1976).

GOLDSCHMIDT (1933), confirma los hallazgos de ADAM, estudiando epidemias de enteritis infantil en distintas instituciones por un método de aglutinación sobre portaobjetos, anticipándose a los métodos de serotipificación usados ahora rutinariamente en clínica, pese a lo cual, la implicación de E. coli en la diarrea no puede ser demostrada hasta 1945, cuando BRAY aisla en 42 de los 44 recién nacidos con diarrea, ingresados en un hospital londinense, cepas de E. coli con idénticas características bioquímicas y antigénicas, denominándolo Bacterium coli napolitanum (BRAY, 1945).

Posteriormente, son varios los investigadores que corroboran esta relación:

GILES et al. (1949), identifican dos nuevas cepas de E. coli como responsables de brotes graves de diarrea en recién nacidos, a los que denominan Aberdeen $\alpha$  y Aberdeen $\beta$ , por haber sido aisladas en esta ciudad.

TAYLOR et al. (1949), estudian en Londres varios focos epidémicos en guarderías, identificando como cau-

sante de 4 de ellos a la cepa D-433.

La clasificación serológica de E. coli, desarrollada por KAUFFMANN en 1947, basada en el reconocimiento de los distintos antígenos superficiales O (somáticos), K (capsulares) y H (flagelares), resultó muy útil para diferenciar las cepas virulentas de las ino-cuas, y para valorar el papel que juega esta bacteria en la diarrea infantil. El antígeno O caracteriza el grupo serológico, y es un polisacárido resistente al calor (estable a 121°C durante 21 horas), que forma parte del lipopolisacárido existente en la membrana externa de las bacterias gram negativas. El término "Antígeno K", englobaba a los polisacáridos termolábiles que envuelven externamente a la pared celular, enmasca-rando al antígeno O. Hoy día se sabe, que de los 103 antígenos K reconocidos, tan sólo 80 son polisacáridos. Los antígenos flagelares H son de naturaleza proteica y más lábiles al calor que los K.

Hasta el momento, se han homologado 171 antígenos O, 103 antígenos K, y 56 antígenos H (ORSKOV et al.1977b y ORSKOV,1978), y aunque existen más variedades, para su homologación sólo se tienen en cuenta las detectadas en cepas que poseen interés científico, médico o epidemiológico, y aunque teóricamente prodrían existir gran número de combinaciones o serotipos O:K:H, tan sólo algunos son frecuentes en E. coli (BETTELHEIM et al.1980).

El serotipado de las cepas Bacterium coli napolitanum, Aberdeen  $\alpha$ , D-433 y Aberdeen  $\beta$ , puso de manifiesto que las dos primeras poseían el serotipo O11:K-85, y la última el O55:K-59. (KAUFFMANN y DUPONT, 1950).

Gracias a la aplicación sistemática del serotipado a todas las cepas de E. coli, causantes de epidemias y casos esporádicos de enteritis infantil en Europa y Norteamérica, durante las siguientes décadas se pudo conocer, que todas ellas pertenecían a un número reducido de serotipos, conocidos bajo la denominación de E. coli enteropatógenos clásicos (E.C.E.P.)(TAYLOR,1961; EDWARDS y EWING,1972a; EDELMAN y LEVINE,1983; GROSS y ROWE,1984). Su patogenicidad ha podido comprobarse experimentalmente y por estudios clínico-bacteriológicos, al demostrar cumplir todos ellos los postulados de HENLE-KOCH (NETER,1959 y 1979; CONNOR y BARRETT-CONNOR 1967):

- E.C.E.P. son detectados en la mayoría de los casos, como microorganismo predominante en la fase aguda de la enfermedad diarreica, sobre todo en lactantes.

- Durante las epidemias, los lactantes carecen de estos agentes antes de la infección, van aumentando en número durante la incubación, y en la fase de diarrea franca aumenta extraordinariamente su presencia en las heces.

- Estos serotipos de E. coli se aíslan muy raramente en las heces de niños sanos o adultos.

- Una antibioterapia adecuada disminuye o hace desaparecer a estos microorganismos, mejorando la sintomatología.

- Experimentos alimentarios en voluntarios humanos, han demostrado, que coincidiendo con la ingestión de estas cepas se producía una diarrea, no apareciendo esta sintomatología con cepas "normales". Además la gravedad de la misma, estaba en relación directa a la dosis administrada.(NETER y SHUMVAY,1950; FERGUSON

y JUNE,1952; JUNE et al.1953), y tanto los pacientes con enfermedad natural como los voluntarios, tras la ingesta del microorganismo, podían formar anticuerpos específicos frente al antígeno O.

Estos últimos datos, son confirmados por LEVINE et al. en 1978, al conseguir inducir diarrea en voluntarios, inoculando oralmente cepas de E.C.E.P. aislados de brotes diarréicos producidos nueve años antes.

Actualmente, la lista de serogrupos de E. coli, epidemiológicamente relacionados con diarreas infantiles, ha crecido para incluir alrededor de 25 miembros, de los que los serogrupos O, 26, 55, 111, 119, 125, 126, 127, 128 y 142 son los más frecuentes (EDELMAN y LEVINE,1983).

Estos serogrupos se han identificado en áreas geográficas muy diversas, y en países con distintos grados de desarrollo y condiciones higiénico-sanitarias (EVANS et al.1977b; MUNIESA CUENCA,1977; GANGAROSA,1978; GURWITH et al.1978; KLIPSTEIN et al.1978; FLOREZ ALIA et al.1980; CLAUSEN y CHRISTIE,1982; DE MOL et al.1983; BLANCO et al.1983a; TOLEDO et al.1983; THOREN,1983b; ELLIS et al.1984; GEORGES et al.1984). En la TABLA 4, se recogen los serogrupos de E. coli considerados enteropatógenos por el Centro internacional de Escherichia y Klebsiella de la O.M.S., en Copenhague dirigido por ORSKOV (THOREN,1983b).

Durante las tres últimas décadas, la mayor parte de las investigaciones se dirigieron a desentrañar el mecanismo de acción de los nuevos agentes, sospechando ya la relación patogénica entre la diarrea por E. coli y la diarrea colérica. KOYA et al.(1954) y THOMSON

## TABLA 4

### PUBLICACIONES ORIGINALES SOBRE SEROGRUPOS DE E.C.E.P.

(CENTRO DE REFERENCIA DE LA O.M.S. PARA LA DETECCIÓN DE  
ESCHERICHIA COLI. STATENS SERUM INSTITUT. COPENHAGUEN)

SEROGRUPO	EPIDEMIOLOGIA	REFERENCIA
025	- Brote de diarrea infantil grave en Rostock, República democrática alemana, 1951.	ORSKOV, 1954
026	- Epidemia infantil grave en hospitales de Copenhague, 1943-44.	ORSKOV, 1951
044	- Epidemia infantil grave en hospitales de Copenhague, 1943-44.	ORSKOV, 1955
055	- Brotes a lo largo de 1947, Aberdeen	GILES <i>et al.</i> 1949
086	- Aislamientos de casos de diarrea infantil, 1950-1951.	ORSKOV, 1954
091	- Brote en guardería. Alemania, 1964	RUCKDESCHEL y LINZENMEIER, 1966
0111	- Brote grave de diarrea estival, 1943	BRAY, 1945
0114	- Casos de diarrea en terneros, 1951 y brotes hospitalarios en Birmingham, 1952.	CHARTER, 1956
0119	- Casos esporádicos de diarrea infantil grave en Aberdeen, 1952.	SMITH, 1953
0125	- Brote en guardería Londres, 1949.	TAYLOR y CHARTER, 1952
0126	- Casos hospitalizados no especificados. Londres, 1949.	TAYLOR y CHARTER, 1952
0127	- Casos esporádicos en ciudad de Méjico 1951-1952 y epidemia en Filadelfia, Ohio, 1953.	EWING <i>et al.</i> 1955
0128	- Casos esporádicos de diarrea infantil y brotes hospitalarios en Birmingham, 1953.	TAYLOR y CHARTER, 1955
0142	- Casos esporádicos de diarrea en Djakarta, Indonesia 1958.	ORSKOV <i>et al.</i> 1959
0158	- Brote en unidad lactantes, Reino Unido, 1972.	ROWE <i>et al.</i> 1974

THOREN, 1983b

(1955), por ejemplo demuestran que en casos de diarrea producidos por cepas de E.C.E.P. 026, 055 y 0111, estas bacterias proliferan y colonizan en las partes más proximales del intestino delgado, del mismo modo que ocurre en el cólera. THOMSON, llama la atención además sobre la ausencia de lesiones en la mucosa intestinal de los niños fallecidos por esta causa, sin poder explicar todavía, cómo se desencadena la diarrea.

De et al. (1956),(citado por SACK,1975, y por GANGAROSA y MERSON,1977), investigan E. coli, aislados en pacientes con diarrea colérica y en diarreas infantiles, encontrando que algunas cepas provocan una reacción idéntica a la de V. cholerae sobre el asa ileal de conejo, aunque en los filtrados que obtienen de los cultivos no llegan a investigar la presencia de enterotoxinas. Llegan a la conclusión que cepas antigénicamente iguales, pueden ser o no enterotoxigénicas, por lo que la serotipificación no constituiría una prueba de patogenicidad.

En este mismo sentido, TAYLOR et al. (citados por SACK,1975 y por GANGAROSA y MERSON,1977), demuestran en 1961, la escasa correlación existente entre el serotipo de E. coli y la respuesta secretoria en el asa ileal, y la buena correlación en cambio, entre esta respuesta y el origen de la cepa (según proceda de niños, con o sin diarrea).

Los primeros trabajos sobre la enterotoxigenicidad de E. coli, proceden de la investigación veterinaria. SMITH y HALLS (1967) estudian los filtrados de cultivos de E. coli, que habían producido diarrea en cerditos, demostrando que estas cepas poseían un factor

de colonización específico (antígeno K), mediado por un plásmido, y que producían 2 tipos de enterotoxinas (SMITH y GYLES,1970), una termolábil y otra termoestable, también codificadas en plásmidos, que podían ser transmitidos de una bacteria a otra, por conjugación.

En 1971, GORBACH et al. y SACK et al., publican investigaciones similares, pero sobre E. coli de origen humano. Estudian cepas aisladas de pacientes adultos afectos de diarrea con características iguales a las del cólera, aunque de menor duración, y en los que no se había detectado V. cholerae. En estos enfermos encontraron una intensa proliferación de E. coli en las partes proximales del intestino delgado ( $10^7$ - $10^9$  bact./ml), perteneciendo todos ellos a 1 ó 2 serotipos solamente, que dejaban de ser identificados cuando mejoraba la diarrea.

La similitud clínica con el cólera, e incluso la identidad en la composición del líquido vertido a la luz intestinal en ambos procesos (BANWELL et al.1971), condujo a SACK et al. (1971), a utilizar las mismas técnicas que se empleaban en la detección de la enterotoxina colérica (TC), demostrando con ellas, que estas cepas producían una enterotoxina termolábil, inmunogénica y no dializable (LT). Posteriormente se vería, que TC y LT son de naturaleza y estructura semejantes, con determinantes antigénicos comunes (GILLIGAN et al.1983), que actúan sobre la adenil-ciclasa de la célula intestinal, y provocan un incremento del AMPc (SACK,1975; FIELD, 1979).

Por último, DUPONT et al. (1971), pueden demostrar que estos E. coli enterotoxigénicos (E.C.E.T.), al ser administrados oralmente a voluntarios, desencade-

nan una diarrea acuosa no sanguinolenta.

Casi al mismo tiempo, y coincidiendo con los hallazgos de SMITH y GYLES, (1970), en E. coli de origen animal, DEAN et al. demuestran en 1972, estudiando diarreas infantiles en Honolulu, que Escherichia coli puede elaborar también una toxina termoestable (ST).

Desde entonces se incrementan las publicaciones informando sobre la capacidad enterotoxigénica de este microorganismo, en distintas modalidades de diarrea y en distintas zonas geográficas. Actualmente sabemos que E.C.E.T. puede producir diarrea infantil (DEAN et al. 1972; ECHEVARRIA et al. 1975; GUERRANT et al. 1975; RUDOY y NELSON, 1975; SACK et al. 1975a; ORSKOV et al. 1976; RYDER, 1976b; DONTA et al. 1977; BÄCK et al. 1980b; GOLDHAR et al. 1980; ALBOUY et al. 1981; KEUSCH, 1981b; LEKSOMBOON et al. 1981; OTNAESS y HALVORSEN, 1981; STINTZING et al. 1981; LOPEZ BREA et al. 1982; REIS et al. 1982; BLANCO et al. 1983a; GEORGES et al. 1983; MAIDIN, 1983; MATA et al. 1983a, diarrea colérica en adultos (FINKELSTEIN et al. 1976; SACK, 1978; MERSON et al. 1979; WOOD et al. 1983), y es el principal agente etiológico en la diarrea del viajero (SHORE et al. 1974; GORBACH et al. 1975; ROWE et al. 1983).

Por otra parte, la diarrea por Escherichia coli también podía manifestarse como un síndrome disentérico, circunstancia que fue observada ya por SAKAZAKI et al. (1967), (citado por GANGAROSA y MERSON, 1977). En 1971, DUPONT et al. estudiando dos cepas no toxigénicas de E. coli en animales de experimentación, evidencian su penetración en las células epiteliales del intestino grueso, produciendo ulceraciones en la mucosa intestinal. Al ser administradas oralmente a voluntarios desencadenan

en ellos una diarrea disenteriforme, con sangre, moco y células inflamatorias, así como tenesmo, hiperpirexia, hipotensión y toxemia grave.

En la revisión que GANGAROSA y MERSON realizan en 1977, llaman la atención sobre los escasos brotes epidémicos causados por este tipo de cepas. Cuando se detectan, se relacionan con casos esporádicos de diarrea, y en general se aíslan infrecuentemente (SHORE et al. 1974; GURWITH y WILLIAMS, 1977; ECHEVARRIA et al. 1977). Sólo excepcionalmente se comunica una incidencia mayor, como ocurre en las publicaciones de:

- . GUERRANT et al. (1975), con alrededor del 20% de los casos de diarrea infantil estudiados en Brasil.
- . RUDOY y NELSON (1975), con el 30% de las cepas de E. coli causantes de diarrea en niños de Texas.
- . TOLEDO y TRABULSI (1983), con un 10.5% de los E. coli aislados de niños y adultos diarreicos en Brasil.

Tras el descubrimiento de los distintos tipos de E. coli, un paso casi obligado era comprobar si el grupo de los denominados E.C.E.P. clásicos, podía ser encuadrado dentro de alguno de estos. La mayor parte de las investigaciones tendieron a ello, comprobando que prácticamente la totalidad de las cepas enteropatógenas no eran capaces de producir enterotoxinas, ni de penetrar en la célula intestinal (DEAN et al. 1972; GOLDSMITH y DUPONT, 1976; GURWITH et al. 1977 y 1978; ROBINS-BROWNE et al. 1982), e incluso que serotipos idénticos, del mismo enfermo, aislados durante la fase aguda de la enfermedad, podían ser enterotoxigénicos y no enterotoxigénicos (SACK et al. 1971).

Sin embargo, se ha podido observar que un

elevado porcentaje de cepas toxigénicas pertenecen a un limitado número de serotipos (EVANS et al.1977a; DE BOY II et al.1980c), que son distintos de los previamente incriminados en los brotes diarréicos infantiles. Esto sugiere la posibilidad, de que en determinados serotipos existan plásmidos reguladores de la enterotoxigenicidad (EVANS et al.1975; SACK,1975), o de la enteroinvasividad (HALE et al.1983). Así por ejemplo, la mayor parte de las cepas del serogrupo 0128 son enterotoxigénicas, (ORSKOV et al.1976; RYDER et al.1979; BÄCK et al.1980b; DE BOY II et al.1980c; GOLDHAR et al.1980; MERSON et al.1980a; REIS et al.1980; SCOTLAND et al.1981; DARFEUILLE et al.1983; WASCHSMUTH et al.1983); del mismo modo, las cepas del serogrupo 0124, suelen ser enteroinvasivas, (DUPONT et al.1971; TOLEDO y TRABULSI,1983).

La discrepancia existente entre los mecanismos patogénicos y la serotipificación, reconocida clásicamente como definitoria de infectividad, ha puesto en duda su valor como técnica diagnóstica en la enfermedad diarreica, en los casos esporádicos (GANGAROSA y MERSON, 1977; NETER,1979; EDELMAN y LEVINE,1983).

### 1.2.1.- Concepto de E.C.E.T., E.C.E.P. y E.C.E.I.

Actualmente se ha impuesto una reclasificación en base a las propiedades patogénicas conocidas y diferenciadas de cada grupo:

- El nombre de enteropatógenos clásicos (E.C.E.P.), se reserva para los serogrupos epidemiológicamente incriminados como patógenos.

- Como enterotoxigénicos (E.C.E.T.), se conocen los E. coli productores de enterotoxina LT ó ST.

- A las cepas con capacidad invasiva se les llama enteroinvasivas (E.C.E.I.).

De todos ellos, el grupo sobre el que persisten más interrogantes es el de los E.C.E.P. Aunque algunas investigaciones apuntan hacia la producción de toxinas distintas a las ST y LT, que no pueden ser detectadas por los métodos habituales para diagnosticar E.C.E.T., (GODSCHMIDT y DUPONT,1976; KONOWALCHUCK et al.1977; KLIPSTEIN et al.1978; LEVINE et al.1978; SCOTLAND et al.1980a), y otras, hacia un comportamiento similar al de Salmonella, con destrucción del microvilli sin penetración de la bacteria en el epitelio intestinal, (ULSHEN y ROLLO,1980; ROTHBAUN et al.1981 y 1982), todavía se desconocen los mecanismos patogénicos de la mayor parte de estas cepas.

Por todo ello, es posible que en un futuro, este grupo requiera una nueva subdivisión, dado que al parecer, no existe un modo de actuación común (Editorial Lancet,1983b).

Además de las propiedades descritas, E. coli poseen otra característica que les confiere el poder de virulencia, de tal modo que sólo pueden colonizar el intestino si son capaces de adherirse al borde en cepillo de la célula intestinal, venciendo de este modo el peristaltismo que trata de impedir su asentamiento (GAASTRA y DE GRAAF, 1982). Tras la adhesión, serán capaces de proliferar y desarrollar su mecanismo de acción. Los tres tipos de E. coli poseen esta capacidad adherente, (MOON et al.1979; BOEDEKER,1984; SANSONETTI, 1985), si bien sólo en E.C.E.T. se han descrito estructuras proteicas filamentosas en su superficie denominadas fimbriae, pili o factores de colonización (EVANS et al.1975; EVANS y EVANS,1978; THOMAS et al.1982; DARFEUILLE et al.1983).

En la TABLA 5, se resumen y comparan las características de cada uno de los tipos de E. coli comentados.

TABLA 5

CARACTERÍSTICAS DE LOS DISTINTOS TIPOS DE ESCHERICHIA COLI

	E.C.E.P.	E.C.E.T.	E.C.E.I.
MECANISMOS PATOGENICOS	Desconocidos	Enterotoxigénicos	Invasión epitelio intestinal
LUGAR DE ACTUACION	Intestino delgado	Intestino delgado	Intestino grueso
TIPO DE DIARREA	Acuosa	Acuosa	Sanguinolenta
AFECTADOS	Niños (lactantes)	Niños y adultos	Niños y adultos
PAISES en que INCIDEN	Todo el mundo	Principalmente en subdesarrollados	Baja frecuencia en todo el mundo
GRUPOS-O MAS FRECUENTES	26, 44, 55, 86, 111,114,119,125, 126,127,142,158.	6,8,15,20,25,27, 63,78,115,128, 148,159.	28 ac,29,42,112ac, 124,136,143,144,152, 164,167.

GONZALEZ GARCIA, 1983

### 1.3.- ESCHERICHIA COLI ENTEROTOXIGENICO (E.C.E.T.)

#### 1.3.1.- Propiedades enterotoxigénicas

Escherichia coli es capaz de producir enterotoxinas, sustancias proteicas que van a provocar una respuesta secretora en el intestino delgado (SMITH y GYLES, 1970; DUPONT et al. 1971; EVANS et al. 1973a,b,c; DONTA et al. 1974a; GUERRANT et al. 1974; RUDOY y NELSON, 1975; DESJEUX et al. 1979; SACK, 1975).

Hasta el momento actual se ha podido demostrar que E.C.E.T. puede producir dos tipos de enterotoxinas, (SMITH y GYLES, 1970; DONTA et al. 1974a; SACK, 1975), aunque se sospecha que pueden existir otras, (SMITH y GYLES, 1970; SACK, 1980; SCHEFEL et al. 1980):

- Una enterotoxina termolábil (L.T.), similar inmunológica y estructuralmente a la toxina colérica (GYLES y FALKOV, 1974; CLEMENTS y FINKELSTEIN, 1979; KEUSCH 1981b).

- Una enterotoxina termoestable (S.T.) no inmunológica y de bajo peso molecular, (SACK, 1975; KEUSCH, 1981b).

Aunque tras las primeras caracterizaciones llevadas a cabo por SMITH y GYLES en 1970, se creía que formaban parte de una misma toxina, se ha podido demostrar que son dos toxinas distintas, con diferente estructura y mecanismo de acción.

La capacidad enterotoxigénica de E. coli, es controlada genéticamente por plásmidos que codifican la producción de ST, LT, o ambas, (SMITH y HALLS, 1967; MINIATS y GYLES, 1972; GYLES et al. 1974; DALLAS y FALKOW, 1979; SACK, 1975 y 1980), por lo que cepas de E. coli no enterotoxigénico pueden convertirse en cepas toxigénicas, y estas últimas, podrían perder su poder virulento, por pérdida de sus plásmidos durante la conservación prolongada de los cultivos, (BÄCK et al. 1980b), o por transferencias múltiples (EVANS et al. 1977a).

#### 1.3.1.1.- Enterotoxina Termolábil (L.T.). Naturaleza y mecanismo de acción

Se trata de una proteína no dializable, que precipita con sulfato amónico, (EVANS et al. 1972), y que es lábil al calor, siendo inactivada parcialmente a 80°C durante 30 minutos, o totalmente a 100°C durante 2 minutos (SACK et al. 1971).

Las diversas purificaciones y caracterizaciones que se han realizado, le otorgan un peso molecular comprendido entre 20.000 y 100.000 d (SACK et al. 1971; EVANS et al. 1973b; FINKESLSTEIN et al. 1976; KUNKEL y ROBERSTON, 1979; GILL et al. 1981; CANDY y NEISH, 1984), aunque en algunas comunicaciones se haya informado de pesos moleculares superiores a 100.000 d (GUGGENBEICHLER, 1979; SACK, 1980). Esta variabilidad obedece a que en muchos casos, se han utilizado preparaciones impuras de enterotoxina cruda conteniendo mezclas de ambas toxinas, (SACK, 1980), o restos de material celular (EVANS et al. 1972; FILKENSTEIN et al. 1976).

Aunque es una toxina idéntica a la de V. cholerae en su estructura y mecanismo de acción, (EVANS

et al.1972), es 10 veces menos potente que ella, (SACK et al.1971; PIERCE y WALLACE,1972), con una respuesta secretora de instauración lenta, aunque sostenida, cuya magnitud y duración es dosis dependiente (EVANS et al. 1973c).

Está compuesta por dos subunidades polipeptídicas, (CLEMENTS y FINKELSTEIN,1979; DALLAS y FALKOW,1979; GILL et al.1981; GROSS y ROWE,1984), que poseen secuencias aminoacídicas comunes a las de la toxina colérica (T.C), (DALLAS y FALKOW,1980; SPICER et al.1981):

- La subunidad LT-A es similar a su homóloga "A" en T.C., tiene un peso molecular (P.M.) de 25.000 a 30.000 d (CLEMENTS y FINKELSTEIN,1979; KUNKEL y ROBERTSON,1979; YAMAMOTO y YOKOTA,1982), y está constituida a su vez, por dos fragmentos ( $A_1$  y  $A_2$ ) unidos entre sí por puentes disulfuro (RUBINO y GUANDALINI,1984):

. El fragmento  $A_1$ , con un PM de 21.000 y 23.000 d (CLEMENTS y FINKELSTEIN,1979; GILL et al.1981), donde reside la función tóxica inductora de la estimulación intracelular de adenil-ciclase (PIERCE y WALLACE,1972; FIELD,1979; PALVA et al.1981).

. El fragmento  $A_2$ , con un PM de 7.000 (CLEMENTS y FINKELSTEIN,1979; GILL et al.1981), que no es tóxico para sí mismo (FIELD,1979).

- La subunidad LT-B está relacionada inmunológicamente con la subunidad B de la toxina colérica, y constituida también por 5 fracciones que se distribuyen simétricamente formando un anillo alrededor de la subunidad LT-A, (DALLAS y FALKOW,1979)(fig. 1). A este agregado se le llama "coligenoide" (GILL et al.1981), de forma similar a la denominación "coleragenoide" de la

T.C. (FINKELSTEIN et al.1966). Cada una de estas 5 fracciones tiene un PM de alrededor de 11.500 d (CLEMENTS y FINKELSTEIN,1979; DALLAS y FALKOW,1979),(entre 11.800 y 12.000 d, según YAMAMOTO y YOKOTA,1982), y sirven para unir la toxina al borde en cepillo del intestino delgado, concretamente a los residuos de galactosa, del monosialogangliósido GM<sub>1</sub> glico-lipídico de la célula intestinal (fig. 1), que protunden desde la capa lipídica de la membrana celular,(CLEMENTS y FINKELSTEIN,1979; FIELD,1979; MOSS y VAUGHAN,1980; GILL et al.1981; PALVA et al.1981; GROSS y ROWE,1984; RUBINO y GUANDALINI,1984).

Esta unión, produce un cambio en la conformación estructural de la toxina,(GILL et al.1981; CANDY y NEISH,1984; RUBINO y GUANDALINI,1984), lo que facilita la penetración del fragmento LT-A en el enterocito, a través de los "poros" creados en el borde en cepillo de la membrana, por el anillo de las 5 subunidades B (GILL et al.1981; CANDY y NEISH,1984).

Una vez en el citoplasma celular, la subunidad A se rompe, soltando a sus 2 componentes A<sub>1</sub> y A<sub>2</sub> (RUBINO y GUANDALINI,1984). El péptido A<sub>1</sub> (fig. 2), es una enzima que divide al dinucleótido adenina nicotinamida, en adenosina difosfato ribosa (ADPR) y en nicotinamida (NA). La primera, (ADPR), se liga covalentemente a un receptor proteico en la membrana plasmática de la célula intestinal. Este receptor es una guanosa-trifosfatasa (GTP), o parte de ella, y regula la actividad de la enzima adenil-ciclasa convirtiéndola de forma activa (ligada al guanosa-trifosfato=GTP-E), en forma inactiva (E).

El fragmento A<sub>1</sub> de la toxina LT, inactiva

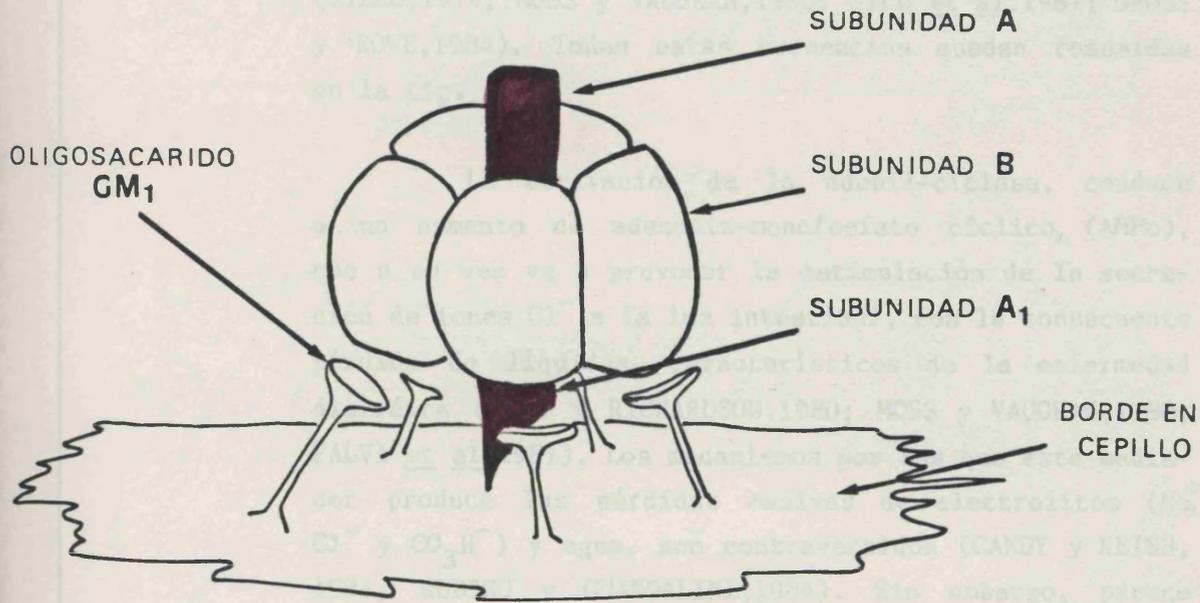


FIG.1.. ESTRUCTURA DE LA TOXINA TERMOLABIL DE E. COLI. UNION A LA MEMBRANA DE LA CELULA INTESTINAL (RUBINO Y GUADALINI, 1984)

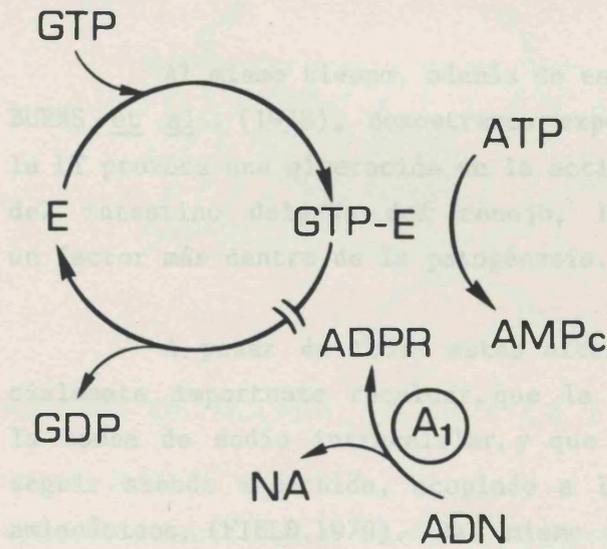


FIG.2.. MODO DE ACCION DE LA SUBUNIDAD A<sub>1</sub> (EXPLICACION EN EL TEXTO) (FIELD, 1979)

a la guanosin-trifosfatasa, lo que aumenta extraordinariamente la actividad intracelular de la adenil-ciclasa (FIELD,1979; MOSS y VAUGHAN,1980; GILL et al.1981; GROSS y ROWE,1984). Todas estas secuencias quedan resumidas en la fig. 3.

La activación de la adenil-ciclasa, conduce a un aumento de adenosin-monofosfato cíclico, (AMPc), que a su vez va a provocar la estimulación de la secreción de iones  $\text{Cl}^-$  a la luz intestinal, con la consecuente pérdida de líquidos, característicos de la enfermedad diarréica (GILL y RICHARDSON,1980; MOSS y VAUGHAN,1980; PALVA et al.1981). Los mecanismos por los que este mediador produce las pérdidas masivas de electrolitos ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  y  $\text{CO}_3\text{H}^-$ ) y agua, son controvertidos (CANDY y NEISH, 1984; RUBINO y GUANDALINI,1984). Sin embargo, parece ser que a nivel de la vellosidad, el AMPc, bloquea el acoplamiento del  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$ , inhibiendo por tanto la absorción de estos electrolitos y del agua, mientras que en la cripta tiene un efecto secretorio directo, favoreciendo la salida del  $\text{Na}^+$  y la pérdida de  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{CO}_3\text{H}^-$  y agua (FORMAL et al.1958; EVANS y EVANS,1978; FIELD,1979).

Al mismo tiempo, además de este efecto secretor, BURNS et al., (1978), demostraron experimentalmente que la LT provoca una alteración de la actividad mioeléctrica del intestino delgado del conejo, lo que podría ser un factor más dentro de la patogénesis.

A pesar de todas estas alteraciones es especialmente importante recalcar, que la toxina no bloquea la bomba de sodio intracelular, y que el ión Na puede seguir siendo absorbido, acoplado a la glucosa o a los aminoácidos,, (FIELD,1979). Del mismo modo, se mantiene

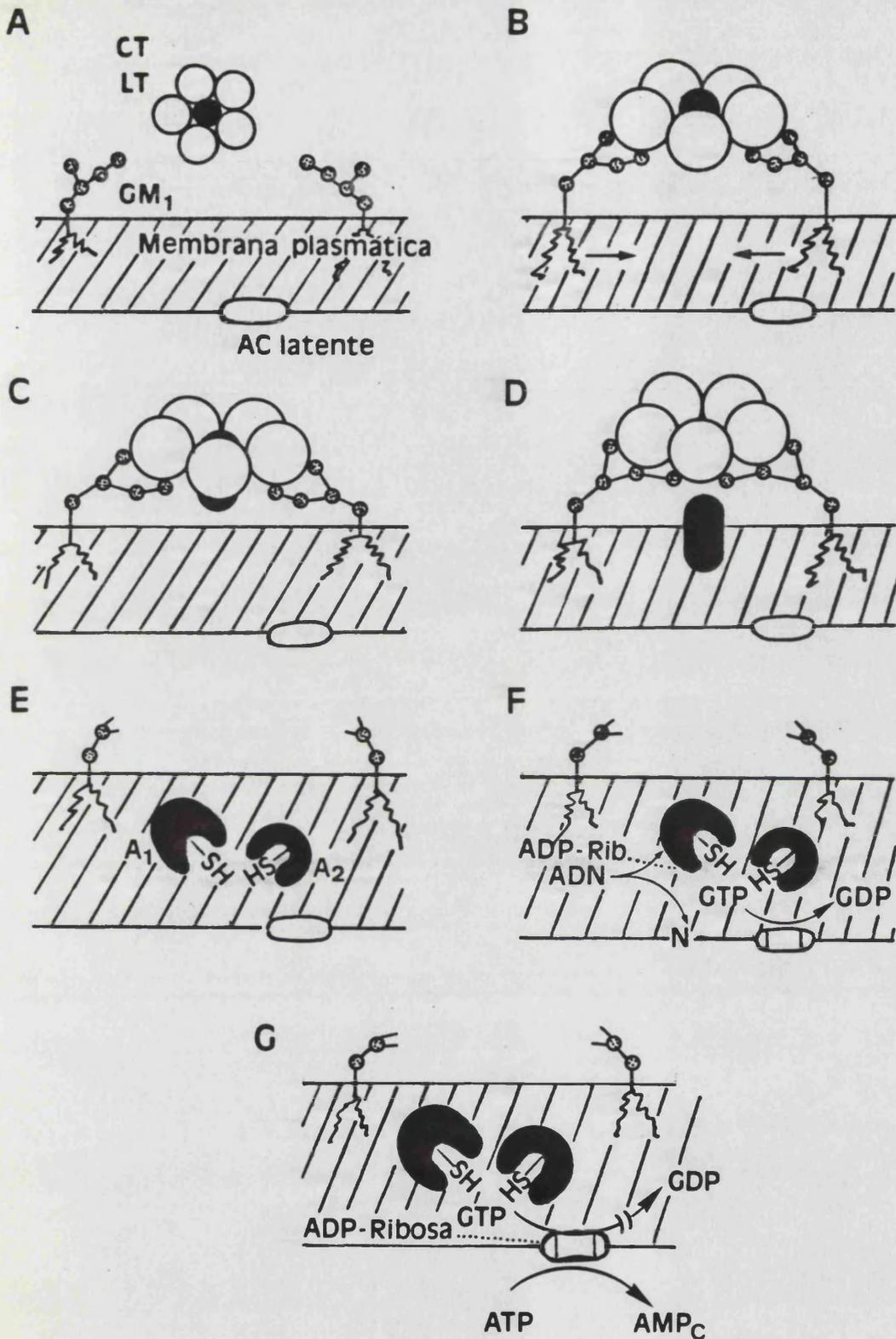


FIG. 3.. MECANISMO DE ACCION DE LT Y CT (FISHMAN, 1980)

- A.. SITUACION INICIAL
- B.. UNION DE LA SUBUNIDAD B AL OLIGOSACARIDO GM<sub>1</sub>
- C.. ALTERACION DE LA ESTRUCTURA MOLECULAR
- D.. SEPARACION DE LOS COMPONENTES A Y B. PENETRACION DE LA SUBUNIDAD A EN LA CELULA
- E.. RUPTURA DE LOS PUENTES DISULFURO: FRAGMENTOS A<sub>1</sub> Y A<sub>2</sub>
- F.. DESDOBLAMIENTO DEL ADN EN NICOTINAMIDA(N) Y ADP-RIBOSA, POR A<sub>1</sub>
- G.. PASO DE ADP-RIBOSA AL COMPLEJO ADENILCICLASA(AC) Y ACTIVACION DE AC

intacta la absorción de dipéptidos. Por ello, la administración precoz de soluciones glucoelectrolíticas, o de nutrientes por vía oral, podría paliar la deshidratación y déficits nutritivos que acompañan a la mayor parte de estos procesos. (NALIN,1983; SANTOSHAM,1983; RUBINO y GUANDALINI,1984).

La enterotoxina termolábil tiene determinantes antigénicos comunes con la toxina colérica, (CLEMENTS y FINKELSTEIN,1978). Utilizando antisueros frente a TC y frente a preparaciones crudas de LT, se observa que TC y sus subunidades purificadas reaccionan cruzadamente con LT, (GILLIGAN et al.1983). Las respuestas obtenidas son idénticas frente a LT-A y frente a TC-A, (BACK et al.1980b), aunque la línea de precipitación es más débil para LT-A, (SACK et al.1971; GILLIGAN et al.1983). De la misma forma, la antitoxina contra LT neutraliza la CT, (EVANS et al.1973c; GUERRANT et al.1974; GYLES y FALKOW,1974; SACK,1975), aunque con una reacción que viene a ser una centésima de su homóloga (EVANS et al.1973b).

Todas las LT producidas por cepas de E.C.E.T., (incluidas las de origen animal), son similares o idénticas entre sí, lo que puede ser comprobado utilizando antisueros frente a LT, o por reacción cruzada con la enterotoxina de V. cholerae (SACK,1975 y 1980).

La enterotoxina LT tiene las características de una exotoxina (SACK et al.1971), y aunque no se conoce todavía su localización precisa dentro de la bacteria, se ha detectado en grandes cantidades entre las envueltas de la pared bacteriana (PALVA et al.1981).

Tanto LT-A como LT-B, se sintetizan como precursores inactivos en el interior de la bacteria, debiendo ser procesados proteolíticamente antes de ser excretados, (DALLAS y FALKOW,1980; PALVA et al.1981). Esta liberación se realiza al parecer secuencialmente, (HIRST et al.1983), de tal forma que mientras la maduración de la subunidad B requiere la utilización de energía, (PALVA et al.1981), la liberación de LT-A sólo puede realizarse si existen subunidades B en el interior de la membrana celular (YAMAMOTO y YOKOTA,1982).

Llama la atención la disparidad existente entre la actividad enterotóxica detectada en los sobrenadantes de E.C.E.T., y en los de V. cholerae, con diferencias de hasta 5 veces en favor de estos últimos (MIDDELDORP y WITHOLT,1981). Esto podría explicar la gravedad, que suele caracterizar al cólera, respecto a los casos, más moderados, provocados por E. coli toxigénico, pero no explicaría sin embargo las diarreas coleriformes graves producidas también por este patógeno, que sólo podrían obedecer, a que cada uno de estos microorganismos disponga de distintos mecanismos para la síntesis y liberación de sus enterotoxinas. MIDDELDORP y WITHOLT, (1981), intentan encontrar un modelo de liberación de LT por E. coli (fig. 4). LT puede liberarse del mismo modo que la toxina colérica, como una proteína soluble (vía A), pero es más probable que las subunidades LT-A y LT-B sean sintetizadas en los ribosomas ligados a la membrana citoplasmática, e impulsados a través de ella (paso B). Tras la unión de una subunidad A con 5 subunidades B, (CLEMENTS y FINKELSTEIN,1979; KUNKEL y ROBERSTON,1979), las moléculas completas, A-5B, permanecerán unidas a la membrana externa de la bacteria.

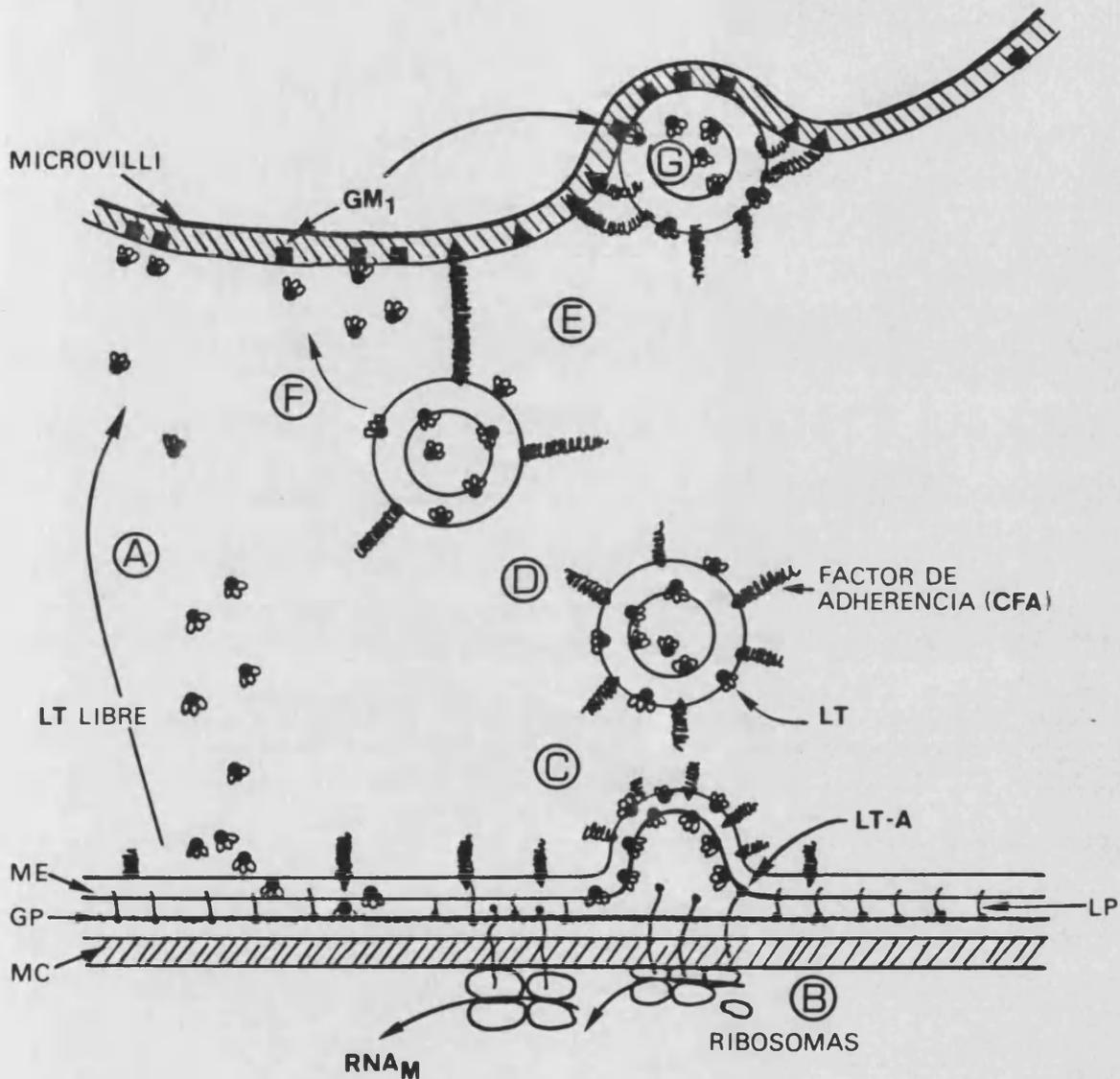


FIG. 4.. MODELO DE LIBERACION DE LA ENTEROTOXINA LT DE E. COLI  
(MIDDELDORP Y WITHOLT, 1981)

- MC.. MEMBRANA CITOPLOSMICA  
 GP.. CAPA GLICOPEPTIDICA  
 ME.. MEMBRANA EXTERNA DE LA BACTERIA  
 LP.. ENLACES LIPOPROTEICOS  
 ▲ RECEPTORES PARA CFA  
 ■ RECEPTORES PARA LT (GM<sub>1</sub>)

Ocasionalmente, fragmentos de esta membrana conteniendo LT, van a emerger, y podrán llegar a ser liberadas si fallan las ligaduras lipoprotéicas que mantienen unidas la membrana externa y la capa subyacente glicopeptídica (paso C).

Estos fragmentos o trozos de membrana, disponen de sus componentes básicos (proteínas, fosfolípidos, lipopolisacáridos ...),(paso D), pero cada uno puede tener una composición distinta. Si alguno contiene factores de adhesión (CFA), van a ser capaces de interactuar con las células intestinales del huésped (paso E), lo que facilitará a su vez, la liberación de nuevos fragmentos de la pared bacteriana, que podrán adherirse también a las células epiteliales (paso G).

Estas hipótesis han podido ser confirmadas al visualizar con el M.E. las vesículas de la membrana bacteriana, tras poner en contacto, experimentalmente, bacterias enterotoxigénicas con segmentos intestinales "in vivo", (MIDDELDORP y WITHOLT, 1981); por ello, aunque V. cholerae excrete mayor cantidad de toxina a la luz del intestino, E. coli puede poner en marcha mecanismos que favorezcan la unión de la enterotoxina termolábil a la célula, a través de estas "vesículas" portadoras de plásmidos responsables de la capacidad toxigénica y adhesiva.

#### 1.3.1.2.- Enterotoxina termoestable (ST). Naturaleza y mecanismo de acción

Se trata de un polipéptido con una mayor heterogeneidad que la enterotoxina termolábil (LT), de tal forma, que han sido precisas sucesivas purifica-

ciones y caracterizaciones para poder describir sus propiedades, dado que las ST excretadas por las diversas cepas de E.C.E.T. de origen humano o animal, no reunían siempre las mismas características, (JACKS y WU,1974; ALDERETE y ROBERTSON,1978; TAKEDA et al.1979; RAO et al.1981; GROSS y ROWE,1984). Esto podía obedecer a que existen al menos dos tipos bien definidos de toxina ST (BURGESS et al.1978; OLSSON y SODERLAND,1980):

1.- Una molécula soluble en metanol, con actividad biológica en ratones, ratas, conejos y cerditos lactantes, conocida como STa. Ha sido descrita en E.C.E.T de origen humano, bovino y porcino.

2.- Una molécula insoluble en metanol, inactiva en ratones lactantes, y activa en asas intestinales ligadas de cerdos y conejos adultos, conocida como toxina STb. Ha sido descrita en E.C.E.T. de origen porcino solamente.

Las cepas de E.C.E.T. pueden producir STa, STb, o ambas, (GROSS y ROWE,1984), y hasta este momento han sido publicadas importantes variaciones respecto al peso molecular, secuencia aminoacídica o características bioquímicas, según se tratara de cepas de distinta procedencia,(DREYFUS et al.1983), debido a la variabilidad en la técnicas para la producción y purificación de la enterotoxina (RAO et al.1981).

Por ejemplo, las informaciones respecto al contenido en aminoácidos de las STa, varían entre 18 a 47 residuos aminoacídicos, del mismo modo que ha ocurrido con otras propiedades químicas (JACKS y WU,1974; BURGESS et al.1978; TAKEDA et al.1979; STAPLES et al.1980; SAEED et al.1983).

Sin embargo, en 1983, DREYFUS et al., logran purificar cinco toxinas ST producidas por E.C.E.T. de origen porcino, bovino y humano, pudiendo demostrar que las STa están constituidas por 18 residuos aminoacídicos, tienen un PM de 1.972 ó 1.928 d, dependiendo de la cepa estudiada, y contienen 6 residuos de cisteína, que permiten el establecimiento de puentes disulfuro y que son los que le confieren una gran resistencia a la temperatura y a la hidrólisis enzimática (CHAN y GIANELLA,1981; DREYFUS et al.1983; SAEED et al.1983).

La toxina ST mantiene su actividad tras ser calentada a 80° durante 30 minutos, desciende ligeramente al someterla a 100°C durante 30 minutos, y se inactiva a 121°C a los 30 minutos (SMITH y HALLS,1967; JACKS y WU,1974; GIANELLA,1976; STAVRIC y JEFFREY,1977; MULLAN et al.1978; LALLIER et al.1980; SAEED et al.1983). Es resistente a la acción de la tripsina, pronasa, desoxirribonucleasa, fosforilasa C, acetona, fenol, cloroformo y metanol, (JACKS y WU,1974; FIELD,1979; LALLIER et al. 1980; SAEED et al.1983), y se mantiene estable frente a los ácidos (pH=1), pero no frente a los alcalis (pH=9). (FRANTZ y ROBERSTON,1981).

MOSELEY et al. (1983), han puesto de manifiesto que en los E.C.E.T. de origen humano existen dos genes denominadas STIa y STIb, que dan lugar a dos tipos de enterotoxinas termoestables, muy semejantes entre sí, y con las características de STa, es decir, activas en ratones lactantes, que se denominan STIa y STIb. Mientras la toxina STIa se ha encontrado en cepas de origen humano y animal, la STIb sólo se ha detectado, hasta este momento, en cepas de E.C.E.T. aisladas de diarreas humanas.

Al parecer, la estructura de la toxina STa debe de ser común para todas las toxinas ST que existen en la naturaleza, lo que explicaría la similitud entre STa de E. coli y la toxina termoestable de Yersinia enterocolítica, la cual es también soluble en metanol, causa deshidratación al inocularla en ratones lactantes y en asas ligadas de intestino de conejos, presentando ambas, reacciones antigénicas cruzadas (OKAMOTO et al. 1981).

La enterotoxina termoestable fue descrita inicialmente como una molécula no antigénica, (SACK, 1975), sin embargo recientemente se ha demostrado, que las toxinas STa acopladas a un transportador proteico logran, tras varias dosis, antisueros con altas titulaciones, que han sido utilizados para ensayos inmunológicos (FRANTZ y ROBERTSON, 1981; GIANELLA et al. 1981). Estos autores, por técnicas de radio-inmuno-ensayo pusieron en evidencia, la existencia de un determinante antigénico común en las toxinas STa sintetizadas por E. coli humanos, porcinos y bovinos, que no existe en las toxinas STb.

Las toxinas STa actúan estimulando la guanilciclase (HUGHES et al. 1978; FIELD, 1979; GROSS y ROWE, 1984), lo que conduce a un aumento intracelular del guanosin 3'-5' monofosfato cíclico (GIANELLA et al. 1981). Esto ocurre únicamente en las células intestinales, no produciéndose a nivel de otras líneas celulares, lo que sugiere la existencia de un único receptor específico para esta toxina, presente sólo en las células del intestino.

La toxina termoestable comienza su acción a los pocos minutos, se mantiene 2-3 horas, y cesa si

se elimina la toxina (RUBINO y GUANDALINI,1984).

La guanil-ciclasa puede adoptar 2 formas: Una soluble y otra como partícula única, que es la forma predominante en el intestino. La toxina STa activa sólo la guanil-ciclasa, en forma de partícula única, (RAO et al.1981), que se encuentra en la membrana basolateral y en el borde en cepillo de la célula intestinal (RUBINO y GUANDALINI,1984).

DREYFUS et al. (1984), tras demostrar que en la estimulación de la partícula de guanil-ciclasa no están implicados ni el metabolismo del ácido araquidónico, ni la activación de la fosfolipasa A<sub>2</sub>, ni la formación de prostaglandinas, llegan a la conclusión de que los grupos tiol de los receptores para la toxina STa, y sus enlaces disulfuro, juegan un papel crítico en el mecanismo de acción, de tal forma que el intercambio de sulfúrico entre la toxina STa y su receptor, puede preceder a la activación de la partícula de guanil-ciclasa. Quedaría por demostrar, si el receptor para la toxina STa y la guanil-ciclasa son proteínas separadas, o una glicoproteína transmembranosa, con el receptor para la toxina STa en la superficie celular, y la guanil-ciclasa en la parte citoplásmica de la membrana.

El mecanismo por el que el aumento de GMPc produce un acúmulo neto de agua y electrolitos en la luz no es bien conocido, aunque se sabe que dosis máximas de toxina termoestable producen fundamentalmente una abolición de la absorción neta de Cl<sup>-</sup> y Na<sup>+</sup>, (RAO et al.1981), un aumento de la secreción de CO<sub>3</sub>H<sup>-</sup>, e inducen una secreción neta de Cl<sup>-</sup>, aunque mucho menor que la provocada por el AMPc, (RUBINO y GUANDALINI,1984).

El GMPc mantiene también intacto el acoplamiento entre la glucosa o/y los aminoácidos con el sodio, (SACK,1975), lo que permite la terapia oral en este tipo de diarreas, como ya comentamos anteriormente.

#### 1.3.1.3.- Relación entre serotipos y enterotoxigenicidad

Cuando E.C.E.T. comenzó a ser definido como un grupo individualizado, distinto a E.C.E.P., se hizo evidente que la mayor parte de las cepas aisladas no pertenecían a los serotipos considerados clásicamente como enteropatógenos, (SACK,1975; ROWE et al.1977). Esta variabilidad fue atribuida al modo en que se transmite la enterotoxigenicidad, que al estar controlada por plásmidos, permite que cualquier cepa de E. coli, enteropatógena o no, pueda adquirir esta propiedad si recibe el plásmido apropiado (SACK et al.1971; SACK, 1980).

Diversos estudios realizados sobre brotes diarréicos infantiles en distintos lugares del mundo, (GORBACH y KHURANA,1972; GUERRANT et al.1975; SACK et al.1975a; GOLDSMITH y DUPONT,1976), confirman que los serotipos enteropatógenos se encuentran con escasa frecuencia entre las cepas toxigénicas. De forma inversa, la aplicación de técnicas para la detección de enterotoxinas, no obtiene respuesta positiva en la mayor parte de los E.C.E.P. estudiados (DEAN et al.1972; SACK,1975; GURWITH et al.1977; ROWE et al.1977; SCOTLAND et al. 1981; ROBINS-BROWNE et al.1982).

Sin embargo, ORSKOV et al. (1976), examinan

un gran número de cepas de E.C.E.T., aisladas en niños y adultos, en distintos lugares geográficos, y encuentran que un elevado porcentaje de ellas, (72%), pertenecen a un número restringido de serotipos, por lo que llegan a afirmar, que la detección de ciertos antígenos O y H (a veces K), en una cepa determinada, puede significar, con gran probabilidad, que se trate de E. coli enterotoxigénico (ORSKOV y ORSKOV,1977a).

Esta correlación fue atribuída por EVANS et al. (1977a), a una inusual estabilidad que los plásmidos enterotoxigénicos mantienen en ciertos serotipos, ya que, según estos autores pudieron comprobar, E. coli productores de enterotoxinas con serotipos frecuentes entre E.C.E.T., poseen unos fenotipos tóxicos más estables y permanentes, que las cepas con serotipos menos frecuentes.

Los serogrupos O, que ORSKOV et al. (1976) encuentran más a menudo entre las cepas toxigénicas son: O6, O8, O15, O25, O78, O115 y O128 predominando los serotipos O6:H16; O8:H9; O15:H11; O25:H42; O78:H<sup>-</sup>; O78:H11; y O78:H12. Sugieren que las cepas encontradas pueden representar clones, que se adaptaron a multiplicarse en el intestino delgado y a transportar los plásmidos necesarios (ORSKOV y ORSKOV,1977a). Para completar el estudio, aplican la técnica de inmunolectroforesis a contracorriente, con el fin de detectar los antígenos polisacáridos K de las cepas investigadas en el trabajo anterior. Observan que, con raras excepciones, cada una de las combinaciones O:H poseían el mismo tipo de antígeno K, o bien carecían de él. Así, todas las cepas E.C.E.T. con los serotipos O6:H16 y O6:H<sup>-</sup>, poseían el antígeno capsular K15; siete de las ocho con el serotipo O8:H9, el K 40; los seis con el serotipo O25:H42,

el K7, y las tres con el serotipo O25:H<sup>-</sup>, el K98. Las 14 cepas del serogrupo O15, y las 28 cepas del O78, no presentaban antígeno capsular, siendo por tanto K negativas. Este tipo de asociación típica, antígeno O-antígeno K, es encontrada también por BÄCK et al. (1980b).

Por otra parte, en su estudio demuestran también, que los E.C.E.T. pertenecientes al mismo serotipo O:K:H se caracterizaban por tener un mismo patrón de fermentación de azúcares, (ORSKOV y ORSKOV, 1977a), hallazgo que posteriormente es confirmado por diversos investigadores, (MERSON et al. 1979; DE BOY II et al. 1980c; REIS et al. 1980), aunque esta característica común no diferencie por sí misma, a las cepas toxigénicas de las no toxigénicas (DE BOY et al. 1980c).

Con estos hallazgos, la serogrupación de E. coli es esgrimida por muchos autores, como una prueba simple para el reconocimiento preliminar de su probable capacidad toxigénica en laboratorios clínicos, (ROWE et al. 1977; MERSON et al. 1980; ROWE et al. 1983; GROSS y ROWE, 1984).

Sin embargo, no todos los aislamientos de E. coli con uno de estos serotipos van a producir necesariamente toxinas. DE BOY II et al. (1980c) pudieron comprobar, que entre 111 cepas, aisladas en E.E.U.U. desde 1960 a 1977, que poseían alguna de las combinaciones O:H típicas para los E.C.E.T., solamente el 25% eran toxigénicas. Estos mismos autores trataron de confirmar, si era necesario que se diera una determinada combinación entre los antígenos O y H en E. coli, para que estos microorganismos fueran toxigénicos. Para ello, aplicaron los ensayos utilizados para detectar las enterotoxinas, en un grupo de 68 cepas que poseían antígenos

O, pertenecientes a los grupos toxigénicos, pero sin los antígenos H asociados comunmente a ellos. Observaron que sólo el 7% producían enterotoxinas, lo que corroboraba la opinión de ORSKOV et al. (1976), de que E.C.E.T. pertenecen a un reducido número de serotipos, con la que coincidirían después muchos autores (ROWE et al. 1977; MERSON et al. 1979; ROWE et al. 1983). Entre ellos, MERSON et al. (1979), intentan conocer la relación existente entre el fenotipo enterotoxigénico y el serotipo, estudiando 109 cepas de E. coli aisladas de otros tantos pacientes con diarrea colérica, en Bangladesh. Encuentran que esta correlación se cumple para las cepas productoras de toxinas ST y LT, de tal forma, que el 90% de ellas pertenecen a alguno de los 7 serogrupos O, citados por ORSKOV et al. (1976), de las cuales, el 86% se encuentran incluídas en sólo 4 de ellos (O6, O8, O78 y O115). Por el contrario los aislamientos de E. coli productores de toxina ST ó LT exclusivamente, se dispersan en un número mayor de serogrupos. Sin embargo, llaman la atención sobre el grupo O128, que recoge 5 de las cepas productoras de toxina ST, ninguna de las cuales posee el antígeno flagelar H<sub>2</sub> típico de las cepas de E.C.E.P. de este serogrupo. También destacan, que el serotipo O6:H16 produzca siempre toxinas LT y ST, y el hecho de que 5 cepas productoras de toxina ST tuvieran el mismo biotipo y serotipo que 12 de las cepas LT/ST, (O78:K<sup>-</sup>:H12), les hace apoyar la hipótesis de EVANS et al. (1977a), sobre el origen de las cepas productoras de toxina ST a partir de cepas ST/LT, que hubieran perdido los plásmidos codificadores de LT.

En 1980, REIS et al., estudiando 76 cepas de E.C.E.T. aisladas en Brasil, confirman la coincidencia

entre el serotipo 0128 y la producción de ST, (todas las cepas que encuentran con esta característica pertenecen al grupo 0128ac), y aunque corroboran la relación entre serotipos y fenotipos toxigénicos, identifican unos serotipos, (06:H16; 063:H<sup>-</sup>; 0139:H28), distintos a los publicados previamente por MERSON et al. (1979 y 1980a), en Bangladesh.

Del mismo modo, ECHEVARRIA et al. (1982), plantean el mismo estudio sobre 386 E.C.E.T. aislados en Tailandia y Filipinas, coincidiendo en sus resultados con el grupo de MERSON et al. (1979), ya que el 83% de las cepas ST/LT pertenecían a 4 serogrupos (06; 08; 025 y 078), y 76% a uno de los 7 serotipos 0:K:H asociados con enterotoxigenicidad. Ellos, igual que otros investigadores, van confirmando desde entonces, que en cada área geográfica suelen abundar unos serotipos concretos, distintos a los que componen el espectro característico o común para este grupo, (SACK, 1980), de tal forma, que por ejemplo, los serotipos 06:K15; 078:H11; 078:H12 y 0128:H (variable) se han encontrado distribuidos ampliamente por todo el mundo, mientras que otros, como 0159:H, se han descrito sólo en Japón (KUDOH et al. 1977), o el 0139:H28, sólo en Brasil (REIS et al. 1980).

En 1980, apoyados en los resultados observados hasta ese momento, MERSON et al. intentan detectar E.C.E.T., entre los aislamientos de E. coli procedentes de pacientes con diarrea colérica, en Bangladesh, utilizando antisueros polivalentes, frente a los grupos O, descritos en esa zona. Preparan 2 clases: Uno que incluye los antisueros 0:K obtenidos frente a cepas de los serogrupos 06:K15:H16; 027:H7; 078:H11; 0148:H28 y 0159:H20,

y el segundo conteniendo los obtenidos frente a cepas de los serotipos 08:K40:H9; 015:H<sup>-</sup>; 020:H<sup>-</sup>; 020:K79:H11; 025:K7:H42; 063:H12 y 0115:H40.

Con ellos fueron capaces de detectar 64% de los 254 E.C.E.T. ensayados, y 9% de las cepas de E. coli no toxigénicas, siendo mayor la efectividad para las cepas ST/LT, (detectan el 92% de ellas), que para las cepas ST, (sólo el 42%), diferencia comprensible dado que el número de los serogrupos O, a los que pertenecen las cepas ST/LT, es mucho menor. Además, compararon este método con las pruebas patrones para la detección de enterotoxinas, apreciando que junto con la sensibilidad del 64% demostrada, los antisueros tienen una especificidad del 96%, y una predictibilidad del 89% para la identificación de E.C.E.T.

Por todo ello, llegan a la conclusión, que los antisueros serían de utilidad en aquellos laboratorios no preparados para la detección de enterotoxinas, pero propugnan y creen necesario ampliar los ensayos a otras zonas geográficas, con el fin de conocer en ellas, la distribución de los serotipos enterotoxigénicos, y ampliar o adaptar así, adecuadamente, el conjunto de antisueros a cada una. (MERSON et al. 1980a).

Estas precauciones en la generalización, rutinaria o indiscriminada, del uso de los antisueros polivalentes, son apoyadas por algunos grupos de investigadores.

BERRY et al. (1982) aportan su experiencia en la identificación de 58 E.C.E.T., 40 de los cuales poseían los antígenos H32 ó 0126 no incluidos dentro

del conjunto propuesto por MERSON et al. (1980a), por lo que con su utilización, sólo hubieran sido detectados 3 E. coli toxigénicos.

STOLL et al. (1983), comparan los serotipos de 207 E.C.E.T. recogidos en Bangladesh, en el año 1980, con los E.C.E.T. obtenidos de controles similares en 1976 y 1978, y pueden comprobar que durante este periodo, los serogrupos han ido cambiando significativamente, de modo que sólo el 46% de las cepas recogidas en 1980, tenían serogrupos incluidos en el antisuero polivalente que era capaz de detectar el 66% de E. coli en 1978. Algunos serotipos, entre los que se encontraba el tercero en frecuencia de los serogrupos encontrados, (0167), no estaban incluidos tampoco en el conjunto.

De aquí se deduce, que en caso de utilizar antisueros para "selección" de E.C.E.T., estos deben ser revisados cada cierto tiempo, y adaptados a los hallazgos específicos del área geográfica donde se vayan a usar (BERRY et al. 1982; STOLL et al. 1983).

Además, por los datos de los que se dispone, para que un sistema serológico de determinación de los E.C.E.T. fuese fiable, resultaría imprescindible la determinación tanto del antígeno O, como el H (FARMER et al. 1977; DE BOY et al. 1980a; EDELMAN y LEVINE, 1983; GONZALEZ GARCIA, 1984).

Hasta la actualidad, a través de los datos recogidos por GONZALEZ GARCIA en la revisión que realiza en 1984, sabemos que se han aislado cepas de E.C.E.T., pertenecientes al menos, a 87 grupos O diferentes, entre los que se incluyen la práctica totalidad de los considerados clásicamente patógenos.

Sin embargo, excepto en las cepas de los grupos 0114, 0126 y 0128, en el resto de las cepas con serotipos E.C.E.P., la producción de enterotoxinas es baja. Del mismo modo, las combinaciones típicas, (O:H), observadas para las cepas E.C.E.T., son infrecuentes en los E. coli no toxigénicos.

Un resumen de los serogrupos y serotipos más frecuentes entre las cepas de E.C.E.T., en el que se indican sus fenotipos enterotoxigénicos característicos, se recoge en la TABLA 6 (GONZALEZ GARCIA,1984).

#### 1.3.1.4.- Detección de las enterotoxinas de E. coli

Dado que ni la identificación de E. coli en las heces diarreicas, ni su serotipificación, pueden informarnos por sí mismas, de su poder virulento, se hace necesaria la demostración de su capacidad enterotoxigénica, o de sus propiedades adherentes, o invasivas, (como veremos más adelante), para poder definirlo como microorganismo patógeno.

##### 1.3.1.4.1.- Medios de cultivo

Se han ensayado una gran variedad de medios de cultivo para facilitar la liberación de las enterotoxinas producidas por E. coli. Uno de los primeros en ser aplicado fué el medio de Syncase (FINKELSTEIN et al.1966), a la vista de sus excelentes resultados en la producción de enterotoxina colérica (TC). Es un medio que sirve tanto para la producción de LT, como de ST, dependiendo de la aireación a que sea sometido (SACK y SACK,1975).

Posteriormente, han sido probados con éxito

TABLA 6

GRUPOS-0 Y SEROTIPOS MÁS FRECUENTES ENTRE LOS ECET

GRUPO-0(a)	ANTIGENOS H ASOCIADOS	SEROTIPOS MAS FRECUENTES(b)	FENOTIPO TOXICO USUAL (c)		PAISES en los que se aislan con mayor FRECUENCIA (d)
<u>06</u>	H <sup>-</sup> , H1, H16, H51	<u>06:K15:H<sup>-</sup></u> <u>06:K15:H16</u> <u>06:K :H51</u>	LT	ST	TUNEZ y ETIOPIA Distribución amplia TAILANDIA y FILIPINAS
<u>08</u>	H <sup>-</sup> , H2, H4, H5, H8 H9, H11, H21, H30	<u>08:K25:H9</u> <u>08:K40:H9</u>	LT	ST	TAILANDIA y FILIPINAS Distribución amplia
015	H <sup>-</sup> , H8, H11, H18	<u>015:H<sup>-</sup></u> <u>015:K:H11</u>	LTST ó	LT	Distribución amplia BANGLADESH
020	H <sup>-</sup> , H7, H11, H21, H40	<u>020:H<sup>-</sup></u> <u>020:H21</u>	LT	ST	Distribución amplia TAILANDIA
<u>025</u>	H <sup>-</sup> , H10, H12, H16, H42	<u>025:H<sup>-</sup></u> <u>025:K7:H42</u>	LTST ó	LT	Distribución amplia Distribución amplia
027	H <sup>-</sup> , H7, H20	<u>027:H7</u> <u>027:H20</u>		ST	Distribución amplia Distribución amplia
063	H <sup>-</sup> , H10, H12, H30	063:H <sup>-</sup>	LT	ST	Distribución amplia
077	H18, H45	077:H18 077:K13:H45	LT		TAILANDIA FILIPINAS

TABLA 6 (continuación)

GRUPO-0 (a)	ANTIGENOS H ASOCIADOS	SEROTIPOS MAS FRECUENTES(b)	FENOTIPO TOXICO USUAL (c)	PAISES en los que se aislan con mayor FRECUENCIA (d)
<u>078</u>	H <sup>-</sup> , H10, H11, H12, H18	<u>078:K<sup>-</sup></u> 078:K <sup>-</sup> :H11 078:K <sup>-</sup> :H12	LTST ó ST LT ST LTST ó ST	Distribución amplia BANGLADESH BANGLADESH
0114	H <sup>-</sup> , H16, H21, H49	0114:H <sup>-</sup> 0114:H49	LT LT	TAILANDIA HONDURAS, BANGLADESH, FILIPINAS
0115	H <sup>-</sup> , H6, H21, H28 H40, H51	0115:H40 0115:H50	LT ST LT ST	BANGLADESH BANGLADESH
0128	H <sup>-</sup> , H7, H12, H18 H21, H27, H49	0128:H7 0128:H12		ST Distribución amplia ST Distribución amplia
0148	H8, H18, H28	0148:K <sup>-</sup> :H8 0148:H28	LT LTST ó ST	TAILANDIA Distribución amplia
0159	H <sup>-</sup> , H4, H20, H21 H34, H37	0159:H4 0159:H20 0159:H21 0159:H34	LTST ó LT LT ST LT ST LTST ó LT	Distribución amplia Distribución amplia JAPON Distribución amplia Distribución amplia
0167	H4, H5	0167:H5		ST BANGLADESH

(a) Están subrayados los serogrupos a los que pertenecen la mayoría de los ECET.

(b) El serotipo más frecuente dentro de cada serogrupo aparece subrayado.

(c) De la mayoría de las cepas de cada serotipo.

(d) Sólo se especifican los países, cuando alguno de los serotipos es particularmente abundante en ellos y no se aislan con frecuencia en otras zonas geográficas.

NOTA: Otros serogrupos de amplia distribución geográfica, aunque con menores frecuencias de aislamiento son 09, 018, 075, 080, 085, 088 y 0109.

GONZALEZ GARCIA, 1984.

otros, entre los que son utilizados con mayor frecuencia los siguientes:

- Medio casaminoácidos con extracto de levadura y sales (CAYE)(EVANS et al.1973a,b,c; GIANELLA,1976; MUNDELL et al.1976; EVANS et al.1977b; SPEIRS et al.1977; BRILL et al.1979; BYERS y DUPONT,1979; SCHEFTEL et al.1980; GOLDHAR et al.1980; CRAIG et al.1981; HONDA et al.1981a; MORGAN et al.1983).

- Infusión de corazón-cerebro (I.C.C.),(RUDOY y NELSON,1975; GURWITH y WILLIAMS,1977; BÄCK et al.1980a; LALLIER et al.1980; MATA et al.1983).

- Caldo soja tripticasa (C.S.T.),(DEAN et al.1972; DONTA et al.1974a; SHORE et al.1974; GIANELLA,1976; SPEIRS et al.1977; STAVRIC y JEFFREY,1977; MOON et al.1978; MAKI et al.1980; SCOTLAND et al.1980a,b; OTNAESS y HALVORSEN,1981; BLANCO et al.1983c; DE MOL et al.1983).

- Caldo soja tripticasa con extracto de levadura (GUERRANT et al.1975; NALIN et al.1975; YOLKEN et al.1977a; MERSON et al.1979; BÄCK et al.1980a; DE BOY II et al.1980b; STINTZING et al.1981).

Los cultivos crecen generalmente a 37°C, pues aunque a 30°C pueden producir también enterotoxina, estas temperaturas bajas, no ofrecen ninguna ventaja, (SACK,1975), e incluso se ha podido demostrar que parte de la toxina puede no liberarse al medio de cultivo, quedando en el interior de la bacteria, o entre sus envolturas externas (KUNKEL y ROBERSTON,1979).

La enterotoxina puede ser detectada en el medio a las 8 horas, durante la fase aguda de crecimiento bacteriano,(SACK et al.1971), aunque las concentraciones máximas se alcanzan a las 24 horas, (GIANELLA,1976)

manteniéndose desde entonces una meseta durante los días siguientes (SACK et al.1971).

#### 1.3.1.4.2.- Factores que influyen en la producción de enterotoxina

La producción de enterotoxina va a estar influida por una serie de factores.

Algunos favorecerán su liberación, como la aireación de los cultivos, que aumenta la producción de toxina ST, (SACK,1975), lo que se consigue evitando el cierre hermético de los frascos que los contienen y sometiéndolos a agitación (DEAN et al.1972; EVANS et al.1973a,b; DONTA et al.1974a; GIANELLA,1976; MUNDELL et al.1976; KETYI et al.1978; BYERS y DUPONT,1979; GILLIGAN y ROBERSTON,1979; KUNKEL y ROBERSTON,1979).

Del mismo modo, si se logra una gran relación entre la superficie y el volumen de los cultivos, se favorece la liberación del toxina LT, (SACK,1975), cuya producción también aumenta, manteniendo el pH entre 6 y 8 durante la fase de crecimiento de E. coli (MUNDELL et al.1976; KUNKEL y ROBERSTON,1979); por la acción de algunas sustancias como la mitomicina C sobre algunas cepas, (MUNDELL et al.1976; KETYI et al.1978), (o como la lincomicina y tetraciclina si son añadidas en los medios de cultivo de E. coli) (YOH et al.1983); o bien por la presencia en el medio de cultivo de iones  $Fe^{+3}$  (GILLIGAN y ROBERSTON,1979). Sin embargo, tanto el pH inferior a 6, como la presencia de iones  $Mn^{+2}$ , inhiben su liberación (GILLIGAN y ROBERSTON,1979).

La fuente de carbono que ha proporcionado

mejores resultados es la glucosa (GILLIGAN y ROBERSTON, 1979).

1.3.1.4.3.- Conservación de los preparados enterotóxicos y de E.C.E.T.

Las preparaciones de enterotoxina se obtienen a partir de los cultivos por centrifugación, diálisis del sobrenadante, liofilización, o concentración por filtración de membrana (SACK,1975).

Las preparaciones liofilizadas son estables en nevera o a temperatura ambiente, durante 6 meses por lo menos, (SACK,1975); mientras que los sobrenadantes de los cultivos pueden conservarse a +4°C durante al menos 3 días, aunque van perdiendo actividad durante las siguientes semanas, de modo que a los 15 días, esta actividad queda reducida al 50% (MUNDELL et al.1976). Para mantener sus propiedades enterotóxicas, estos filtrados deben congelarse rápidamente a -20°C (GIANELLA, 1976), a -70°C (DEAN et al.1972; MUNDELL et al.1976).

Los aislamientos de las cepas de E.C.E.T., pueden almacenarse en cultivos inclinados de agar nutritivo, realizando subcultivos, (lo menos frecuentemente posibles), durante unos 6 años, sin perder la capacidad toxigénica. Sin embargo, esta estabilidad enterotóxica, puede no ser constante en todas las cepas (EVANS et al.1977a).

1.3.1.4.4.- Modelos experimentales para la detección de enterotoxinas

Han sido muchos los modelos utilizados para demostrar la producción de enterotoxinas por E.

coli. Al principio, fueron aplicados los mismos que se empleaban para la detección de toxina TC, todos de experimentación animal, pero posteriormente se incluyeron otros específicos para E. coli.

Las pruebas que han demostrado ser de mayor utilidad se conocen como "pruebas convencionales de enterotoxigenicidad" e incluyen, tanto pruebas in vivo, como pruebas in vitro.

#### 1.3.1.4.4.1.- Pruebas in vivo

Existen 2 pruebas básicas:

- Prueba en asas ligadas de intestino de conejos adultos (R.I.L.). Ha sido probablemente el método utilizado con mayor frecuencia para investigar la acción de la toxina colérica, desde su descripción por DE y CHATTERJEE, en 1953. Posteriormente se comprobó, que también resultaba adecuado para valorar las enterotoxinas LT y ST (SACK et al.1971; GORBACH et al.1971; DEAN et al.1972; EVANS et al.1972 y 1973c; PIERCE y WALLACE, 1972; DONTA et al.1974b; CLEMENTS y FINKELSTEIN,1979; ZELLER et al.1979).

Consiste en inyectar cultivos bacterianos o sobrenadantes libres de bacterias, en segmentos ligados de intestino delgado de conejos, de aproximadamente 2 Kg de peso. Tras un periodo de incubación de 6, ó de 18 horas, se sacrifica al animal, estableciendo entonces la relación entre el volumen acumulado (en ml), y la longitud del asa (en cm), conocida como COEFICIENTE RIL.

La respuesta a la toxina LT es idéntica a

la de TC, con una acumulación máxima de líquido a las 18 horas de iniciada la prueba, y con un coeficiente de alrededor de 2 a 2.5, dependiendo del tamaño del conejo. Además, la composición del líquido retenido es idéntica entre ambas toxinas, (SACK et al.1971; PIERCE y WALLACE,1972), y en ambos casos, las secciones de la mucosa muestran la falta de reacción inflamatoria.

Si se examinan las asas a las 6-8 h, se puede cuantificar el efecto transitorio de la toxina ST, (EVANS et al.1973c), aunque pueden imbricarse respuestas iniciales a la toxina LT, lo que dificulta la especificidad de su lectura. Del mismo modo, retrasos en esta valoración darían resultados fálidamente negativos, (al reabsorberse el líquido acumulado), o detectarían ya, una respuesta a la toxina LT.

Esta prueba ha ido sufriendo algunas modificaciones, (PIERCE y WALLACE,1972; EVANS et al.1973c), y ha sido adaptada a otro tipo de animales: cerdos (SMITH y GYLES,1970), perros (NALIN et al.1975), terneros (MYERS et al.1975), etc.

- Ensayo en ratones lactantes (I.M.T.). Fue descrito por DEAN et al.(1972), surgiendo como alternativa al anterior que resultaba caro, (necesidad de un elevado número de conejos adutos), consumía mucho tiempo, y proporcionaba resultados variables. La elección de este tipo de animales se basó en que carecían de bacterias en sus intestinos, lograban un alto grado de homogeneidad en las muestras, y facilitaban su manipulación al ser de pequeño tamaño.

Este bioensayo resulta sensible únicamente

frente a la enterotoxina ST, (variedad STa), no reaccionando frente a la toxina LT, (GIANELLA,1976; PESTANA DE CASTRO et al.1978), verotoxina (VT), hemolisinas y colicinas (BLANCO et al.1983c). Además, dadas sus ventajas respecto a RIL, (más barato, seguro, rápido y uniforme)(DEAN et al.1972; GIANELLA,1976), en la actualidad, para la detección de esta enterotoxina termoes- table, se utiliza casi exclusivamente este método.

Consiste en inocular 0.1 ml de sobrenadante de cultivo libre de bacterias a ratones de 1 a 4 días de vida, recién separados de sus madres. Para ello, se realiza una punción intragástrica, a través de la pared abdominal, (DEAN et al.1972; SHORE et al.1974; GIANELLA,1976; OLSSON,1982), o un sondaje esofágico (JACKS y WU,1974; STAVRIC y JEFFREY,1977; MOON et al. 1978; MULLAN et al.1978; BLANCO et al.1983c).

Tras la inoculación, se mantienen a los ratones en grupos de 3 ó más, por cada una de las cepas probadas, a temperatura ambiente, (25 a 28°C), durante 4 horas, y a continuación, se sacrifican y se extraen los intestinos, calculando la relación entre el peso de los intestinos y el del resto de los cuerpos de cada uno de los lotes.

Desde su descripción se han aportado diversas modificaciones, respecto a las condiciones de crecimiento de E. coli para favorecer la producción de ST, (GIANELLA, 1976), a la raza de los animales, (PESTANA DE CASTRO et al.1978; BLANCO et al.1983c), edad de los mismos (MOON et al.1978), o al tiempo de incubación de los ratones tras su inoculación, (GIANELLA,1976; STAVRIC

y JEFFREY,1977; MOON et al.1978); pero quizás, la más significativa fue la de BYERS y DUPONT (1979), que para facilitar el procesamiento de gran número de cepas, inoculan mezclas de los sobrenadantes de cultivo de 5 cepas de E. coli, en un mismo lote de ratones (que en este caso elevan a 6). Esta modificación, trata de paliar el principal factor limitante en la realización de esta prueba, como es el poder contar con un número suficientemente elevado de ratones recién nacidos.

#### 1.3.1.4.4.2.- Pruebas in vitro

Entre las pruebas convencionales a llevar a cabo in vitro, destacan las que utilizan líneas de cultivo histiotípicos, que resultan sensibles a la acción de la enterotoxina LT o/y a la acción de una citotoxina excretada por algunas cepas de E.C.E.P., conocida como verotoxina (como veremos en el apartado 1.4.3.2.). La enterotoxina termoestable no ejerce ningún efecto sobre ellas (DONTA et al.1974a; GUERRANT et al. 1974; SACK,1975; GROSS y ROWE,1984).

Las líneas celulares más utilizadas son las células adrenales de ratón ( $Y_1$ )(DONTA et al.1974a; KEUSCH y DONTA,1975; SACK y SACK,1975; ECHEVARRIA et al.1976; MUNDELL et al.1976; EVANS et al.1977a; GURWITH,1977; KUNKEL y ROBERSTON,1979; BÄCK et al.1980b; DE BOY II et al.1980c; MERSON et al.1980; CALDERON y LEVIN,1981; OTNAESS y HALVORSEN,1981); las células de ovario de hamster chino (Chinesse hamster ovary= C.H.O.)(GUERRANT et al.1974 y 1975; NALIN et al.1975; HONDA et al.1976; KONOWALCHUCK et al.1977; KETYI et al.1978; NOZAWA et al.1978; KETYI y PACSA,1980), y las células de riñón de mono verde africano (VERO)(KONOWALCHUCK et al.1977;

SPEIRS et al. 1977; SCOTLAND et al. 1980a; BLANCO et al. 1983a; O'BRIEN y LA VECK, 1983a).

En estos ensayos, las células son expuestas a la acción de los filtrados de los sobrenadantes de los cultivos de E. coli, que cuando contienen enterotoxina van a provocar alteraciones en su morfología habitual, fácilmente evaluables al microscopio. Estos cambios morfológicos obedecen, en el caso de LT, al incremento intracelular de AMPc, y en el caso de VT (sobre las células VERO), a una acción tóxica directa. En todos los casos se ha podido comprobar que, con estos métodos, pueden ser detectadas cantidades de toxina LT mucho menores que con el RIL, (DONIA et al. 1974a; GUERRANT et al. 1974; SACK, 1975).

Del mismo modo que sucedió con las técnicas anteriores, en este tipo de pruebas se han ido introduciendo también una serie de variantes, que han tendido o a facilitar su realización, o a simplificar el método acortando los pasos previos.

Entre las primeras, se incluyen las que utilizan al mismo tiempo conjuntos de varias colonias de E. coli de cada paciente, (SACK et al. 1977), o las que permiten ensayar a la vez un elevado número de muestras, como la técnica del minicultivo celular, (SACK y SACK, 1975).

Entre las segundas, se encuentran las que transfieren directamente las colonias de E. coli a las placas de microcultivo, (GURWITH, 1975), las que utilizan directamente las heces, (MERSON et al. 1980b), o las que emplean el método de filtración selectiva de membrana, (CALDERON y LEVIN, 1981).

En la TABLA 7, se reseña la acción de las enterotoxinas LT y ST, (variedad STa), así como de la citotoxina VT, en los ensayos convencionales de enterotoxigenicidad (GONZALEZ GARCIA, 1984).

TABLA 7

ENSAYOS DE ENTEROTOXIGENICIDAD

TOXINAS	IN VIVO			IN VITRO		
	R. I. L. <sup>(a)</sup>			CELULAS EUCARIOTAS		
	6 h.	18 h.	IMT <sup>(b)</sup>	Y <sub>1</sub>	CHO	VERO
LT	- <sup>(c)</sup>	+	-	+	+	+
ST	+	- <sup>(c)</sup>	+	-	-	-
VT	-	V <sup>(d)</sup>	-	-	-	+ <sup>(e)</sup>

(a) Asas ligadas de I. de conejo. Incubación de 6 y 8 horas.

(b) Ratones lactantes.

(c) Generalmente (-) aunque los filtrados de algunas cepas pueden provocar acumulación de líquido.

(d) Resultados variables, por lo que no está bien establecido el carácter enterotóxico de VT.

(e) Destrucción completa de las células, distinto al efecto citopático de LT.

GONZALEZ GARCIA (1984).

Además de estos ensayos convencionales, existen otros métodos para detectar la actividad enterotóxica de E. coli, que se han aplicado con mayor o con menor éxito. Entre ellos, algunos se basan en la administración de cultivos de E. coli, o preparaciones enterotóxicas a animales recién destetados, como conejos, (BURGESS et al.1979), ratones, (DUCHET-SUCHAUX,1980), hamsters, (FRISK et al.1978), cerdos, terneros etc. (SMITH y HALLS, 1967). Otros, observan la alteración de la permeabilidad vascular, (KOPANIAK et al.1980), tras la inoculación intradérmica de filtrados de cultivos, en conejos o hamsters, ya sea por la acción de la toxina LT, (EVANS et al.1973a,b; KETYI et al.1978), ST (TAKEDA et al. 1979; CRAIG et al.1981), o ambas (GORBACH et al.1975). Otro grupo, determina la cantidad neta de agua secretada en asas intestinales aisladas y perfundidas (RAO et al.1981).

Sin embargo, todos los ensayos enumerados, necesitan ser realizados en laboratorios muy dotados y por un personal experto. Utilizan procedimientos laboriosos y delicados, y consumen bastante tiempo (MEHLMAN et al.1977; BRILL et al.1979; TSUKAMOTO et al.1980; HONDA et al.1981a). Por todo ello, a lo largo de los últimos años se han tratado de buscar alternativas que simplificasen esta detección, acortasen el tiempo y permitieran su inclusión en la rutina del laboratorio.

La mayor parte de las investigaciones realizadas son de tipo inmunológico, utilizando antisueros antitóxicos; de tipo enzimático, o de identificación directa de genes productores de enterotoxina.

Entre ellas, enumeramos las que se utilizan para la detección de las toxinas LT y de ST, con sus referencias bibliográficas:

- Detección de toxina LT

- . Radioinmunoensayo (R.I.A.)(GREENBERG et al.1977).
- . Inmunoheólisis (EVANS y EVANS,1977; TSUKAMOTO, et al.1980).
- . Inmunoanálisis enzimático (E.L.I.S.A.)(YOLKEN et al.1977a; KETYI y PACSA,1980; BEUTIN et al.1984; LEVINE et al.1985).
- . Inmunoadsorción a gangliosidos GM<sub>1</sub>(E.L.I.S.A-GM<sub>1</sub>)(BÄCK et al.1979; SVENNERHOLM y WIKLUND, 1983; SEN et al.1984).
- . Coaglutinación estafilocócica (BRILL et al.1979; HONDA et al.1983; SEN et al.1984).
- . Prueba de BIKEN (HONDA et al.1981a,b y 1982; SEN et al.1984).
- . Aglutinación con latex (FINKELSTEIN y YANG, 1983).
- . Hibridación del ADN (GEORGES et al.1983; HIRST et al.1983; ECHEVARRIA et al.1984).

- Detección de toxina ST

- . Radioinmunoensayo (R.I.A.)(FRANTZ y ROBERTSON,1981; GIANELLA et al.1981).
- . Inmunoanálisis enzimático (E.L.I.S.A.)(DE MOL et al.1983b).
- . Hibridación del ADN (MOSELEY et al.1982; GEORGES et al.1983; ECHEVARRIA et al.1984).

### 1.3.2.- Propiedades adhesivas

La adhesión y colonización de la superficie de la mucosa intestinal, sin dañar la célula subyacente, es una propiedad característica de las cepas de E.C.E.T., siendo, al parecer, el primer mecanismo de la diarrea secretora.

En la bacteria existen unos determinantes específicos de estructura filamentososa y de naturaleza proteica (GAASTRA y DE GRAAF,1982; BOEDEKER,1984), denominados pili por BRINTON (1959), o fimbriae por DUGUID et al.(1955), y que son los que les confieren su capacidad adhesiva, así como una actividad hemaglutinante característica (GAASTRA y DE GRAAF,1982).

El tipo más común de fimbriae es el pilus tipo I, que se encuentra en la mayor parte de las cepas de E. coli patógenos o no,(DUGUID et al.1955), y cuyas propiedades adhesivas y aglutinantes son inhibidas por el azúcar D-manosa (GAASTRA y DE GRAAF,1982). Existen sin embargo, otro tipo de fimbriae, características de las cepas de E.C.E.T., que facilitan la adherencia al epitelio de la mucosa intestinal de ciertas especies de animales, y aglutinan sólo, específicamente, a ciertos eritrocitos, aglutinación que no es inhibida por la D-manosa.

La importancia patogénica de estas estructuras fue demostrada por investigadores en el campo de la veterinaria, estudiando diarreas de evolución fatal en cerditos recién nacidos (WILLIAMS-SMITH y JONES,

1963). En esta enfermedad, ciertas cepas de E. coli colonizaban en gran número la parte proximal del intestino delgado de los animales afectados, mientras que, otras cepas avirulentas no se multiplicaban. Al examinar con detalle estas cepas, se observó que las cepas virulentas poseían un antígeno de superficie, (K-88) que era capaz de aglutinar eritrocitos, (ORSKOV y ORSKOV, 1966), mientras que las cepas avirulentas carecían de él.

Estas investigaciones sugirieron la hipótesis, de que el antígeno K-88 era un factor de adherencia de E. coli, en cerdos.

Posteriormente, tras el descubrimiento de que la información genética para la producción de K-88 y enterotoxinas era transportada por plásmidos, (ORSKOV y ORSKOV, 1966; SMITH y HALLS, 1967), SMITH y LINGGOOD (1971) pudieron demostrar, que el antígeno fimbrial K-88 era un factor patogénico esencial para que E. coli causara diarrea en cerditos recién nacidos. Estos autores insertaron en distintas cepas de E. coli, el plásmido enterotoxigénico y el plásmido portador del antígeno K-88, individualmente y en conjunto. La cepa, capacitada de esta forma para producir enterotoxinas, pero carente del antígeno K-88, ( $Ent^+$ ,  $K-88^-$ ), ni colonizaba, ni desencadenaba diarrea, aunque la toxina producida por ella, in vitro, pudiera estimular la secreción de las células del intestino delgado si se le hacía actuar directamente sobre ellas. La cepa no enterotoxigénica ( $Ent^-$ ), pero con la fimbria K-88 ( $K-88^+$ ), colonizaba el intestino desarrollando un cierto grado de diarrea, y sólo la cepa  $Ent^+ K-88^+$ , era capaz de producir una

enfermedad comparable a la natural.

El antígeno K-88 se encuentra frecuentemente en E.C.E.T. de origen porcino en todo el mundo, (GUINEE y JANSEN,1979; WHO Scientific working group,1980). Es controlado por un plásmido transferible por conjugación, (ORSKOV y ORSKOV,1966), y puede ser detectado por su habilidad para provocar hemaglutinación, resistente a la manosa (HAMR), de los eritrocitos de hamster, (GAASTRA y DE GRAAF,1982). Desde su descubrimiento, han sido descritos otros antígenos similares como el 987P, el K-99 ó el F-41, comunes entre E. coli aislados de ganado porcino, ovino o bovino, (GUINEE y JANSEN, 1979; CANDY,1980; WHO scientific working group,1980a; GAASTRA y DE GRAAF,1982).

En E.C.E.T. de origen humano, el primer antígeno de superficie de estas características fue descrito por EVANS et al.(1975), en la cepa H-10407 aislada de las heces líquidas de un paciente en Bangladesh, y fue denominado factor de colonización CFA/I. Posteriormente, en 1978, EVANS y EVANS, describen un nuevo antígeno fimbrial al que designan como CFA/II. Ambos son controlados por plásmidos, y pueden perderse con cierta facilidad originando cepas isogénicas derivadas, sin la fimbria en su superficie (EVANS et al.1975).

Desde entonces, numerosos investigadores han publicado su presencia en las cepas de E.C.E.T. aisladas de casos de diarrea humana, en distintas partes del mundo. (ORSKOV y ORSKOV,1977a; BÄCK et al.1980b; REIS et al.1980; BERGMAN et al.1981; SCOTLAND et al.1981; CRAVIOTO et al.1982; GONZALEZ GARCIA et al.1983).

El papel desempeñado en la diarrea por el factor de colonización, CFA/I, fue estudiado por SATTERWHITE et al. (1978) en voluntarios, a los que hace ingerir la cepa H-10407 CFA/I<sup>+</sup>, o la cepa H-10407-P CFA<sup>-</sup>. Sólo aquellos que recibieron un número elevado de E. coli CFA<sup>+</sup>, (10<sup>8</sup> organismos), presentaron diarrea, detectándose el organismo en las heces a lo largo de una semana. La cepa CFA/I<sup>-</sup> era eliminada, en cambio, rápidamente por las heces, demostrándose así su incapacidad para colonizar el intestino.

A lo largo de los últimos años, se han ido describiendo otras nuevas fimbrias en las cepas de E.C.E.T., cuya trascendencia en la colonización intestinal todavía no ha sido establecida. Entre ellas, THORNE et al. (1979), descubren una, en la cepa 334 productora de las toxinas ST y LT, con capacidad hemaglutinante y adhesiva sobre las células bucales humanas, en presencia de D-manosa. En 1983, DENEKE et al., demostrarían que esta cepa es capaz de adherirse a las células del íleon humano, lo que aboga a favor del papel de la nueva fimbriae en la colonización intestinal.

En 1982, THOMAS et al., describen la fimbria E-8775, distinta a las conocidas hasta entonces, que provoca hemaglutinación resistente a la manosa de eritrocitos humanos y bovinos. Esta adhesina, sólo se ha detectado en E.C.E.T. de los grupos 025, 0115 y 0167, carentes de otros CF, y sobre todo en el 025, que engloba aproximadamente el 68% de las cepas en las que se halló este factor, (THOMAS et al. 1982).

El último factor de colonización conocido fue descrito por DARFEUILLE et al. (1983), y es el

CFA/III. Se encontró en una cepa de E.C.E.T. procedente de un niño con diarrea en Senegal. Hasta el momento, sólo se ha detectado en la cepa 1373, con el serotipo 0128:K-67 (B12). Posee las mismas propiedades hemaglutinantes que CFA/I, y parece que cuenta con unos receptores específicos para los otros tres tipos de fimbrias.

#### 1.3.2.1.- Asociación entre adhesinas y serogrupos O

La presencia de los antígenos de colonización descritos en E.C.E.T., parece relacionarse con un número relativamente pequeño de serogrupos O (TABLA 8). Esto contrasta con los pili tipo I que se encuentran en la mayor parte de E. coli, patógenos o no (DUGUID et al.1955).

Si nos centramos sobre los factores de colonización CFA, las cepas de E.C.E.T. que las contienen, son consideradas como las más frecuentemente implicadas en la diarrea del viajero, sobre todo las portadoras de CFA/II, (GONZALEZ GARCIA,1984), así como en las diarreas de lactantes en países en vías de desarrollo (GAASTRA y DE GRAAF,1982).

En los E.C.E.T. con CFA/I, el serogrupo más representativo es el 078, al que pertenecen el 50 y 60% de los E. coli portadores de este factor de colonización, que además, son usualmente productores de LT y ST, (ORSKOV y ORSKOV,1977a; EVANS y EVANS,1978; BÄCK et al.1980b).

La fimbria CFA/II abunda principalemtno en

TABLA 8

ANTIGENOS FIMBRIALES	ORIGEN	SEROGRUPOS (a)	ENTEROTOXINAS			ERITROCITOS HEMAGLUTINADOS
			ST	LT	ST+LT	
K88	PORCINO	08,045,0138,0141, 0147,0149,0157	+	+	+	HAMSTER. POLLO
987P	PORCINO	09,020,0141	+	-	-	-- (b)
K99	BOVINO-OVINO PORCINO	08,09,020,0101, 064,0101	+	-	-	CABALLO. CORDERO
F41	BOVINO-PORCINO	09,0101	+	-	-	HUMANOS. HAMSTERS CABALLO. CORDERO
CFA/I	HUMANO	04,015,020,025,062, 063,078,090,0110, 0114,0126,0128,0153	++	+	+++	HUMANOS. BOVINOS POLLO
CFA/II	HUMANO	06,08,09,078,080, 085,0115,0128,0139	-+	-+	+++	BOVINOS. POLLO
CFA/III	HUMANO	0128			+	BOVINOS. POLLO
E8775	HUMANO	025,0115,0167	++	+	++	HUMANOS. BOVINOS

(a) Los serogrupos subrayados son los más frecuentes.

(b) Falla en la hemaglutinación de eritrocitos de caballo, hamsters, conejos, corderos, cerdos y vacas.

GAASTRA y De GRAAF, 1982; GONZALEZ GARCIA, 1984.

los E.C.E.T. con el antígeno somático O6, sobre todo los de serotipo O6:H10, (EVANS y EVANS,1978; CRAVIOTO et al.1982), que representa un 60-65% de las cepas con este antígeno de superficie, y que también suelen ser productoras de toxinas LT y ST.

Sin embargo, un importante porcentaje de cepas de E.C.E.T. de origen humano no poseen estos antígenos, (EVANS y EVANS,1978; CRAVIOTO et al.1982), lo que puede obedecer a que existen otros mecanismos adhesivos diferentes a los descritos hasta ahora, o bien a que su presencia no es un prerequisite indispensable para que E. coli desencadene una diarrea (SACK,1980). A pesar de todo, se ha de tener presente que la producción de estas adhesinas va a estar influida por las condiciones de crecimiento de la bacteria, (GAASTRA y DE GRAAF,1982), y según sean éstas, podrían no ser detectadas.

Hasta el momento, se desconoce el motivo por el que la producción de adhesinas y enterotoxinas queda restringida a un número relativamente pequeño de serotipos; se especula que pueda deberse a la habilidad de ciertas cepas pertenecientes a determinados serotipos, para mantener estables los plásmidos que codifican para adoptar estos atributos virulentos (GAASTRA y DE GRAAF, 1982).

#### 1.3.2.2.- Relación entre la producción de enterotoxinas y de antígenos de colonización

A medida que fueron describiéndose los distintos tipos de antígenos fimbriales, se trató de buscar una correlación entre su existencia en una

determinada cepa y sus propiedades enterotoxigénicas.

Tanto la presencia de CFA/I, como de CFA/II, se detecta más frecuentemente en cepas productoras de las enterotoxinas ST y LT, (EVANS y EVANS,1978; REIS et al.1980; CRAVIOTO et al.1982). Sin embargo, CFA/I se encuentra también, con relativa frecuencia, en cepas productoras sólo de toxina ST, (EVANS y EVANS,1978; REIS et al.1980; CRAVIOTO et al.1982).

Las razones para explicar esta correlación se encuentran, en la existencia de plásmidos codificadores, al mismo tiempo, para la producción de enterotoxinas, y para los factores de adherencia, lo que no ocurre sin embargo, cuando se trata de los antígenos K-88 y K-99, pues sus determinantes genéticos se encuentran localizados en distintos plásmidos.

En la TABLA 8 quedan reflejadas las enterotoxinas, que suelen encontrarse en las cepas portadoras de los distintos factores de colonización.

#### 1.3.2.3.- Capacidad hemaglutinante

La hemaglutinación fue la primera manifestación de las propiedades adhesivas de las bacterias entéricas (DUGUID et al.1955).

La mayor parte de E. coli muestran un patrón similar de actividad aglutinante con los eritrocitos de varias especies de animales. Es una hemaglutinación sensible a la acción del azúcar D-manosa, y se correlaciona con la presencia de los pili tipo I (DUGUID et

al.1955; BRINTON,1959).

Por el contrario, la mayoría de los antígenos fimbriales de colonización intestinal presentes en los E.C.E.T., tanto de origen humano, (CFA/I; CFA/II; CFA/III; E-8775), como animal, (K-88, K-99, F-41), se correlacionan con una actividad aglutinante frente a eritrocitos de distintas especies, caracterizada por ser resistente a la D-manosa (EVANS y EVANS,1978).

En la mayor parte de trabajos publicados se ha encontrado, que un elevado porcentaje de cepas de E.C.E.T. portadoras de la fimbria CFA/I, provocan hemaglutinación manosa resistente (HAMR) de eritrocitos humanos del grupo A, así como de eritrocitos bovinos y de pollo. Las cepas de E.C.E.T. CFA/II, aglutinan eritrocitos bovinos y de pollo, pero no hematíes humanos (ORSKOV et al.1976; ORSKOV y ORSKOV,1977a; EVANS y EVANS, 1978; EVANS et al.1979; BÄCK et al.1980b; CRAVIOTO et al.1982; DENEKE et al.1983). Lo mismo ocurre con las cepas portadoras de CFA/III (DARFEUILLE et al.1983).

En un trabajo llevado a cabo por EVANS et al.(1980), sobre 1334 cepas de Escherichia coli de distinta procedencia, en el que llegan a proponer 7 grupos distintos según el comportamiento aglutinante, estos investigadores comprueban que los patrones típicos de H.A.M.R., comentados anteriormente para las cepas toxigénicas con factores de colonización, sólo fueron compartidos por el 0.7% de las cepas de E.C.E.P. y E. coli no enteropatógenos que carecían de dichos antígenos. También observaron que, aunque los aislamientos de Escherichia coli con propiedades H.A.M.R. eran relativamente abundantes entre las cepas no enterotoxigénicas, ni

enteropatógenas, se encontraban en cambio en escaso número entre los E.C.E.T. carentes de CFA, (alrededor del 6%)(EVANS et al.1979), y entre los E.C.E.P. (alrededor del 10%). Sin embargo, algunos investigadores (BERGMAN et al.1981; THOMAS et al.1982) aportan en sus publicaciones bastantes cepas de E.C.E.T. con propiedades H.A.M.R., pero sin antígenos de colonización. Por este motivo, CRAVIOTO et al.(1982), consideran que a pesar de que la H.A.M.R. es una prueba útil para demostrar la existencia de CFA, se hace necesaria la utilización de antisueros específicos que corroboren su presencia.

En la TABLA 8 se expone el tipo de aglutinación de los distintos eritrocitos, que caracteriza a cada uno de los factores de colonización.

### 1.3.3.- Transmisión genética

#### 1.3.3.1.- Plásmidos Ent.

En Escherichia coli enterotoxigénico (E.C.E.T) tanto las propiedades enterotóxicas, como las adhesivas, están reguladas por plásmidos (GORBACH et al.1971; SKERMAN et al.1972; GYLES et al.1974; GAASTRA y DE GRAAF, 1984).

Este modo de transmisión genética fue sugerido por vez primera por SMITH y HALLS (1967) y corroborado por SMITH y GYLES (1972), en cepas de E. coli, patógenos para animales, productoras de toxinas LT ó ST.

Paralelamente a estos estudios, tanto SMITH y LINGGOOD (1971), como SKERMAN et al.(1972), demuestran que los plásmidos son también los mediadores de la capacidad enterotoxigénica en E. coli de origen humano. A estos elementos genéticos extracromosómicos se les conoce desde entonces como plásmidos Ent (MINIATS y GYLES,1972; SKERMAN et al.1972).

Existen plásmidos Ent, codificados para la producción de la enterotoxina LT (Plásmidos Ent-LT) (DALLAS y FALKOW,1979). Otros codificados para la ST que se caracterizan por su heterogeneidad, (Plásmidos Ent-ST),(GYLES et al.1974),y un tercer grupo que determinan al mismo tiempo la producción de LT y de ST,(Plásmidos Ent-LT-ST), caracterizados por su homogeneidad. (ECHEVARRIA y MURPHY,1980; STIEGLITZ et al.1980; FRANKLIN et al.1981; LEKSOMBOON et al.1981).

La estructura determinante de la biosíntesis

tóxica ocupa una pequeña porción del genoma plasmídico total, (GYLES et al.1974; DE BOY II et al.1980b) que es compartido también por genes codificadores para los factores de colonización (CFs), resistencia a los antibióticos (R),(GYLES et al.1974; REIS et al.1980; LEKSOMBOON et al.1981; WACHSMUTH et al.1983), o para una entidad termolábil hemolítica (HLy),(SMITH y HALLS, 1967).

Las cepas de E.C.E.T., productoras tanto de la enterotoxina termolábil como de la toxina termoestable, pueden transportar plásmidos que transfieran separadamente cada una de estas enterotoxinas, o bien un sólo plásmido que contenga genes responsables de la síntesis de ambas. (LEKSOMBOON et al.1981; LEVINE et al.1983; MURRAY et al.1983; SILVA et al.1983; WACHSMUTH et al.1983).

Los plásmidos LT-ST no pueden ser transferidos por conjugación, por lo que suelen hacerlo con los factores R que, de igual forma, pueden unirse a los plásmidos CFA. (ECHEVARRIA y MURPHY,1980; MURRAY et al.1983; SILVA et al.1983; WACHSMUTH et al.1983). De este modo se han encontrado plásmidos, que además de ser responsables de la síntesis de las toxinas LT y ST, transfieren la resistencia a tetraciclinas, (ECHEVARRIA y MURPHY,1980), ampicilina (STIEGLITZ et al.1980), sulfadiacina y estreptomycinina (SILVA et al.1983).

La heterogeneidad de los plásmidos Ent-ST puede ser explicada porque el gen específico para la toxina ST puede integrarse en diversos plásmidos codificadores de otras tantas características fenotípicas.

En general, su transmisión no va unida a la de resistencias a los antibióticos.

Las cepas de E.C.E.T. portadoras de plásmidos Ent-LT, son poco frecuentes, (MURRAY et al.1983), y tampoco es común que transfieran al mismo tiempo resistencia a antibióticos.

#### 1.3.3.2.- Plásmidos CFA

Los antígenos fimbriales CFA/I y CFA/II, también son mediados por plásmidos, (MOON et al.1979; CRAVIOTO et al.1982; THOMAS et al.1982; RUBINO y GUANDALINI,1984), con la característica de que son los mismos que regulan la capacidad enterotoxigénica.

Todas las cepas que poseen el factor de colonización CFA/I producen toxina ST, (EVANS y EVANS,1978), ya que el mismo plásmido transporta genéticamente ambas propiedades (plásmidos CFA/I-ST). Esto va a suceder, independientemente de que la cepa pueda además producir toxina LT, aunque lo más frecuente sea lo anterior, (EVANS et al.1975; REIS et al.1980; CRAVIOTO et al.1982; LEVINE et al.1983; MURRAY et al.1983).

El antígeno CFA/II es codificado conjuntamente con la capacidad para producir toxinas ST y LT (plásmidos CFA/II-LT-ST),(THOMAS et al.1982; SMITH et al.1983a).

THOMAS et al.(1982) sugieren que la fimbria E-8775 también está mediada por plásmidos, que no parecen estar ligados a los que codifican las toxinas ST y LT.

#### 1.3.3.3.- Plásmidos R

Este tipo de plásmidos, transmisores de la resistencia a determinados antibióticos, existen tanto en E. coli toxigénicos, como en los no toxigénicos, y aunque en general son más abundantes entre los segundos (ORSKOV et al.1976; DE BOY II et al.1980b; ECHEVARRIA et al.1980), adquieren especial interés entre las cepas productoras de enterotoxinas, al poder servir de vehículo para la cesión de ambas propiedades, (SCOTLAND et al.1979). Sin embargo, los factores R no suelen formar parte del mismo plásmido que regula la síntesis de enterotoxinas (Ent ST y/o LT),(SACK,1978; ECHEVARRIA y MURPHY,1980; MURRAY et al.1983; WACHSMUTH et al.1983), aunque en ocasiones, ambos plásmidos, (Ent y R), puedan formar una molécula única, (ECHEVARRIA y MURPHY,1980; STIEGLITZ et al.1980; SILVA et al.1983).

La resistencia a los antibióticos por parte de E.C.E.T. es variable, dependiendo de la zona geográfica o país de donde proceda la cepa, (ORSKOV et al.1976; DE BOY II et al.1980b; ECHEVARRIA y MURPHY,1980; ECHEVARRIA et al.1981; LEKSOMBOON et al.1981; MAIDIN,1983) y de la utilización de antibióticos, de forma más o menos indiscriminada (ECHEVARRIA y MURPHY,1980; LEKSOMBOON et al.1981). Aún así, incluso en estas zonas, los plásmidos R siguen predominando en E. coli no enterotoxigénico, lo que podría abogar a favor de una cierta incompatibilidad entre plásmidos R y Ent, en una misma bacteria (DE BOY II,1981b).

#### 1.3.4.- Epidemiología

Las infecciones debidas a E.C.E.T. pueden ser clasificadas en varias categorías. En aquellas zonas donde la población goza de un buen nivel higiénico-sanitario y nutritivo, las diarreas por E.C.E.T. son infrecuentes, (ECHEVARRIA et al. 1975; KAPIKIAN et al. 1976; BÄCK et al. 1977; GURWITH y WILLIAMS, 1977; BRUNTON et al. 1980; MAKI et al. 1980; ALBOUY et al. 1981; BLANCO et al. 1983a; KOOPAN et al. 1984), pero pueden ocasionar esporádicamente brotes diarreicos en guarderías o salas de hospitalización infantil, (RYDER et al. 1976a y 1979; GROSS y ROWE, 1984; ESPINOSA et al. 1983), o en individuos de cualquier edad en la comunidad (ROSEMBERG et al. 1977; KUDOH et al. 1977; LUMISH et al. 1980; TAYLOR et al. 1982; WOOD et al. 1983). En estas zonas constituyen además la causa más común de diarrea entre las personas que viajan a países con baja higiene, sobre todo de clima tropical, (SHORE et al. 1974; GORBACH et al. 1975; SACK et al. 1975b; SACK, 1978; ROWE et al. 1983; TAYLOR et al. 1983).

En países en vías de desarrollo los E.C.E.T. son responsables de una elevada proporción de diarreas agudas, contribuyendo de forma significativa, junto a la malnutrición subyacente, a elevar la tasa de mortalidad infantil, (HARRIS, 1972; RODHE y NORTHRUP, 1976).

De igual modo, ciertas poblaciones de los países desarrollados con bajo nivel socio-económico, sobre todo si son de clima caluroso, tienen una alta incidencia de infecciones por este microorganismo,

similar a la de los trópicos, (SACK et al. 1975a).

#### 1.3.4.1.- Diarreas en los países en vías de desarrollo

No hay duda de que E.C.E.T. constituye en estos países una causa primordial de diarrea en todos los grupos de edad, particularmente en regiones tropicales, (NALIN et al. 1975; SACK, 1975; WHO Scientific working group, 1980a; BLACK et al. 1981; STINTZING et al. 1981).

Antes del descubrimiento de E.C.E.T. la proporción de pacientes con diarrea colérica, en los que no se aislaba V. cholerae como agente causal, era significativa, (CARPENTER, 1980). Desde que SACK et al. (1971), usando el asa intestinal ligada de conejo, demostraron la producción de toxina LT por un E. coli aislado en cuatro pacientes adultos con cólera clínico en Calcuta, han sido muchos los investigadores que han corroborado y ampliado estos hallazgos, poniendo en evidencia, que E.C.E.T. se encuentra con gran frecuencia en las heces diarreicas de niños y adultos, con porcentajes de aislamientos que oscilan generalmente entre el 3 y 65% (GUERRANT et al. 1975, (67%); NALIN et al. 1975, (19%); RYDER et al. 1976, (17%); WADSTROM et al. 1976, (37%); DONTA et al. 1977, (16%); EVANS et al. 1977b, (47%); ECHEVARRIA et al. 1977, (16%); MERSON et al. 1979, (62%); LEKSOMBOON et al. 1981, (18%); STINTZING et al. 1981, (12%); MAIDIN et al. 1983, (8%); GEORGES et al. 1983, (3%); DE MOL et al. 1983a, (9%); MATA et al. 1983, (18%); TOLEDO et al. 1983, (7%).

Sin embargo, para valorar adecuadamente estos porcentajes, se ha de tener en cuenta el tipo de población sobre la que se realizó el estudio, (rural o urbana, hospitalizados o no), su edad, etc., así como las técnicas utilizadas para demostrar la producción de toxinas, el tipo de toxinas detectadas, (LT, ST ó ST/LT), y el número de colonias de E. coli estudiadas por cada muestra de heces. Sólo así son comparables los resultados expuestos.

No obstante, llaman la atención varios aspectos:

- En algunos de estos países, fundamentalmente en los situados en las zonas tropicales, (Bangladesh, Tailandia, India...), la tasa de aislamientos de E.C.E.T., en los individuos control, no afectados de diarrea, ya sean contactos familiares o no, es también muy alta, (entre 1 y 32% de los casos estudiados), (ECHEVARRIA et al. 1977; BLACK et al. 1981; LEKSOMBOON et al. 1981), no existiendo, en ocasiones, diferencias significativas respecto a los pacientes diarreicos (LEKSOMBOON et al. 1981). Ello indica que en estos países la infección es endémica, favorecida y mantenida por las malas condiciones del agua o/y de los alimentos, (BLACK et al. 1983a).

En ocasiones, como en un estudio realizado en Brasil por REIS et al. (1982), ciertos tipos de E. coli enterotoxigénico, como los productores de toxina LT aislada, llegaron a ser más frecuentes entre los controles que entre los enfermos de diarrea.

- Es llamativa también la mayor afectación

en estas zonas, (India y Bangladesh), de individuos adultos, respecto a la que E.C.E.T. produce en países desarrollados, (SACK,1975; RYDER et al. 1976; EVANS et al. 1977; SACK et al. 1977; SACK,1980). Esto podría atribuirse a las altas titulaciones de anticuerpos que son alcanzadas por la población joven frente a la toxina colérica, que al poseer inmunidad cruzada frente a las toxinas de E. coli van a ejercer un efecto protector.

- En los países donde el cólera es endémico la diarrea desencadenada por E.C.E.T. es en todo similar a la producida por V. cholerae, sea cual sea el tipo de toxinas que produzca. (SACK et al. 1971; NALIN et al. 1975; RYDER et al. 1976a; SACK,1978; GROSS y ROWE,1984). Suelen tener un comienzo brusco conduciendo rápidamente a una deshidratación grave, aunque su duración suele ser más corta, (GORBACH et al. 1971; SACK,1975; RYDER et al. 1976a).

#### 1.3.4.2.- Diarrea del viajero

Es una entidad perfectamente definida que afecta con relativa frecuencia a las personas que viajan desde países con clima templado y buena higiene, a otros con malas condiciones higiénicas y clima caluroso.

ROWE et al. fueron los primeros que demostraron la relación de E. coli y este tipo de diarrea, en un estudio realizado sobre 540 soldados británicos desplazados al sur de Arabia, en 1970. (ROWE et al.

1970). En el 54% de los afectados por diarrea se aisló E. coli 0148:K?:H28. Posteriormente descubrieron que esta cepa era productora de toxina termoestable, (ROWE et al. 1983). Este mismo serogrupo de E. coli, fue también encontrado en las heces diarreicas de soldados estadounidenses en Vietnam, (DUPONT et al. 1971), y a partir de entonces han sido varios los serotipos implicados en brotes diarreicos, que afectan a personal militar de E.E.U.U, en Tailandia, (ECHEVARRIA et al. 1981; TAYLOR et al. 1985), o a civiles que viajaron a estos países (SHORE et al. 1974).

En este sentido, son varias las publicaciones en las que se pone en evidencia a E.C.E.T. como agente causal de procesos diarreicos, algunos de extraordinaria gravedad, desarrollados en personas durante su estancia en Méjico, tanto en investigaciones retrospectivas, (SACK et al. 1975b; FINKELSTEIN et al. 1976), como prospectivas. En este último caso, GORBACH et al. pudieron demostrar, que el porcentaje de afectados entre los turistas era del 29%, y de ellos, E.C.E.T. se aisló en el 72% de los casos, (GORBACH et al. 1975).

Del mismo modo, esta misma patología afecta también a europeos en el transcurso de viajes a países tropicales, o incluso mediterráneos. BÄCK et al. (1977), por ejemplo, encuentran que en el 11% de los pacientes diarreicos que habían regresado a Suecia tras una estancia en el extranjero se encontraba E.C.E.T., lo que a su vez constituía el 70% del total de aislamientos de este patógeno, en su estudio.

### 1.3.4.3.- Diarreas en los países desarrollados

#### 1.3.4.3.1.- Diarreas en la comunidad

Aunque no son muchas las investigaciones llevadas a cabo sobre la incidencia de E. coli toxigénico entre los casos esporádicos de diarrea en los países industrializados, se ha podido demostrar que en la mayor parte de ellos este microorganismo tiene escasa importancia como agente causal, llegando a no detectarse en ciertas áreas urbanas, (DEAN et al. 1972; ECHEVARRIA et al. 1975; KAPIKIAN et al. 1976; GUINEE y JANSEN, 1979), y no superando, en general en ellos una tasa de aislamientos del 3%, (BÄCK et al. 1977; PICKERING et al. 1978; BRUNTON et al. 1980; MAKI et al. 1980; BLANCO et al. 1983a).

En la TABLA 9 resumimos las características de los estudios realizados por los distintos investigadores, reflejando los datos referentes al lugar, las características de los pacientes incluidos en el estudio, la duración del mismo, el número de colonias ensayadas, y el tipo de pruebas aplicadas para la detección de enterotoxinas.

Entre los resultados expuestos, destacan los elevados porcentajes de aislamientos obtenidos por GORBACH y KHURANA (1972), en Chicago, y por RUDOY y NELSON en Boston, (1972), de 82 y 86% respectivamente, que contrastan con la baja incidencia que E.C.E.T. muestra en zonas similares. Estos resultados no han

TABLA 9

INCIDENCIA DE ECET EN PAISES DESARROLLADOS

PAIS (localidad)	Periodo de estudio Tipo de paciente, edad	Nº colonias investi- gadas por paciente	Método aplicado	Nº de pacientes con ECET/ nº investigados (%)	AUTORES
EEUU (Honolulu)	Enero-Julio 1971 Niños <7 años	7	IMI	(D) <sup>(a)</sup> 0/37	DEAN <u>et al.</u> 1972
EEUU (Chicago)	Niños		Conejo lactante	(D) 24/29 (82.75%)	GORBACH y KHURANA 1972
EEUU (Boston)	Julio 1974-Junio 1975 Niños <5 años	5-10	Y <sub>1</sub> RIL 18 h	(D) 0/61 (C) <sub>(b)</sub> 0/30	ECHEVARRIA <u>et al.</u> 1975
EEUU (Dallas)	Niños	5	IMI <sub>(c)</sub>	(D) 31/36 (86%) (C) 7/17 (41%)	RUDOY y NELSON, 1975
EEUU (Arizona)	Verano de 1971 y 1972 Niños <4 años. Reserva India	10	Y <sub>1</sub> RIL 18 h IMI	(D) 10/59 (16.9%)	SACK <u>et al.</u> 1975
EEUU (Columbia)	Enero 1974-Abril 1975 Niños de 1 a 27 meses	7-10	Y <sub>1</sub>	(D) 0/32	KAPIKIAN <u>et al.</u> 1976
SUECIA <sub>(d)</sub>	Julio-Diciembre 1975 Niños y adultos	6	Y <sub>1</sub>	(D) 27/648 (4.2%) <sup>(e)</sup> (C) 0/440	BÄCK <u>et al.</u> 1977
CANADA (Manitoba)	Diciembre 1973-Nov. 1975 Niños <16 años	5-10	Y <sub>1</sub> IMI	(D) 3/276 (1.07%)	GURWITH y WILLIAMS, 1977

TABLA 9 (continuación)

PAIS (localidad)	Periodo de estudio Tipo de paciente, edad	Nº colonias investi- gadas por paciente	Método aplicado	Nº de pacientes con ECET/ nº investigados (%)	AUTORES
EEUU (Houston)	Dic. 1975-Sept. 1977 Niños > 21 meses	5	$Y_1$ IMT	(D) 10/255 (3.92%) (C) 2/112 (1.78%)	PICKERING <u>et al.</u> 1978
SUECIA <sup>(d)</sup>	Enero 1976-Julio 1979 Niños y adultos	6	$Y_1$ IMT <sup>(f)</sup>	(D) 73/3510 (2%) (g)	BÄCK <u>et al.</u> 1980, a
CANADA (Manitoba)	Mayo 1974-Nov. 1975 Nov. 1976-Enero 1979	1	$Y_1$ IMT <sup>(h)</sup>	(D) 16/945 (1.7%) (C) 4/1282 (0.3%)	BRUNTON <u>et al.</u> 1980
ISRAEL (Tel-Aviv)	Verano de 1977, 78 y 79 Niños y adultos	34	$Y_1$ IMT PIH <sup>(LT)</sup>	(D) 69/335 (20.5%) (C) 2/10 (20%)	GOLDHAR <u>et al.</u> 1980
FINLANDIA (Tampere)	Dic. 1977-Nov. 1978 Niños < 15 años	5	$Y_1$ IMT <sup>(i)</sup>	(D) 5/283 (1.76%) (C) 0/88	MAKI <u>et al.</u> 1980
FRANCIA (Burdeos)	Dic. 1979-Abril 1980 Niños < 2 años	?	Vero Permeabilidad cutánea	(D) 1/159 (0.62%) <sup>(j)</sup>	ALBOUY <u>et al.</u> 1981
NORUEGA (Oslo)	Nov. 1979-Julio 1980 Niños	1	$Y_1$ ELISA-GM <sub>1</sub>	(D) 7/40 (17.5%)	OTINAESS y HAL- VORSEN, 1981
ESPAÑA (Madrid)	Oct. 1981-Febrero 1982 Niños < 2 años	1	IMT	(D) 1/155 (0.64%)	LOPEZ BREA <u>et al.</u> 1982

TABLA 9 (continuación)

PAIS (localidad)	Periodo de estudio Tipo de paciente, edad	Nº colonias investi- gadas por paciente	Método aplicado	Nº de pacientes con ECET/ nº investigados (%)	AUTORES
ESPAÑA (Galicia)	Nov. 1979-Julio 1980 Niños < 3 años	1 a 2	Y <sub>1</sub> RIL IMT	(D) 5/190 (2.63%) (C) 0/35	BLANCO <i>et al.</i> 1983, a
EEUU (Michigan)	Sep. 1978-Abril 1981 Niños < 16 años	?	Y <sub>1</sub> IMT	(D) 3/763 (0.4%)	KOOPAN <i>et al.</i> 1984

- (a) Tasa de aislamientos en pacientes con diarrea.
- (b) Tasa de aislamientos en controles sanos.
- (c) Valoración para coeficiente  $IMT \geq 0.072$ .
- (d) Los pacientes procedían de distintos lugares del país.
- (e) 70% de los pacientes habían regresado del extranjero.
- (f) Sólo fueron ensayados en IMT las cepas LT(+).
- (g) Alrededor del 90% de los adultos acababan de regresar del extranjero.
- (h) Sólo fueron ensayadas en IMT 294 muestras.
- (i) Sólo fueron ensayadas en IMT las colonias LT(+) y las que tenían un serotipo considerado ECEP clásico, o ECEI.
- (j) El niño con ECET LT(+) acababa de regresar de Irak.

sido aceptados por la mayor parte de los autores dado, que en el primer caso, fue empleada la técnica del conejo lactante para la detección de las toxinas LT y ST, técnica que no se utiliza como ensayo convencional ni está suficientemente estandarizada. En el segundo caso, la valoración del ensayo IMT se realizó utilizando un coeficiente inferior al comúnmente aceptado, (0.071), sin que los resultados obtenidos fueran corroborados por otros centros de investigación (SACK, 1975; GURWITH y WILLIAMS, 1977; GANGAROSA, 1978).

Otro elevado porcentaje de aislamientos es el obtenido por SACK et al., (1975a). En esta ocasión se aplicaron técnicas adecuadas, y el resultado se explica por el tipo de población sobre la que se realizó el estudio al tratarse de niños indios, de una reserva Apache, donde las condiciones ambientales eran deficitarias. Esto demuestra, que aún en países con alto nivel de vida, ciertos estamentos sociales, o ciertas zonas con mala infraestructura sanitaria, pueden verse afectados con la misma intensidad que los habitantes de países subdesarrollados.

No existe una explicación en cambio, para la alta frecuencia con que E.C.E.T. es detectado en todos los grupos de edad en Israel, sobre todo teniendo en cuenta que la mayor parte de pacientes procedían de una zona urbana y de un buen nivel socio-económico (GOLDHAR et al. 1980). Sin embargo, se trata de un estudio realizado durante 3 periodos veraniegos consecutivos, en la época más calurosa, en un país mediterráneo.

Por último, es llamativa también la frecuencia con que los aislamientos de E.C.E.T. encontrados en países de clima templado-frío, se relacionan con diarreas sufridas por pacientes recién llegados de zonas cálidas, o con malas condiciones higiénicas (BÄCK et al. 1977, 1980a; ALBOUY et al. 1981).

Las diferencias que hasta aquí hemos podido constatar respecto a la importancia de E.C.E.T. como agente etiológico en las diarreas de países con alto o bajo nivel socio-económico, pueden entenderse recordando el mecanismo patogénico de las bacterias toxigénicas. Estos microorganismos para inducir diarrea precisan de la ingestión de un gran inóculo infectante, ( $10^6$  -  $10^9$  organismos), (DUPON et al. 1971; LEVINE et al. 1977), que sólo podía obtenerse desde una fuente o ambiente altamente contaminado. Esto explica su prevalencia en zonas del tercer mundo, y la posibilidad de que en países con buenas condiciones sanitarias las diarreas puedan producirse en forma de brotes ocasionales, a partir de un foco contaminante (alimentario o acuoso), (GANGAROSA, 1978), o más raramente por contacto persona-persona (WHO Scientific working group, 1980).

#### 1.3.4.3.2.- Brotes diarreicos en niños y adultos

Escherichia coli enterotoxigénico es una causa ocasional de brotes de diarrea acuosa en guarderías o salas de neonatos y lactantes, así como contaminante frecuente de aguas o alimentos, que en ciertos lugares provocarán diarreas masivas en adultos.

En estos últimos, el primer brote conocido fue el producido en Crater-Lake (E.E.U.U.), en el verano de 1975, entre más de 200 miembros del personal que atendía este Parque Nacional y unos 2000 visitantes que bebieron agua contaminada. Fue aislado E. coli 06:K15:H16 productor de toxinas LT y ST, (ROSEMBERG et al. 1977). Esta misma cepa fue encontrada también por KUDOH et al. (1977), como agente causal de 5 de los 38 brotes diarréicos producidos a lo largo de los 8 años anteriores en Tokio. Seis más fueron producidos por E. coli 059:H20 ST+ y uno por E. coli 011:H27 ST+.

TAYLOR et al. (1982) vuelven a identificar E. coli 06:H16 ST/LT, en 20 de las 37 heces diarréicas investigadas en otro brote producido entre los clientes de un restaurante en el área mejicana de Wisconsin (E.E.U.U.). En este caso se dedujo, que el responsable de la infección era un manipulador de alimentos.

Esta cepa se ha encontrado implicada no sólo en este tipo de problemas, sino en la diarrea del viajero y en diarreas coléricas, (EVANS et al. 1977a; EVANS y EVANS, 1978; MERSON et al. 1979; BÄCK et al. 1980a; ROWE et al. 1983).

Otros brotes han sido descritos entre personal sanitario, (WOOD et al. 1983), pasajeros de cruceros, (LUMISH et al. 1980), o entre niños pequeños acogidos en guarderías o salas pediátricas. En la TABLA 10, hemos expuesto las características de los casos publicados en niños hasta la actualidad.

TABLA 10

BROTOS DIARRÉICOS INFANTILES CAUSADOS POR ECET

Localidad (PAIS)	Nº Brotes Año	Ubicación del Brote (Nº de afectados)	Transmisión	Serotipo	Entero- toxinas	AUTORES
Glasgow (R. UNIDO)	2 brotes	Sala de neonatología (25 niños)	P-P <sup>(a)</sup>	0159:H20	ST	GROSS y ROWE, (1984)
Gloucester (R. UNIDO)		Unidad neonatal de cuida- dos especiales (10/18 niños)	P-P <sup>(b)</sup>	06:H16	ST/LT	GROSS y ROWE, (1984)
Birmingham (EEUU)	Agosto 1971	Sala de neonatología (24 niños)	?	0128:H7	ST	RYDER <u>et al.</u> (1979)
Maricopa (EEUU)	Varios brotes durante 9 me- ses de 1972	Unidad cuidados intensivos neonatales	P-P <sup>(a)</sup>	0142:K86:H6	No especi- fican cuál	BOYER <u>et al.</u> (1975)
Houston (EEUU)	Dic. 1974- Agos. 1975	Unidad neonatal de cui- dados especiales	leche	078:K80:H12	ST	RYDER <u>et al.</u> (1976,b)

TABLA 10 (continuación)

BROTOS DIARREICOS INFANTILES CAUSADOS POR ECET

Localidad (PAIS)	Nº Brotes Año	Ubicación del Brote (Nº de afectados)	Transmisión	Serotipo	Entero- toxinas	AUTORES
Louisiana (EEUU)	1980	Lactantes	?	O128:H7	ST	WACHMUTH <u>et al.</u> (1983)
Madrid (ESPAÑA)	Nov.-Dic.1982	Sala de neonatología (7 niños)	?		LT (no se estudió dia ST)	ESPINOSA <u>et al.</u> (1983)
Burgos (ESPAÑA)	Nov. 1982	Sala de neonatología (8 niños)	?		LT (no se estudió dia ST)	ESPINOSA <u>et al.</u> (1983)

(a) No se encontró fuente contaminante. Por las características de la diseminación se piensa que se debe a contactos persona-persona.

(b) A partir de un bebé pretérmino que desarrolló diarrea a los 4 días de vida.

En general, la diarrea desencadenada por E.C.E.T. en este tipo de epidemias se caracteriza por ser de grado moderado, (RYDER et al. 1976b), careciendo de la gravedad y agudeza que caracteriza a la diarrea colérica, y al contrario de lo que ocurre en ésta, suele tener una duración más prolongada, (ROSEMBERG et al. 1977). E.C.E.T. por tanto, puede dar lugar a manifestaciones clínicas muy variables, aún tratándose de microorganismos con el mismo serotipo o fenotipo toxigénico (EVANS et al. 1977a; EVANS y EVANS, 1978; MERSON et al. 1979; BLACK et al. 1981).

#### 1.4.- ESCHERICHIA COLI ENTEROPATOGENO

##### 1.4.1.- Concepto. Serogrupación

El término Escherichia coli enteropatógeno (E.C.E.P.) designa actualmente, según fue acordado por 15 investigadores de 8 países en el Simposium Internacional que sobre este tema fue organizado en Septiembre de 1982, por el Instituto Nacional de Alergia y Enfermedades Infecciosas, en E.E.U.U., a las cepas de E. coli capaces de producir una diarrea, pertenecientes a los serogrupos epidemiológicamente considerados como patógenos, pero sin poseer las características de las cepas enterotoxigénicas, (productoras de las toxinas ST o/y LT), ni las propiedades de las cepas enteroinvasivas (GANGAROSA,1978; EDELMAN y LEVINE,1983; EDITORIAL Lancet,1983; TOLEDO et al. 1983; SANSONETTI,1985).

Esta definición por exclusión, recoge probablemente un grupo heterogéneo de cepas que sobrepasan el estricto margen impuesto por los criterios serológicos clásicos, que consideran como enteropatógenos a los siguientes serogrupos: 020; 026; 044; 055; 086; 0111; 0114; 0119; 0124; 0125; 0126; 0127; 0128; 0142; 0144; 0158; 0159. SANSONETTI (1985) diferencia ya, un nuevo tipo de E. coli, que denomina E. coli enterohemorrágico, del que hablaremos más adelante, y es

probable que en el futuro surjan nuevos grupos distintos, a medida que se conozcan factores específicos de patogenicidad.

A pesar de todo, esta definición de E.C.E.P. tiene algunas excepciones, de tal forma que diversas investigaciones planteadas en países desarrollados sobre cepas enteropatógenas coinciden en demostrar que sólo una, perteneciente al grupo 0119, de las más de 600 cepas estudiadas producía la toxina LT, y ninguna era invasiva (GOLDSCHMIDT y DUPONT, 1976; EVANS et al. 1977b; GURWITH et al. 1977 y 1978; SCOTTLAND et al. 1980a; ROBINS-BROWNE et al. 1982; ROTHBAUM et al. 1981).

Sin embargo, en países en vías de desarrollo algunas publicaciones indican lo contrario, existiendo un pequeño número de E.C.E.P. (044; 0114; 0119 y 0128), que también son enterotoxigénicos (MERSON et al. 1979; REIS et al. 1980 y 1982; TOLEDO et al. 1983).

Para valorar estas diferencias SCOTTLAND et al. (1981) decidieron plantear un estudio sobre cepas que, perteneciendo a estos serogrupos, tuvieran distintas procedencias. En él corroboran esta discrepancia, al comprobar que el 31% de las cepas de origen asiático producían enterotoxinas, mientras que sólo ocurría en el 3% de las recogidas en el Reino Unido. Incluso en estas últimas, 2 de las 3 cepas enterotoxigénicas encontradas habían sido aisladas de pacientes diarreicos recién llegados de un viaje a países tropicales.

Ahora bien, analizando estos resultados

SANSONETTI observa que, la mayor parte de los serotipos flagelares, (H), de estas cepas no corresponden a los E.C.E.P., siendo tan sólo compatible la especificidad O. Por ello sugiere que probablemente no se traten de E.C.E.P. en sentido estricto, sino de E.C.E.T. (SANSONETTI,1985).

Esta solapación serológica apoya la importancia de la determinación de antígeno H, sobre todo en los casos esporádicos de diarrea, debiendo huir de la identificación simplificada de E.C.E.P. a través de la aglutinación exclusiva de las mezclas de anti-sueros A y B, que es un método inadecuado de detección de E.C.E.P., (FARMER et al. 1977), a la que sin embargo se recurre frecuentemente, contribuyendo con ello, a crear falsos conceptos y malentendidos.

La especificidad de la seroagrupación correcta es corroborada en el Simposium Internacional sobre E.C.E.P., (EDELMAN y LEVINE,1983). En él, SECHTER (de Jerusalem, Israel), afirmaba que sólo un número muy limitado de serotipos (O:H),(la lista no es mayor de 25), causa brotes diarreicos en todo el mundo, lo que confirmaban a su vez WACHSMUTH, (de Atlanta, E.E.U.U.), y ORSKOV, (de Copenhague, Dinamarca), refiriéndose a los E.C.E.P. aislados en sus países respectivos, desde 1948 a 1980 en el primer caso, y desde 1959 a 1968 en el segundo. En E.E.U.U. todas las cepas quedaban incluidas en 34 serotipos, y en Dinamarca 99% de ellas pertenecían a sólo 9 serobiotipos. ORSKOV concluye por ello que existen unos serotipos básicos distribuidos por todo el mundo, que representan probablemente clones bacterianos; por eso, cuando

se investigan las propiedades fisiopatológicas de los E.C.E.P., la búsqueda debe concentrarse en los serotipos más prevalentes (EDELMAN y LEVINE,1983).

#### 1.4.2.- Aspectos epidemiológicos y patogénicos

La negatividad que el grupo de E.C.E.P. muestra respecto a los mecanismos de acción que caracterizan hasta este momento, a los E. coli virulentos, ha hecho que en algunos sectores se hayan planteado dudas sobre su poder patógeno, llegando a negar el valor de la serotipificación,(ECHEVARRIA et al. 1976; GOLDSMIDT y DUPONT,1976; NETER,1976; GANGAROSA y MERSON,1977; CANDY y NEISH,1984). A eso se une el hecho, de que si bien hasta 1970 E.C.E.P. se encontraba asociado a numerosas epidemias de diarrea de gravedad variable, (BRAY,1945; GILES et al. 1947; TAYLOR et al. 1949; BRAUN,1967; EDWARDS y EWING,1972), en la actualidad, en áreas templadas y con buena higiene, estos brotes no sólo han disminuído en frecuencia sino también en gravedad,(SOUTH,1971; EDELMAN y LEVINE, 1983; EDITORIAL Lancet,1983b), aunque sigan produciéndose, (EDELMAN y LEVINE,1983). Al mismo tiempo, su papel en los casos esporádicos de diarrea es desconocido, (Editorial Annals. Intern. Med. 1981), pues son muchos los laboratorios que decidieron abandonar la serotipificación rutinaria, (EDELMAN y LEVINE,1983). Con ello, muchos procesos diarreicos han podido y pueden ser catalogados fáltsamente como "diarrea inespecífica" o "no bacteriana " (GURWITH et al. 1978).

En los casos en los que se ha planteado su búsqueda, E.C.E.P. sigue aislándose como uno de los agentes etiológicos más importantes. GURWITH et al. por ejemplo, en una investigación llevada a cabo en 1977, en Canadá, encuentran que es el patógeno más frecuente en los niños diarreicos no hospitalizados, menores de 1 año, observando que la enfermedad que produce en ellos, es tan grave como la desencadenada por Shigella sonnei, y más grave que las enteritis de causa no bacteriana. Posteriormente, en 1978, en un estudio prospectivo sobre enfermos y controles sanos, vuelven a demostrar que su asociación con la enfermedad diarreica en los niños pequeños, es significativa (GURWITH et al. 1978) aunque señala que los serotipos, en estos casos, cambian de año en año.

Estos hallazgos contrastan sin embargo con el elevado porcentaje, (15%), de E.C.E.P. aislados en portadores sanos por LEVEQUE et al. (1977), lo que contribuye a mantener las dudas existentes en nuestras áreas sobre el valor del aislamiento de E.C.E.P. en casos esporádicos de diarrea. Estas dudas, que ciertos autores tratan de resolver proponiendo la realización de nuevos estudios que intenten clarificar los hechos, (SMITH, 1976; FARMER et al. 1977), no existen en cambio en los países subdesarrollados, donde su incidencia, tanto en casos esporádicos como en brotes epidémicos, es alta, (DONTA et al. 1977; EVANS et al. 1977b; BÄCK et al. 1980b; STINTZING et al. 1982; TOLEDO et al. 1983), afectando a niños de edad superior a 6 meses, y sobre todo a mayores de 2 años, cuando abandonan la lactancia materna (SOUTH, 1971).

#### 1.4.3.- Mecanismos patogénicos

Existen numerosas experiencias que avalan la virulencia de E.C.E.P.:

- La admisión en una sala de neonatos sanos de un enfermo o convaleciente, eliminando por sus heces una de estas cepas, va a desencadenar, a lo largo de la siguiente semana, una epidemia de diarrea, con la peculiaridad de que de las heces diarreicas de los demás recién nacidos va a aislarse en cultivo puro una cepa del mismo serogrupo que la original, y que en el suero de los enfermos se va a producir una elevación de la tasa de anticuerpos específicos.

- Se ha podido demostrar que tanto en el niño, (NETER y SHUMWAY, 1950), como en el adulto, (FERGUSON y JUNE, 1952; JUNE et al. 1953; KOYA et al. 1954; LEVINE et al. 1978), la administración oral de un elevado inóculo de E.C.E.P. desencadena una diarrea.

Estas demostraciones ponen en evidencia que E.C.E.P. produce diarrea a través de unos mecanismos distintos a los descritos para E.C.E.T. o E.C.E.I..

##### 1.4.3.1.- Adhesividad

Las investigaciones post mortem y las técnicas de intubación indicaban, que la capacidad de colonizar la mucosa epitelial del intestino delgado era importante en la patogenia de la diarrea por

E.C.E.P., (EDITORIAL Lancet,1983b). Sin embargo, en contraste con lo que ocurre con E.C.E.T. el mecanismo de esta colonización es desconocido. Los investigadores trataban por ello de encontrar alguna forma de adhesión, que como primer paso, facilitase la proliferación posterior. Así, MCNEISH et al. (1975) destacan ya la adhesión que ciertas cepas de E.C.E.P. muestran sobre un modelo de mucosa de intestino delgado de feto humano.

CANTEY y BLAKE, (1976) tratan de investigar un nuevo mecanismo de acción en Escherichia coli utilizando para ello, la cepa RDEC-1 con enteropatogenicidad específica para el conejo, (equiparable a lo que E.C.E.P. es para el neonato). Tras su inoculación, por vía orogástrica, observan que produce la destrucción del microvilli y la adherencia de la bacteria a las microvellosidades intactas del intestino, en ausencia de invasión de la célula intestinal y de producción de enterotoxinas. (CANTEY y BLAKE,1977).

En 1979, CRAVIOTO et al. describen un método in vitro que evidencia la capacidad de E.C.E.P. para adherirse a las células HEp-2 en cultivo tisular, propiedad que no poseen las cepas de E.C.E.T., ni de E. coli no patógenas.

Posteriormente, diversos estudios clínicos corroboran in vivo la importancia de esta adhesión:

- ULSHEN y ROLLO (1980), describen las mismas alteraciones histológicas y ultraestructurales que CANTEY y BLAKE (1977), en un niño de 7 semanas, con diarrea intratable y sobrecrecimiento de E. coli

O125ac:H21 en el intestino delgado.

- CLAUSEN y CHRISTIE (1982), encuentran que la cepa de E. coli O111, (no enterotoxigénica, ni invasiva), aislada del intestino delgado de dos niños con diarrea, era capaz de adherirse in vitro al cultivo de células HEp-2, del mismo modo que in vivo se observa adherencia al epitelio intestinal biopsiado. Este mismo serogrupo de E.C.E.P. es aislado como único agente causal, en 15 niños con diarrea grave intratable, por LACROIX et al. (1984). Todas las cepas eran del serotipo O111:K58:H2, no enterotoxigénicas, ni invasivas, resistentes a la mayor parte de los antibióticos ensayados, y con la capacidad de adherirse a las células HeLa.

- ROTHBAUM et al., en dos estudios sucesivos (1981 y 1982), presentan los resultados clínico-patológicos de 18 casos de enteritis por E. coli enteropatógeno O119, en recién nacidos, a los que practican biopsia yeyunal. En ella se aprecia una marcada atrofia vellositaria, con disolución del glicocalix y se observan las bacterias adheridas en racimos al enterocito.

Todas estas investigaciones apoyan la hipótesis de que la adhesión a la célula intestinal por parte de E.C.E.P., es un elemento esencial de su virulencia, y puede representar un nuevo mecanismo de acción, aunque todavía se desconoce si es suficiente por sí mismo, o precisa de otros factores.

#### 1.4.3.2.- Citotoxicidad

Varios estudios han podido demostrar que E.C.E.P. causa acumulación de líquido, tanto en el asa ileal ligada de conejo, (SMITH y GYLES, 1970; GOLDSCHMIDT y DUPONT, 1976), como en el intestino de rata aislado y perfundido in vitro, (KLIPSTEIN et al. 1978). Estos resultados sugerían que E.C.E.P. era capaz de producir enterotoxinas, que afectarían el transporte intestinal de agua y electrolitos. Sin embargo estas enterotoxinas no eran detectadas por los métodos habituales aplicados sobre E.C.E.T., a pesar de lo cual existían publicaciones que apoyaban la existencia de sustancias tóxicas distintas de las toxinas LT y ST.

GOLDSCHMIDT y DUPONT (1976), analizando 2 cepas enteropatógenas que habían causado acúmulo de líquido en las asas intestinales de conejo, observaron que producían una toxina termolábil, diferente de la toxina LT, pues no alteraba las células Y<sub>1</sub>.

LEVINE et al. (1978), sospechan también la liberación de enterotoxinas por parte de 2 de las 3 cepas de E.C.E.P., ensayadas por ellos en voluntarios, pertenecientes a los serogrupos 0127 y 0142, comprobando que un filtrado concentrado de la cepa 0142, (no ensayan la cepa 0127), causa un descenso de la absorción intestinal en perros.

KLIPSTEIN et al. (1978), descubren en los lisados bacterianos de 10 cepas enteropatógenas una

toxina termolábil de alto peso molecular, y otra termoestable con bajo peso molecular, capaces de aumentar la secreción de agua a la luz industrial de ratas.

En 1977, KONOWALCHUK et al. muestran que los filtrados de cultivo de ciertas cepas de E. coli, tenían un efecto citotóxico irreversible sobre monocapas de células VERO, distinto al efecto citopático reversible, producido por la enterotoxina LT. Esta nueva toxina fue denominada verotoxina (VT), (SCOTLAND et al. 1980a).

La toxina VT es distinta de las toxinas LT y ST, ya que no actúa sobre las líneas celulares Y<sub>1</sub> y CHO, ni provoca acumulación de líquido en la prueba del ratón lactante. Sin embargo parcialmente purificada, induce cierta acumulación de líquido en el ensayo RIL.

En el estudio inicial, KONOWALCHUK et al. (1977) identifican 7 cepas productoras de toxina VT entre las 26 cepas de E.C.E.P. investigadas (27%). 3 de ellas pertenecían al serogrupo O26. En el estudio de SCOTLAND et al. (1980a), de 253 cepas de E.C.E.P. pertenecientes a 11 serogrupos O, aisladas en el curso de epidemias de diarrea infantil en el Reino Unido, 25, (10%), fueron VT(+), de las que 23 pertenecían al serogrupo O26. De estas, 20 eran del serotipo O26:H11.

Es evidente por tanto, que existe una clara relación entre la toxina VT y el serogrupo O26, como corroboran también otros autores (WADE et al. 1979;

WILSON y BETTELHEIM, 1980; SMITH et al. 1983b).

El interés por esta toxina ha ido en aumento desde su descubrimiento por varias razones:

- KARMALI et al. (1983), demuestran la presencia significativa de E. coli VT(+) en las heces de 11 de 15 niños con síndrome hemolítico-urémico, internados en un hospital canadiense, desde 1980 a 1982. Este hallazgo podría ser de gran importancia al tratarse de un síndrome de etiología desconocida considerado como una de las causas más frecuentes de insuficiencia renal aguda en el niño. Las cepas de E. coli VT(+) encontradas, pertenecen al menos a 4 serogrupos diferentes O26, O111, O113 y O157:H7, siendo los 2 primeros serogrupos enteropatógenos.

- En el curso de una epidemia de diarrea acuosa primero y hemorrágica después, desencadenada en Michigan y Oregón en 1982, fue identificada una cepa de E. coli perteneciente a un serogrupo no enteropatógeno, pero tampoco invasivo, ni enterotoxigénico, el O157:H7, capaz en cambio de producir toxina VT (RILEY et al. 1983). Esta misma cepa fue también la causante de otro brote epidémico en Canadá (JONHSON et al. 1983).

SANSONETTI (1985) considera que este tipo de E. coli puede desglosarse del grupo de E.C.E.P. al poseer un serogrupo no incluido entre los patógenos clásicos y unas características clinico-patológicas específicas, constituyendo el grupo de E. coli entero-hemorrágico.

- Por último, los trabajos recientes de O'BRIEN vienen a precisar la naturaleza de la verotoxina. Una publicación previa de este autor, esgrimía la posibilidad de que ciertas cepas de E. coli, aisladas de heces diarréicas, no enterotoxigénicas ni enteroinvasivas, fueran capaces de producir toxina disintérica (O'BRIEN et al. 1977). Sin embargo, esta hipótesis no había podido ser confirmada, hasta que gracias a unas modificaciones introducidas en las condiciones de crecimiento de las cepas, (cultivo en medio alcalino y presencia de una resina intercambiadora de Fe), se consiguió aumentar su producción (O'BRIEN et al. 1982).

Al estudiar 5 cepas, una de las cuales correspondía a la cepa del serogrupo 026 identificada por KONOWALCHUK et al. (1977) como productora de toxina VT(+), (cepa H-30), comprobaron que los filtrados de dicha cepa, al igual que los de la cepa 60R de Shigella dysenteriae tipo 1, eran citotóxicas sobre las células HeLa, letales para ratones adultos inoculados intraperitonealmente y enterotóxicas en asas ligadas de intestino de conejo, (O'BRIEN y LAVECK, 1983). Ambas tienen una gran semejanza en su estructura molecular, y el antisuero específico contra la toxina de Shigella, neutraliza el efecto citotóxico que la toxina VT, sintetizada por la cepa H-30, ejerce sobre las células VERO.

En una de estas investigaciones O'BRIEN et al. (1983a) muestran que las cepas de E. coli enterohemorrágico 0157:H7, eran más citotóxicas para

las células VERO que para las HeLa, citotoxicidad que era neutralizada por un antisuero preparado contra la toxina de Shigella.

Tanto la toxina de Shigella, como la toxina purificada a partir de la cepa 0157:H7, o la obtenida de la cepa H-30, son estructural, fisiológica e inmunológicamente idénticas (O'BRIEN et al. 1983b).

A pesar de estas aportaciones clarificadoras, son numerosas las cepas de E.C.E.P. que no presentan ninguno de los mecanismos patogénicos expuestos, y a la inversa, existen cepas no enteropatógenas que pueden presentar estas propiedades (SANSONETTI, 1985).

Por los datos aportados parece también claro que, dentro del grupo de E.C.E.P. existe una gran diversidad, a pesar de haber sido considerado desde siempre como un grupo homogéneo. Queda por determinar sin embargo, el tipo de relación existente entre las cepas productoras de VT y las cepas adherentes, y es seguro que quedan por descubrir también otras toxinas y otros sistemas de adhesión.

### 1.5.- ESCHERICHIA COLI ENTEROINVASIVO

Ciertos grupos de E. coli pueden desencadenar una enfermedad semejante a la disentería. Se trata de los denominados E. coli enteroinvasivos (E.C.E.I.) que se caracterizan por su capacidad para penetrar en las células epiteliales del intestino, (DUPONT et al. 1971; DESJEUX et al. 1979; MOON et al. 1979), multiplicarse en su interior, y dar lugar a una intensa reacción inflamatoria que conducirá a la destrucción de la mucosa intestinal y a la formación de microúlceras y escaras en su superficie (LABREC et al. 1964; KEUSCH,1981c). Todo ello ha sido comprobado experimentalmente, por DUPONT et al., en voluntarios adultos a los que administraron por vía oral, cepas de E. coli invasivo, (0124, 0136 y 0143), y por FRISK et al. (1981), con la cepa 1056, en hamsters recién destetados.

La similitud patogénica entre este tipo de E. coli y el género Shigella, es corroborada por el hecho de poseer ambos antígenos somáticos comunes (WHO Scientific working group,1980a; KEUSCH,1981c; GROSS y ROWE,1984), y porque aunque bioquímicamente E.C.E.I. son E. coli típicos, un porcentaje de ellos son incapaces de fermentar la lactosa, de decarboxilar la lisina y carecen de antígeno H (SILVA et al. 1980; KEUSCH,1981c; TOLEDO y TRABULSI,1983), lo que unido

a su comportamiento invasivo, puede dar lugar en ocasiones a confusiones diagnósticas (WHO Scientific working group,1980a; EDITORIAL Lancet,1981; KEUSCH, 1981c; GROSS y ROWE,1984).

De igual forma, para diagnosticar la capacidad invasiva de E. coli y Shigella son utilizadas las mismas pruebas diagnósticas, tanto in vivo como in vitro. Las primeras estan representadas por la prueba de SERENY (1955), que se considera positiva cuando la inoculación de 1 gota de un cultivo puro de E. coli en el saco conjuntival de un conejo o cobyaya provoca una queratoconjuntivitis, en la que puede detectarse, y posteriormente aislarse de nuevo, el microorganismo ensayado. El segundo grupo, utiliza los cultivos celulares, ya sea con células HeLa, (DUPONT et al. 1971; STINTZING et al. 1982), como HEp-2, (RUDOY y NELSON,1975; MEHLMAN et al. 1977; MAKI et al. 1980; DAY et al. 1981). Aunque con ambos se obtienen resultados similares, la prueba de SERENY resulta más costosa, existe en ella posibilidad de contagio del personal manipulador, o de interferencias con la microflora indígena, mientras que los cultivos celulares tienen una mayor posibilidad de estandarización y adaptación a la rutina microbiológica del laboratorio, menor costo y mayor rapidez en la obtención de resultados (MEHLMAN et al. 1977).

Los serotipos que hasta este momento se han relacionado con E.C.E.I. pertenecen a un grupo reducido, distinto al de los patógenos clásicos(DUPONT et al. 1971; SILVA et al. 1980; WHO working group, 1980a; KEUSCH,1981c; TOLEDO y TRABULSI,1983), y quedan

reflejados en la TABLA 11. En ella, quedan indicados entre paréntesis al lado de cada serogrupo de E. coli, los serotipos de Shigella antigénicamente relacionados con ellos, (EDWARDS y EWING,1972b; KEUSCH, 1981c).

El mejor conocido de todos es el O124, aislado por primera vez en las heces diarreicas de soldados estadounidenses desplazados al Mediterráneo entre 1943-1945, e identificado también como agente causal de un brote diarreico en una escuela del Reino Unido en 1947, (WHO Scientific working group,1980a; GROSS y ROWE,1984). Ha sido citado además como responsable de casos esporádicos y de brotes en adultos, en Inglaterra, Hungría, E.E.U.U., transmitido por el agua y los alimentos, (KEUSCH,1981c; GROSS y ROWE,1984). No obstante, se trata de un agente etiológico muy poco frecuente en la diarrea infantil, (GANGAROSA y MERSON,1977; PIKERING et al. 1978), y aunque son pocos los estudios existentes para determinar su prevalencia en la comunidad, en la mayor parte de ellos no se llega a detectar en ningún caso, (SHORE et al. 1974; ECHEVARRIA et al. 1976 y 1977; EVANS et al. 1977b; GURWITH y WILLIAMS,1977), o se hace con escasa frecuencia (MAKI et al. 1980; STINTZING et al. 1982; TOLEDO et al. 1983).

Tan sólo se encuentra una tasa de aislamiento mayor en 2 estudios realizados en Brasil, (GUERRANT et al. 1975; TOLEDO y TRABULSI,1983), y en una investigación llevada a cabo por RUDOY y NELSON en 1975, en Dallas (Texas), sobre 36 niños con diarrea y 17 niños sanos. Estos autores encuentran, en cada

TABLA 11

SEROTIPOS DE E. COLI ENTEROINVASIVOS

---

028 ac: K73 (S. *Boydii* 13)

029:

042:

0112 ac: K66 (S. *dysenteriae* 2)

0115: (S. *boydii* 10)

0124: K72 (S. *dysenteriae* 3)

0136: K78 (?)

0143: K (S. *boydii* 8)

0144: (S. *dysenteriae* 10)

0152:

0164:

0167:

---

(DUPONT et al. 1971; SILVA et al. 1980; WHO Scientific working group, 1980a; KEUSCH, 1981c; TOLEDO y TRABULSI, 1983).

uno de estos grupos, 11 y 2 E.C.E.I. respectivamente. Sin embargo, algunos de estos aislamientos eran negativos en la prueba de SERENY, y dado que en el mismo estudio fueron encontrados Shigella y Salmonella en 15 enfermos, es difícil determinar el papel invasivo de los E. coli aislados (GROSS y ROWE, 1984).

Aunque la correlación entre patogenicidad y serogrupación no está claramente establecida, en un trabajo reciente TOLEDO y TRABULSI (1983) relacionan de forma altamente específica las características bioquímicas y serológicas de E. coli, con los resultados de la prueba de SERENY. En 325 cepas de E. coli lisina-decarboxilasa negativos, observan que 138 reaccionan frente a un conjunto de antisueros que reunía los serogrupos de E.C.E.I. más frecuentes, y que de ellos, 137 dan positiva la prueba de SERENY.

Basándose en estos resultados, recomiendan una pauta que facilitaría en su opinión la detección de este tipo de E. coli:

- Todas las cepas de E. coli inmóviles y lisin-decarboxilasa negativas deberían ser sometidas a seroaglutinación frente a un antisuero polivalente, (serogrupos enteroinvasivos).

- Las cepas de E. coli que hubieran aglutinado se enfrentarían al antisuero monovalente correspondiente.

Si aglutinaban, se ensayaría en ellas la prueba de SERENY.

## 2.- HIPOTESIS DE TRABAJO

A pesar de la importancia y frecuencia de las diarreas agudas infecciosas en la edad pediátrica, hasta hace unos años ha existido un gran desconocimiento de la mayor parte de los agentes que la producían.

La identificación en las heces de partículas víricas, y la demostración de su papel patogénico en la mayor parte de las diarreas infantiles supuso un extraordinario avance. Sin embargo todavía hoy son varios los aspectos que permanecen oscuros en la etiología de la enfermedad, fundamentalmente los referidos a Escherichia coli, saprófito intestinal habitual, que no obstante, aparece relacionado con un gran número de brotes diarréicos en niños menores de 2 años de edad.

En la última década se ha dedicado una atención especial al estudio de la patogenia de este microorganismo, intentando dilucidar el papel de los distintos mecanismos por él desarrollados.

Se sabe que E. coli es un importante patógeno, cuya virulencia está relacionada en unas cepas con su capacidad para adherirse al epitelio intestinal y para sintetizar toxinas, y en otras, con la posibilidad de penetrar a través de la mucosa intestinal invadiendo la célula.

La actividad de algunas toxinas de E. coli, (LT y ST), han sido estudiadas con detalle, mientras que existen dudas respecto al comportamiento enterotóxico de otras, como VT, así como sobre los mecanismos de acción de E. coli enteropatógeno, relacionado clásicamente con la enfermedad diarreica, y cuya detección es discutida en la actualidad.

Por tales motivos, nos proponemos conocer el papel que este microorganismo desempeña en nuestro medio respecto a otras etiologías, bacterianas y virales, de la diarrea infantil.

Para detectar las propiedades tóxicas, pondremos a punto y evaluaremos diversos ensayos in vivo e in vitro, en los que se analizará la actividad de las toxinas LT, ST y VT, con el fin de comprobar su reproductibilidad y posible utilización práctica en nuestro laboratorio.

Para la valoración etiológica de E.C.E.T. y E.C.E.P. en la edad pediátrica, se estudiarán prospectivamente las heces líquidas de niños afectos de diarrea aguda, con los siguientes objetivos:

- Conocer la incidencia de E.C.E.T. y E.C.E.P. en la diarrea infantil en nuestro medio.

- Analizar tanto la enfermedad que producen como las características de los pacientes afectos, observando si existen en ambos, rasgos propios que los distingan de otras etiologías.

- Caracterizar los aislamientos de E. coli

enterotoxigénicos, comparándolos con los descubiertos hasta la actualidad por otros investigadores.

- Tratar de conocer el interés clínico y microbiológico de identificar E.C.E.P.

- Tratar de conocer si se puede diagnosticar de forma rutinaria E.C.E.T. serológicamente, como se hace con E.C.E.P.

- Tratar de conocer la utilidad de detectar de forma rutinaria E.C.E.T. en nuestros hospitales.

- Conocer la incidencia de otros patógenos entéricos, bacterianos y virales, evaluando su importancia respecto a E. coli.

### 3.- MATERIAL Y METODOS

### 3.1.- MUESTRAS DE HECES ESTUDIADAS

#### 3.1.1.- Procedencia de las heces

Con intención pragmática, y ante la ausencia de criterios unívocos para definir el signo diarrea hemos aceptado como tal la disminución de la consistencia de las heces o/y el aumento del número de deposiciones, a extremos que los familiares o/y el médico consideren fuera de la norma habitual del niño concreto.

Sin embargo, dado que el fin primordial de nuestro estudio es conocer la incidencia e importancia de E. coli enterotoxigénico como agente etiológico en la diarrea infantil en nuestro medio, se han seleccionado, entre los niños afectos de diarrea aguda, atendidos por tal motivo en el Departamento de Pediatría del Hospital Clínico Universitario de Valencia, a aquellos que llevando al menos 12 horas de evolución, presentaran unas heces exclusiva o predominantemente líquidas, con o sin moco o sangre, tomando este dato, como la expresión patognomónica del mecanismo toxigénico.

El periodo de estudio abarca 8 meses, comprendidos desde enero hasta agosto de 1984.

#### 3.1.1.1.- Características de los pacientes

El número de niños estudiados ha sido

de 101 de los cuales, 6, presentaron dos episodios diarreicos totalmente distintos entre sí, a lo largo del periodo que duró la recogida de muestras, por lo que se han incluido como casos independientes.

Las edades de estos niños están comprendidas entre el periodo neonatal y los 14 años, siendo los menores de 1 año los que constituyen el grupo mayor (70 casos). La distribución por edades queda reflejada en la Figura 5.

El número total de pacientes se divide en 3 grupos:

Grupo A.- Constituido por 33 niños, que tuvieron que ser ingresados en el Departamento de Pediatría a causa de su proceso diarreico.

Grupo B.- Integrado por 33 pacientes que presentaron diarrea en algún momento de su estancia en el hospital donde permanecían ingresados por procesos patológicos diversos. Todos los niños de este grupo, excepto uno, eran menores de 1 año de edad, y se encontraban en salas de lactantes, neonatos o prematuros.

Grupo C.- Formado por 35 niños, cuyo proceso diarreico pudo ser controlado ambulatoriamente.

La distribución de los pacientes, en cada uno de los 3 grupos se realizó al azar.

#### 3.1.1.2.- Características de las muestras recogidas

Se han realizado en total 104 estudios coprológicos, ya que en 3 niños se practicaron 2

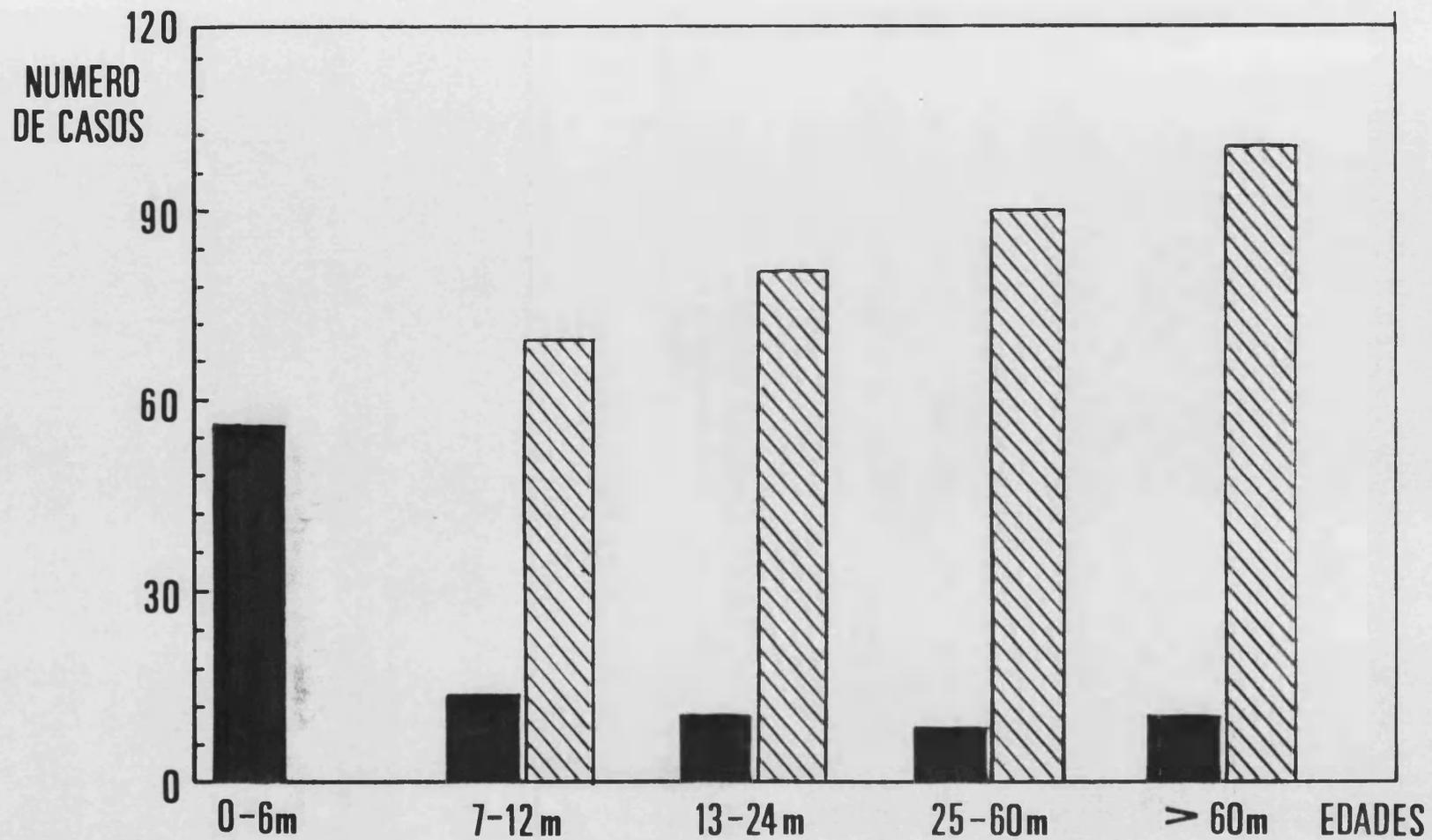


FIG.5.-DISTRIBUCION DE LOS PACIENTES POR EIDADES

- NUMERO DE CASOS POR GRUPO DE EDAD
- ▨ ACUMULATIVO DE CASOS

estudios sucesivos, a consecuencia de la persistencia de los síntomas o de recaídas tras la mejoría del proceso anterior.

En 58 de los 101 niños estudiados (57.4% del total), las muestras de heces líquidas obtenidas fueron conservadas por congelación a  $-70^{\circ}\text{C}$ , para realizar una investigación virológica posterior.

### 3.1.2.- Recogida de heces

Para realizar el estudio coprológico, las heces fueron recogidas en un frasco estéril de boca ancha cuando se trataba de niños mayores, o en una bolsa estéril, adherida alrededor del ano, cuando se trataba de niños pequeños o de lactantes. No se procesaron muestras obtenidas mediante escobillón rectal.

Tras la recogida, las heces fueron remitidas al Servicio de Microbiología y procesadas inmediatamente para aislamientos bacterianos, fúngicos o exámen parasitológico.

### 3.2.- INVESTIGACION DE BACTERIAS ENTEROPATOGENAS

Sobre las muestras de heces, se ha planteado un estudio global, para identificar cualquiera de los microorganismos enteropatógenos presuntos responsables de la diarrea. Para ello, hemos desarrollado una pauta diagnóstica general, seguida de la identificación de cada microorganismo concreto. E. coli, ha sido motivo de una investigación complementaria planteada para conocer su capacidad enterotoxigénica, lo que nos ha obligado a conservar los aislamientos de E. coli de cada uno de los coprocultivos realizados.

#### 3.2.1.- Procedimiento diagnóstico general

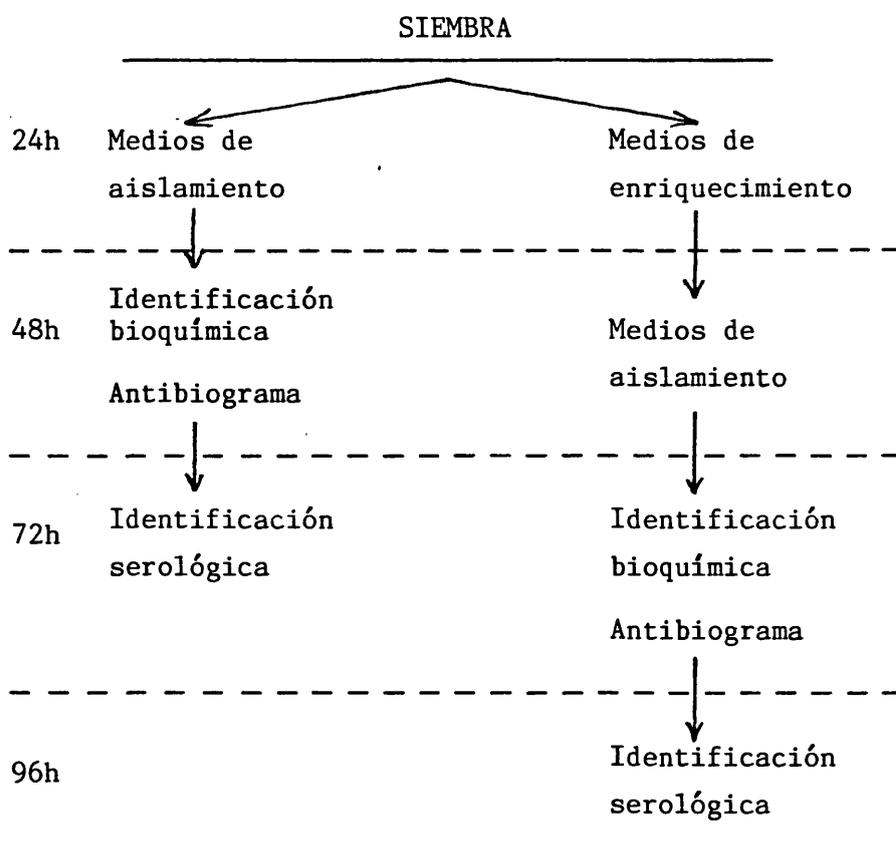
En la realización del coprocultivo (TABLA 12) se han utilizado medios líquidos de enriquecimiento (Muller-Kauffman y Leifson al selenito), en los que se suspende una pequeña cantidad de heces, y medios sólidos de aislamiento (MacConkey, Salmonella-Shigella), sobre los que se siembran las heces según su consistencia, bien directamente, o bien previa emulsión en solución salina fisiológica estéril.

Una vez realizadas las siembras, se incuban a 37°C durante 18-24 horas y transcurrido este tiempo se realizaron subcultivos a partir de los medios de

TABLA 12

COPROCULTIVO DE HECES

---



enriquecimiento a los medios de aislamiento. Paralelamente, a partir de las colonias crecidas en los medios de aislamiento, se realizan una serie de pruebas de identificación bioquímica para la identificación bacteriana y un estudio de sensibilidad, incubándose a 37°C durante 18-24 horas.

Transcurrido ese tiempo, se efectúa la lectura de las pruebas de identificación bioquímica, y si sobre el segundo grupo de placas de aislamiento han aparecido colonias bacterianas sospechosas de ser distintas a las obtenidas anteriormente, vuelve a realizarse una nueva batería bioquímica, centrándose el estudio, en este caso de forma preferente, sobre las colonias fermentadoras de la lactosa, si queremos identificar E. coli.

Por último, se realiza el estudio antigénico.

### 3.2.2.- Medios de cultivo

#### 3.2.2.1.- Medios de enriquecimiento

Los medios de enriquecimiento se caracterizan por ser líquidos y llevar incorporados determinados productos químicos, que detienen o dificultan el crecimiento de los comensales, facilitando por ello la proliferación y posterior recuperación de los patógenos buscados.

Hemos utilizado:

- Medio de MULLER-KAUFFMANN
- Medio de LEIFSON al selenito
- Agua peptonada alcalina
- Agua hipersalina

##### 3.2.2.1.1.- Medio de MULLER-KAUFFMANN

Es un medio de enriquecimiento selectivo que se usa paralelamente al aislamiento directo sobre un medio sólido selectivo (agar SS) para la búsqueda de Salmonella en heces.

A partir de la siembra en el medio MULLER-KAUFFMANN (M-K) se realizaron resiembras a las 24-48 horas en el medio de MacConkey y Salmonella-Shigella (S-S).

Su composición es la siguiente:

- . Caldo de carne (Difco 0126-02) - - - - - 900ml
- . Carbonato de calcio (Mallinckrodt works, 4072) - 50g

- . Tiosulfato de sodio al 50% (Merck, 6512) - - - - 100ml
- . Solución iodo-iodurada: - - - - - 20ml  
(Iodo 20% (Probus, 3008)-ioduro potásico al 25% (Pan-  
reac))
- . Verde brillante (Difco, 0192-15) - - - - - 0.01g
- . Bilis (Merck, 4054) - - - - - 50ml

Este medio se esteriliza por filtración y se dispensan 10 ml en tubos.

Para su siembra se introducen en él 2 ml de la suspensión de heces, y se incuba a 37°C, durante 24-48 h. Posteriormente se resiembra en medios selectivos de aislamiento.

#### 3.2.2.1.2.- Medio de LEIFSON al selenito

Al igual que el anterior, se siembra paralelamente al aislamiento directo sobre un medio sólido selectivo.

Se prepara disolviendo en un litro de agua destilada, 23 g de polvo del medio Selenito (Difco, 0275-01) y haciendo hervir la mezcla. No se introduce en autoclave. Se reparte en tubos, a razón de 10 ml en cada tubo.

#### 3.2.2.1.3.- Agua de peptona alcalina

Similar en su utilización a los anteriores.

De la siembra realizada en este medio, se hacen resiembras en los medios de MacCONKEY y T.C.B.S. agar (selectivo para vibriones).

Composición:

- . Peptona (Difco,0149-01) - - - - - 15g
- . Cloruro sódico (Merck,6400) - - - - - 5g
- . Agua destilada - - - - - 1000ml
- . pH=8-8.4

Se calienta hasta la ebullición durante 10 minutos y se esteriliza posteriormente en autoclave durante 20 minutos a 115°C, siendo necesario comprobar entonces nuevamente el pH del medio, pues la peptona puede acidificarlo.

3.2.2.1.4.- Agua hipersalina

Su composición es la siguiente:

- . Peptona (Difco,0149-01) - - - - - 30g
- . Cloruro sódico (Merck,6400) - - - - - 30g
- . Agua destilada c.s.p. - - - - - 1000ml
- . pH=8.6

Se disuelve sin hervir, se distribuye en tubos cerrados con tapón de rosca de 16x160, y se esteriliza posteriormente en autoclave.

3.2.2.2.- Medios de aislamiento

Entre los medios de aislamiento idóneos para las enterobacterias, hemos utilizado:

- Agar lactosado de MacCONKEY
- Agar SALMONELLA-SHIGELLA

3.2.2.2.1.- Agar lactosado de MacCONKEY  
(Instituto Pasteur,69087)

Su composición es la siguiente:

- . Peptona (Difco,0149-01) - - - - - 20g
- . Sales biliares (Merck,4054) - - - - - 1.5g

- . Lactosa (Difco, 0156-15) - - - - - 10g
- . Cloruro sódico (Merck, 6400) - - - - - 5g
- . Rojo neutro (Difco, 0208-15) - - - - - 0.03g
- . Cristal violeta (Merck, 10127) - - - - - 0.001g
- . Bacto agar (Difco, 0140-01) - - - - - 15g
- . Agua destilada - - - - - 1000ml
- . pH=7.4

Se esteriliza en autoclave durante 15 minutos, a 121°C, dispensándose luego 20 ml en cada placa de Petri.

Las placas, una vez secas, se siembran e incuban durante 18-24 horas en estufa a 37°C.

Las colonias correspondientes a las bacterias que utilizan la lactosa, aparecen de color rojo con un halo turbio alrededor, debido al descenso del pH que producen en el medio y la precipitación de los ácidos biliares. Por el contrario, las colonias de las bacterias que no degradan la lactosa se observan de color blanquecino-amarillento.

#### 3.2.2.2.2.- Agar SALMONELLA-SHIGELLA (Instituto Pasteur, 64517)

Es un medio selectivo para el aislamiento de los géneros SALMONELLA y SHIGELLA. El verde brillante que lleva incorporado inhibe totalmente el crecimiento de bacterias Gram positivas y de numerosas enterobacterias.

Su composición es la siguiente:

- . Extracto de carne (Difco, 0126-02) - - - - - 5g
- . Proteosa peptona (Difco, 0120-01-4) - - - - - 5g
- . Lactosa (Difco, 0156-15) - - - - - 10g

- . Sales biliares (Merck, 4054) - - - - - 8.5g
- . Citrato de sodio (Mallinckrodt, 0754) - - - - - 8.5g
- . Tiosulfato de sodio (Merck, 6512) - - - - - 8.5g
- . Citrato de hierro (Merck, 3759) - - - - - 1g
- . Agar (Difco, 0140-01) - - - - - 13.5g
- . Verde brillante (Difco, 0192-15) - - - - - 0.00033g
- . Rojo neutro (Difco, 0208-15) - - - - - 0.025g
- . Agua destilada - - - - - 1000ml
- . pH=7

Se dispensa en placas de Petri, en la misma proporción que el medio de MacCONKEY. Una vez secas, las placas se siembran a 37°C durante 24 horas.

Al igual que en el caso anterior las colonias que utilizan la lactosa presentan un color rojo, mientras que las que no lo hacen, aparecen incoloras y transparentes. Otras colonias pueden presentarse con un punteado negro, que se debe a la producción de ácido sulfhídrico.

### 3.2.2.3.- Medios utilizados para la identificación

Con las colonias aisladas obtenidas en los medios de cultivo anteriormente citados, tanto a partir de la siembra, como de las resiembras, se realizan las siguientes pruebas para llegar al diagnóstico bioquímico:

#### 3.2.2.3.1.- Investigación de la movilidad

La investigación de la movilidad se ha de realizar siempre a partir de cultivos jóvenes, pues es una característica que se puede perder con el tiempo.

El método utilizado ha sido la investigación en medio semisólido, utilizando para ello el medio manitol-

movilidad (Instituto Pasteur, 64877), y solamente en casos dudosos se efectuó en fresco, observándola al microscopio sobre portaobjetos.

El medio se prepara disolviendo 28 g en 1000 ml de agua destilada; se distribuye en tubos de forma que quede una columna de unos 50 mm, esterilizándolos en autoclave durante 15 minutos a 120°C.

Se inocula por punción, procurando seguir esta línea al retirar el asa de platino.

Los tubos se incuban a 37°C durante 24 horas. La reacción positiva viene indicada por la aparición de turbidez o de líneas de crecimiento visibles que se apartan de la estría de la siembra.

#### 3.2.2.3.2.- Enzimas respiratorios

##### 3.2.2.3.2.1.- Catalasas

La investigación de las catalasas se basa en la reducción del peróxido de hidrógeno y liberación de oxígeno (DAGUET,1977). Se utiliza como reactivo el agua oxigenada de 10 volúmenes (3%), del que se toma una gota en la que se emulsiona una parte de la colonia a estudiar, sobre el portaobjetos; si el microorganismo posee una catalasa, se observa un desprendimiento de burbujas de oxígeno, que no aparecerán en caso contrario.

##### 3.2.2.3.2.2.- Citocromooxidasas

Las oxidasas son enzimas capaces de activar el oxígeno gaseoso, de transferir dos electrones para producir agua oxigenada, o de fijar el oxígeno sobre un sustrato (BRISOU,1971).

La citocromooxidasas es un enzima ferroporfirí-

nico, presente en toda célula en la que funcione el sistema respiratorio de los citocromos.

Para su detección se utilizaron tiras de papel absorbente impregnado con los reactivos que se indican a continuación, y sobre los cuales, se extiende la colonia a estudiar. El método está basado en las descripciones de GORDON y MacLEOD (1928), y modificado por KOVACS (1956).

**Reactivos:**

- Clorhidrato de NN-dimetil-parafenil-diamina (Sigma, D-4139) en solución acuosa al 1%.
- Alfa-naftol (Merck, 6223), en solución alcohólica de 95% al 1%

En el caso de que el microorganismo posea un citocromo oxidasa, aparece una coloración azul intensa debida a la formación de azul de indofenol.

**3.2.2.3.2.3.- Prueba de inhibición enzimática (C.N.K.)**

Para el estudio de la sensibilidad al cianuro potásico (C.N.K.), como inhibidor enzimático se ha utilizado la técnica de BRAUN (1932), modificada por MOLLER (1954).

El medio está compuesto por agua peptonada tamponada, a la que se añade 0.5% de CNK (Mallinckrodt, 6881), hasta conseguir una concentración final del 1.5%.

Se distribuye en tubos, a razón de 1 ml por tubo. La siembra se realiza a partir de un cultivo de 18-24 horas. La reacción positiva se manifiesta por la inhibición del crecimiento bacteriano en 24 horas a 37°C.

3.2.2.3.3.- Metabolismo de los hidratos de carbono

3.2.2.3.3.1.- Vía de degradación de los hidratos de carbono (Prueba de Hugh-Leifson)

Para determinar si la bacteria degrada los glúcidos por vía oxidativa o fermentativa, se ha utilizado el medio de Hugh y Leifson, cuya composición es la siguiente:

- . Triptona (Difco,0123-01) - - - - - 2g
- . Cloruro sódico (Merck,6400) - - - - - 5g
- . Fosfato bipotásico (Merck,5099) - - - - - 0.3g
- . Agar (Difco,0140-01) - - - - - 2.5g
- . Azul de bromotimol (Merck,3026) - - - - - 0.03g
- . Agua destilada - - - - - 1000ml
- . pH=7.1

Una vez distribuido en tubos a razón de 10 ml, se esteriliza en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

Para su utilización se regenera el medio en baño a 100°C, añadiéndose el glúcido a estudiar de forma que queda a una concentración del 1%, y se solidifica después en agua fría.

Para estudiar el metabolismo oxidativo o fermentativo de la glucosa, seguimos las indicaciones de HUGH y LEIFSON (HUGH y LEIFSON,1953), tomando 2 tubos de este medio adicionados de glucosa y sembrándolos por picadura vertical a partir de un cultivo de 18-24 horas. Uno de ellos se cubre de una capa de parafina estéril y ambos se incuban a continuación a 37°C, examinándolos diariamente.

La producción de ácido se traduce por el virado del indicador de pH, pasando la coloración del medio

a amarillo. De esta forma se pueden distinguir:

- bacterias fermentativas, que dan reacción ácida en los 2 tubos, con o sin producción de gas.
- bacterias oxidativas, que dan reacción ácida sólo en el tubo abierto, mientras que en el tubo cerrado no se modifica el pH.
- bacterias inertes o inactivas, que no modifican el pH en ninguno de los dos tubos.

HUGH y LEIFSON (1953), demostraron que los microorganismos que oxidan la glucosa sin fermentarla, son incapaces de fermentar cualquier otro azúcar, siendo suficiente estudiar el metabolismo de los otros azúcares sólo en los tubos abiertos.

#### 3.2.2.3.3.2.- Fermentación butilenglicola (R. de Voges-Proskauer)

Esta reacción, descrita por Voges-Proskauer, permite descubrir en los cultivos microbianos la presencia de acetyl-methyl-carbinol, o acetona, metabolito intermediario de la fermentación butilenglicólica.

Se ha utilizado el medio Clark y Lubs (RMVP), cuya composición es:

- . Peptona (Difco,0149-01) - - - - - 7g
- . Fosfato bipotásico (Merck,5099) - - - - - 5g
- . Glucosa (Difco,0155-17) - - - - - 5g
- . Agua destilada - - - - - 1000ml
- . pH=7.0

El reactivo utilizado en la lectura de la reacción es:

- Alfa-naftol (Merck,6223), al 6% en alcohol de 96°
- Hidróxido sódico (Panreac), o potásico (Panreac Cod 131515) al 16%

El método utilizado en la reacción V.P., ha sido el descrito por RICHARD (RICHARD,1970 y 1972).

Se colocan 0.5 ml de medio base en un tubo de 22x220 mm. Se inocula e incuba a 37°C durante 18 h, tras lo cual se añaden 0.5 ml de alfa-naftol, y 0.5 ml de NaOH, se calienta hasta la ebullición, y luego se agita durante 1 minuto. La reacción positiva se manifiesta por un color franco.

#### 3.2.2.3.3.3.- Fermentación ácida mixta (R. de rojo de metilo)

Se ha utilizado, como en el caso anterior, el medio de Clark y Lubs.

El reactivo que se utiliza para su lectura es el siguiente:

- . Rojo de metilo (Difco,0207-13) - - - - - 0.1g
- . Alcohol de 96° - - - - - 300ml
- . Agua destilada - - - - - 200ml

Para la reacción del rojo de metilo, se colocan 0.5 ml del medio base en un tubo de 11x110 mm. Se inoculan e incuban durante un mínimo de 48 horas, al cabo de las cuales se realiza la lectura, añadiendo 1-2 gotas de indicador de rojo de metilo. La reacción positiva se traduce por una coloración roja (pH ácido).

#### 3.2.2.3.3.4.- Medio de Kligler

Se utiliza en la identificación de bacilos Gram negativos, basándose en la fermentación de la lactosa y de la glucosa (con o sin producción de gas), y la producción de sulfuro de hidrógeno.

El medio de Kligler, (Difco,0086-01), se prepara

diluyendo 55g en 1000 ml de agua destilada, haciéndolo hervir y esterilizándolo en autoclave.

Debe de solidificar inclinado, de forma que aproximadamente 2/3 del medio quede en pendiente (pico de flauta).

Se siembra, a partir de una colonia, el fondo por picadura y la pendiente en estrías centrales, y se incuba a 37°C durante 18-24 horas.

La utilización de este medio nos da 5 respuestas (LE MINOR,1972):

- Si la base del medio aparece de color amarillo, indica que la glucosa ha sido fermentada; en caso contrario el medio no cambia de color .
- Cuando el microorganismo tiene capacidad para fermentar la lactosa, aparece un color amarillo en la base del medio.
- La producción de sulfhídrico se verá en el apartado de enzimas diversos.
- También se puede averiguar si la cepa posee o no una lisina-decarboxilasa, mediante la técnica de CARLQUIST (CARLQUIST,1956).

#### 3.2.2.3.3.5.- Prueba de beta galactosidasa (Q.N.P.G.)

Sirve para diferenciar las bacterias con actividad lenta sobre la lactosa de aquellas que carecen absolutamente de actividad (BULLOW,1956; LE MINOR y BEN HAMIDA,1962).

Par que la lactosa sea fermentada por una bacteria es necesario que penetre en el interior de la célula bacteriana, lo que va a depender de una enzima (galactopermeasa), y que otra enzima intracelular, beta-galac-

tosidasa, desdoble la molécula en glucosa y galactosa.

Un microorganismo puede ser lactosa negativo porque carezca de galactopermeasa, a pesar de que posea beta galactosidasa.

Sin embargo, el orto-nitrofenilgalactósido (ONPG) se difunde fácilmente en la célula, donde es escindido por la misma enzima betagalactosidasa en orto-nitrofenil (que al quedar libre se traduce por una coloración amarilla) y en beta-galacto-piranósido.

El material necesario para realizar la prueba es:

- Solución salina fisiológica esteril.
- Discos de papel absorbente impregnados en ONPG (Inc., 17038).
- Cultivo del microorganismo de 18-24 horas.

En un tubo de hemólisis se colocan 0.25 ml de solución salina fisiológica estéril. Se realiza una emulsión densa del microorganismo, y se añade un disco de ONPG. Se examina a los 20 minutos, y tras 1,2,3 y 24 horas (BALLIVEAU et al. 1968). La existencia de una beta-galactosidasa se traduce, como ya se ha comentado anteriormente, por la aparición de una coloración amarilla.

#### 3.2.2.3.3.6.- Medio manitol movilidad

La utilización de este medio nos permite conocer:

- la movilidad del microorganismo
- la fermentación del manitol
- la existencia o no de una nitrataasa

Su composición y forma de uso ya ha quedado descrita en el apartado 3.2.2.3.1.

La fermentación del manitol por el microorganismo se demuestra por el cambio de pH, (acidificación) que sufre el medio, que hace cambiar su color rojo a amarillo.

### 3.2.2.3.3.7.- Medio base para azúcares

Se utiliza, tras la adición de los glúcidos correspondientes, para diferenciar los microorganismos que fermentan los hidratos de carbono, de los que no los fermentan, y para detectar los productos resultantes de dichas fermentaciones.

El medio base utilizado es el denominado agua de peptona con azul de bromotimol, cuya composición es:

- . Peptona (Difco,0149-01) - - - - - 15g
- . Cloruro sódico (Merck,6400) - - - - - 5g
- . Agua destilada - - - - - 1000ml
- . pH= 7.5-7.6

Esta mezcla se calienta hasta la ebullición durante 1 a 2 minutos, y tras comprobar el pH, se añade el indicador: 12 ml de solución de azul de bromotimol al 1/500, que se prepara de la siguiente forma:

- . Azul de bromotimol (Merck,3026) - - - - - 1g
- . NaOH N/10 (Panreac,131687) - - - - - 25ml
- . Agua destilada - - - - - 475ml

Posteriormente se distribuye en tubos, a razón de 5 a 10 ml y se esteriliza en autoclave a 115°C, durante 30 minutos.

Una vez preparado el medio base, el azúcar se añade de forma que quede a una concentración final

de 0.5-1%.

Los azúcares que se utilizan deben ser esterilizados por filtración. Entre ellos se han utilizado:

Pentosas = xilosa

Hexosas = glucosa

Disacáridos = trealosa, lactosa

Polialcoholes = dulcitol, inositol

Glicósidos = salicina

La reacción positiva se traduce por un virado del indicador de pH, de azul a amarillo, no debiendo darse como positiva hasta que no se produzca un cambio evidente y total de todo el medio.

#### 3.2.2.3.4.- Catabolismo de las sustancias nitrogenadas

##### 3.2.2.3.4.1.- Investigación de decarboxilasas y de hidrolasas

Lisina decarboxilasa (LDC), ornitina decarboxilasa (ODC) y arginina dehidrolasa (ADH), son enzimas inducidos elaborados durante la fase logarítmica del crecimiento bacteriano, que actúan sobre los aminoácidos correspondientes dando lugar a aminas terminales, en las cuales reside el interés desde el punto de vista de la identificación del microorganismo. La síntesis de estos enzimas se ve favorecida por el pH ácido (WOLFE y AMSTERDAM,1968), precisándose que el sustrato esté en el medio de cultivo para que el microorganismo pueda realizarla.

El medio utilizado ha sido el medio de Falkow (FALKOW,1958) sin peptona (RICHARD,1970; THIBAUT y LE MINOR,1957), adicionándose los aminoácidos correspondientes. Su fundamento es el siguiente:

- En una primera fase la cepa a investigar fermenta la glucosa existente en el cultivo y el medio se acidifica tomando color amarillo.
- En una segunda fase, y favorecido por el pH ácido, en presencia del sustrato, el microorganismo realiza la biosíntesis del enzima que actúa sobre aquel, dando lugar a la amina terminal, y a la alcalinización del medio, que volverá a tomar coloración violeta.

La composición del medio es la siguiente:

- . L-lisina (Merck,5700)(o L-ornitina, o L-arginina) 2.5g
- . Extracto de levadura (Difco,0127-01) - - - - - 1.5g
- . Glucosa (Difco,0155-17) - - - - - 0.5g
- . Bromocresol púrpura (Difco,0201-11)(1.6% en alcohol de 95°) - - - - - 0.5ml
- . Agua destilada - - - - - 500ml
- . pH= 6.3-6.4

Se esteriliza a 120°C, durante 15 minutos, distribuyéndose en tubos.

La siembra se realiza a partir de una suspensión de la cepa a estudiar en solución salina fisiológica estéril de forma que quede a una concentración de  $10^8$ - $10^9$  bacterias/ml. La cepa debe proceder de un cultivo en agar nutritivo.

Los tubos con el medio de Falkow se inoculan a razón de 5 gotas por tubo, recubriéndose su superficie con 1 ml de parafina líquida estéril.

Junto a estos tubos de racción, se debe utilizar siempre un tubo testigo sin sustrato. Se incuban a 37°C y deben examinarse durante 4 días.

La reacción positiva se manifestará por el virado del medio a violeta-púrpura, mientras que en caso de reacción negativa el medio permanecerá amarillo. El tubo testigo deberá quedar también amarillo, en caso contrario el resultado de la reacción no es válido.

#### 3.2.2.3.4.2.- Proteolisis de la gelatina

El método utilizado para investigar la hidrólisis de la gelatina, ha sido el preconizado por LE MINOR y PIECHAUD (1963), basado en la utilización de una película fotográfica previamente velada.

Para la búsqueda de la gelatinasa, se realiza una suspensión de bacterias en aproximadamente 0.5 ml de solución salina fisiológica estéril. Después se coloca una tira de la película, de forma que una parte queda sumergida y la otra no, sirviendo esta última como testigo de la reacción. Se le añaden 1-2 gotas de tolueno (Panreac, 141745) para acelerar la reacción y se tapa el tubo para evitar la evaporación, llevándose seguidamente a incubar a 37°C, debiéndose leer durante 4 días consecutivos.

La reacción positiva, (presencia de gelatinasa), se manifiesta por la liberación de las sales de plata de la película en la zona sumergida, quedando el soporte transparente.

#### 3.2.2.3.4.3.- Investigación de la ureasa

La ureolisis es una propiedad muy extendida entre los microorganismos. Se pone de manifiesto por una alcalinización del medio que contenga el sustrato específico (STUART et al. 1945).

El medio base utilizado es el medio urea-indol de

FERGUSON modificado por ROLLAND, et al. 1947, que sirve para valorar tres tipos de reacciones: búsqueda de la presencia de ureasa, producción de indol y determinación de la presencia de triptófano desaminasa.

La composición del medio es la siguiente:

- . L-triptófano (Merck,8374) - - - - - 3g
- . Fosfato monopotásico (Panreac,141509) - - - - - 1g
- . Fosfato bipotásico (Merck,5099) - - - - - 1g
- . Cloruro sódico (Merck,6400) - - - - - 5g
- . Urea (Merck,8488) - - - - - 20g
- . Alcohol de 95° - - - - - 10ml
- . Rojo de fenol (Flow 16-900-49) - - - - - 25mg
- . Agua destilada - - - - - 1000ml

La esterilización se realiza por filtración y se conserva a +4°C.

La siembra se realiza añadiendo unas gotas de la suspensión bacteriana espesa sobre 0.5 ml del medio. En la reacción positiva la enzima ureasa hidroliza la urea en amoníaco y anhídrido carbónico. Por producción de amoníaco se alcaliniza el medio, con lo que éste toma un tinte rojizo.

#### 3.2.2.3.4.4.- Producción de indol

La detección de la presencia de indol se realiza mediante la adición de reactivo de KOVACS (KOVACS,1928), que producirá una coloración rojiza en la superficie del medio.

El medio base utilizado es el urea-indol anteriormente citado.

El reactivo de KOVACS está compuesto por:

- . Paradimetil-amino-benzaldehido (Merck,3058) - - - 5g
- . Alcohol amílico (Merck,975) - - - - - 75ml
- . Ac. clorhídrico concentrado (PRS,141019) - - - 25ml

### 3.2.2.3.4.5.- Fenilalanin-desaminasa

El medio utilizado ha sido el agar fenilalanina, en el cual la fenilalanina es transformada en ácido fenil-pirúvico por la enzima fenilalanina-desaminasa. Como revelador de la reacción se utiliza cloruro férrico, al 10% en agua destilada.

El medio agar de fenilalanina está compuesto de:

- . Extracto de levadura (Difco,0127-01) - - - - - 3g
- . Fosfato bipotásico (Merck,5099) - - - - - 1g
- . Cloruro sódico (Merck,6400) - - - - - 5g
- . D-L-fenilalanina (Merck,7256) - - - - - 2g
- . Agar (Difco,0140-01) - - - - - 12g
- . Agua destilada - - - - - 1000ml

Para su utilización se distribuye en tubos y se esteriliza en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

Una vez sacado del autoclave, los tubos se colocan de forma que la solidificación del medio sea en pendiente.

La siembra se realiza por estría en superficie, que se incuba en estufa a 37°C durante 18-24 horas.

Para la lectura se le añaden 4-5 gotas de la solución de cloruro férrico, manifestándose la presencia de ácido fenil-pirúvico, por la aparición inmediata de una coloración verde intenso.

### 3.2.2.3.5.- Acción sobre las sales de ácidos orgánicos

#### 3.2.2.3.5.1.- Utilización del citrato

Se investiga la capacidad que presentan ciertas bacterias de utilizar el citrato como fuente de carbono (SIMMONS,1926).

El medio utilizado es el agar citrato de Simmons; es un medio sintético, que tiene como fuente de nitrógeno el fosfato de amonio, y como única fuente de carbono el citrato de sodio.

La composición del medio es la siguiente:

- . Sulfato de magnesio (Merck,5886) - - - - - 0.2g
- . Fosfato de amonio (Merck,1126) - - - - - 1g
- . Fosfato bipotásico (Merck,5099) - - - - - 1g
- . Citrato de sodio (Mallinckrodt,0754) - - - - - 2g
- . Cloruro sódico (Merck,6400) - - - - - 5g
- . Agar (Difco,0140-01) - - - - - 15g
- . Azul de bromotimol (Merck,3026) - - - - - 0.08g
- . Agua destilada - - - - - 1000ml

Una vez preparado el medio se distribuye en tubos y se esteriliza a 121°C, durante 15 minutos. A continuación, se colocan los tubos de forma que el medio solidifique en pendiente.

La siembra del microorganismo a estudiar se realiza a partir de un medio sólido, y la utilización del citrato se manifiesta por el cambio de coloración que sufre el medio, pasando de verde a azul.

#### 3.2.2.3.5.2.- Utilización del malonato

Se utiliza un medio líquido cuya composición es la siguiente:

- . Extracto de levadura (Difco,0127-01) - - - - - 1g
- . Sulfato de amonio (Merck,1217) - - - - - 2g
- . Fosfato bipotásico (Merck,5099) - - - - - 0.6g
- . Fosfato monopotásico (Panreac,141509) - - - - - 0.4g
- . Cloruro sódico (Merck,6400) - - - - - 2g
- . Malonato de sodio (Merck,6527) - - - - - 6g
- . Azul de bromotimol, a 1/500 (Merck,3026) - - - - 12.5ml
- . Agua destilada - - - - - 1000ml
- . pH= 6.1

Una vez preparado el medio se reparte en tubos a razón de 5 ml, y se esteriliza en autoclave a 120°C durante 15 minutos.

La siembra se realiza por emulsión espesa del microorganismo en el medio, y se incuba a 37°C, durante 72 horas.

Si el microorganismo utiliza el malonato de sodio como única fuente de carbono, el medio sufre un cambio de coloración pasando de amarillo verdoso a azul intenso (EWING et al. 1957; LE MINOR y BEN HAMIDA, 1962).

### 3.2.2.3.5.3.- Utilización del tartrato

Se utiliza un medio líquido compuesto por:

- . D-Tartrato (Merck,6663) - - - - - 10g
- . Peptona (Difco,0149-01) - - - - - 10g
- . Hidróxido sódico N/10 (Panreac,131687) - - - - - 8.5ml
- . Azul de bromotimol al 1/500 (Merck,3026) - - - - 12ml
- . Agua destilada - - - - - 1000ml
- . pH= 7.4

Se reparten en tubos a razón de 3 ml esterilizando en autoclave a 115°C, durante 15 minutos.

La siembra se realiza por emulsión espesa, siendo preferible sembrar dos tubos para así, poder realizar una lectura precoz (a los dos días), y otra tardía (a los 7 días).

Para la lectura, se añaden 0.5 ml de solución saturada de acetato de plomo. Si la reacción es positiva se formará un precipitado que ocupa las dos terceras partes del tubo (LE MINOR,1972).

#### 3.2.2.3.5.4.- Utilización del mucato

El medio base utilizado es el agua peptonada al azul de bromotimol cuya composición es la siguiente:

- . Peptona (Difco,0149-01) - - - - - 15g
- . Cloruro de sodio (Merck,6400) - - - - - 5g
- . Agua destilada - - - - - 1000ml
- . pH= 7.5-7.6

La mezcla, se calienta hasta la ebullición durante 1-2 minutos, y tras comprobar el pH, se le añade el indicador: 12 ml de azul de bromotimol al 1/500 que se prepara de la siguiente manera:

- . Azul de bromotimol (Merck,3026) - - - - - 1g
- . NaOH N/10 (Panreac,131687) - - - - - 25ml
- . Agua destilada - - - - - 475ml

Una vez preparado el medio base, el mucato se añade de forma que quede a una concentración de 0.5 a 1%.

Posteriormente se distribuye en tubos a razón de 3 ml, y se esteriliza en autoclave a 115°C durante 30 minutos.

La siembra se realiza por emulsión a partir de un cultivo de 18-24 horas.

### 3.2.2.3.6.- Investigación de enzimas diversos

#### 3.2.2.3.6.1.- Nitrataasa

Esta prueba trata de poner en evidencia la propiedad que tienen ciertos microorganismos de reducir los nitratos en nitritos (WALLACE y MEAVE,1927), para lo cual es necesaria la adición de los reactivos A y B de Griess al medio empleado, que es el de manitol-movilidad (ya descrito en el apartado 3.2.2.3.1.).

La composición de los reactivos es la siguiente:

#### Reactivo A

- . Acido sulfanílico (Mallinckrodt,2864) - - - - - 0.8g
- . Acido acético 5N (Panreac,131008) - - - - - 100ml

#### Reactivo B

- . Alfa naftilamina (Merck,6245) - - - - - 0.5g
- . Acido acético 5N (Panreac,131008) - - - - - 100ml

La preparación del ácido acético 5N se realiza agregando una parte de ácido acético glacial a 2.5 partes de agua.

Para la lectura se añaden los reactivos A y B a partes iguales. La reducción de los nitratos a nitritos se pone de manifiesto por el cambio de coloración, apareciendo el medio con un color rojo fuerte en 1 a 2 minutos.

Si la reacción es negativa (medio coloreado de amarillo), puede ser debido a que los nitratos no se hayan reducido, o a que la reducción haya sido completa,

sobrepasando el estadio de nitritos, transformándose en amoníaco o nitrógeno. Para discernir entre ambas posibilidades se añadirá un poco de zinc en polvo, con lo cual, si los nitratos no han sido metabolizados, se reducirán químicamente al contacto con el zinc, apareciendo una coloración rojiza alrededor de las partículas de Zn. Si los nitratos habían pasado a amoníaco o nitrógeno, el medio permanece invariable, siendo considerada entonces la reacción como positiva.

#### 3.2.2.3.6.2.- Producción de sulfhídrico

La producción de sulfhídrico testimonia la desintegración de las peptonas y de sus aminoácidos azufrados (ZOBELL y FELTHAM,1934; CLARKE,1953).

El medio utilizado para su estudio ha sido el agar de Kligler, ya descrito en el apartado 3.2.2.3.3.4.

La producción de sulfhídrico se traduce por un ennegrecimiento del medio en la zona de unión entre la base y la porción inclinada.

#### 3.2.2.3.6.3.- Tetrionato-reductasa

La investigación de la tetrionato reductasa tiene especial interés en las bacterias Gram-negativas anaerobias facultativas (LE MINOR y PIECHAUD, 1963), y sobre todo en Salmonella (LE MINOR,1967).

Se ha utilizado un método simplificado sobre medio líquido (LE MINOR,1972) cuya composición es la siguiente:

- . Tetrionato de potasio (Merck,5169) - - - - - 5g
- . Azul de bromotimol al 1/50 (Merck,3026) - - - - 25ml
- . Agua peptonada - - - - - 1000ml
- . pH= 7.4

Se esteriliza por filtración y se reparte en tubos estériles a razón de 3 ml. Este medio puede ser conservado durante varias semanas a 4°C.

Se siembra por emulsión de la cepa a estudiar, que se incuba en estufa a 37°C.

La reacción positiva se manifiesta por el virado de color del medio, que pasa a amarillo en 1-3 días, mientras que será negativa si no se produce el cambio de coloración en 5 días. Pasado este tiempo, puede producirse una acidificación espontánea del medio con el consiguiente cambio de color, por lo que ya no es válida la lectura (LE MINOR y PICHINOTY,1963; NICOLLE y LE MINOR,1965).

### 3.2.3.- Diferenciación general de las enterobacteriaceas

Los componentes de esta familia se definen como cocobacilos Gram-negativos, oxidasa negativos y no formadores de esporas. Son móviles, por flagelos peritricos o inmóviles; son aerobios-anaerobios facultativos, fermentan la glucosa, son catalasa positivos (excepto en el caso de S. dysenteriae 1) y reducen los nitratos a nitritos (excepto algunas especies de Erwiniae)(MARTIN y WASHINGTON,1980; ORSKOV y ORSKOV,1981).

Se clasifican en 5 tribus en base a las siguientes características (tabla 13):

- Patrón de fermentación
- Rojo de metilo
- Voges-Proskauer
- Fenil-alanina-desaminasa
- Reducción de los nitratos
- Hidrólisis de la urea
- Crecimiento en KCN

Los componentes de las tribus I, IV y V utilizan la vía ácido-mixta. La tribu Erwiniae (tribu V) también puede fermentar los carbohidratos produciendo 2-3 butanediol, mientras que los componentes de la tribu II sólo pueden utilizar esta última vía para realizar el proceso de fermentación.

Los microorganismos de las tribus I, III y IV y algunas especies de la tribu II son rojo metilo positivos.

Algunas especies de las tribus II, III y V pueden dar positiva la reacción de Voges-Proskauer.

TABLA 13

CARACTERES DIFERENCIALES DE LAS ENTEROBACTERIACEAE

	TRIBU I Escherichieae	TRIBU II Klebsielleae	TRIBU III Proteeae	TRIBU IV Yersinieae	TRIBU V Erwinieae
Patrón fermentación	Acido-mixta	2-3 butanediol		Acido-mixta	Acido-mixta y 2-3 butanediol
R.M.	+	D	+	+	
V.P.	-	D	D	-	D
F.A. desaminasa	-	-	+	-	D
Reducción nitratos	+	+	+	+	D
Ureasa	-	D	D	D	-
Crecimiento en KCN	D	+	+	-	D

D: diferentes reacciones por diferentes especies de un género.

BUCHANAN y GIBBONS, 1974 (tomado de ORSKOV, F, 1981).

La tribu Proteeae posee una fenil-alanina desaminasa, del mismo modo que algunas especies de Erwiniae.

Todos reducen los nitratos en nitritos, excepto algunos tipos de Erwiniae, como ya señalábamos con anterioridad. Esta tribu y la tribu Escherichieae no producen nunca hidrólisis de la urea. Por otro lado, los microorganismos de la tribu Yersinieae no son capaces de crecer en medio de KCN.

3.2.4.- Estudio general de las principales etiologías bacterianas de las gastroenteritis infantiles

3.2.4.1.- Aislamiento de Salmonella

3.2.4.1.1.- Identificación bioquímica de Salmonella

La identificación química se ha realizado siguiendo una serie de estadios:

3.2.4.1.1.1.- Primer estadio

Se utiliza una batería de pruebas compuesta por:

- Medio de Kligler
- Medio de manitol-movilidad
- Medio de citrato de Simmons
- Medio de fenil-alanina
- Medio de urea-indol
- Prueba de ONPG

Posteriormente, a partir del cultivo en medio de Kligler, se investiga la presencia de citocromo-oxidasa.

3.2.4.1.1.2.- Segundo estadio

En él investigamos la L.D.C., O.D.H. y A.D.H., así como la acetoina y rojo de metilo mediante:

- Medio de Falkow con aminoácidos
- Medio MR-VP

3.2.4.1.1.3.- Tercer estadio

En este tercer estadio incluimos las pruebas bioquímicas para la clasificación de Salmonella, dentro de los subgéneros de Kauffmann, así como para los biotipos de S. typhimurium y S. typhi.

#### 3.2.4.1.1.3.1.- Subgéneros de Kauffmann (tabla 14)

- Utilización del malonato de sodio
- Fermentación del dulcitol
- Fermentación de la salicina
- Fermentación de la lactosa
- Proteólisis de la gelatina
- Utilización de D-tartratos
- Utilización del mucato
- Prueba de la ONPG, que ya se realiza en el primer estadio. Crecimiento del KCN.

#### 3.2.4.1.1.3.2.- Biotipos de S. typhi (tabla 15)

Para el estudio de los biotipos S. typhimurium, se ha seguido el esquema de clasificación propuesto por CORDANO et al. 1971, según el cual, las pruebas bioquímicas necesarias son: (tabla 16)

- Fermentación del inositol
- Fermentación de la trehalosa
- Presencia de la tetraciónato reductasa
- Fermentación de D-tartratos ya utilizados en la investigación de los subgéneros de KAUFFMANN.

#### 3.2.4.1.2.- Estudio de la estructura antigénica

Nos hemos basado en el esquema antigénico de KAUFFMANN, que agrupa los serotipos de las especies del género Salmonella, de acuerdo al factor antigénico del grupo.

Dicho esquema está dividido en columnas, en la primera de las cuales se indica el nombre del serotipo de Salmonella, y en las siguientes, la estructura antigénica (la segunda para Antígenos O, la tercera y cuarta para los Antígenos H, en su primera y segunda fase respectivamente)(tabla 17).

TABLA 14

SUBGENEROS DE KAUFFMAN

	s.g.I	s.g.II	s.g.III	s.g.IV
DULCITOL	+	+	-	-
LACTOSA	-	-	+/x	-
O.N.P.G.	-	-/x	+	-
SALICINA	-	-	-	+
GELATINA	-	+	+	+
MALONATO	-	+	+	-
D-TARTRATO	+	-/x	-/x	-/x
KCN	-	-	-	+
MUCATO	+	+	+/-	-

+ Reacción positiva

- Reacción negativa

x Reacción tardía irregularmente positiva

TABLA 15

BIOTIPOS DE SALMONELLA TYPHI

	<u>BIOTIPO I</u>	<u>BIOTIPO II</u>
XILOSA	+	-

---

---

TABLA 16

BIOTIPOS DE SALMONELLA TYPHIMURIUM

	<u>TTR</u>	<u>INOSITOL</u>	<u>TREHALOSA</u>	<u>D-TARTRATO</u>
a	+	+	+	+
b	+	-	+	+
c	+	+	-	+
d	+	+	+	-
e	+	-	+	-
f	-	+	+	+
g	-	+	-	+
h	-	-	+	+

---

TABLA 17

ESQUEMA ANTIGÉNICO DE KAUFFMAN (REDUCIDO)

ESPECIE	GRUPO	FORMULA ANTIGENICA	
		AgO	AgH
		FASE I	FASE II
<i>S. Paratyphi A</i>	A 1,2,12	a	-
<i>S. paratyphi B</i>	B 1,4,5,12	b	1,2,
<i>S. stanley</i>	1,4,5,12	d	1,2,
<i>S. derby</i>	1,4,5,12	f,g	(1,2)
<i>S. californica</i>	4,12,	g,m,t	-
<i>S. typhimurium</i>	1,4,5,12	i	1,2,
<i>S. typhimurium</i> var. copenhagen	1,4,12	i	1,2,
<i>S. bredeney</i>	1,4,12,27	1,v	1,7,
<i>S. heidelberg</i>	1,4,5,12	r	1,2,
<i>S. colera suis</i>	C <sub>1</sub> 6,7,	(c)	1,5.
<i>S. montevideo</i>	6,7,	g,m,(p)s	-
<i>S. oranienburg</i>	6,7,	n,t,	-
<i>S. muenchen</i>	C <sub>2</sub> 6,8,	d	1,2,
<i>S. newport</i>	6,8,	e,h,	1,2,
<i>S. miami</i>	D 1,9,12	a	1,5,
<i>S. typhi</i>	9,12,(v <sub>i</sub> )	d	-
<i>S. enteritidis</i>	1,9,12	g,m,	-
<i>S. berta</i>	1,9,12	f,g,t,	-
<i>S. dublin</i>	1,9,12	g,p,	-
<i>S. panama</i>	1,9,12	1,v,	1,5,
<i>S. gallinarum-pullorum</i>	1,9,12	-	-
<i>S. anatum</i>	E <sub>1</sub> 3,10,	e,h,	1,6,
<i>S. newington</i>	E <sub>2</sub> 3,15,	e,h,	1,6,
<i>S. illonis</i>	E <sub>3</sub> 3,15,34	z <sub>10</sub>	1,5,
<i>S. poona</i>	G 1,13,22	z	1,6,
<i>S. worthington</i>	1,13,23	z	1,w,
<i>S. cubana</i>	1,13,23	z <sub>29</sub>	-

El esquema de KAUFFMANN es revisado y completado por el Centro Internacional de Salmonella mediante suplementos anuales, referentes a las cepas aisladas en el año anterior y que presentaban estructura antigénica nueva (KAUFFMANN, 1975; LE MINOR et al. 1975, 1976, 1977, 1978; LE MINOR et al. 1979).

La clasificación serológica del Género Salmonella se ha realizado mediante el estudio de los siguientes antígenos:

- Antígeno capsular (Vi): Antígeno de superficie descrito por FELIX y PITT, al que atribuyeron la virulencia. Sólo existe en tres serotipos conocidos: S. typhi, S. paratyphi c. y S. dublin.

- Antígeno somático (O): Es el antígeno más importante en el diagnóstico de los grupos serológicos, KAUFFMANN y WHITE demostraron que los antígenos O de Salmonella están compuestos por diversos factores antigénicos, que son designados por dígitos (del 1 al 67). Alguno de estos factores son comunes a diversos serotipos siendo reunidos en serogrupos (tabla 18).

- Antígeno flagelar (H): Dentro de él se han observado serotipos mono y difásicos, e incluso se han descrito algunos serotipos trifásicos y cuadrifásicos aunque son extremadamente raros.

#### 3.2.4.1.2.1.- Descripción de los inmunosueros

Los sueros aglutinantes anti-Salmonella se preparan por inmunización de conejos, por medio de suspensiones bacterianas de cepas seleccionadas. Para su conservación y posterior uso se esterilizan por filtración y se les añade solución de methiolate al uno por mil.

TABLA 18

SEROGRUPOS " 0 "

GRUPO	FACTORES	GRUPO	FACTORES
A	1,2,12	Q	39
B	1,4,5,12	R	40
C <sub>1</sub>	6,7,	S	41
C <sub>2</sub>	6,8,	T	42
C <sub>3</sub>	(8),20	U	43
D <sub>1</sub>	1,9,12	V	44
D <sub>2</sub>	9,46,	W	45
E	1,3,10,15,19,34	X	47
E <sub>1</sub>	3,10,	Y	48
E <sub>2</sub>	3,15,	Z	50
E <sub>3</sub>	(3),(15),34	51	51
E <sub>4</sub>	1,3,19	52	52
F	11,	53	53
G	13,22,23,(36),(37)	54	54
G <sub>1</sub>	13,22,(36),	55	55
G <sub>2</sub>	1,13,23,(37),	56	56
H	1,6,14,24,25	57	57
I	16,	58	58
J	17,	59	59
K	18,	60	60
L	21,	61	61
M	28,	64	64
N	30,	65	65
O	35,	66	66
P	38,	67	67

3.2.4.1.2.1.1.- Sueros polivalentes de orientación diagnóstica:

3.2.4.1.2.1.1.1.- Mezclas (aglutininas anti-0)

- OMA: compuesta por aglutininas anti-0, de los grupos A.B.D.E.L.
- OMB: aglutininas anti-0 de los grupos C.F.G.H.
- OMC: aglutininas anti-0, de los grupos I.J.K.M.N.O.P.
- OMD: aglutininas anti-0, de los grupos Q.R.S.T.U.V.W.
- OME: aglutininas anti-0, de los grupos X.Y.Z.+51,+52,+53
- OMF: aglutininas anti-0, de los grupos +54,+55,+56,+57,+58,+59
- OMG: aglutininas anti-0, de los grupos +60,+61,+62,+63,+64,+65,+66,+67

Todo cultivo de Salmonella 0-aglutinable, será inmediatamente aglutinado por una de ellas.

La mayor parte de Salmonella de origen humano poseen un antígeno 0 correspondiente a las aglutininas contenidas en las mezclas OMA y OMB.

3.2.4.1.2.1.1.2.- Mezclas flagelares (aglutininas anti-H)

- HMA: a + b + c + d + i + z<sub>10</sub><sup>+</sup> z<sub>29</sub>
- HMB: e,h + en (.) + G (.)
- HMC: k + y + z + L (.) + z<sub>4</sub>(.) + r
- HMD: z<sub>35</sub><sup>+</sup> z<sub>36</sub><sup>+</sup> z<sub>38</sub><sup>+</sup> z<sub>39</sub><sup>+</sup> z<sub>41</sub><sup>+</sup> z<sub>42</sub><sup>+</sup> z<sub>44</sub>
- HME: z<sub>33</sub><sup>+</sup> z<sub>37</sub><sup>+</sup> z<sub>43</sub><sup>+</sup> z<sub>45</sub><sup>+</sup> z<sub>46</sub><sup>+</sup> l (.)
- HMF: z<sub>47</sub><sup>+</sup> z<sub>48</sub><sup>+</sup> z<sub>49</sub><sup>+</sup> z<sub>50</sub><sup>+</sup> z<sub>52</sub>
- HMG: z<sub>53</sub><sup>+</sup> z<sub>54</sub><sup>+</sup> z<sub>55</sub><sup>+</sup> z<sub>56</sub><sup>+</sup> z<sub>57</sub><sup>+</sup> z<sub>58</sub><sup>+</sup> z<sub>59</sub>

A su vez los sueros H marcados con (.) son mezclas compuestas por los siguientes sueros:

- H: 1 = 1.2 + 1.5 + 1.6 + 1.7 + z<sub>6</sub>

- H: L = L,v + L,w + L,z<sub>13</sub> + L,z<sub>28</sub> + L,z<sub>40</sub>
- H: en = e,n,x + e,n,z<sub>15</sub>
- H: z<sub>4</sub> = z<sub>4</sub>,z<sub>23</sub> + z<sub>4</sub>,z<sub>24</sub> + z<sub>4</sub>,z<sub>32</sub>
- H: G = f,g, + g,p + g,m,s + g,m + m,t

3.2.4.1.2.1.2.- Sueros monovalentes destinados al estudio de la fórmula antigénica

3.2.4.1.2.1.2.1.- Sueros monovalentes anti-0

1,2	8	13,22	21	40	46	53	59
4	9	13,23	28	41	47	54	60
5	3,10	6,14,24	30	42	48	55	61
6,7	3,15	16	35	43	50	56	62
7	1,3,19	17	38	44	51	57	63
6,8	11	18	39	45	52	58	64

65

66

67

Suero Vi

3.2.4.1.2.2.2.- Sueros Monovalentes anti-H

a	k	v	z <sub>15</sub>	z <sub>36</sub>	z <sub>44</sub>	2
b	m	w	z <sub>23</sub>	z <sub>37</sub>	z <sub>45</sub>	5
c	p	x	z <sub>24</sub>	z <sub>38</sub>	z <sub>46</sub>	6
d	q	y	z <sub>27</sub>	z <sub>39</sub>	z <sub>47</sub>	7
eh	r	z	z <sub>28</sub>	z <sub>40</sub>	z <sub>48</sub>	
f	s	z <sub>6</sub>	z <sub>29</sub>	z <sub>41</sub>	z <sub>49</sub>	
h	t	z <sub>10</sub>	z <sub>32</sub>	z <sub>42</sub>	z <sub>51</sub>	
i	u	z <sub>13</sub>	z <sub>35</sub>	z <sub>43</sub>	z <sub>52</sub>	

3.2.4.1.2.1.3.- Sueros polivalentes anti-H para inversión de fases (método de SVEN-GARD)

- SG1 = aglutininas anti a + b + c
- SG2 = aglutininas anti d + i + e,h

- SG3 = aglutininas anti k + y + L,v + L,w + L,z<sub>13</sub> +  
L,z<sub>28</sub>
- SG4 = aglutininas anti r + z
- SG5 = aglutininas anti e + n,x + e,n,z<sub>15</sub>
- SG6 = aglutininas anti 1,2 + 1,5 + 1,6 + 1,7

#### 3.2.4.1.2.2.- Pauta seguida para la investigación de la fórmula antigénica

El estudio de la fórmula de Salmonella se ha realizado según las indicaciones de LE MINOR (1972), mediante aglutinación directa sobre porta-objetos.

La cepa que previamente había sido calificada bioquímicamente como especie de Salmonella se procesa del siguiente modo:

1. Se inocular a partir del cultivo en el medio de Kligler, en agar semisólido dispensado en placa de Petri, por simple contacto en el centro del medio, para exaltar la movilidad y se incuba en estufa a 37°C durante 18-24 horas, con lo que se obtiene una difusión del cultivo por la superficie del medio.

2. La aglutinación somática se efectúa a partir de la zona central del cultivo, para lo cual y en primer lugar, se realiza una suspensión en suero fisiológico, para detectar la eventual autoaglutinación de la cepa, fenómeno que ocurre excepcionalmente, procediéndose después a ensayar el suero anti-Vi y los polivalentes somáticos (OMA, OMB, etc...). En los casos en que se detecta una cepa "O" inaglutinable y "Vi" aglutinable, se efectúa una suspensión densa en solución salina fisiológica del microorganismo en cuestión, y se mantiene a 60°C durante 1 hora, volviendo de nuevo a aglutinar con los polivalentes somáticos.

3. Una vez aglutinada la cepa con uno de los antisueros polivalentes somáticos, se continúa el estudio

con cada uno de los sueros monovalentes incluidos en dicha mezcla.

4. La aglutinación flagelar fase I, se realiza a partir de la periferia del cultivo, de forma similar a la descrita para la investigación de los antígenos somáticos, es decir, ensayando en primer lugar los anti-sueros flagelares polivalentes, y a continuación los monovalentes que integran la mezcla reactiva.

5. Una vez conocida la fórmula flagelar fase I, se realiza la inversión según el método de SVEN-GARD para poner de manifiesto los antígenos flagelares fase II, para lo cual a 30 ml de agar semisólido (7.5% de agar) fundido y mantenido a 45°C, se le añaden 1 gota, o de la mezcla inversora de la fase correspondiente, o del suero específico monovalente fase I dispensándose sobre una placa de Petri. Una vez solidificado el medio, la cepa problema se siembra por simple contacto con el centro del medio y se incuba en estufa a 37°C durante 18-24 horas. Finalmente, tras el periodo de incubación, se comienza de nuevo la investigación de los antígenos polivalentes, y en último lugar, de los monovalentes correspondientes.

### 3.2.4.2.- Aislamiento de Shigella

#### 3.2.4.2.1.- Identificación bioquímica de Shigella

Para ello, se ha planteado una serie corta de pruebas, descritas por DOUGLAS et al. (1966), con algunas modificaciones.

Esta batería consta de :

- Urea-Indol (Ferguson)
- Kligler
- Manitol-movilidad
- Beta-galactosidasa
- Fenil-alanina-desaminasa
- Citrato de Simmons
- Gelatinasa (método del film)
- Medio de Falkow.

O bien, la sustitución de todos ellos por una tira del sistema API 20E.

Los caracteres bioquímicos que permiten establecer que el germen estudiado es una Shigella, se expresan en las tablas 19 y 20 (LE MINOR,1972; COWAN y STEEL,1974).

#### 3.2.4.2.2.- Determinación del subgrupo y serotipo

Para la separación de los diversos subgrupos se utilizan, como indicó THIBAUT (1958), criterios bioquímicos y serológicos.

Cada serotipo posee una serie de caracteres bioquímicos que lo definen, pero además debe ser confirmado por serología, mediante la técnica de aglutinación en portaobjetos.

El diagnóstico bioquímico de los subgrupos y

TABLA 19

DIAGNÓSTICO BIOQUÍMICO DEL GRUPO SHIGELLA

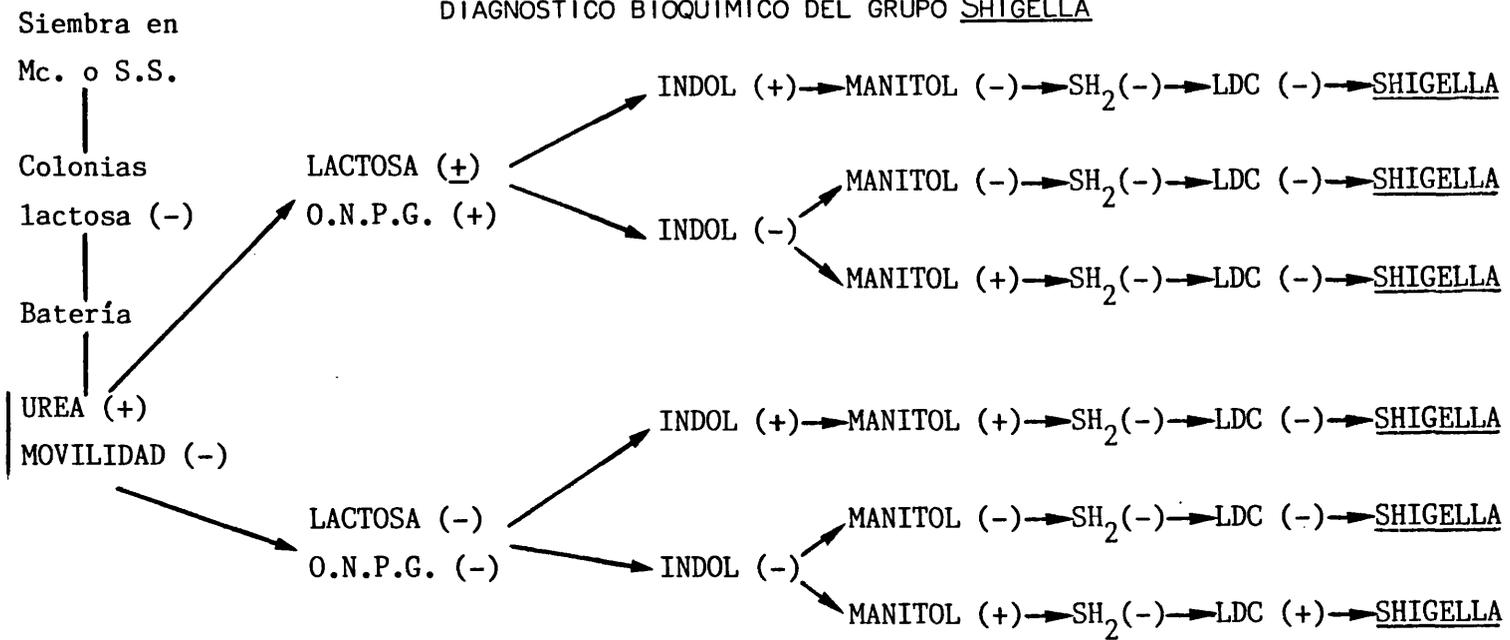


TABLA 20

SHIGELLA/REACCIONES BIOQUIMICAS DE LOS  
DIVERSOS SEROTIPOS

Serotipos		Indol	Mani- tol	Dulci- tol	Ramosa	Maltosa	Arabi- nasa	Xilosa	Sorbi- tol
<u>Shigella</u>	1	-	-	-	-	x	-	-	-
<u>Dysenteriae</u>	2	+	-	-	+ -	- (+)	- +	-	x
	3	-	-	-	-	x	+ -	-	x
	4	-	-	-	-	x	x	-	x
	5	-	-	(+)	-	-	+	-	+ (+) -
	6	-	-	-	-	-	+	-	x
	7	+	-	-	(+)	(+)	+	-	-
	8	+	-	-	+ -	+	+	+	x
	9	-	-	-	-	(+)	+	+	-
	10	-	-	-	-	(+)	+	+	+
<u>Shigella</u>	1	- +	+	-	x	x	x	-	-
<u>flexneri</u>	2	- +	+	-	x	+ -	+ -	-	- +
	3	+ -	+	-	+ -	+ -	+ -	-	+ (+) -
	4	+ -	d	-	x	+ (+) -	+ -	- +	+ -
	5	+ -	+	-	x	x	+ -	-	-
	6	-	d	+ -	- +	+ -	x	-	-
<u>Shigella</u>	1	-	+	-	-	x	+	+ -	+
<u>boydii</u>	2	-	+	-	-	+ (+)	+	- +	x
	3	-	+	+ (+)	-	-	+	+	+
	4	-	+	- +	-	+ -	+	-	-
	5	+	+	-	-	-	(+)	(+)	-
	6	-	+	(+)	-	-	+	(+)	-
	7	+	+	-	-	(+) -	+	+	+ -
	8	-	+	-	-	(+)	+	(+)	+ (+)
	9	+	+	-	(+)	(+)	- +	-	+
	10	-	+	(+)	-	(+)	+	(+)	+
	11	+	+	-	+	(+)	+	-	x
	12	-	+	-	-	-	+	-	-
	13	+	+	-	-	-	+	-	+
	14	-	+ -	-	-	+ -	-	(+)	+
	15	+	+	-	-	-	+	-	-
<u>Shigella</u>		-	+	-	+	+	+	d	-
<u>sonnei</u>									

+ = positivo en 24h; (+) = positivo pasadas 48h; d = diferentes tipos; - = negativo durante 30 días; x = tardamente positivo o negativo. Los signos estan dispuestos según el orden de su frecuencia decreciente.

serotipos queda resumido en las tablas 21,22,23 y 24 (OLIVIER,1963; LE MINOR,1972; COWAN y STEEL,1974; DAGUET, 1977).

El diagnóstico diferencial entre Sh. sonnei y los demás subgrupos de Shigella, viene indicado en la tabla 25 (OLIVIER,1963; LE MINOR,1972; COWAN y STEEL, 1974; DAGUET,1977).

TABLA 21

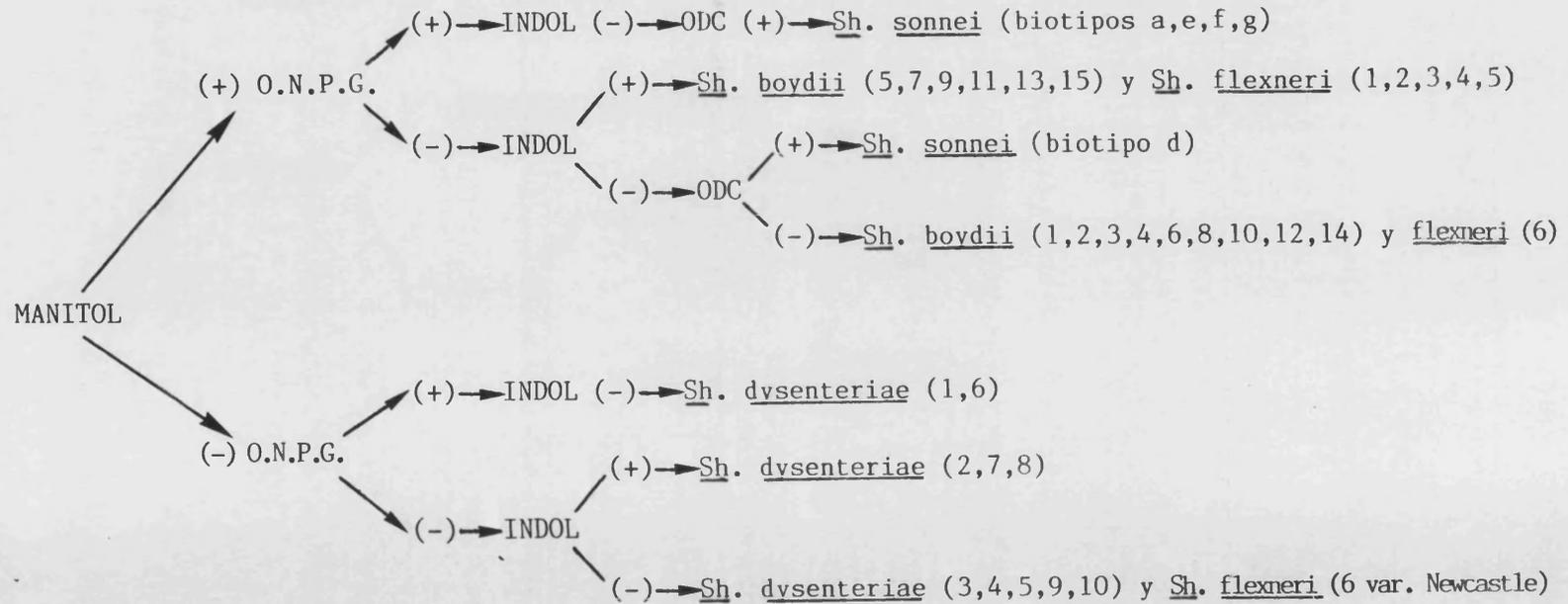


TABLA 22

DIAGNÓSTICO BIOQUÍMICO DE LOS SEROTIPOS DEL SUBGRUPO A

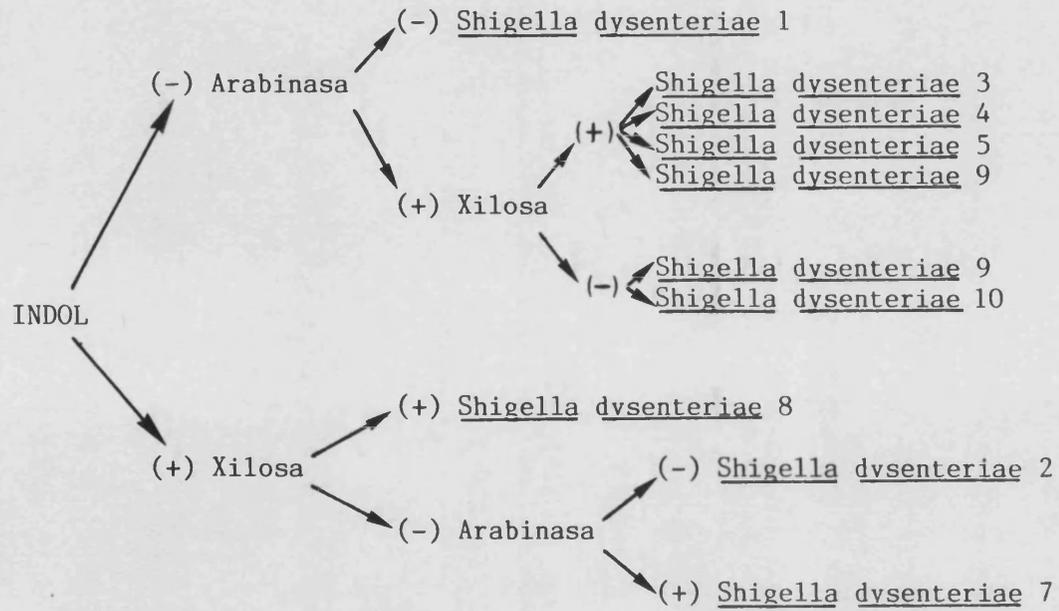
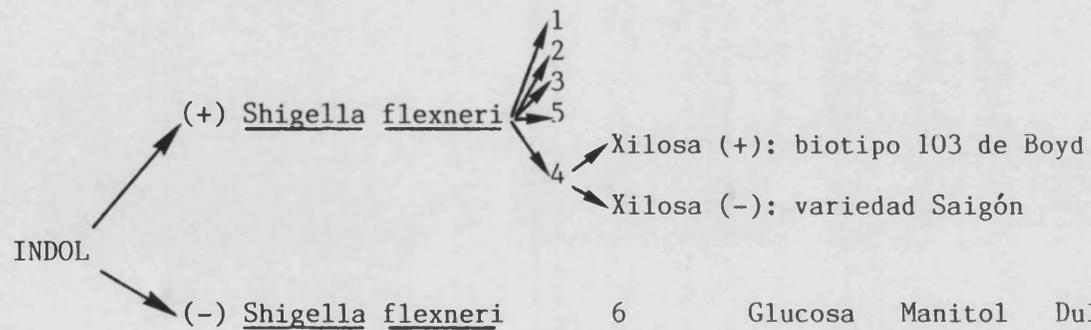


TABLA 23

DIAGNÓSTICO BIOQUÍMICO DE LOS SEROTIPOS DEL SUBGRUPO B



6	Glucosa	Manitol	Dulcitol
Boyd 88	+	+	+
Manchester	+ gas	+ gas	+ gas
Mewcastle	+ gas	-	+ gas

TABLA 24

DIAGNÓSTICO BIOQUÍMICO DE LOS SEROTIPOS DEL SUBGRUPO C

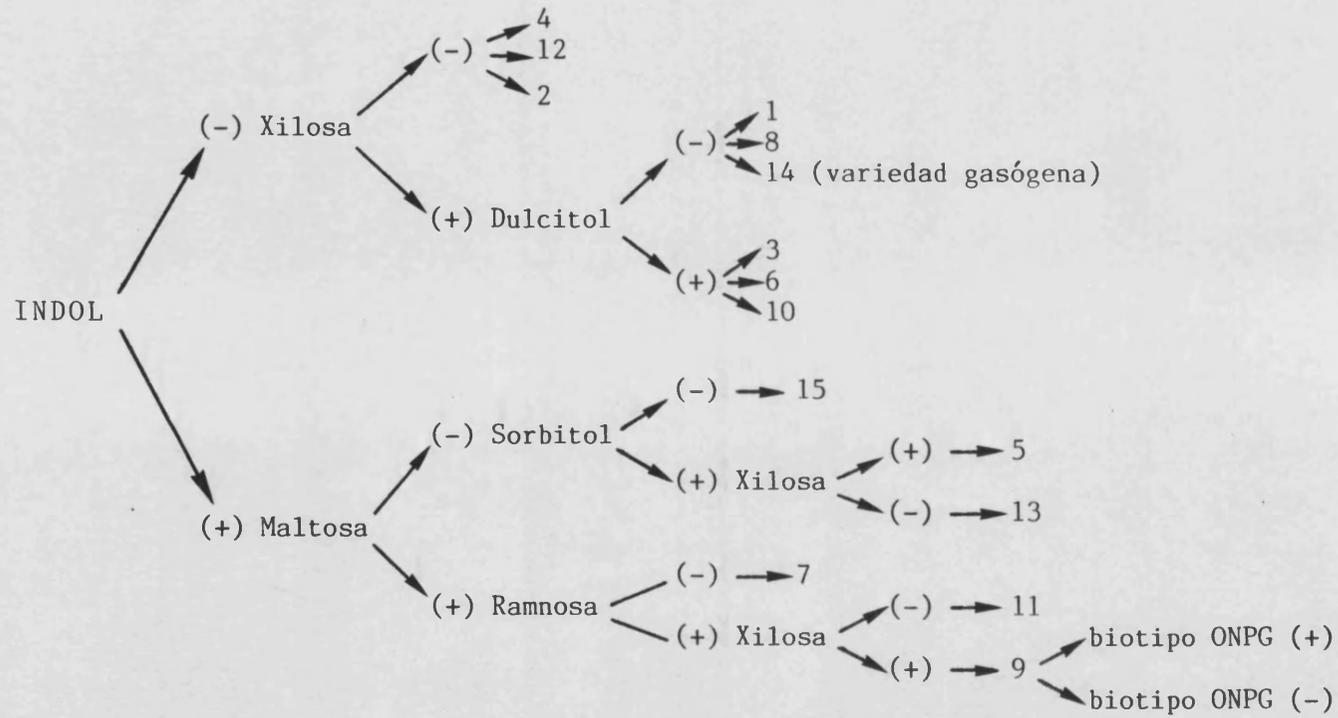


TABLA 25

DIAGNOSTICO DIFERENCIAL ENTRE SHIGELLA SONNEI  
Y OTRAS SHIGELLA

Carácter	<u>Sh. sonnei</u>	Otras <u>Shigella</u>
Indol .....	-	d
ONPG .....	d	d
Lisina descarboxilasa ...	-	-
Arginina dihidrolasa ....	-	d
Ornitina descarboxilasa..	+	-
Glucosa .....	+	+
Gas de glucosa .....	-	- (1)
Ac. beta-fenil propiónico	+	- (2)
Acetato de sodio .....	-	-
Tartratos .....	+	d
Movilidad .....	-	-
Manitol .....	+	d
Arabinosa .....	+	d

(1) Existen algunas excepciones

(2) Pequeño porcentaje de positividades

+ = reacción positiva

d = diferentes cepas

- = reacción negativa

### 3.2.4.3.- Aislamiento de E. coli

De los 104 coprocultivos realizados a los 101 niños estudiados (ver apartado 3.1.1.1.), se obtuvieron 96 aislamientos de E. coli. De cada uno de estos aislamientos se tomaron de 5 a 10 colonias distintas con la morfología típica de E. coli. En total se aislaron 506 colonias que fueron identificadas como E. coli por los métodos bacteriológicos que se describen a continuación.

#### 3.2.4.3.1.- Identificación de E. coli

Tras la dilución de las heces y su siembra posterior en medios de aislamiento, e incubación de los mismos, se procede a la diferenciación de este tipo de microorganismos según la siguiente pauta:

##### 3.2.4.3.1.1.- Estadío uno: Diagnóstico de familia

Se procede de igual forma que para Salmonella y Shigella.

##### 3.2.4.3.1.2.- Estadío dos: Diagnóstico de tribu

Se sigue el mismo método que para Salmonella y Shigella (ver apartado 3.2.1.3.1.1.2.).

##### 3.2.4.3.1.3.- Estadío tres: Diagnóstico de género

Se estudian las siguientes características:

- Movilidad
- Producción de SH<sub>2</sub>
- Presencia de  $\beta$ - galactosidasa
- Utilización de citrato de Simmons como única fuente de hidrato de carbono

E. coli, es móvil, no produce SH<sub>2</sub>, tiene beta-

galactosidasa y no es capaz de utilizar el citrato como única fuente de carbono para crecer (ver tabla 26).

3.2.4.3.1.4.- Estadío cuatro: Diagnóstico de especie

E. coli es la única especie de este género.

La serología es el método mas comúnmente utilizado para realizar la subdivisión de E. coli. La base para la realización de este método la constituyen las estructuras de superficie:

- el lipopolisacárido de la pared (antígeno O)
- el polisacárido capsular (antígeno K)
- la proteína flagelar (antígeno H)

Estos microorganismos presentan más de 160 antígenos O, unos 80 antígenos K y 50 antígenos H. Para su clasificación, se aglutinan las cepas con antisueros (O:K) polivalentes A,B y C (Difco), así como con antisueros monovalentes (O y O:K), incluidos en los polivalentes anteriormente mencionados.

El serotipado se realizó siguiendo las instrucciones de EDWARDS y EWING (EDWARDS y EWING,1972a).

3.2.4.3.1.4.1.- Serogrupado presuntivo

Cada una de las cepas de E. coli se resiembran en medio MUELLER-HINTON (Inst. Pasteur,11438), e incuban a 37°C durante 18 horas.

Cada una de las cepas de E. coli se suspende en solución salina fisiológica sobre un portaobjetos (ClNa al 0.85%). Sobre cada gota de suspensión bacteriana se añade 1 gota de antisero O:K polivalente, se mantiene

TABLA 26

ESTADIO TRES: DIAGNÓSTICO DE GÉNERO

	<u>ESCHERICHIA</u>	<u>EDWARSIELLA</u>	<u>CITROBACTER</u>	<u>SHIGELLA</u>	<u>SALMONELLA</u>
MOVILIDAD	+	+	+	-	+
SH <sub>2</sub>	0	+	D	0	+
Beta-galactosidasa	-	0	+	D	D
Citrato	0	0	+	0	+

a temperatura ambiente durante 1 minuto y se comprueba la aglutinación. Cada uno de los antisueros polivalentes se ha de probar por separado.

A continuación, se repite la prueba con cada antisuero O:K monovalente que forma parte del antisuero (o antisueros) polivalente (s), que haya aglutinado al cultivo. Si hay aglutinación con alguno de los antisueros O:K monovalentes, la suspensión bacteriana se calienta en un baño a 100°C, durante 60 minutos, y se vuelve a realizar la aglutinación en portaobjetos con el anticuerpo monovalente específico.

#### 3.2.4.3.1.4.2.- Confirmación del antígeno O

Se calienta la suspensión bacteriana, diluyéndola a continuación en solución salina hasta lograr una turbidez similar a la del tubo 3 de la escala de Mc. Farland (TRABULSI et al. 1967), aproximadamente  $9 \times 10^8$  bacterias/ml.

A continuación, se añade formol, hasta alcanzar una concentración final de 0.5% (v/v).

Se han preparado soluciones (de 1/20 a 1/1280) del antisuero O en tubos serológicos de 12mmx75mm, utilizando solución salina fisiológica, dejando 0.5 ml por tubo y teniendo en cuenta, que al rehidratar los antisueros O, quedan diluídos a la mitad.

Se han añadido 0.5 ml de la suspensión bacteriana ajustada y formolizada, a cada tubo, quedando de esta forma el antisuero diluído de 1/40 a 1/2560. Se han incubado a 50°C, durante 18 a 20 horas, en un baño de agua.

Las cepas cuyas suspensiones aglutinan con el antisuero diluido, al menos hasta 1/320 tienen el mismo antígeno O, que la cepa contra la que se obtuvo.

#### 3.2.4.3.2.- Conservación de las cepas de E. coli

Todos los aislamientos de E. coli de los niños estudiados en nuestro medio, fueron conservados a 4°C y a -70°C, de forma individualizada, evitando la conservación de los mismos formando conjuntos con las 5 a 10 colonias de E. coli procedentes de un mismo paciente. Con ello, se ha tratado de impedir la posible inhibición, dentro del conjunto, de las propiedades enterotoxigénicas de cualquiera de las cepas conservadas, por parte de alguna cepa de E. coli no enterotoxigénica, productora de colicinas, tal como describen MURRAY et al. (1981), en un estudio en el que demuestran que la conservación de 9 cepas de ECET, con cepas de E. coli no enterotoxigénicas pero productoras de colicinas, conducía a la negativización de 51 de los 96 conjuntos así formados, en la prueba del ratón lactante, (IMT), y de 17 de 52 conjuntos en la prueba para la detección de toxina LT, sobre células Y<sub>1</sub>.

La conservación a 4°C se ha realizado tras hacer crecer los cultivos de E. coli, durante 18 a 24 horas a 37°C, en tubos inclinados, cerrados con tapón de rosca, con agar soja tripticasa (AST),(Difco,0369-01-4). Este medio se preparó con 40 g de agar soja tripticasa, disueltos en 1 litro de agua destilada, junto con 5 g de Bacto-agar, (Difco,0140-01), para obtener una concentración final del mismo al 2%. Se ha disuelto mediante ebullición, y se ha esterilizado en autoclave a 120°C, durante 15 minutos.

Una vez preparado el medio, se ha distribuido

volúmenes iguales en tubos inclinados, dejándolos enfriar para que se solidifiquen.

Para la conservación de E. coli, los tubos se han mantenido cerrados, realizando resiembras periódicas cada 6 meses.

La conservación a  $-70^{\circ}\text{C}$ , se ha llevado a cabo utilizando cultivos de 18 a 24 h, en un medio que se preparó mezclando 850ml de caldo corazón-cerebro (OXOID, C.M.375) con 150ml de glicerina (Merck,4091), distribuyéndolo en tubos y esterilizándolo en autoclave.

#### 3.2.4.4.- Aislamiento de Campylobacter sp

El aislamiento de Campylobacter sp, requiere la utilización de medios selectivos que favorezcan su crecimiento.

##### 3.2.4.4.1.- Medios de cultivo

Se ha utilizado el medio de Skirrow modificado, que al llevar incorporados una serie de antibióticos selectivos inhibe el crecimiento de otras bacterias, y consigue mejores resultados que el método de filtración previa de la muestra (BUTZLER y SKIRROW,1979; PATTON et al. 1981).

Su composición y forma de preparación es la siguiente:

Agar columbia (Difco Ref. 0792-01-1) - - - - -	44g
Agua destilada - - - - -	950ml

Se disuelve y esteriliza posteriormente en autoclave, durante 15 minutos, enfriándolo a continuación a 50°C y añadiendo entonces 70ml de sangre de caballo lisada esteril, (MR. Ref.,0,98491102) y los siguientes antibióticos:

Vancomicina (Sigma,V-2002) - - - - -	10mg
Colimicina 50 (Latino,735001) - - - - -	15mg
Trimethroprim (Sigma,T-7833) - - - - -	5mg

Una vez preparado, se distribuye en placas como es habitual en bacteriología.

La sangre de caballo se lisa, someténdola a sucesivas congelaciones y descongelaciones, con lo que se asegura la neutralización de los antagonistas del Trimethroprim (BUTZLER y SKIRROW,1979).

#### 3.2.4.4.2.- Identificación

Las colonias de Campylobacter son típicamente planas y brillantes, tendiendo a extenderse siguiendo la dirección del trazo dejado por el asa inoculadora. Presentan el aspecto de gotas planas que hubieran sido salpicadas sobre la superficie del agar.

##### 3.2.4.4.2.1.- Diagnóstico de género

A partir de las colonias sospechosas, se han realizado las siguientes pruebas:

- Valoración de los caracteres morfológicos y de movilidad.
- Presencia de citocromo-oxidasa.
- Producción de catalasa.

##### 3.2.4.4.2.1.1.- Caracteres morfológicos y movilidad:

Al examen microscópico, previa tinción con fucsina, las especies de Campylobacter se presentan como microorganismos delgados (0.2-0.4  $\mu$ m) Gram negativos, con forma de S o espiral, y con extremos afilados. En alguna ocasión tienen formas bacilares.

A los 5 días de cultivo presentan una morfología cocoide, sobre todo si crecen en medios sólidos poseyendo entonces menor movilidad y no siendo capaces de crecer en subcultivos.

##### 3.2.4.4.2.1.2.- Citocromo-oxidasa

Estos microorganismos poseen este enzima respiratorio, tal como vimos en el apartado 3.2.2. 3.2.2.

##### 3.2.4.4.2.1.3.- Catalasas

La producción de catalasas divide

a los componentes de este género en 2 grupos:

- Campylobacter catalasa negativos - no demostrados como patógenos para el hombre.
- Campylobacter catalasa positivos - al que pertenecen las especies causantes de patología humana.

#### 3.2.4.4.2.2.- Diagnostico de especie

El diagnóstico diferencial entre las diversas especies de Campylobacter productores de catalasas, se realiza en base a su comportamiento frente a diversas temperaturas de incubación, así como a su crecimiento en agar de cloruro de tripheniltetrazolium (TTC).

Campylobacter fetus se diferencia de otras especies en que no crece a 42°C y sí, a 25°C, siendo inhibido por el TTC (a concentración de 400 µg/ml),(Tabla 27),(BUTZLER y SKIRROW,1979).

Una vez realizada la distinción entre las especies catalasa positiva y catalasa negativas, la distinción entre las especies patógenas para el hombre se realiza por el crecimiento a 25°, 30.5°, 37°, 42° y 45°C, y la sensibilidad al disco de 40 µg de ácido nalidixico y 30 µg de cefalotina como se muestra en la TABLA 28.

TABLA 27

DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL DE ESPECIES DE CAMPYLOBACTER

	<u>C. FETUS</u>	OTROS <u>CAMPYLOBACTER</u>
Crecimiento a 42°C	-	+
Crecimiento a 25°C	+	-
Crecimiento en TTC-agar	-	+

TABLA 28

	<u>TEMPERATURA de CRECIMIENTO</u>					<u>SENSIBILIDAD al DISCO de</u>	
	25°C	30.5°C	37°C	42°C	45°C	40 µg <u>Ac. nalidixico</u>	30 µg <u>Cefalotina</u>
<u>C. jejuni/Coli</u>	-	-	+	+	V	S	R
<u>C. fetus</u>	+	+	+	-	-	R	S

- = no crecimiento

+ = crecimiento

V = crecimiento según cepas

S = sensible

R = resistente

#### 3.2.4.5.- Aislamiento de Yersinia enterocolitica

Para el aislamiento de este tipo de microorganismo, se ha recurrido a la utilización de un medio de enriquecimiento, el propugnado por GREENWOOD et al. (1975), dado el escaso crecimiento que se obtiene tras siembra directa en los medios de agar convencionales (BOTTONE y ROBIN,1977).

##### 3.2.4.5.1.- Medio de enriquecimiento

Se ha utilizado el agua peptonada, cuya composición ya ha quedado indicada en el apartado 3.2.2.1.3. En este medio se siembra una porción de las heces, manteniéndose desde entonces en nevera a +4°C, durante 15 días (PATERSON y COOK,1963). Bajo estas condiciones, se consigue un significativo incremento en la recuperación de Yersinia; cuando no se han obtenido aislamientos por métodos habituales (EISS,1975; GREENWOOD et al. 1975; WEISSFELD A.S.,1980; BOTTONE,1981).

##### 3.2.4.5.2.- Medio de aislamiento

Una vez transcurrido el periodo de incubación, las muestras se resiembran en agar de MacCONKEY (ver apartado 3.2.2.2.1.), manteniéndolas en estufa a 37°C, durante 18-24 horas.

##### 3.2.4.5.3.- Identificación

Con las colonias obtenidas, se procede a la identificación siguiendo los siguientes estadios:

###### 3.2.4.5.3.1.- Primer estadio

En él, se investiga la presencia de citocromo-oxidasa sobre aquellas colonias que no degradan la lactosa (ver apartado 3.2.2.3.2.2.).

Para aquellas que no presentaban este enzima respiratorio se pasa al estadio 2.

#### 3.2.4.5.3.2.- Segundo estadio

Se realiza una siembra sobre los siguientes medios de identificación:

- Medio de Kliger (apartado 3.2.2.3.3.4.)
- Medio de urea-indol (apartado 3.2.2.3.4.3.)
- Medio manitol-movilidad (apartado 3.2.2.3.3.6.)

Los dos primeros se incuban durante 18-24 horas a 37°C, y del tercero, se utilizan 2 tubos, que se incuban también durante 18-24 horas, uno a 37°C y otro a 22°C.

#### 3.2.4.5.3.3.- Tercer estadio

Aquellos microorganismos que fermentan la glucosa sin producir gas, que producen hidrólisis de la urea, y son inmóviles a 37°C y móviles a 22°C, se siembran en el medio de Falkow, para investigar si producen ornitina-decarboxilasa, según queda explicado en el apartado 3.2.2.3.4.1. La producción de este enzima es propia de Yersinia enterocolítica (excepto el biotipo 5), lo que la diferencia de Yersinia pseudotuberculosis.

Otra diferencia característica entre ambos microorganismos consiste en que Yersinia pseudotuberculosis fermenta la ramnosa y la melobiosa, mientras que Yersinia enterocolítica actúa sobre la sucrosa.

#### 3.2.4.5.3.4.- Cuarto estadio

La clasificación en biotipos de Yersinia enterocolítica se puede realizar utilizando las siguientes pruebas:

- lecitinasa
- producción de indol
- acidificación de la lactosa en medio de OF.
- fermentación de la xilosa a las 48 horas
- fermentación de la trealosa
- reducción de los nitratos
- existencia de ornitín-decarboxilasa
- $\beta$ -galactosidasa
- utilización de la sucrosa

El biotipo 1 es el único que presenta lecitinas, siendo capaz, como el biotipo 2, de producir indol, aunque para ello, este último tenga que ser incubado a 29°C.

Los biotipos 1,2 y 3 acidifican la lactosa en medio de OF y fermentan la xilosa a las 48 horas.

Las especies del biotipo 5, se diferencian de los otros cuatro en que no fermentan la trealosa, no reducen los nitratos a nitritos, ni poseen una ornitín-decarboxilasa y no presentan  $\beta$ -galactosidasa (TABLA 29)(BOTTONE,1981).

Los biotipos 1A se diferencian de los 1B, en que son capaces de utilizar la sucrosa.

TABLA 29.

ESPECIES DE YERSINIA ENTEROCOLITICA

ESPECIES	BIOTIPOS				
	1	2	3	4	5
Lecitinasa	+	(-)	(-)	(-)	(-)
Indol	+	(+)			
Lactosa (OF)	+	+	+	(-)	(-)
Xilosa (48 horas)	+	+	+	(-)	(-)
Trealosa	+	+	+	+	(-)
Nitratos	+	+	+	+	(-)
ODC	+	+	+	+	(-)
Beta-galactosidasa	+	+	+	+	(-)

+ = Positivo

(-) = Negativo

(+) = Positivo a 29°C

3.3.- ESTUDIO MICROBIOLÓGICO DE LAS ETIOLOGIAS  
PARASITARIAS DE LA GASTROENTERITIS

Las muestras investigadas fueron examinadas macroscópicamente y microscópicamente.

3.3.1.- Examen macroscópico

En el examen macroscópico se ha estudiado el color y consistencia de las heces, así como la presencia o no, de mucosidades o/y sangre.

3.3.2.- Examen microscópico

Dado que las muestras de heces incluídas en nuestro estudio eran líquidas, se ha investigado en ellas la presencia de formas vegetativas. En las heces pastosas en cambio, está indicada la investigación de huevos de helmintos y quistes de protozoos.

El examen microscópico se ha realizado directamente sobre las heces en fresco, tras tinción de las mismas, o bien utilizando técnicas de enriquecimiento.

3.3.2.1.- Examen directo en fresco

Es el proceso mas simple, y nos permite la observación de formas vegetativas de protozoos, en casos de alto grado de parasitación.

El examen se ha realizado directamente suspendiendo las heces en una solución iodada, entre portaobjetos y cubreobjetos.

### 3.3.2.1.1.- Solución iodada

La composición de la solución iodada es la siguiente:

- . Agua destilada - - - - - 100ml
- . Ioduro potásico (Mallinckrodt,1123) - - - - - 4g
- . Iodo (Probus,3008) - - - - - 2g

El iodo tiñe los núcleos de los quistes de amebas de color marrón-amarillento. Si existe acúmulo de glucógeno se teñirá de marrón a marrón-rojizo.

El procedimiento que se ha utilizado consiste en tomar una gota de la solución, homogeneizando en ella una pequeña cantidad de heces, hasta obtener una suspensión trasparente, a través de la cual, puede realizarse la lectura. Esta se ha llevado a cabo, aplicando un cubre-objetos, y examinando al microscopio, primero con un objetivo de poco aumento (4x10X), y después con otro de mayor aumento.

### 3.3.2.2.- Examen tras técnicas de enriquecimiento

Las técnicas de enriquecimiento tienen como misión, concentrar los elementos parasitarios existentes en las muestras que no pueden ser detectados por su escasez, con un simple examen directo.

Hemos elegido el método de concentración más comúnmente utilizado: el método de Ritchie modificado (GOLVAN y DROUHET,1977).

#### 3.3.2.2.1.- Método de formol-eter (Método de Ritchie o M.G.L.)

Se ha tomado una pequeña cantidad de heces (aproximadamente media cucharita de café) emulsionándolas en una solución de formol al 10%, en una propor-

ción aproximada de 1/10.

Se han tamizado (con un tamiz metálico), y se han dejado sedimentar entre 30 segundos y 2 minutos, sin pasar de este tiempo, ya que se podrían perder los elementos parasitarios más pesados.

Se ha recogido el sobrenadante, en un tubo de centrífuga cónico, y se ha añadido 1/3 del volumen total de eter etílico, teniendo en cuenta que el nivel debe quedar a 1-2 cm del borde del tubo.

Se ha tapado con papel encerado, y se ha agitado para obtener una suspensión homogénea, centrifugándolo por último a 2000 rpm, durante 2 minutos.

Siguiendo este proceso, se obtienen 3 capas:

- Capa acuosa
- Anillo de restos diversos
- Capa etérea coloreada de amarillo

Invirtiendo bruscamente el tubo hemos eliminado todas las capas, conservando sólo el sedimento. Este se ha recogido con una pipeta Pasteur, observándolo al microscopio entre porta y cubreobjetos.

### 3.3.2.3.- Examen directo tras fijación y tinción

Esta forma de examen microscópico es especialmente útil en caso de infecciones por protozoos.

Hemos utilizado dos métodos de tinción:

- El método de hematoxilina férrica de Heindenhain
- La tinción de Ziehl-Neelsen modificada

### 3.3.2.3.1.- Hematoxilina férrica de Heindenhain

Es un método de coloración indispensable para la identificación precisa de especie. Para realizarla, se ha preparado una extensión fina sobre un cubreobjetos de 22mm, homogeneizando una pequeña cantidad de heces, en una gota de solución salina caliente. Cuando los extremos de la extensión se comienzan a secar, se ha colocado un cubreobjetos invertido en una placa con líquido de Schaundinn, calentándolo a 40°-60°C, y manteniéndolo flotando sobre la superficie del fijador 1 a 2 minutos. Luego se ha invertido, y dejado en el fondo de la placa 5 a 10 minutos.

A continuación, se ha transferido la muestra a alcohol etílico de 50°, realizando dos cambios de 5 minutos de duración cada uno, y luego, a alcohol de 70° con unas gotas de solución yodurada para eliminar el sublimado corrosivo (15-30 min). Después, se ha pasado a través de alcohol etílico de 50°-30° y agua destilada (3 min cada uno), y por último, a solución mordiente de Lang al 4% (1-3h). Se ha lavado en agua destilada, y se ha teñido durante 1 a 3 horas en solución madura al 0.5% de hematoxilina. Se ha vuelto a lavar en agua y se ha decolorado en mordiente de Lang al 2%, debiendo quedar teñido sólo el núcleo.

Tras lavar en agua corriente alcalina 15 ó 20 minutos, y deshidratar en alcoholes de 35, 50, 70, 95 y 100° (2 min en cada uno), se ha aclarado con xilol o toluol (10 min), y se ha montado en cubreobjetos con la extensión hacia abajo.

Las distintas soluciones empleadas, se han preparado de la forma siguiente:

#### Líquido de Schaundinn:

Solución acuosa saturada de cloruro de mercurio:

- . Cl<sub>2</sub>Hg (D'Herniu) - - - - - 100ml
- . Alcohol etílico 100° (Farmitalia.Carlo Erba.414637)50ml

Extemporáneamente, se pueden añadir 7.5 ml de ácido acético cristalizabile.

Mordiente de Lang:

- . Sulfato férrico amónico (sol. ac. 4%)(Merck,3792) 500ml
- . Acido acético glacial (Panreac,131008) - - - - - 5ml
- . Acido sulfúrico concentrado (PRS,141058) - - - - 0.6ml

Solución de Hematoxilina de Heindenhain:

Disolver 1g de hematoxilina en polvo en 10ml de alcohol etílico 100° (Farmitalia.Carlo Erba.414637). Esta es la solución base, de la cual, se prepara la solución de trabajo al 5% en agua (5ml de solución madre y 95ml de agua destilada).

3.3.2.3.2.- Método de Ziehl-Neelsen modificado

Es un método de tinción empleado para la detección de Cryptosporidium sp (GARCIA et al. 1983).

3.3.2.3.2.1.- Reactivos

Solución de fuchina fenicada

- . Fuchina básica (Merck,1358) - - - - - 10ml
- . Fenol (Merck,822296) - - - - - 50ml
- . Etanol de 96° (Farmitalia.Carlo Erba.414637) - - 100ml
- . Agua destilada c.s.p. - - - - - 100ml

Disolver en un mortero la fuchina en alcohol; agregar el fenol, y mezclar. Trasferir a un matraz y completar con agua. Dejar madurar durante 24 horas, filtrar y conservar en frasco de topacio.

Decolorante

- . Acido sulfúrico (PRS,141058) - - - - - 5ml
- . Agua destilada - - - - - 95ml

Solución de azul de metileno

- . Azul de metileno (Merck,1283) - - - - - 10g
- . Fenol (Merck,822296) - - - - - 10g
- . Etanol de 96° (Farmitalia,Carlo Erba,414637) - - 50ml
- . Agua destilada c.s.p. - - - - - 930ml

Preparar como la solución de fuchina fenicada.

3.3.2.3.2.2.- Fijación

Se ha colocado la preparación sobre una platina calefactora a 70°C, durante 10 minutos. Se ha cubierto con fuchina fenicada, y se ha calentado hasta la emisión de vapores, sin dejar que llegase a hervir, agregando más colorante en el caso que se observase la evaporación de la fuchina (5 min).

Se ha lavado con agua del grifo.

Se ha decolorado con la solución de ácido sulfúrico al 5%, durante 30 segundos.

Se ha vuelto a lavar con agua del grifo.

Se ha cubierto la preparación con azul de metileno (1 min). Se ha lavado de nuevo con agua corriente, y se ha dejado secar.

Cryptosporidium se observa como pequeñas esférulas ácido-alcohol resistentes.

### 3.4.- ESTUDIO MICROBIOLÓGICO DE LAS ETIOLOGIAS VIRALES DE LA GASTROENTERITIS

#### 3.4.1.- Muestras de heces estudiadas

El estudio virológico se ha realizado sobre 58 muestras de heces líquidas, recogidas al azar de los 101 niños incluidos en nuestro estudio, y que fueron conservadas independientemente para este fin.

De ellas 22 procedían de niños que fueron ingresados a consecuencia de su problema diarreico, 20 de niños recién nacidos y lactantes, que presentaron brotes diarreicos nosocomiales y 16 se obtuvieron de niños controlados ambulatoriamente.

Las edades de los niños en los que se investigó la etiología viral, quedan reflejadas en la figura 6 .

#### 3.4.2.- Procesamiento de las heces

Las heces recogidas en bolsas de plástico o en frascos estériles, fueron conservadas a  $-70^{\circ}$ , desde el momento de su recepción en el laboratorio, permaneciendo congeladas durante un periodo que osciló entre 1 y 8 meses, (según el momento de la recogida de cada una), hasta que fueron estudiadas.

Se han aplicado dos métodos diagnósticos distintos para la detección de los enterovirus:

- Microscopía electrónica (M.E.)
- Ensayo inmunoenzimático (E.L.I.S.A.)

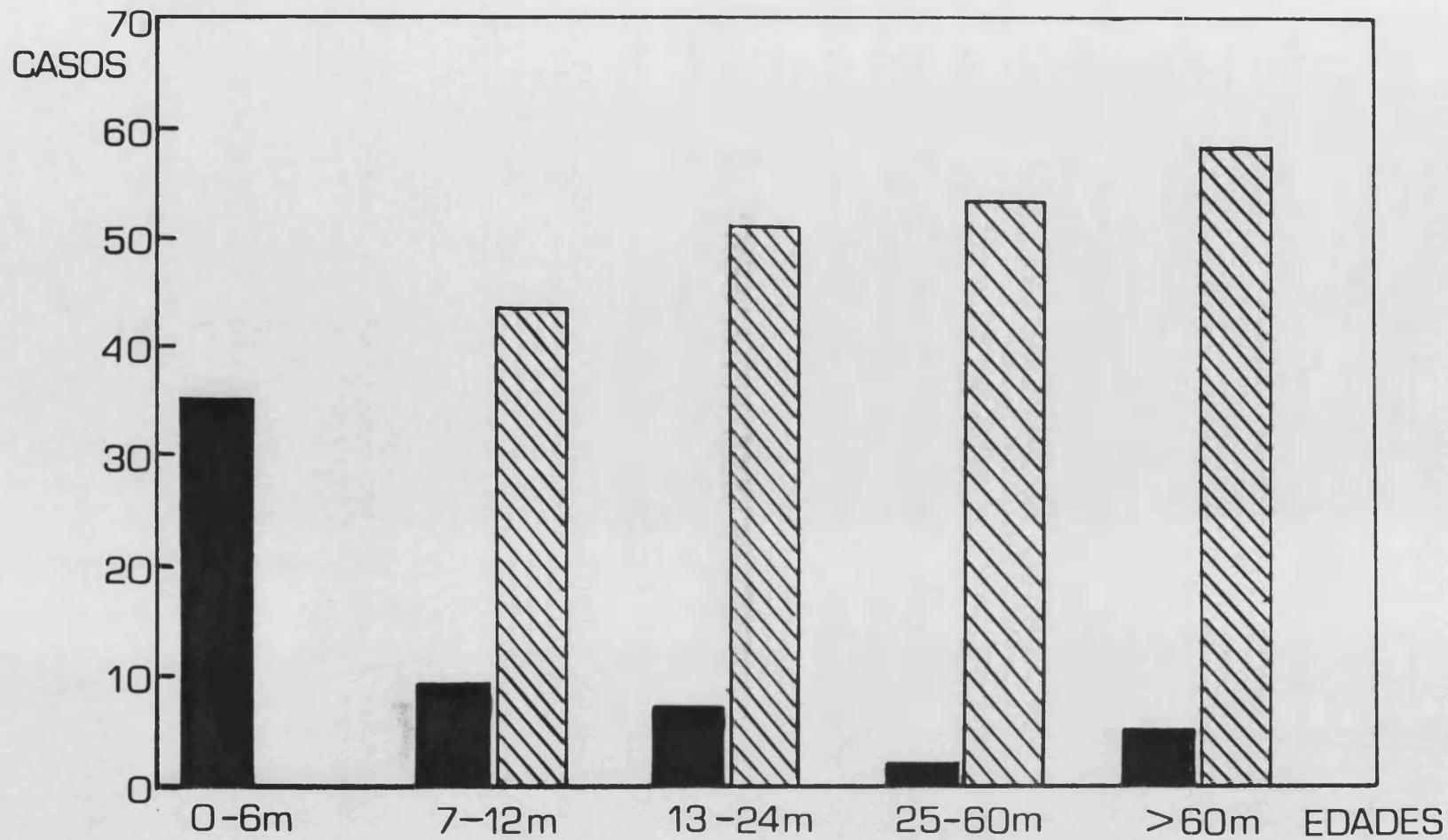


FIG.6.\_ INVESTIGACION VIRAL EN LAS DISTINTAS EIDADES

- Número de casos investigados
- ▨ Acumulativo de casos

El primero fue aplicado para diagnosticar cualquier tipo de partícula viral.

El segundo fue utilizado para demostrar la existencia de rotavirus.

#### 3.4.2.1.- Investigación virológica global

##### 3.4.2.1.1.- Microscopía electrónica

La investigación de los virus en muestras fecales por microscopía electrónica, es uno de los métodos más idóneos de diagnóstico, al permitir visualizar cualquier tipo de virus, muchos de ellos no demostrables por otras pruebas diagnósticas.

Para mejorar su rendimiento, se requiere una concentración elevada de partículas virales en la muestra (superior a  $10^7$  por ml), por lo que son necesarios métodos de concentración, tales como ultracentrifugación o la aglutinación por anticuerpos específicos.

##### 3.4.2.1.1.1.- Método

La tinción negativa para la identificación de virus fue inicialmente descrita por FLEWETT et al. (1984), para los rotavirus, y se basa en la preparación de muestras de heces, su colocación sobre rejillas de cobre con película de carbono o de Formvar y su tinción con ácido fosfotúngstico al 2%.

##### 3.4.2.1.1.2.- Material y equipo necesarios

- Rejillas de cobre de microscopía electrónica (malla 400)(Polaron 6400.Pattern,0030)
- Solución de Formvar al 3% (polivinyl Formvar)(Merck, 12164) en Et.Cl<sub>2</sub> (Merck,803524)
- Acido fosfotúngstico (solución al 3.3%)(Sigma P-4006)

- Tampón fosfato salino (PBS), pH 7.2
- Solución de KOH (hidróxido potásico) 1N (Mallinckrodt, 1123)
- Liphogel (Gelman Science Limited 51030)
- Pinzas Watchmaker nº 4 ó 5, o curvas nº 7
- Portaobjetos
- Papel de filtro Watman 1
- Microscopio electrónico High-resolution EM 10C/CR

#### 3.4.2.1.1.3.- Concentración de virus

Tras descongelar las muestras, se ha colocado una pequeña cantidad de cada una de ellas en un tubo. Se ha añadido tampón fosfato salino (PBS), y se han homogeneizado en un agitador, durante 5 minutos, a temperatura ambiente.

A continuación, se han centrifugado a 4°C durante 15 a 30 minutos, a 3000 ó 3500 rpm., recogiendo los sobrenadantes (extractos de heces) con una pipeta Pasteur sobre los que han aplicado uno de los dos métodos siguientes:

- Liphogel
- Sulfato amónico

##### 3.4.2.1.1.3.1.- Liphogel

En este método, se toman 0.1g de Liphogel (Gelman Science Limited, 51030), introduciéndolo en un vial pequeño (bijoux), sobre el que se agregan 0.55ml de extracto fecal. Se deja 90 minutos a temperatura ambiente y se recoge 1 gota para impregnar las rejillas.

##### 3.4.2.1.1.3.2.- Sulfato amónico

Se agregan 1.5g de  $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$  (Merck, 1217) sobre 5ml de extracto fecal manteniendo la mezcla

en agitación, en agitador rotatorio de tubos, durante una hora, a 4°C.

A continuación, se centrifuga a 15.000 rpm, durante 15 minutos, se desecha el sobrenadante, y se secan las paredes con papel de filtro (Watman,1). Se resuspende el sedimento en 2 gotas de agua destilada, colocando una gota sobre lámina de cera para impregnar las rejillas.

De los dos métodos descritos, se ha utilizado el primero, debido a su menor complejidad y sus buenos resultados.

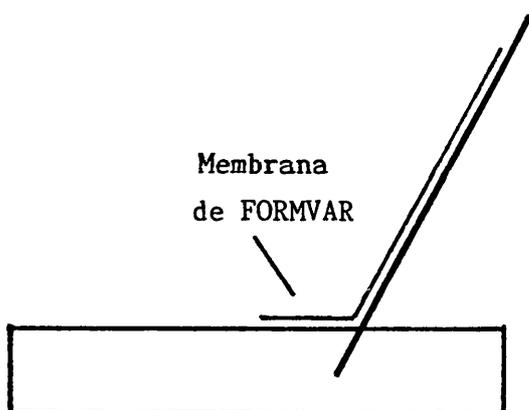
#### 3.4.2.1.1.4.- Preparación de las rejillas de M.E. recubiertas con película de Formvar

Se ha preparado una solución de trabajo, partiendo de la solución de Formvar al 3%, que hemos diluido al 1/10 en  $\text{EtCl}_2$ , colocándola en un contenedor (4 cm de ancho x 8 cm de altura).

Se ha desengrasado y limpiado un portaobjetos introduciéndolo a continuación, durante unos segundos, en la solución de trabajo. Se ha retirado y mantenido formando un ángulo de 60° hasta que se ha secado, con lo que se forma una fina película sobre el vidrio.

Se ha despegado ligeramente por un extremo, rayando una estría sobre el porta con un escalpelo, y se ha acabado de desprender, introduciendo lentamente el portaobjetos en agua destilada, de tal forma que forme un ángulo de 45° aproximadamente con la superficie líquida, y ayudándonos, para ello, de una aguja.

Sobre la película flotando en el agua, y ayudándo-



nos de unas pinzas, hemos colocado las rejillas, con la cara mate apoyada hacia abajo, procurando no tocar la membrana con las pinzas.

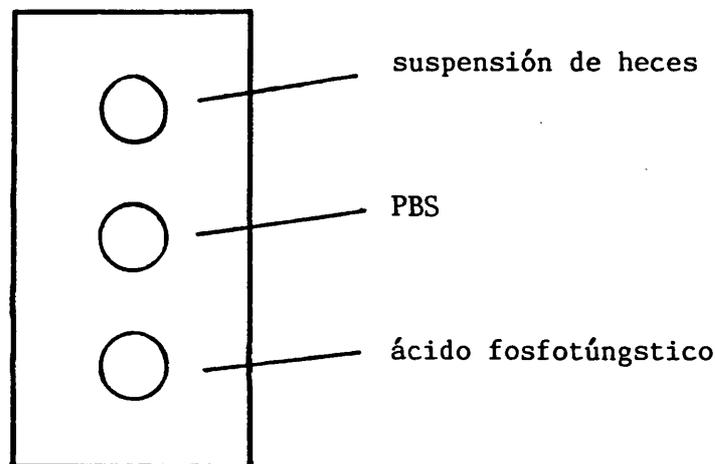
Se ha colocado un trozo de papel de filtro (Watman 1) sobre la membrana con rejillas sacándola rápidamente, lo que resulta fácil ya que la membrana se adhiere enseguida al papel.

Se ha dejado secar en una placa de Petri, con papel de filtro, manteniéndola entreabierta.

Por último, las rejillas se carbonan.

#### 3.4.2.1.1.5.- Tinción negativa

Se ha colocado una lámina de cera en el interior de una placa de Petri, y sobre ella, una gota de concentrado de heces, 1 gota de ácido fosfotúngstico (PTA)(Sigma P-4006) al 3.3%, con un pH de 6.3, y una gota de tampón fosfato salino (PBS), separadas entre sí según se indica en el esquema adjunto.



Se han colocado cada una de las rejillas recubiertas de Formvar y carbono (preparadas previamente), con la superficie mate hacia abajo, sobre cada una de las gotas de extracto de heces, durante 2 a 3 minutos, tras los cuales se han retirado, ayudándonos de unas pinzas, y se han secado por capilaridad, con papel de filtro (Watman 1).

A continuación, se han lavado las rejillas en la gota de tampón fosfato salino, secándolas de nuevo en papel de filtro.

Por último, se han pasado a la gota de ácido fosfotúngstico (PTA) durante 2 a 3 minutos, tras lo cual, se han recogido las rejillas, se han secado y guardado en cajas hasta su observación.

Para ello, se ha utilizado el microscopio electrónico a 35.000 aumentos, examinando cada rejilla durante 10 minutos.

La solución de ácido fosfotúngstico al 2% se ha preparado disolviendo este preparado al 2% en agua destilada, quedando con un pH aproximadamente de 2. Este pH se ha ajustado después a 6.8-7.2 con KOH 1N.

#### 3.4.2.1.2.- Investigación diagnóstica de rotavirus por E.L.I.S.A. (Enzyme-Linked-immunosorbent-assay)

Se ha elegido este método para la investigación de rotavirus, por ser de realización asequible y con elevada sensibilidad y especificidad (YOLKEN et al. 1977b; BLACKLOW et al. 1981), y porque puede estudiar rápidamente gran número de muestras en micrométodo (YOLKEN et al. 1977b; STENIHOFF, 1980; BLACKLOW et al. 1981).

#### 3.4.2.1.2.1.- Prueba de Rotazyme

La prueba de "Rotazyme" (Abbott) utiliza el método de inmunoensayo enzimático de fase sólida (YOLKEN et al. 1977b; VOLLER et al. 1979) para detectar antígeno de rotavirus en materiales fecales.

Consiste en incubar esferas de plástico recubiertas con anticuerpos de cobayo anti-rotavirus, con una alícuota de heces del paciente, suspendidas en un tampón de dilución. Si existe antígeno de rotavirus, éste, se unirá al anticuerpo de la esfera durante la incubación.

Tras eliminar las pruebas que no hubieran reaccionado, se deja reaccionar la esfera con el anticuerpo anti-rotavirus conjugado con peroxidasa, lo que dará lugar a la formación de un complejo anticuerpo-antígeno-anticuerpo-enzima en la esfera.

El material no unido se elimina por lavados y posteriormente se mide la actividad enzimática que actúa sobre su sustrato, lo que dará lugar a un cambio de color, cuya intensidad, es proporcional a la cantidad de enzima de la esfera, y por tanto, representativa de la cantidad de antígeno viral (FIGURA 7).

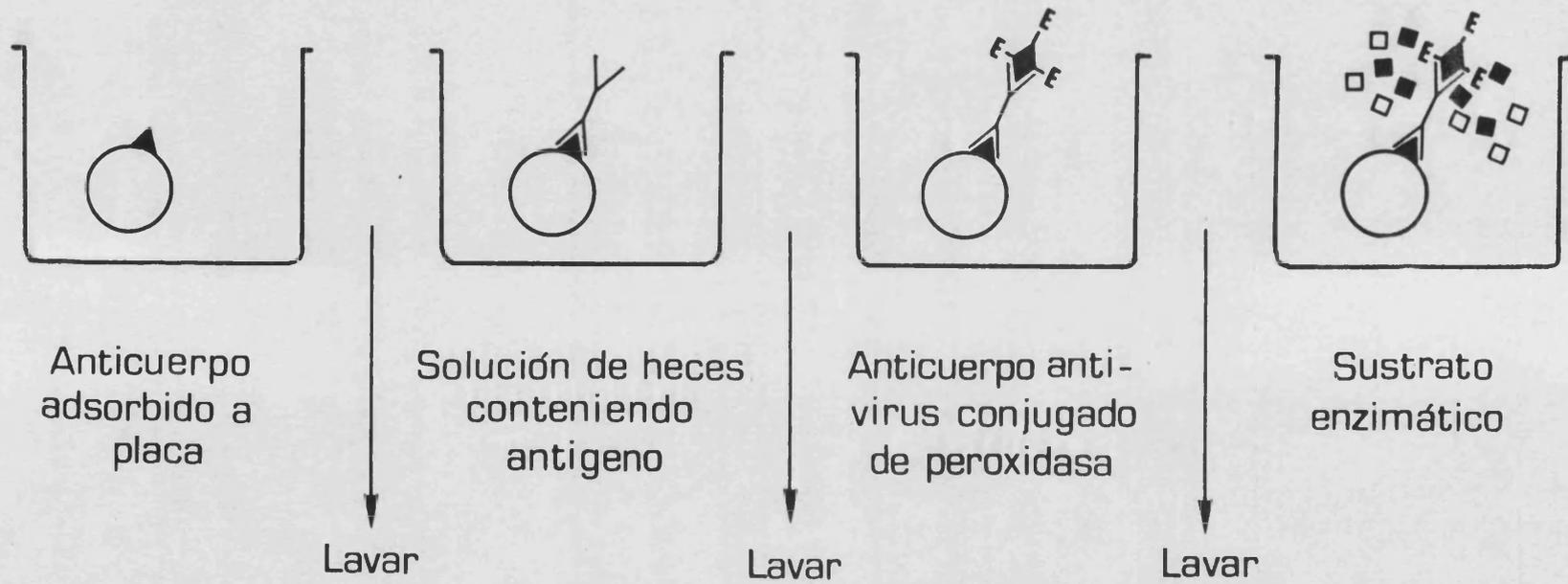
##### 3.4.2.1.2.1.1.- Reactivos

- Esferas recubiertas de anticuerpos anti-rotavirus (cobayo).

- Anticuerpos anti-rotavirus (conejo): conjugado peroxidasa. Concentración mínima= 0.2  $\mu$ g/ml en solución salina fisiológica tamponada con fosfatos con estabilizadores de proteínas. Medio de conservación: Thiomersal al 0.01%.

- Control positivo Rotazyme. Rotavirus de mono

FIG. 7.- PRUEBA DE ROTAZYME



SA-11 inactivado, equivalente a  $10^8$  partículas virales/ml en solución salina fisiológica tamponada con fosfatos y 0.1% de albúmina de suero bovino. Medio de conservación= Thiomersal al 0.01%.

- Diluyente para pruebas Rotazyme. Solución salina fisiológica tamponada con fosfatos 0.01M. Medio de conservación= Thiomersal al 0.01%.

- OPD, o-fenilendiamina-2 HCl, 12.8 mg/tableta.

- Diluyente para OPD (o-fenilendiamina-2 HCl). Tampón de citratos-fosfatos con 0.02% de peróxido de hidrógeno. Medio de conservación= Thiomersal al 0.01%.

- Acido clorhídrico 1N.

#### 3.4.2.1.2.1.1.1.- Preparación de la solución de sustrato OPD

La tableta OPD (o-fenilendiamina-2 HCl) debe disolverse inmediatamente antes de ser usada, en el diluyente para OPD, no pudiendo guardar la solución más de 60 minutos antes del uso. Por este motivo se prepara, durante los últimos 5 a 10 minutos del segundo periodo de incubación, o después del lavado final, del siguiente modo:

Utilizando una pipeta limpia, se transfiere a un recipiente adecuado, 5 ml del diluyente para OPD por cada tableta que vaya a ser disuelta.

Se disuelve cada una de las tabletas en su solución correspondiente, utilizando un forceps no metálico para extraerlas de la botella.

Se agita suavemente para obtener una solución homogénea inmediatamente antes de utilizarla para la incubación final de la prueba.

#### 3.4.2.1.2.1.2.- Instrumentos

La realización de la prueba Rotazyme, requiere el uso de un espectrofotómetro de precisión (Quantum II, Abbott) con las siguientes especificaciones a una longitud de onda de 492 nm:

- Ancho de banda - 10 nm ó menor
- Rango de absorción - 0 a 2  $A_{492}$
- Repetibilidad - mínimo 0.005  $A_{492}^{0.1\%}$
- Linealidad o precisión - mínimo 0.010  $A_{492}^{0.2\%}$
- Desviación - máxima 0.005  $A_{492}$  por hora

#### 3.4.2.1.2.1.3.- Procedimiento

Se han distribuido 200  $\mu$ l de heces líquidas en cada uno de los pocillos de una placa de reacción, 200  $\mu$ l del control positivo Rotazime y 200  $\mu$ l de solución fisiológica tamponada (control negativo) en otros 2 pocillos, identificándolos o señalizándolos apropiadamente.

Se ha colocado a continuación, una esfera dentro de cada uno de los pocillos, utilizando un dispensador de esferas (Nº 6155-20), mezclando bien su contenido durante 3 a 5 segundos, y se ha cubierto la placa así preparada con una cinta adhesiva, incubándola en un baño a 45°C, durante  $3 \pm 0.5$  horas.

Tras este periodo de tiempo se han sacado las placas del baño, retirando la cinta adhesiva, y se ha aspirado el líquido utilizando para ello el Pentawash II, que lleva incorporadas 5 sondas, que se adaptan perfectamente a una hilera de 5 pocillos en la placa de reacción, y mediante las cuales se aspiran simultáneamente 5 muestras, lavando las esferas a continuación 4 veces,

con porciones de 4 a 5 ml de agua destilada o desionizada. Para realizar esta operación adecuadamente, se han de levantar las esferas del fondo de la cavidad, eliminando el exceso de agua antes de continuar. Además, se ha de retirar inmediatamente el Pentawash tras la aspiración, ya que un secado excesivo puede dar lugar a resultados falsos.

Tras el lavado, se han pipeteado 200  $\mu$ l de anticuerpos anti-rotavirus (conejo) conjugado con peroxidasa dentro de cada pocillo, mezclándolo durante 3 a 5 seg. Se ha vuelto a cubrir con una cinta adhesiva, dejándolo en baño durante 60 $\pm$ 5 minutos.

Durante los últimos 5 a 10 minutos de la incubación se ha preparado la solución de sustrato OPD descrita en el apartado 3.4.2.1.2.1.1.1.

Al finalizar la incubación, se han sacado las placas del baño y se han lavado de nuevo las esferas seis veces con 4 a 5 ml de agua destilada o desionizada, transfiriendo las esferas a pocillos limpios debidamente identificados.

Por último se han pipeteado 200  $\mu$ l de solución OPD, dentro de cada pocillo, y también dentro de un pocillo vacío (blanco de sustrato). Se incuban a temperatura ambiente durante 15  $\pm$  2 minutos, protegiéndolos durante este tiempo de la luz, tras los cuales, se ha suspendido la reacción con 1 ml de ácido, y se han leído los resultados, o bien por el método visual (a los 5 minutos), o por el método instrumental.

#### 3.4.2.1.2.1.3.1.- Método visual

Se ha comparado la intensidad de color de cada tubo, usando la escala de color suministrada como referencia.

#### 3.4.2.1.2.1.3.2.- Método fotométrico

Se ha seleccionado una longitud de onda de 492 nm en un espectrofotómetro.

Se han inspeccionado visualmente ambos blancos, descartando uno o ambos si están contaminados (presentan entonces un color amarillo-anaranjado). Si ambos están contaminados se repite el ensayo completo. El control diluyente se puede utilizar como "control negativo" o se puede utilizar una muestra fecal reconocida como negativa.

Se ha calibrado el blanco del instrumento usando uno de los dos tubos de blanco de sustrato; se ha leído el diluyente o el control negativo y positivo, y se ha efectuado por último la medición de las muestras problema.

Las muestras cuyas absorciones sean mayores o iguales al valor límite establecido con el control negativo o de diluyente, se consideran positivas para el antígeno rotavirus. Las muestra cuyas absorciones estén dentro del  $\pm 25\%$  del valor límite son sospechosas y se han de repetir.

#### 3.4.2.1.2.1.3.2.1.- Determinación del valor límite

Se ha determinado agregando el factor 0.075 al control negativo o de diluyente.

3.4.2.1.2.1.3.2.2.- Cálculos para determinar la zona gris (dudosa)

La zona gris (dudosa) se define como el +25% del valor límite o 0.75 veces a 1.25 veces el valor límite.

### 3.5.- METODOS PARA LA DETERMINACION DE LAS PROPIEDADES TOXICAS

#### 3.5.1.- Preparaciones de enterotoxinas de E. coli

##### 3.5.1.1.- Medios de cultivo

##### 3.5.1.1.1.- Medio de crecimiento

Los aislamientos de E. coli se hicieron crecer en dos tipos de medio de cultivo diferentes, para observar cuál de ellos proporcionaba un desarrollo más eficaz.

Cada uno de los aislamientos de E. coli conservados, creció de forma independiente y separada de los demás, aunque se tratase de varias colonias obtenidas de un mismo paciente. Se hizo de esta forma, para evitar la acción de las colicinas que pudieran ser liberadas por alguna de las cepas, en el medio de cultivo común, tal como demostraron MURRAY et al. (1981) y explicamos detalladamente en el apartado 3.2.4.3.2.

- Agua peptonada que se preparó con 1 g de peptona (Difco,0149-01) y 0.5 g de cloruro sódico disueltos en 100 ml de agua destilada.

- Agar soja tripticasa (AST), que se preparó como ya hemos descrito en el apartado 3.2.4.3.2., distribuyendo volúmenes iguales en placas colocadas sobre una superficie previamente nivelada para que se solidifiquen.

Tras el crecimiento en ambos medios, nos decidimos por el segundo al ser más fácil obtener en él, una cantidad abundante de inóculo para transferir al medio de producción de enterotoxina.

#### 3.5.1.1.2.- Medio para la producción de enterotoxinas

Entre los medios propugnados como útiles para la obtención de toxinas se incluyen: Medio Syncase (FINKELSTEIN et al. 1966; SACK y SACK,1975); Medio Casanuco-ácidos-extracto de levadura-sales modificado (CAYE -2)(MUNDELL et al. 1976; SCHEFTEL et al. 1980); y el Medio caldo soja tripticasa (CST).

Este último fue elegido por su sencillez de preparación, su eficacia, y por ser el más ampliamente utilizado por la mayor parte de los autores (DEAN et al. 1972; DONTA et al. 1974a,b; GUERRANT et al. 1975; KONOWALCHUCK et al. 1977; SPEIRS et al. 1977; DEBOY II et al. 1980b; MAKI et al. 1980; SCOTLAND et al. 1980a,b; OTNAES y HALVORSEN,1981; CAPRIOLI et al. 1983; BLANCO et al. 1983c).

Se preparó tomando 30 g de polvo caldo-soja-triplicasa (Difco,0370-01-1) y disolviéndolos en 1 litro de agua destilada, distribuyendo a continuación volúmenes iguales, en matraces Erlenmeyer de 100 ml de capacidad.

Los medios se conservaron en nevera a 4°C.

#### 3.5.1.2.- Siembras

La siembra de los medios para la producción de enterotoxina, se realizaron mediante inoculación con asa de platino, en 10 ml de medio C.S.T., en matraces Erlenmeyer de 100 ml. En otras ocasiones, se dispensaron cantidades entre 5 y 20 ml en matraces Erlenmeyer de 50 y 250 ml respectivamente, según la cantidad final del filtrado que quisieramos obtener. Los frascos fueron tapados con algodón, para evitar una oclusión hermética que impidiese la aireación del microorganismo en crecimiento, y se dejaron crecer durante un periodo de 20 horas,

a 37°C (DONTA et al. 1974a; DE BOY II 1980c; GUERRANT, et al. 1975; MAKI et al. 1980), bajo agitación a 200 rpm (DONTA et al. 1974a; KONOWALCHUCK et al. 1977; DE BOY II et al. 1980b y MAKI et al. 1980), en agitador Orbitol (Lab-line Junior orbit-shaker. Lab-line instruments. Inc. Mel rose Park. Illinois).

#### 3.5.1.3.- Separación de sobrenadantes

Transcurrido el periodo de incubación, el caldo se centrifugó entre 10.000xg y 20.000xg (DEAN et al. 1972; DONTA et al. 1974a; GUERRANT et al. 1975; KONOWALCHUCK et al. 1977; SPEIRS et al. 1977; KAPPERUD, 1980; MAKI et al. 1980; OTNAESS y HALVORSEN, 1981; CAPRIOLI et al. 1983) a 4°C, durante unos 20 a 30 min (DEAN et al. 1972; GUERRANT et al. 1975; CALDERON y LEVIN, 1981) separando a continuación el líquido sobrenadante que fue filtrado o no, de acuerdo a su destino posterior. En ambos casos, las muestras obtenidas fueron analizadas de inmediato, o fueron conservadas, en cuyo caso, se mantuvieron en nevera a 4°C durante 2 días como máximo (SCOTLAND et al. 1980a,b; KONOWALCHUCK et al. 1977; SPEIRS et al. 1977), y en caso de que la conservación fuese más prolongada, fueron congelada a -20°C (OTNAESS y HALVORSEN, 1981) hasta 15 días (BLANCO, 1983, comunicación personal).

La filtración se realizó con filtros Millipore de 0.22 milimicras de diámetro de poro (DONTA et al. 1974a; MAKI et al. 1980; OTNAESS y HALVORSEN, 1981), o de 0.45 milimicras de diámetro de poro (KONOWALCHUCK et al. 1977; CAPRIOLI et al. 1983).

### 3.5.2.- Detección de enterotoxinas

#### 3.5.2.1.- Detección de la enterotoxina termolábil (LT)

##### 3.5.2.1.1.- Cultivo de células adrenales de ratón (Y<sub>1</sub>)

Las células adrenales de ratón (Y<sub>1</sub>) responden a la enterotoxina termolábil de V. cholerae y E. coli tanto morfológicamente, adquiriendo un aspecto redondeado, como fisiológicamente secretando esteroides en el medio de cultivo (SACK y SACK,1975). Sin embargo, no responden a la enterotoxina termoestable (ST) de E. coli u otras bacterias entéricas, ni ante otros tipos de enterotoxinas (DONTA y MOON,1974).

Han demostrado ser muy sensibles (DONTA et al. 1974a,b; SACK y SACK,1975) ya que con ellas, pueden detectarse la centésima parte de la cantidad que se detecta en la prueba del asa ileal de conejo adulto (DONTA et al. 1974a) siendo además muy útil en la clínica, al permitir analizar diariamente, gran cantidad de muestras (SACK y SACK,1975).

##### 3.5.2.1.1.1.- Medios de cultivo

Las células adrenales Y<sub>1</sub>, se mantienen en el medio Ham's F-10 (DONTA et al. 1974a; SACK y SACK, 1975; KUNKEL y ROBERSTON,1979). Este medio fue preparado diluyendo 50 ml de medio de Ham F-10 10X (Flow,14-410-54) en 400 ml de agua bidestilada esteril, añadiendo a continuación, 8 ml de bicarbonato sódico (PRS,141638) al 7.5%, 2.5ml de L-glutamina (Flow,16-801-49), 5ml de penicilina-estreptomina (Flow,16-700-49) y 0.25ml de gentamicina (concentración= 80mg/2ml)(Shering Corp. 76-7176). Por último, se suplementó con suero bovino fetal (SBF)(Flow lab. 29-101-54), previamente descomplementado

por calentamiento a 56°C durante 30 minutos, y conservándolo en nevera a 4°C. La cantidad de suero bovino fetal añadida fue del 2 ó 10%, según fuese destinado a los pases celulares, o a mantener la monocapa ya formada.

#### 3.5.2.1.1.2.- Mantenimiento de la línea celular

Las células  $Y_1$ , nos fueron suministradas por el Centro Nacional de Microbiología Sanitaria de Madrid. Fueron mantenidas en frascos para cultivo celular de 200ml de capacidad (Nunc. Intermed.), con unos 20 a 40ml de medio de Ham F-10, suplementado al 10% con suero bovino fetal, haciéndolas crecer en forma de monocapas, en una atmósfera de  $CO_2$  al 6%, a 37°C (DONTA *et al.* 1974a; CALDERON y LEVIN, 1981), y haciendo pases por tripsinización, cada 4 a 6 días aproximadamente, alternados con cambios del medio de cultivo cada 3 ó 4 días.

Las transferencias celulares se efectuaron cuando se observó al microscopio la formación de monocapa homogénea y densa, sin lagunas, y cuando comienzan a existir células flotando libremente en el medio, o agrupamiento de las mismas. Entonces, se toman 1 ó 2 nuevos frascos, en los que se introduce una cantidad similar de nuevo medio de cultivo. Del frasco antiguo se elimina el medio existente, haciendo un lavado con unos 4-5ml de tampón fosfato alcalino (PBS), que se deshecha. A continuación se introduce una pequeña cantidad, alrededor de 3ml de solución de tripsina-versene manteniéndolas en contacto con las células, hasta observar a través del microscopio que éstas cambian de forma redondeándose.

En este momento se elimina la solución de tripsina, y se deja el frasco tapado y apoyado sobre la pared donde asienta la monocapa celular, a 37°C, durante unos minutos, hasta comprobar que las células comienzan a sepa-

rarse entre sí y desprenderse.

La solución tripsina-versene, se preparó diluyendo en un litro de agua bidestilada los siguientes componentes=

- . Tripsina 1:250 en polvo (Difco 0152-15-100g) - - - 1.25g
- . PBS en tabletas (Oxoid Br 14a) - - - - - 10 tabletas
- . EDTA (Panreac,141952) - - - - - 0.2g

Se mezclan en un matraz sobre agitador magnético y se filtran a través de membrana, distribuyéndolos a razón de 20ml, en tubos estériles de 0.22 micras. Se conservan congelados a -30°C.

Tras conseguir la separación celular, y un despegamiento uniforme de la pared, se realizan lavados de la superficie donde asentaba la monocapa, con 5ml de medio de cultivo completo, pipeteando repetidamente sobre ella, hasta recoger las células desprendidas en el medio, transportándolas entonces hasta el nuevo frasco preparado, o repartiéndolas entre dos, dependiendo de la cantidad que nos interese mantener. La nueva monocapa, suele empezar a formarse a las 24 horas.

Los cambios de medio se realizan vaciando el contenido del frasco que queremos desechar, e introduciendo una pequeña cantidad (5ml) del nuevo, con el que se lava la pared donde se ha formado la monocapa celular, con el fin de arrastrar todos sus detritus, y células muertas o sueltas. Tras el lavado se elimina, introduciendo entonces una cantidad de medio nuevo, similar a la anterior.

Estos cambios de medio completo de crecimiento, pueden realizarse con la proporción del 10% de suero bovino-fetal, o sólo con el 2%, cuando se comprueba que el

crecimiento celular es rápido y efectivo y sólo nos interesa mantener la línea de crecimiento.

#### 3.5.2.1.1.3.- Preparación de las placas con células para la detección de enterotoxina termolábil

Para la distribución de células adrenales de ratón sobre las que detectar el efecto de la enterotoxina termolábil hemos utilizado placas para cultivo tisular de 96 pocillos (Nunc. Intermed. Cat.167008).

Por tripsinización de cada frasco ROUX, con la monocapa de cultivo celular, se obtiene una suspensión de células que se ajustan a  $2 \times 10^5$  células por mililitro (SPEIRS et al. 1977). De esta suspensión, se introducen 0.25ml en cada uno de los pocillos de la placa de cultivo celular quedando  $5 \times 10^4$  células en cada pocillo, y a los 4 días se habrá formado una monocapa celular. El medio de crecimiento se cambia 24 horas antes, y en el momento de ensayar los filtrados enterotóxicos, utilizando en esta ocasión un medio suplementado con suero bovino fetal al 2%.

#### 3.5.2.1.1.4.- Detección de la enterotoxina termolábil (LT)

Cuando comprobamos la formación de una monocapa completa, tras sustituir el medio de cultivo antiguo, como hemos comentado anteriormente, se añade sobre cada uno de los pocillos, 0.025ml de cada uno de los filtrados problema preparados anteriormente, teniendo la precaución de ensayar por duplicado cada uno de los filtrados de cada colonia de E. coli, en pocillos separados, así como de utilizar una cepa control positiva productora de enterotoxina y otra cepa control negativo, no

productora de enterotoxina termolábil. También se mantienen unos pocillos control, en los que sólo existen las células  $Y_1$  con el medio de crecimiento.

La lectura se realiza a las 14, 16 y 24 horas, valorando el número de células que presentan cambios morfológicos (SACK y SACK, 1975; KUNKEL y ROBERSTON, 1979; OTNAESS y HARVONSEN, 1981 y BÄCK, et al. 1980b), utilizando un microscopio invertido de contraste de fases. La lectura fue siempre realizada por dos personas, dando por válidos los resultados sólo en el caso de que fueran concordantes. Cuando hubo discrepancia la prueba fue repetida de nuevo (BACK, et al. 1977). Las cepas de E. coli que produjeron alteración morfológica sobre las células  $Y_1$ , fueron probadas de nuevo para comprobar la fiabilidad del resultado.

### 3.5.2.1.2.- Cultivo de células C.H.O. (Chinesse hamster ovary)

Las células de ovario de hamster chino (C.H.O.: Chinesse hamster ovary), presentan, como las células  $Y_1$ , la característica de responder con cambios morfológicos ante la enterotoxina termolábil de V. cholerae y E. coli (GUERRANT et al. 1974; NALIN et al. 1975). Tales cambios se ha demostrado que están correlacionados significativamente, con un aumento del adenosin 3'-5' monofosfato-cíclico (AMPC) intracelular, así como con la dosis de toxina existente (GUERRANT et al. 1975). Su sensibilidad es similar a la de las células adrenales  $Y_1$  según SACK (1975), aunque menor que la prueba de permeabilidad cutánea en el conejo, según KETIYI y CZIROK (1978) y quizás más fáciles de mantener que las células  $Y_1$  (Who Scientific Working Group, 1980a).

GUERRANT et al. (1974) la consideran como una prueba simple y específica para la detección de la enterotoxina termolábil (LT) de E. coli, ya que detecta  $3 \times 10^{-17}$  mol de toxina colérica (CT), o una dilución 1:250 de filtrado de cultivo crudo de toxina termolábil producida por E. coli 334.

#### 3.5.2.1.2.1.- Medios de cultivo

Se han utilizado dos medios de cultivo distintos para hacer crecer las células CHO:

- Medio de Ham F-12 (GUERRANT, et al. 1974). Este medio se preparó diluyendo sus componentes, incluyendo glutamina y 12g/l de rojo fenol sin bicarbonato sódico (Flow-laboratories r:10-431-20), en 1 litro de agua bidestilada, añadiendo después, sobre agitador, 1.18g de bicarbonato sódico (Sodium bicarbonate Anhydrous Sigma r: S-8875), y manteniendo la agitación hasta su completa disolu-

ción. A continuación, se filtró e introdujo en un frasco esteril, realizando una prueba de esterilidad, (24h en estufa a 37°C).

Posteriormente, o en el momento de usar, al medio base obtenido, se añadió 10% a 20% de suero bovino fetal, (SBF),(Flow. Lab. Ref.29-101-54), previamente descomplementado, según fuese su utilización posterior (ver después), penicilina (5000UI/ml) y estreptomycin (5000mg/ml)(Flow. Lab. r:16-700-49), en una proporción del 5% guardándose en nevera a 4°C.

- Medio mínimo esencial de Eagle (Minimum essential medium Eagle: MEM),(KETYI et al. 1978; KETYI y PACSA, 1980; HONDA et al. 1981a,b). Para su preparación, se utilizó una solución 10X (Minimum Essential Medium agle odified) con sales de Earle sin bicarbonato sódico y sin glutamina,(Flow. Lab. r:14-100-54), del que se mezclaron 50ml con 400ml de agua bidestilada esteril, 5ml de L-glutamina, 200mM (r:16-801-49), 5ml de aminoácidos no esenciales (100X non essential aminoacids.Flow. Lab. r:16-810-49), 14ml de bicarbonato sódico al 7.5%, 2ml de NaOH 1N y 0.25ml de gentamicina (80mg/2ml)(Shering Corp.). Además es suplementado con suero bovino fetal (SBF)(Flow. Lab. r:29-101-54) previamente descomplementado, o al 10%, ó al 2%, según el destino posterior del medio. Tras su preparación se conservó a +4°C.

El crecimiento de las células en ambos medios, es excelente, sin grandes diferencias, pero nos decidimos definitivamente por el uso del medio M.E.M., siguiendo las indicaciones del HONDA et al. (1981a), dado que en él disminuye el grado de elongación celular en ausencia de enterotoxina termolábil.

### 3.5.2.1.2.2.- Mantenimiento de la línea celular

Las células CHO fueron obtenidas del laboratorio Flow (Glasgow), y se mantuvieron en frascos para cultivo celular de forma similar a la descrita previamente.

### 3.5.2.1.2.3.- Preparación de las placas con células para la detección de enterotoxina termolábil

Utilizamos también, como para las células  $Y_1$ , placas para cultivo tisular de 96 pocillos (Nunc. Intermed Cat.167008).

Tripsinizando uno de los frascos ROUX, donde ya se había formado una monocapa uniforme, se obtuvo una suspensión de células que se ajustó a  $2 \times 10^4$  células/ml (GUERRANT et al. 1975; KONOWALCHUCK, 1977; SPEIRS 1977; KETIYI y PAESA, 1980) diluyéndolos en medio M.E.M. con 2% de SFF, penicilina 100U/ml y estreptomycinina 100mg/ml. Posteriormente utilizamos medio M.E.M. al 1% (GUERRANT et al. 1975; HONDA et al. 1976; BLANCO, comunicación personal, 1984). De esta suspensión se tomaron 0.25ml que se introdujeron en cada uno de los pocillos de la placa de cultivo celular, con lo que quedan  $5 \times 10^3$  células en cada pocillo, sobre los que se añaden a continuación 0.02ml del filtrado enterotóxico preparado anteriormente (GUERRANT et al. 1975; HONDA et al. 1976). Así se mantienen 16 a 24 horas a 37°C en una atmósfera con 6% de  $CO_2$ , tras lo que se efectuó el recuento de las células elongadas, bipolares o en forma de huso, determinando el porcentaje de las que han sufrido esta alteración. Cada recuento se hizo por duplicado, en pocillos separados teniendo, como en las células  $Y_1$ , controles positivos (cepas de E. coli enterotoxigénicas) y negativos (cepas de E. coli LT(-)), así como controles de células sin filtrados.

### 3.5.2.2.- Detección de la enterotoxina VT. Cultivo de células VERO

Las investigaciones de SPEIRS et al. (1977), permitieron conocer el efecto de la toxina termolábil (LT) de E. coli sobre la línea celular VERO (cels. de riñón de mono verde africano pero posteriormente estos mismos autores (KONOWALCHUCK et al. 1977), demostraron la existencia de una citotoxina (VT), distinta de las enterotoxinas LT y ST, en los filtrados de los cultivos de algunas cepas de E. coli, con un efecto citotóxico sobre las células VERO, totalmente distinto al efecto citopático causado por la toxina termolábil, y fácilmente distinguible del producido por ellas.

Las células afectadas aparecen redondeadas, pero habiendo reducido su tamaño, arrugadas, flotando muchas de ellas en el medio. Este efecto, se hace además más patente a medida que va pasando el tiempo, sin posibilidades de recuperación, mientras que la acción de la enterotoxina LT se debilita, por lo que lo que la monocapa celular expuesta a ésta, tiene a los 3 ó 4 días su aspecto normal.

#### 3.5.2.2.1.- Medios de cultivo

Se utilizó el medio mínimo esencial de Eagle (MEM), preparado tal como consta en el apartado 3.5.2.1.2.1.

#### 3.5.2.2.2.- Mantenimiento de la línea celular

Las células VERO fueron obtenidas del Laboratorio del Instituto de Microbiología de la Universidad de Bolonia.

Para su conservación y crecimiento, seguimos

un método similar al referido en el apartado 3.5.2.1.1.2 para las células  $Y_1$  y células CHO, no distanciando los pases celulares más allá de 4-6 días como indican SPEIRS et al. (1977).

3.5.2.2.3.- Preparación de las placas con células para la detección de la enterotoxina VT

Para el ensayo de la actividad enterotóxica VT, utilizamos células distribuídas en placas de cultivo tisular de 96 pocillos (SCOTLAND et al. 1980a).

Con el fin de facilitar la lectura del efecto citotóxico (VT), sin interferencias con el efecto citopático producido por la enterotoxina termolábil LT, presentes ambos cuando se analiza la respuesta celular sobre una monocapa totalmente formada, utilizamos células recién tripsinizadas, en suspensión, y que habrán sido distribuídas en cada uno de los pocillos, de la placa de cultivo tisular.

Para ello actuamos tal como describimos en el apartado 3.5.2.1.1.3. para las células  $Y_1$ , con una única diferencia consistente en utilizar el medio, con un 10% de suero bovino-fetal. Como para aquellas células, utilizamos controles de cepas de E. coli, en este caso VT (+), así como pocillos con células en los que sólo crecieron células VERO normales.

La lectura se realizó a las 8, 10 y/o 24 horas, aunque por la persistencia del efecto se pudo completar 2,4 hasta 7 días después.

3.5.2.3.- Detección de la enterotoxina termoestable  
(ST)

3.5.2.3.1.- Prueba del ratón lactante (infant mouse  
test = I.M.T.)

Se trata de una prueba que surge como alternativa a otra anterior ya utilizada, la del asa ileal de conejo adulto o de otros animales (SMITH y HALLS,1967), que aunque efectiva, resultaba cara, difícil de llevar a cabo, y con resultados, a veces, dispares (DEAN et al. 1972). Ofrece la ventaja de utilizar animales de menor tamaño, en los que todavía no existe proliferación bacteriana intestinal, lo que condiciona un mayor grado de uniformidad en su respuesta (DEAN, et al. 1972).

3.5.2.3.1.1.- Obtención y características de los  
animales

Utilizamos ratones blancos de la raza Swiss, criados en jaulas preparadas para tal efecto, en el estabulario del Departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina de Valencia.

Para poder contar con un alto número de unidades de cría de forma practicamente continua, dispusimos de 45 a 50 jaulas, en las que colocamos 1 ratón macho por cada 3 a 5 ratones hembras, lo que permitió tras los primeros meses de adaptación, contar con unos 50 ratones recién nacidos, como promedio semanal, que reunieran las condiciones exigidas en la prueba.

Todos los ratones utilizados han sido recién nacidos, de 1 a 4 días de edad, (DEAN et al. 1972; RUDOY y NELSON,1975; SACK,1975; MAKI et al. 1980), FIGURA 8



Fig. 8.- Conjunto de crías de ratones, de 1 a 4 días de edad, recién separados de sus madres. (raza Swiss).

predominando los de 3 días a causa de su mejor adaptabilidad a la prueba, dado que su tamaño y fortaleza son mayores que las de los ratones más pequeños, y la respuesta es más homogénea que en los mayores.

Los ratones fueron separados de sus madres un poco antes de ser utilizados, reuniéndolos al azar en grupos de 6, ó de 3, según veremos posteriormente, en el momento de administrarles el filtrado de cultivo de E. coli.

#### 3.5.2.3.1.2.- Preparación del material de inoculación

Hemos procedido tal y como ha quedado expuesto en el apartado 3.5.1., aunque en este caso no es necesario filtrar las muestras que van a ensayarse (GIANELLA,1976; BLANCO, et al. 1983c).

Para facilitar la aplicación rutinaria de la prueba a un número elevado de cepas de E. coli, disminuir su costo y disponer de un número suficiente de ratones cada vez, realizamos la prueba con las mezclas de los extractos de 5 colonias diferentes de E. coli, de cada uno de los cultivos de los aislamientos a ensayar. (BYERS y DUPONT,1979; BLANCO ALVAREZ et al. 1983c). Para ello tomamos 1ml de los sobrenadantes o filtrados de cada uno de los cinco aislamientos, mezclándolos en un frasco, del que a su vez, separamos 1ml de la mezcla, al que añadimos una gota de colorante de azul de Evans, previamente preparado al 2% en tampón fosfato salino, de pH 7.4 (BLANCO ALVAREZ,1983).

El tampón fosfato salino fue preparado según la siguiente composición:

.  $\text{PO}_4\text{H}_2\text{Na} \times 2 \text{H}_2\text{O}$  (Merck,6580) - - - - - 2.82g

- .  $\text{PO}_4\text{HNa}_2$  (Merck,6586) - - - - - 11.93g
- . Agua destilada c.s.p. - - - - - 500ml
- . Se ajustó a un pH de 7.2-7.4

Se añadió 87.66g de cloruro sódico, llevando hasta 1 litro con agua destilada, y se añadió por último azida sódica hasta una concentración final de 0.005% (0.05g).

### 3.5.2.3.1.3.- Inoculación del sobrenadante del cultivo

Una vez homogeneizado el extracto de cultivo con el colorante, se administró por vía oral 0.1ml a cada uno de los ratones (KETYI, et al. 1978). Para ello se utilizaron jeringas de insulina Conolver(Americano), 16/5 (lot.X/009 02/85), con agujas previamente despuntadas, romas y revestidas de papel parafinado (Parafilm) con el fin de evitar lesionar la mucosa oral y esofágica. La aguja se introdujo en la boca, con pequeños y suaves movimientos de rotación, y desde allí, en el esófago de los ratones,(fig. 9). El color azul del material inyectado facilita la visualización de su llegada al interior del estómago lleno de leche, asegurando así la ejecución correcta del procedimiento.

Desechamos la inyección percutánea directa, en el estómago de los animales, (DEAN, et al. 1972; GUE-RRANT, et al. 1975; MAKI, et al. 1980), al ser un método más traumático y expuesto a mayor número de complicaciones.

Cada muestra, (mezcla del conjunto de las cinco colonias distintas del mismo aislamiento de E. coli), se ensayó en lotes de 6 ratones, tomados al azar.



Fig. 9.- Inoculación orogástrica del filtrado de cultivo de E. coli a ensayar.

En cada una de las pruebas realizadas se utilizó siempre una cepa de E. coli conocida, productora de enterotoxina termoestable (ST), que sirvió de control positivo de la misma. Con ella se procedió de igual modo, pero utilizando exclusivamente 1 ml de filtrado enterotóxico obtenido, y se ensayó en un lote de 3 ratones (BLANCO ALVAREZ, 1983c).

Del mismo modo, ensayamos en diversas ocasiones cepas de E. coli ST negativos que nos sirvieron de base comparativa con nuestros propios resultados negativos, así como el propio medio de crecimiento de E. coli, (CST), al que sometimos al mismo procedimiento por el que pasan las propias cepas para comprobar sus posibles interferencias en los resultados finales.

Al mismo tiempo, y para dar validez al método de BYERS y DUPONT (1979), planteamos varias pruebas diluyendo al 1/5 extractos de una cepa de E. coli ST(+), con extractos de cepas conocidas como ST(-), utilizando en estos casos, (como en las pruebas habituales), lotes de 6 ratones.

#### 3.5.2.3.1.4.- Evaluación del efecto enterotóxico

Tras la inoculación, los animales permanecieron durante 4 horas a temperatura ambiente, entre 25 y 28°C, (DEAN et al. 1972; KETYI et al. 1978; DE BOY et al. 1980; BLANCO ALVAREZ et al. 1983c). Durante este tiempo los ratones inoculados con el filtrado del cultivo de una cepa de E. coli productora de enterotoxina termoestable suelen cambiar su aspecto, de tal forma que, trascurrido el periodo de incubación, se muestran letárgicos, inmóviles y con el abdomen llamativamente distendido. En cambio los ratones que recibieron

el extracto de la cepa negativa, ofrecen un aspecto normal (Figura 10).

A las 4 horas los animales son sacrificados por dislocación cervical, (BLANCO ALVAREZ et al. 1983c), que ha de realizarse limpiamente evitando soluciones de continuidad que puedan provocar hemorragias al exterior.

A continuación se pesan cada uno de los lotes de 3 ó 6 ratones, procediendo después a abrir el abdomen de cada uno de ellos, examinando el intestino delgado para evaluar tanto su dilatación, (SACK, 1975; KETYI et al. 1978), como la coloración azulada que adoptan, (MAKI et al. 1980; RUDOY y NELSON, 1975), siendo incluidos solamente en la prueba, aquellos en los que es visible el azul de metileno. Se extrae luego el tubo digestivo, desde píloro a recto (RUDOY y NELSON, 1975), procurando no romper las asas para evitar la salida del contenido intestinal, y se pesan por último los ratones sin intestino (Figura 11), calculando el peso de los intestinos por la diferencia de peso de los ratones, antes y después de la extracción de las asas intestinales, (GIANELLA, 1976; OLSSON y SODERLAND, 1980).

El grado de deshidratación viene dado por el cociente entre el peso de los intestinos respecto al peso de los cuerpos, (Coeficiente I.M.T.), (DEAN et al. 1972; GUERRANT et al. 1975; RUDOY y NELSON, 1975; GIANELLA, 1976; KETYI y PACSA, 1980; MAKI et al. 1980; BLANCO ALVAREZ et al. 1983c).

Todos los organismos con respuesta positiva

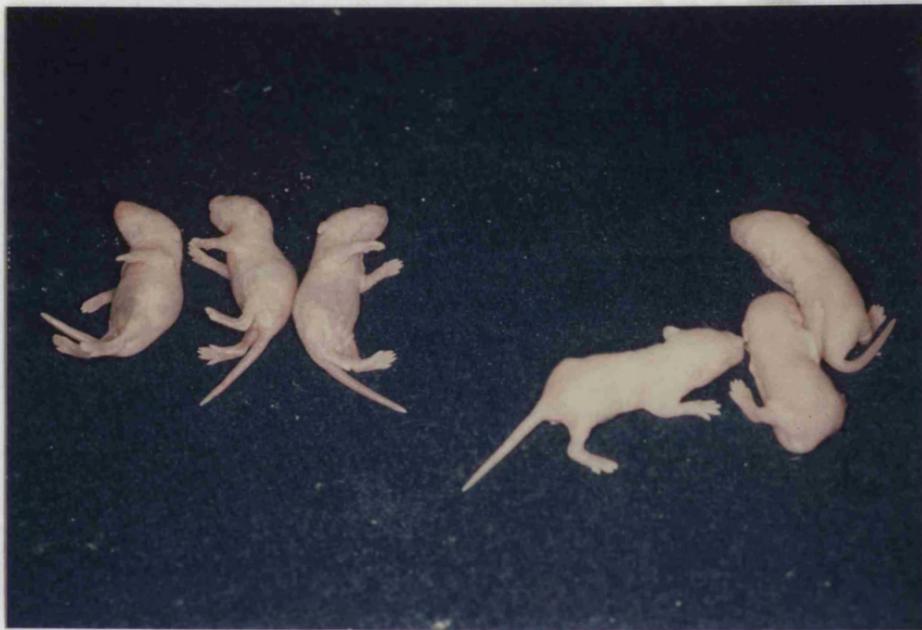


Fig. 10.- Ratones inoculados con una cepa de E. coli ST(+), (izquierda), y con una cepa ST(-), (derecha), tras un periodo de incubación de 4 horas.



Fig. 11.- Lote de 6 ratones inoculados con una misma cepa de E. coli, tras extraerles los intestinos, previa pesada.

volvieron a ser ensayados para asegurar la veracidad del resultado. Si seguían siendo positivos, la prueba se repetía de nuevo, ensayando entonces individualmente cada uno de los 5 aislamientos diferentes de E. coli que habían dado coeficientes positivos en conjunto. En esta ocasión fueron utilizados lotes de 3 ratones para cada una de las cepas ensayadas, tal como procedíamos habitualmente cuando ensayábamos una única cepa de E. coli. Esto permite concretar cuál y cuántas de ellas son las productoras de enterotoxina termoestable.

### 3.5.3.- Cepas control

Hemos utilizado como cepas control productoras de enterotoxinas, E. coli aislados de seres humanos con diarrea en diversas partes del mundo. Los serotipos, fenotipos enterotoxigénicos y procedencia de cada una de ellas se indican en la TABLA 30. Todas ellas nos fueron cedidas amablemente por E. A. GONZALEZ GARCIA y J. BLANCO del departamento de Microbiología Interfacultativo (Farmacia y Medicina) de la Universidad de Santiago de Compostela.

TABLA 30

SEROTIPOS, FENOTIPOS TOXICOS Y AISLAMIENTOS  
DE E. COLI ENTEROTOXIGENICOS CONTROL

CEPA	SEROTIPO	AISLADA EN	TOXINAS
B2C	06:H16	VIETNAM	LT y ST
PB-176	06:H16	MEXICO	LT y ST
PB-176-P	06:H16	Derivado de laboratorio	LT
H-10407	078:H11	BANGLADESH	LT
H-10407-P	078:H11	Derivado de laboratorio	LT
Gonzales-C <sub>2</sub>	No conocido	EGIPTO	LT y ST
D-121-C <sub>3</sub>	08:K40:H9	HONDURAS	LT
M-8031-MI	No conocido	GUAM (EEUU)	ST
H-19	026:K60:H11	CANADA	VT
H-30	026:K60	CANADA	VT

### 3.5.4.- Análisis estadístico de los datos obtenidos

Con la finalidad de describir e interpretar la información obtenida, tanto en lo referente a la puesta a punto del ensayo de ratones lactantes, antes de su aplicación al material objeto de este estudio, como respecto a las características de nuestros pacientes y de los hallazgos microbiológicos de las heces examinadas, se han tabulado los resultados siguiendo las indicaciones de VIEDMA (1976) y DOMENECH y MASSONS (1980), mediante la aplicación de pruebas paramétricas, cuando se trataba de valorar datos cuantitativos, o de pruebas no paramétricas si se examinaban datos cualitativos.

#### 3.5.4.1.- Métodos paramétricos

##### 3.5.4.1.1.- Medidas de tendencia central

Investigan la posición de los datos dentro de una distribución:

- Media aritmética ( $\bar{x}$ ) =  $\frac{\sum x_i}{n}$

- Mediana ( $M_d$ ) =  $P_{50} = \frac{L_i - (N - nN/100)h.}{n_i}$

- Moda ( $M_o$ ) o variable más frecuente.

##### 3.5.4.1.2.- Medidas de dispersión

Revelan la homogeneidad de los datos dentro de una distribución:

- Varianza ( $s^2$ ) =  $\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}$
- Desviación tipo ( $s$ ) =  $\sqrt{s^2}$
- Rango o amplitud ( $A$ ) =  $x_{\max.} - x_{\min.}$

#### 3.5.4.1.3.- Medidas de forma

Muestran el modo de agruparse los datos de la distribución:

- Coeficiente de variación (C.V.) =  $\frac{100 s}{\bar{x}}$
- Puntuación estandar ( $z$ ) =  $\frac{x_i - \bar{x}}{s}$
- Coeficiente de asimetría de Pearson ( $\beta_1$ )

$$\beta_1 = \frac{\sum (z)^3}{n}$$

$\beta_1 < 0$  : Distribución asimétrica negativa

$\beta_1 = 0$  : Distribución simétrica

$\beta_1 > 0$  : Distribución asimétrica positiva

- Coeficiente de curtosis de Pearson ( $\beta_2$ )

$\beta_2 < 3$  : Distribución plana o platicúrtica

$\beta_2 = 3$  : Distribución normal o mesocúrtica

$\beta_2 > 3$  : Distribución apuntada o leptocúrtica

#### 3.5.4.1.4.- Comparación de grupos de datos independientes

##### 3.5.4.1.4.1.- Muestras pequeñas

Se han aplicado sucesivamente la prueba de Snedecor, o de igualdad de varianzas "F", y la ley de Student-Fisher.

##### 3.5.4.1.4.1.1.- Prueba de Snedecor

La prueba "F" se ha ensayado con objeto de determinar si las varianzas de las series comparadas son significativamente diferentes entre sí, y provienen de dos poblaciones distintas.

Para desarrollarla se aplica el cociente  $F = \frac{s_1^2}{s_2^2}$ , entre la mayor y la menor de las varianzas, ( $s^2$ ), y el valor obtenido se compara con el valor F, ( $v_1, v_2, \alpha$ ) dado por la tabla de significación F de Fisher-Snedecor, siendo  $v_1 = n_1 - 1$ , y  $v_2 = n_2 - 1$  grados de libertad, con un riesgo  $\alpha = 0.05$ . Si  $F \leq F(v, v, \alpha)$ , significa que no existen diferencias entre las varianzas, por lo que las muestras comparadas son normales.

##### 3.5.4.1.4.1.2.- Prueba de Student-Fisher

Admitida la premisa de que partimos de muestras normales, se pasa a aplicar la prueba "t" de Student para la comparación entre medias, (media observada y media teórica-control), mediante la fórmula:

$$t = \frac{\bar{x} - m}{\sqrt{s^2/n}}$$

#### 3.5.4.1.4.2.- Muestras grandes

Para establecer si existen diferencias significativas entre las medias de dos muestras con más de 30 individuos, se ha aplicado la prueba:

$$z = \frac{(\bar{x}_1 - \bar{x}_2)}{\sqrt{s_1^2/n_1 + s_2^2/n_2}}$$

en la que  $\bar{x}_1$  y  $\bar{x}_2$  son las medias de cada una de las muestras comparadas,  $s_1^2$  y  $s_2^2$  las varianzas respectivas, y  $n_1$  y  $n_2$  el número de individuos de las mismas.

Para un riesgo  $\alpha = 0.05$ , si  $z \leq z_\alpha$ , la diferencia entre las medias no es significativa. Si  $z > z_\alpha$ , esta diferencia si que existe.

#### 3.5.4.1.5.- Estimación de las propiedades de la media ( $\bar{x}$ )

##### 3.5.4.1.5.1.- Intervalo normal

Es el intervalo normal (I.N.) que contiene el 95% de los individuos de una población y se expresa por la fórmula:

$$I.N. = \bar{x} \pm z_\alpha s$$

Para muestras grandes esta fórmula equivale en la práctica a  $\bar{x} + 2s$ , ya que para un riesgo  $\alpha = 0.05$ , el valor  $z$  es igual a 1.96 en la tabla de la Ley Normal (DOMENECH y MASSONS, 1980), equivalente a 2.

Para muestras pequeñas, el cálculo de  $z_\alpha$  se realiza aplicando la ley de Student-Fisher, para

un riesgo  $\alpha = 0.05$ , y un número de grados de libertad ( $v$ ) igual a  $n-1$ , quedando expresada, por tanto, de la forma siguiente:

$$I.N. = \bar{x} \pm t(v, \alpha)s$$

La variable  $t(v, \alpha)$  está tabulada en la tabla F (DOMENECH y MASSONS, 1980).

Cuando el carácter  $x$  estudiado queda fuera del intervalo normal, se considera como un dato patológico o anormal.

#### 3.5.4.1.6.- Relación entre dos caracteres cuantitativos.

El análisis comparativo entre dos caracteres cuantitativos permite medir, según SCHWARTZ (1972), su grado de asociación y calcular las rectas de regresión.

Además de las pruebas de independencia entre las variables comparadas, basada en el índice  $r$ , se han de realizar pruebas de correlación si estas variables son aleatorias, o pruebas de regresión si una de ellas es aleatoria y la otra controlada.

##### 3.5.4.1.6.1.- Cálculo de la recta de regresión

La recta de regresión es la expresión lineal del valor de una variable aleatoria, en función de distintos valores controlados.

Se calcula por el método de los mínimos

cuadrados de Gauss, y está determinada por el estadígrafo:

$y = a + bx$ , en el que

$$b = \frac{(\sum xy - (\sum x \sum y / N))}{(\sum x^2 - (\sum x)^2 / N)}$$

$$a = \bar{y} - b\bar{x}$$

Tras conocer los valores de  $a$  y de  $b$ , dando valores a  $(x)$  se obtienen los de  $(y)$ .

#### 3.5.4.1.6.2.- Cálculo del coeficiente de correlación

Mide la intensidad en la relación entre dos variables cuantitativas y el grado de adaptación a una línea recta.

Este coeficiente varía entre  $-1$  y  $+1$  considerándose en la práctica que cuando se aproxima a  $1$ , la dependencia lineal es muy fuerte. Los valores iguales o superiores a  $0.8$  indican buena dependencia. Los valores inferiores a  $0.5-0.8$  reflejan una dependencia aceptable, y los inferiores a  $0.5$  señalan que el modelo lineal no es adecuado para describir la relación entre las variables, si es que existe alguna.

Viene dado por la fórmula:

$$r = \frac{\sum xy - \sum x \sum y / N}{\sqrt{(\sum x^2 - (\sum x)^2 / N)(\sum y^2 - (\sum y)^2 / N)}}$$

### 3.5.4.2.- Métodos no paramétricos

Se han utilizado métodos no paramétricos cuando se trataba de analizar la relación existente entre dos muestras expresadas mediante atributos.

#### 3.5.4.2.1.- Ley de $\chi^2$

Se puede aplicar a cualquier estudio en el que se investiguen caracteres cualitativos con K categorías, y en el que se tratan de comparar dos proporciones.

En el caso de muestras independientes se ha recurrido a la distribución  $\chi^2$ , de acuerdo a los siguientes criterios:

En tablas de contingencia de  $2 \times 2$ , se han realizado la prueba  $\chi^2$  salvo cuando alguna frecuencia fuera menor de 5, en cuyo caso se ha aplicado la corrección de Yates, siempre que los efectivos calculados estuvieran comprendidos entre 3 y 5. Para efectivos inferiores a 3, se ha utilizado un método de comparación de dos proporciones observadas basado en el cálculo de probabilidades.

En tablas de contingencia de  $2 \times k$ , siendo k mayor de 2, se ha utilizado exclusivamente la distribución  $\chi^2$ .

La representación algebraica convencional de una tabla  $2 \times 2$  sería:

a(1)	b(2)	a+b
c(3)	d(4)	c+d
a+c	b+d	a+b+c+d=n

$$(1) = (a+c) \times (a+b)/a+b+c+d$$

$$(2) = a+b-(1)$$

$$(3) = a+c-(1)$$

$$(4) = c+d-(1)$$

$$\chi^2 = \frac{(a-(1))^2}{(1)} + \frac{(b-(2))^2}{(2)} + \frac{(c-(3))^2}{(3)} + \frac{(d-(4))^2}{(4)}$$

Cuando  $\chi^2 \leq \chi^2(v, \alpha)$  no existe diferencia significativa entre los grupos comparados.

Cuando  $\chi^2 \geq \chi^2(v, \alpha)$ , existe diferencia significativa entre ambos grupos.

El valor de  $\chi^2(v, \alpha)$  se calcula, para un riesgo  $\alpha$  de 0.001 a 0.05, y un número de grados de libertad (k-1), en las tablas correspondientes, (DOMENECH y MASSONS, 1980).

#### 3.5.4.2.2.- Estimación de una proporción: Intervalo de probabilidad

Para estimar la probabilidad de que un determinado carácter, encontrado en una proporción determinada ( $p_0$ ) dentro de una muestra, se dé en la población origen de dicha muestra, se ha hallado el intervalo de probabilidad  $1-\alpha$  de una proporción, mediante la fórmula:

$$p_o \pm z_\alpha \sqrt{pq/n}$$

en donde  $q = 1 - p_o$ .

Esta prueba permite predecir, con un riesgo de error  $\alpha$ , el intervalo en el que estará contenido la proporción  $p_o$  observada en una muestra de tamaño  $n$ , que a su vez procede de una población caracterizada por una proporción  $p$ .

El valor  $\alpha$  debe oscilar entre 0.05 y 0.01, lo que hace que el intervalo de probabilidad contenga el 95% o el 99% de las proporciones observadas.

#### 4. - RESULTADOS

#### 4.1.- CARACTERISTICAS GENERALES DE LOS PACIENTES ESTUDIADOS

El número de niños incluidos en el estudio es de 101, de los que 66 son varones y 35 mujeres.

La distribución por edad, en los 3 grupos en que quedan clasificados los pacientes, según describíamos en el apartado 3.1.1.1., se refleja en las figuras 12, 13 y 14. El núcleo principal de niños estudiados corresponde al primer año de vida, 69.3% del total, y más aún al primer semestre, 55.44% del total. Los niños mayores de 2 años constituyen el 19.8%. Todos ellos se distribuyen por igual, sin diferencias significativas, entre los grupos A y C. Sin embargo el grupo B está formado casi exclusivamente por niños menores de 6 meses (93.93%), lo que supone más de la mitad, (55.35%), de los integrantes de esta edad.

En 58 casos se ha podido realizar una investigación virológica sobre heces líquidas conservadas para tal fin. Las edades de los niños en los que se practicó esta investigación quedan expresadas en la figura 15, en relación a los 3 grupos de referencia.

La investigación se ha planteado en 51 de los 81 niños menores de 2 años, (62.9%), de los

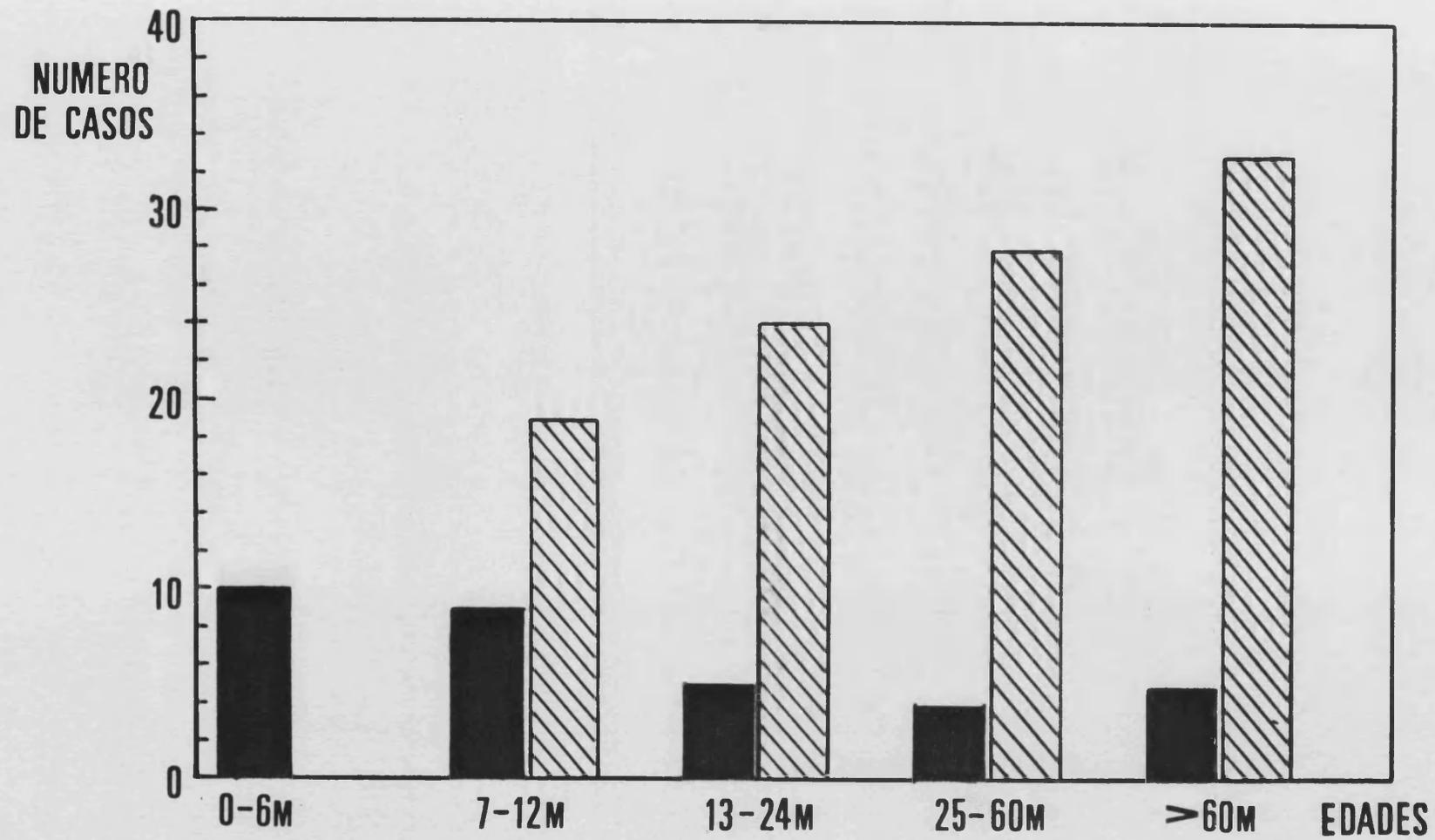


FIG.12.- DISTRIBUCION POR EIDADES (GRUPO A)

- NUMERO DE CASOS POR GRUPO DE EDAD
- ▨ ACUMULATIVO DE CASOS

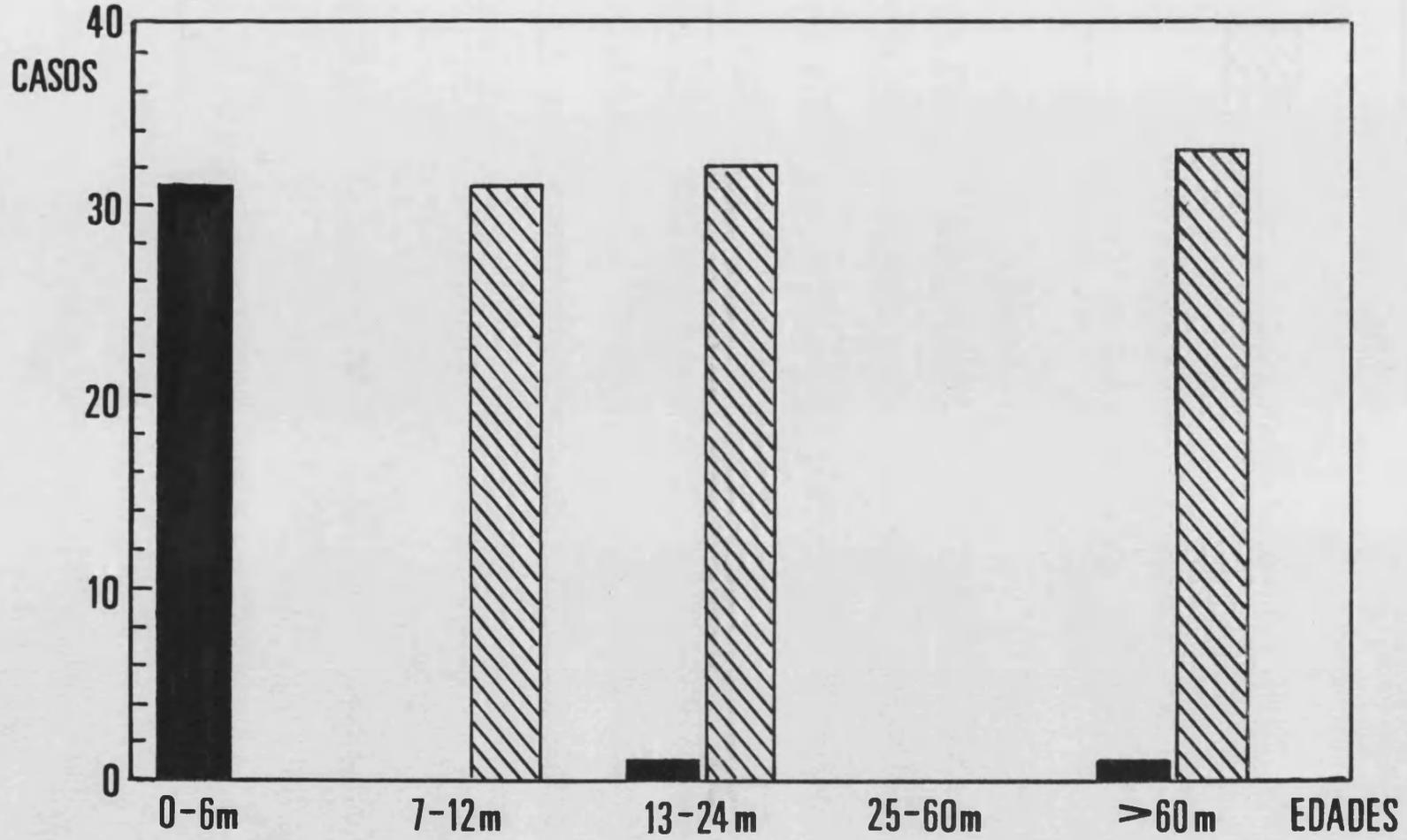


FIG.13.\_ DISTRIBUCION POR EIDADES (GRUPO B )

- NUMERO DE CASOS POR GRUPO DE EDAD
- ▨ ACUMULATIVO DE CASOS

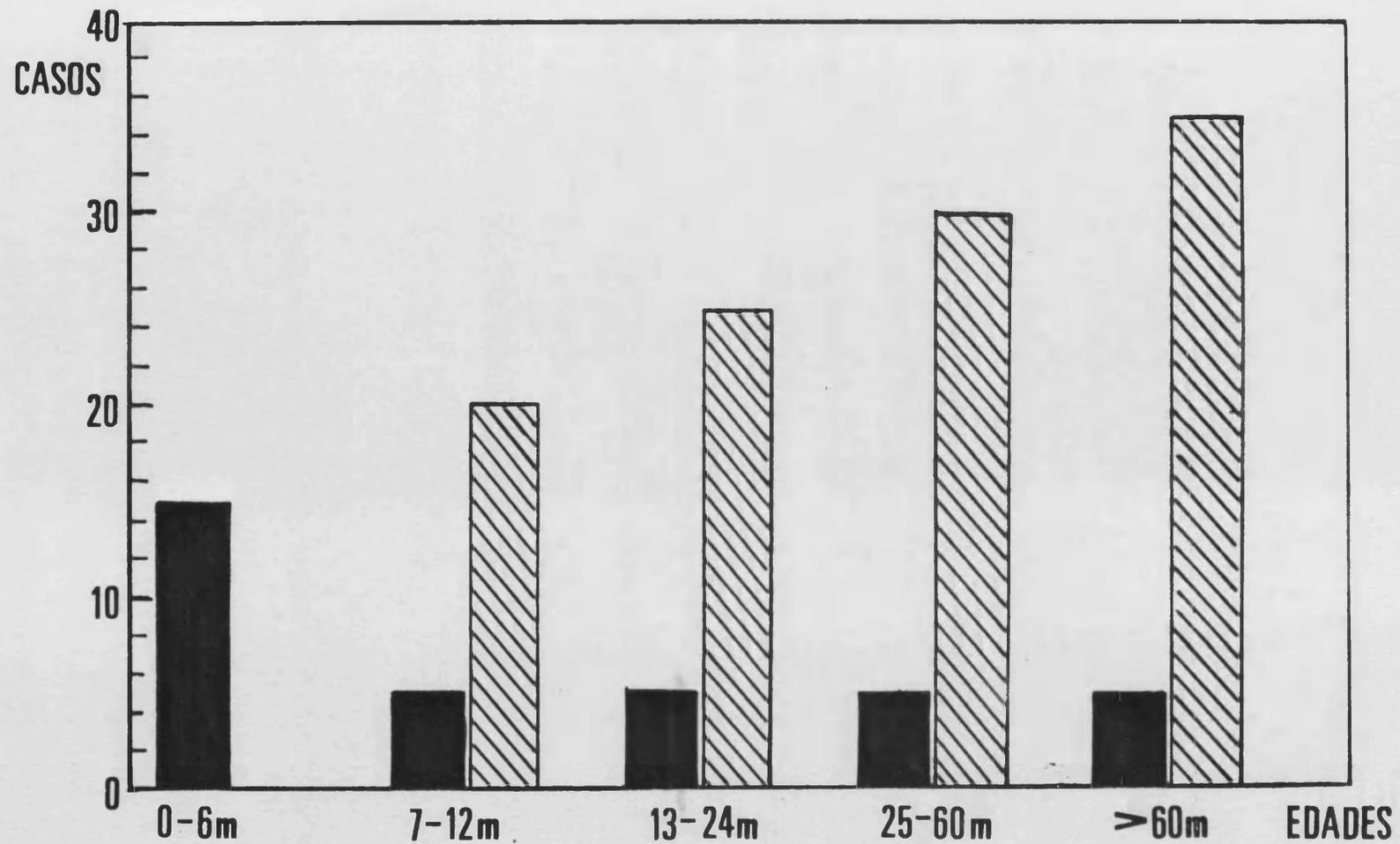


FIG.14.- DISTRIBUCION POR EIDADES (GRUPO C)

- NUMERO DE CASOS POR GRUPO DE EDAD
- ▨ ACUMULATIVO DE CASOS

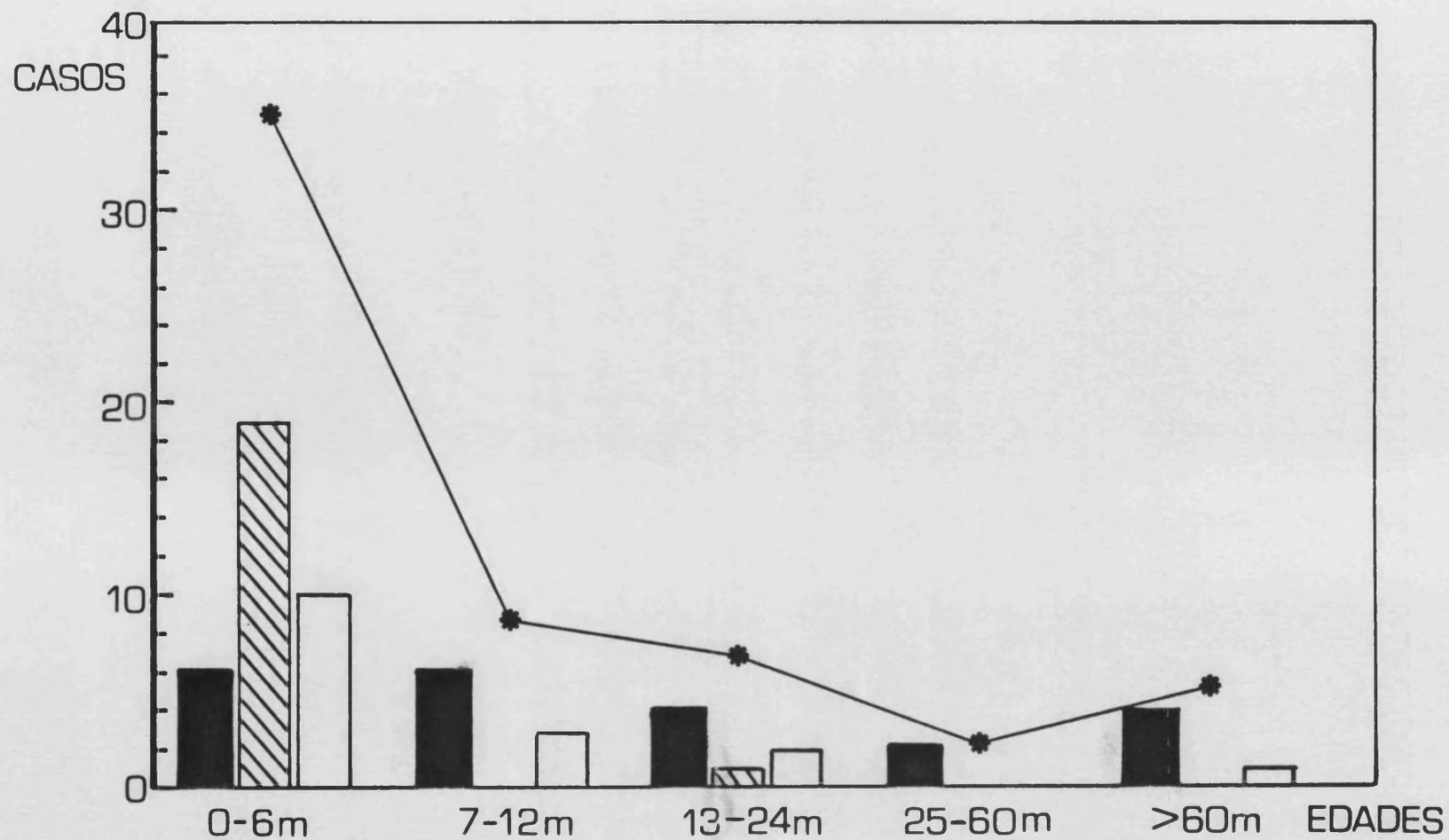


FIG.15.- INVESTIGACION DE VIRUS POR EDADES

■ Grupo A    ▨ Grupo B    □ Grupo C

\* Numero total de casos investigados por edades

que 35 tienen menos de 6 meses, lo que corresponde a su vez, al 62.5% de los 56 pacientes de esta edad. Estas proporciones sufren un descenso entre los niños mayores de 2 años, en los que la búsqueda de la etiología viral se ha planteado en sólo 7 de los 20 casos estudiados (35%).

Analizando los grupos de referencia, se observa que centrándonos de nuevo en los menores de 2 años, el mayor número de detecciones se realiza entre los enfermos del grupo A, 66.6%, seguidos por los del grupo B, 64.5%, y los del grupo C, 60% .

En los mayores de 2 años, sólo se ha planteado la investigación viral en 6 de los 9 pacientes del grupo A, 66.66%, y en 1 de los 10 del grupo C, (10%).

En la figura 16 se observa la distribución del número total de casos durante los 8 meses que ha durado la recogida de muestras. El mayor número se ha producido en el mes de julio, 33/101 (32.67%), seguido por los meses de febrero, 16/101 (15.84%), y enero, 14/101 (13.86%), manteniendo en general un reparto proporcional entre los 3 grupos. Tan sólo disminuyen los casos de control ambulatorio durante los meses de marzo, mayo y junio, periodos en los que también es menor el número global de pacientes estudiados.

En la gráfica 17, se aplican los mismos parámetros a los casos en los que se ha planteado la investigación viral. En ella se aprecia igualmente

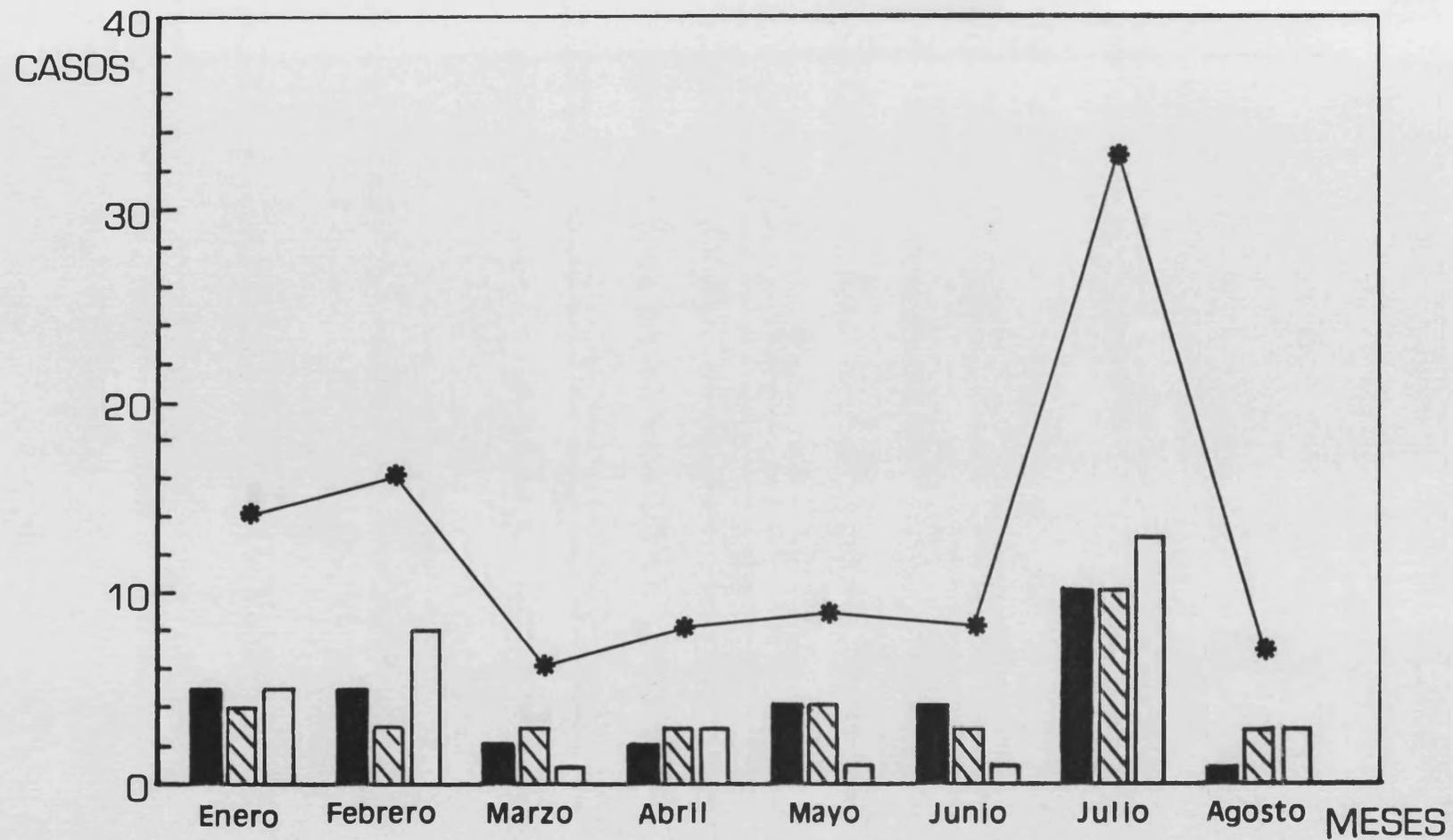


FIG.16.- DISTRIBUCION DE LOS CASOS POR MESES

■ Grupo A    ▨ Grupo B    □ Grupo C  
 \* Número total

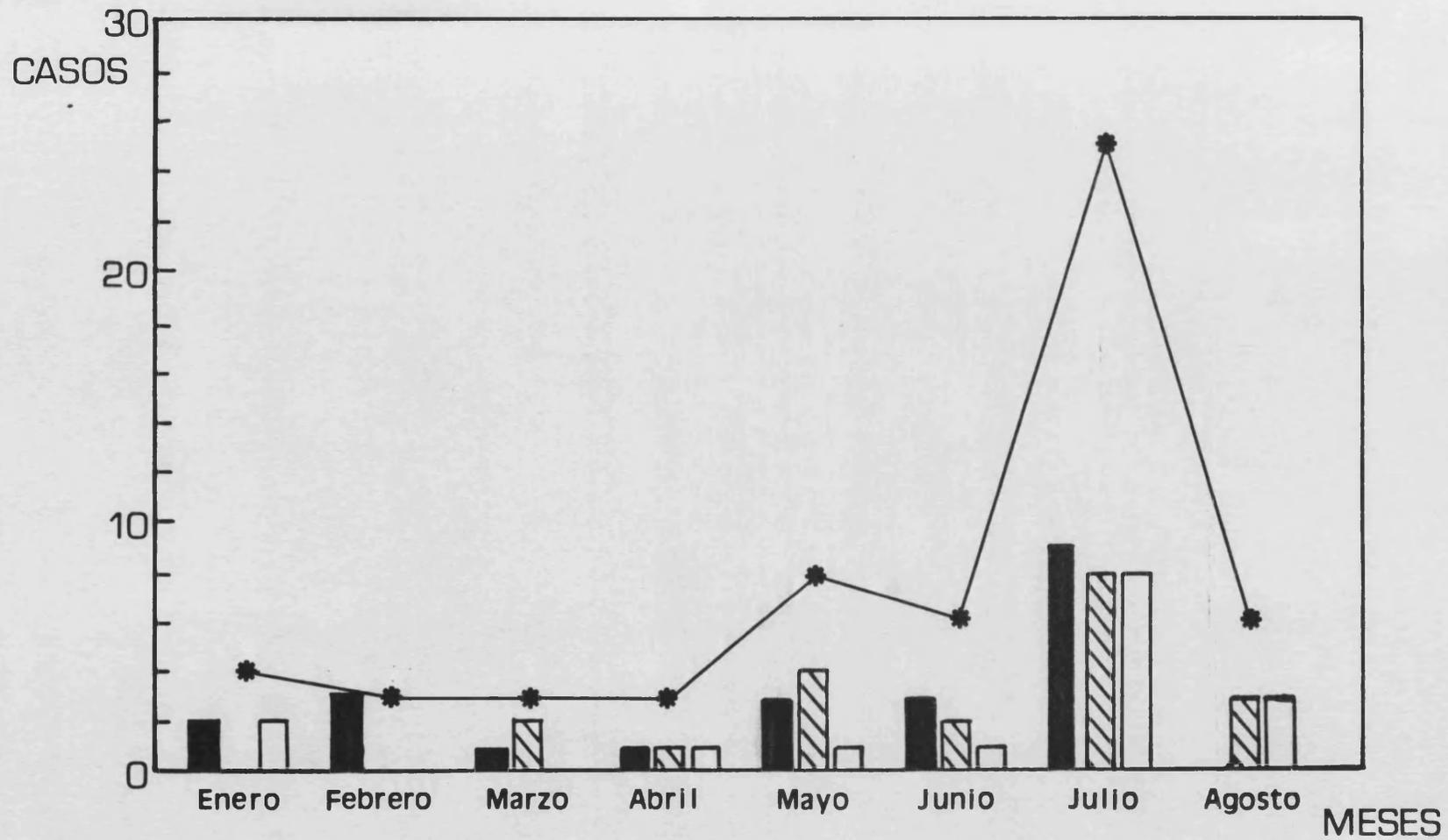


FIG..17.. INVESTIGACION VIRAL POR MESES

Grupo A  
  Grupo B  
  Grupo C  
 \* Número total de investigaciones

que el mayor número de investigaciones se realiza durante el mes de julio, siendo el número de determinaciones similares entre sí el resto de los meses.

Aunque el proceso diarreico ha sido el motivo de consulta en todos los casos, 27 de ellos se acompañaron de otra enfermedad infecciosa concomitante. Tanto el tipo de infección acompañante, como su incidencia en los distintos grupos quedan reseñados en la TABLA 31.

Estas infecciones han acompañado con mayor frecuencia a las diarreas nosocomiales, 30.3%, y a las que precisaron hospitalización, 39.39%, dándose también en estos dos grupos las de mayor gravedad.

Por otra parte, en el grupo nosocomial, casi todos los pacientes han presentado una patología subyacente que había condicionado el ingreso hospitalario previo, y que en general está relacionada con problemas perinatales, (bajo peso, asfixia, membrana hialina...), de desarrollo, (malnutrición), o neurológicos, (encefalopatía), dado que la mayor parte de estos niños son lactantes o recién nacidos.

En el momento de ser valorados en nuestro hospital, 75% de los enfermos no habían recibido antibióticos. Entre los niños tratados, 25/101, 11 pertenecen al grupo A, y excepto 2, a los que se administró tratamiento específico frente a la diarrea, los restantes habían recibido antibióticos por el proceso infeccioso acompañante.

TABLA 31

ENFERMEDADES INFECCIOSAS CONCOMITANTES

DIAGNOSTICOS	GRUPO A	GRUPO B	GRUPO C
Estomatitis	1		
Faringitis o/y amigdalitis	1		3
Otitis	3	2(.)	
Bronquitis	1		
Bronconeumonía o Neumonía	4	2	
Infección urinaria	3	1	1
Sepsis neonatal		1	
Lues neonatal		1	
Meningitis bacteriana		2	
Enterocolitis necrotizante		1	
<u>Nº infecciones</u>	13/33	10/33	4/35
<u>Total de enfermos(%)</u>	(39.39%)	(30.3%)	(11.42%)

(.) En un caso asociada a infección urinaria.

Grupo A: Enfermos ingresados por diarrea.

Grupo B: Diarreas nosocomiales.

Grupo C: Pacientes controlados ambulatoriamente.

Lo mismo sucede en el grupo B en el que el tratamiento previo, instaurado en 9 enfermos, se estableció frente a la enfermedad subyacente que había motivado su ingreso en el hospital. En el último grupo, sólo 1 de 5 niños tratados, lo era por su enfermedad diarreica, en 3 casos se trató la enfermedad infecciosa concomitante, y en 1 no existía justificación para el mismo.

Los criterios que han permitido valorar el estado del enfermo para decidir o no su ingreso, se han basado en los parámetros clínicos y analíticos usados habitualmente en el Departamento de Pediatría para estos procesos. Según ellos, sólo han presentado deshidratación 18 niños, 10 de ellos lactantes, que se distribuyen entre el grupo A, (con 15), y el grupo B, (con 3). De ellas 12 fueron leves, 5 moderadas y 1 grave. Esta última, acompañada de shock, afectó a un neonato que presentó un brote diarreico nosocomial.

De estas deshidrataciones, 16 han sido isotónicas y las 2 restantes hipertónicas, de grado moderado con cifras de sodio de 158 y de 151 mEq respectivamente, afectando a un niño de 12 años del grupo de diarrea nosocomial, y a una niña malnutrida de 11 meses, del grupo A.

En todos los demás casos en los que se ha practicado control de electrolitos, (niños hospitalizados de los grupos A y B), los resultados han sido normales.

En 32 niños se ha producido una acidosis metabólica durante el curso de la diarrea. En 20 casos se trataba de niños hospitalizados por su proceso diarreico, de los cuales 14 estaban deshidratados, y en 12 afectó a niños con diarrea nosocomial, de los que sólo uno presentaba deshidratación.

Uno de los signos clínicos más constantes en su presentación ha sido la pérdida de peso, que se ha producido en 53 casos, 21 del grupo A, 22 nosocomiales y 10 ambulatorios. Esta disminución de peso afectó principalmente a los niños menores de 2 años de edad, en los que ocurrió en el 85% de los casos.

Respecto a la persistencia de la diarrea, independientemente de su etiología y en relación a las 3 subdivisiones en las que se han clasificado los enfermos, el grupo en el que la enfermedad fue de menor duración ha sido el B con una media de 5 días, al que le sigue el grupo C, con una media de 5 días y medio. Los niños del grupo A han mantenido diarrea durante un periodo de 6 días y medio.

La presencia de otros signos o la relación de estos datos con los hallazgos etiológicos se expondrán en apartados posteriores.

4.2.- EVALUACION DE LAS PRUEBAS CONVENCIONALES DE  
ENTEROTOXIGENICIDAD DE ESCHERICHIA COLI

Antes de iniciar la búsqueda de E.C.E.T. entre los aislamientos obtenidos de los niños incluidos en nuestro estudio, se han puesto en marcha los ensayos convencionales de enterotoxigenicidad, tal como han sido expuestas en el apartado 3.5. de material y métodos.

4.2.1.- Actividad de las toxinas LT y VT sobre  
cultivos in vitro de células eucariotas  
(Y<sub>1</sub>, CHO y Vero)

Se han ensayado los filtrados de cultivo de 10 cepas de E.C.E.T., con propiedades enterotóxicas ya conocidas y definidas (ver tabla 30), así como los de 6 cepas de E. coli no enterotoxigénicos. Para la detección de enterotoxina LT se han utilizado cultivos en monocapa de células Y<sub>1</sub> y CHO y cultivos en suspensión de células CHO. Para la detección de enterotoxina VT se han usado cultivos en suspensión de células VERO.

Como se puede ver en la tabla 32, sólo los filtrados de las 7 cepas productoras de LT causaron

TABLA 32

RESULTADOS DE LA ACCIÓN DE CEPAS DE E.C.E.T. (LT+ o/y ST+ ó VT+) SOBRE  
LOS CULTIVOS DE CÉLULAS DE TUMOR ADRENAL DE RATÓN (Y<sub>1</sub>), OVARIO DE  
HAMSTER CHINO (CHO) Y RIÑÓN DE MONO VERDE AFRICANO (VERO).

CEPA	TOXINAS		CULTIVOS CELULARES			
			CÉLULAS EN MONOCAPA		CÉLULAS EN SUSPENSIÓN	
			Y <sub>1</sub>	CHO	CHO	VERO
B2C	LT	ST	LT(b)	-(c)	LT(d)	V(e)
PB176	LT	ST	LT	-	LT	V
H-10407	LT	ST	LT	-	LT	V
Gonzales C <sub>2</sub>	LT	ST	LT	-	LT	V
H-10407-P	LT		LT	-	LT	V
PB-176-P	LT		LT	-	LT	V
D121-C <sub>3</sub>	LT		LT	-	LT	V
H19		VT	-	-	-	VT(f)
H30		VT	-	-	-	VT
M8031-MI		ST(a)	-	-	-	-
K12-185			-	-	-	-
Otras 5 cepas no E.C.E.T.			-	-	-	-

- (a) A pesar de tratarse de una cepa productora de ST, el coeficiente IMT obtenido en nuestro ensayo fue negativo. Posiblemente se deba a la pérdida del plásmido Ent ST+.
- (b) Transformación celular de tipo citotónico (efecto LT).
- (c) Ausencia de transformación celular.
- (d) Efecto no siempre fácil de objetivar.
- (e) Resultados variables, en muchas ocasiones negativos.
- (f) Efecto citotóxico (acción de la toxina VT).

una transformación citotónica específica de las células  $Y_1$ , típica de LT, que con mayor dificultad se pudo observar también sobre las células CHO y Vero.

La actividad LT de los filtrados de las cepas productoras de esta enterotoxina, ya fueran cepas LT positivas o LT-ST positivas, sobre los cultivos celulares, fue destruída al calentarlos a 100°C durante 15 minutos. Sobre las células  $Y_1$  en monocapa, la enterotoxina LT causó un redondeamiento celular con emisión de prolongaciones dendríticas y aumento de su refringencia (fig. 18 y 19).

El efecto LT sobre las células CHO sólo se ha observado cuando la toxina se ha inoculado en células recién tripsinizadas, todavía en suspensión. Consistió en una elongación celular con inhibición del crecimiento, dando lugar a núcleos aislados de multiplicación celular, sin llegar a formar capas confluentes y únicas. Sin embargo no siempre este efecto fue totalmente objetivable, y en ocasiones se ha hecho difícil discernir entre la forma, ya por sí misma, alargada de las células CHO normales, y la posible elongación producida en ellas por la toxina LT. Por este motivo, y ante la buena respuesta de la monocapa de células  $Y_1$ , se han elegido éstas para llevar a cabo nuestro ensayo.

Respecto a las células Vero, el efecto que sobre ellas ejerce la toxina LT ha sido variable cuando se utilizan en suspensión, de modo que en repetidas ocasiones no llegó a evidenciarse ninguna res-



10x

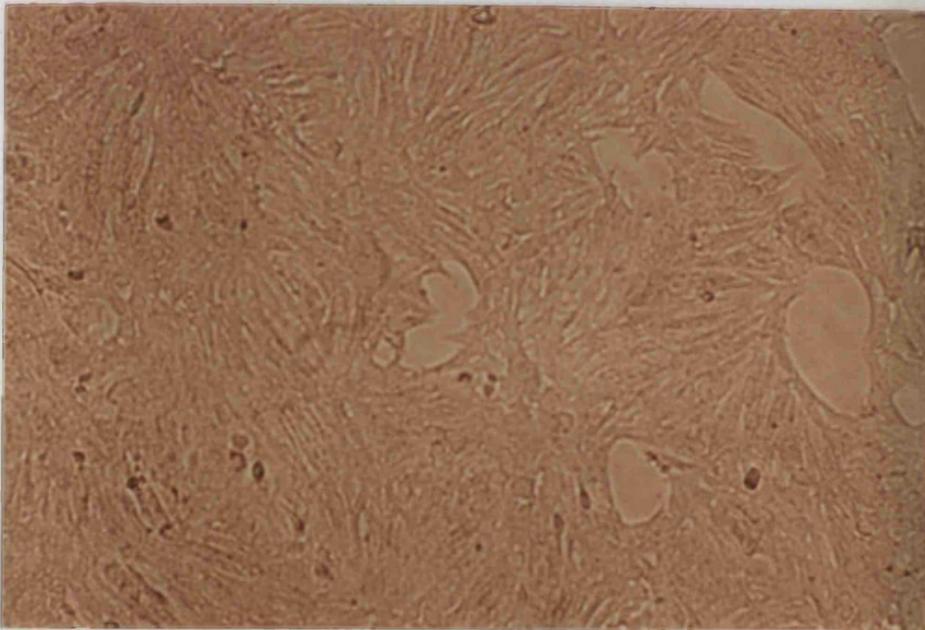
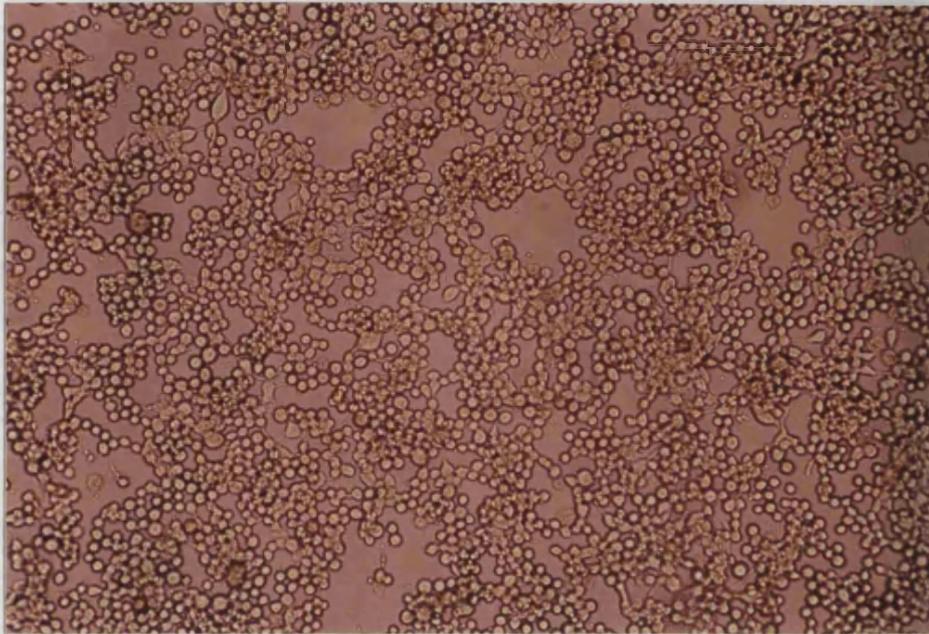


Fig. 18.- Aspecto de la monocapa normal de las células  
 $Y_1$  (20x)



10x

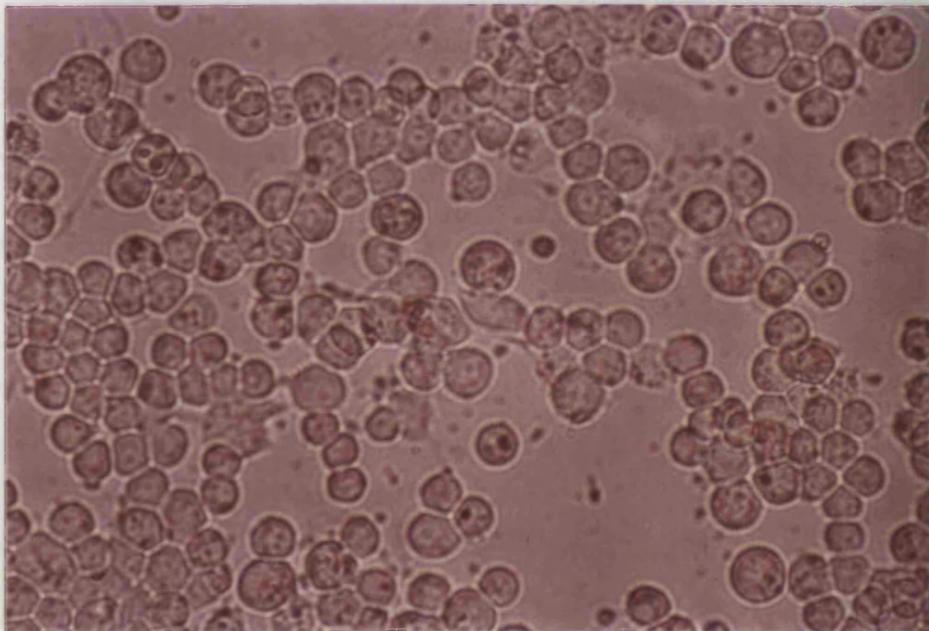


Fig. 19.- Efecto de la toxina LT sobre la monocapa de células  $Y_1$ . (40x)

puesta, a pesar de que son células sensibles a su acción. Esto obedece a que en las células en suspensión es imprescindible adicionar suero bovino fetal hasta una concentración del 5-10%, con objeto de que aumente su adhesión a los frascos de cultivo y lleguen a formar monocapas. Este porcentaje de suero neutraliza el efecto LT en la mayoría de los filtrados de dicha toxina, (GONZALEZ GARCIA, 1984), lo que explica la negatividad observada.

Las células Y<sub>1</sub>, CHO y Vero, alteradas específicamente por la enterotoxina LT, se recuperan generalmente tras eliminar la toxina del medio de cultivo celular, lo que se logra realizando lavados sucesivos con medio de mantenimiento fresco. Se trata por tanto de un efecto citotónico reversible.

Los filtrados de las dos cepas productoras de citotoxina VT, (TABLA 32), destruyeron las células Vero en suspensión. Al calentar los filtrados a 100°C, durante 15 minutos, perdieron su actividad citotóxica, lo que confirma el carácter termolábil de VT.

La destrucción celular que produce la toxina VT es irreversible. Las células afectadas aparecen flotando en el medio de mantenimiento celular, (fig 20 y 21), comenzando a detectarse este efecto a las 8 horas, y progresando de tal modo, que **a las 24 horas suelen** observarse hasta el 75% de células destruidas.

Ninguno de los filtrados de las 14 cepas no productoras de VT, indicadas en la TABLA nº 32,

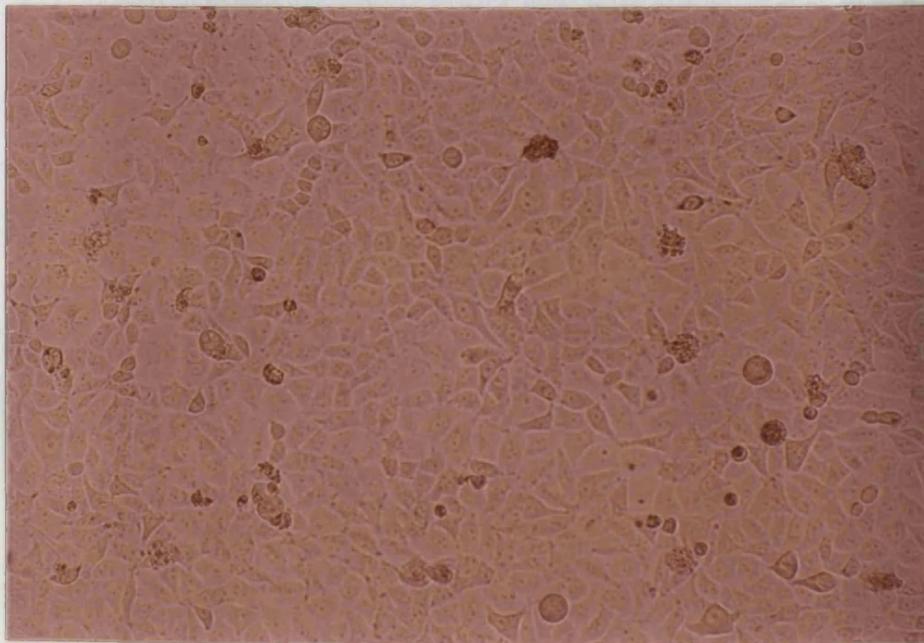


Fig. 20.- Aspecto de la monocapa normal de las células VERO. (20x)

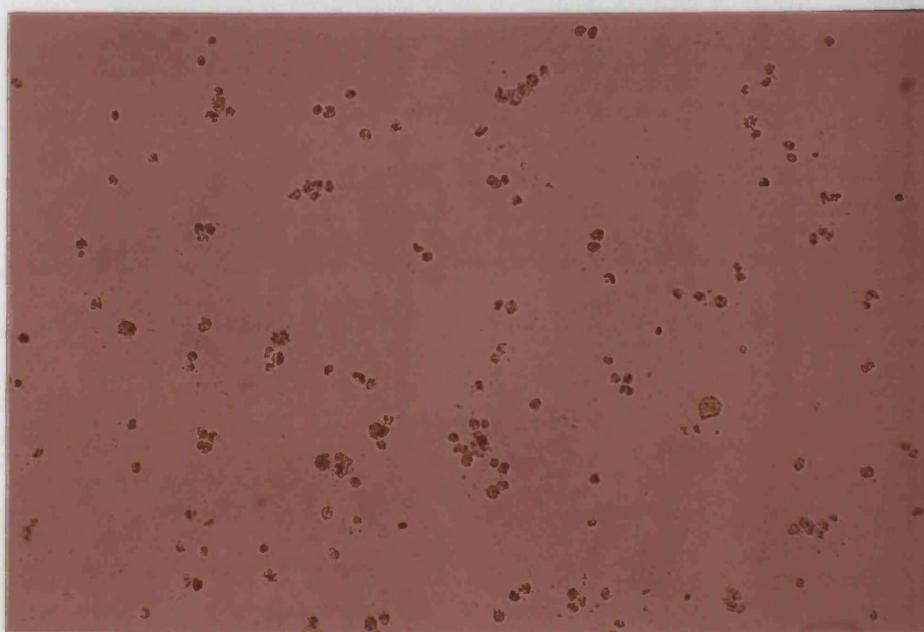


Fig. 21.- Efecto de la toxina VT sobre las células VERO. (20x)

han mostrado actividad citotóxica sobre ninguna de las 3 líneas celulares utilizadas.

La acción de la enterotoxina termoestable ST no ha sido detectable en los ensayos realizados sobre las células Y<sub>1</sub>, CHO y Vero, ya que al calentar los filtrados de las 5 cepas productoras de enterotoxina ST, ninguno produjo alteraciones morfológicas al ser inoculados en ellas.

Los ensayos comentados han sido repetidos individualizadamente, tras mantener almacenadas las cepas a -70°C durante periodos variables de tiempo, que han oscilado entre 1 y 10 meses. En todas las ocasiones los resultados han sido los mismos.

#### 4.2.2.- Actividad de la enterotoxina ST en ratones lactantes (I.M.T.). Valoración estadística

Se han utilizado 9 filtrados de 3 cepas no productoras de ST y 65 filtrados de 3 cepas productoras de esta toxina.

En primer lugar se ha intentado demostrar la existencia de una diferencia significativa, entre los pesos de los intestinos extraídos de los ratones inoculados con los filtrados de las cepas ST positivas, respecto a los inoculados con los filtrados de las cepas ST negativas. Para ello, se ha aplicado la prueba de comparación de dos varianzas observadas en grupos con datos independientes, que parte de la premisa de

establecer previamente la similitud entre las varianzas estudiadas.

Se han comparado sucesivamente las acciones que, sobre el intestino de los animales, provocan las cepas B2c, PB-176 y Gonzales-C2, con las desencadenadas por las cepas negativas H-407-P, K12-185 y H-30.

La distribución de los 17 pesos obtenidos con la cepa B2c tiene una desviación tipo de 0.1987g, la de los 33 obtenidos con la cepa PB-176 es de 0.24489g, y la de los 15 de Gonzales-C2, de 0.25222g. La desviación tipo de las cepas negativas es de 0.18541.

La relación entre las varianzas de los 3 grupos establecidos dá unos valores F de 1.1486, 1.7443 y 1.8499, todos ellos inferiores respectivamente a 3.20, 3.08 y 3.23 dados por la ley de Snedecor para un riesgo de 0.05 y un grado de libertad  $V_1=17-1=16$ ,  $V_2=33-1=32$  y  $V_3=15-1=14$ . Con ello se llega a la conclusión de que no existen diferencias entre las varianzas, lo que significa que las poblaciones estudiadas son normales.

Sobre esta base, para conocer si existe una diferencia significativa entre los parámetros evaluados, se ha aplicado la ley de Student-Fisher con la que se han obtenido valores de t de 7.6067, 8.7439 y 5.4374, mayores a  $t(16, 0.05) = 2.120$ ,  $t(32, 0.05) = 2.042$ , y  $t(14, 0.05) = 2.145$ , en cada uno de los grupos considerados, lo que demuestra que el peso de los intestinos de los ratones inoculados con cepas ST(+) presenta

una diferencia significativa respecto a los ratones inoculados con cepas ST(-).

Por otra parte, para estudiar la dependencia existente entre el peso de los intestinos y los coeficientes IMT obtenidos, (Coeficiente IMT= Peso de los intestinos/Peso resto de los cuerpos), se ha aplicado el cálculo del coeficiente r sobre variables cuantitativos, tanto en forma de coeficiente de correlación, como en forma de coeficiente de regresión.

El valor de la pendiente de la recta de regresión, (o coeficiente de regresión), dado por las cepas ST(+) es de 0.2997.

El coeficiente de correlación (r) es de 0.9972, ( $p < 0.01$ ), lo que denota la existencia de una correlación positiva óptima entre las variables estudiadas.

El polinomio de regresión alcanzado al aplicar el método de los mínimos cuadrados de Gauss, que determina los puntos por los que pasa una línea baricéntrica, o recta de regresión, es de:

$$y = -0.1641016157 + 0.2997206371x,$$

quedando representados sus valores en la gráfica nº 22.

Estas mismas pruebas, aplicadas para evaluar la relación existente entre el peso de los intestinos y los coeficientes IMT de las cepas negativas, demuestran la falta de correlación existente entre estas dos variables.

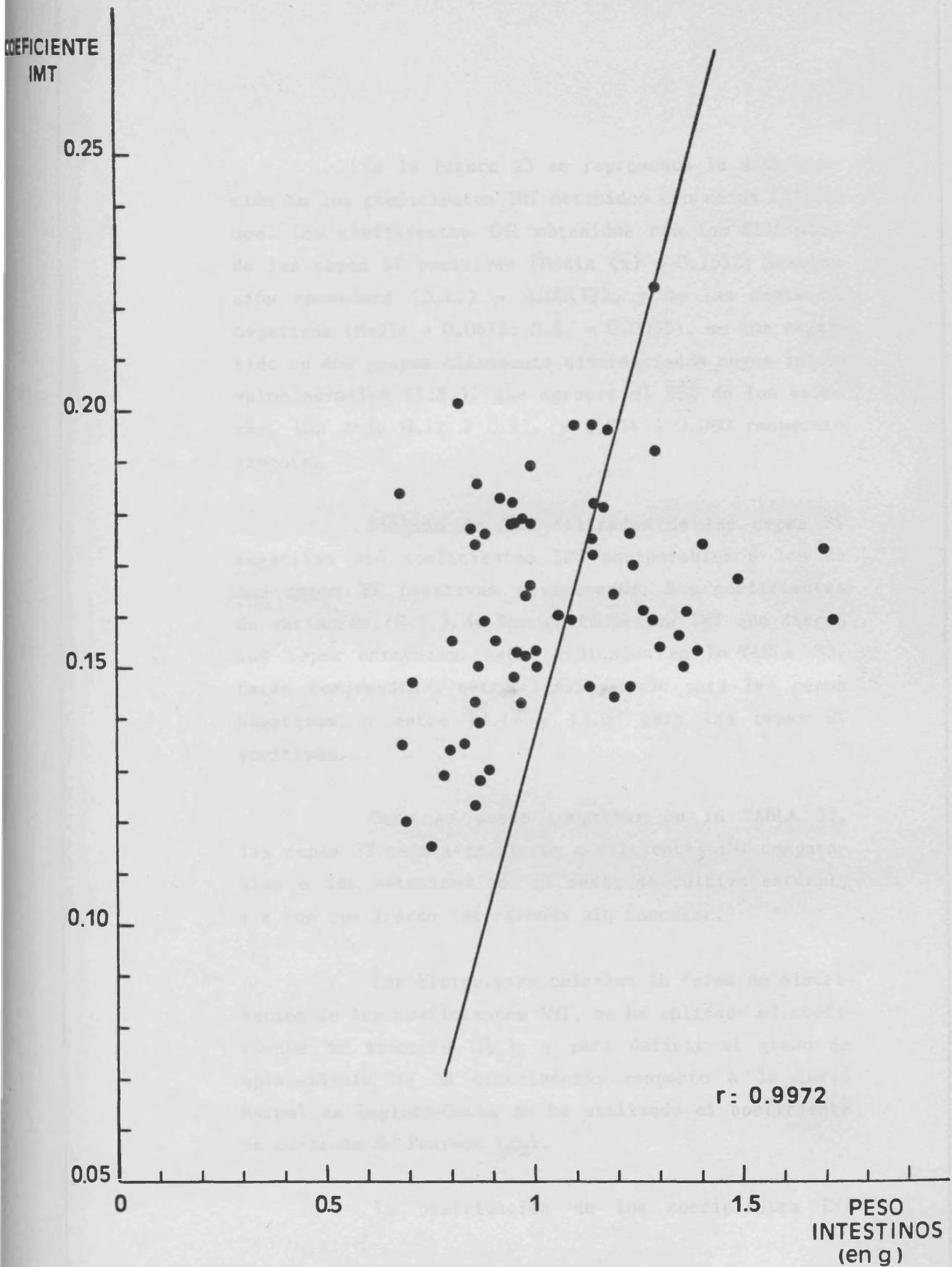


FIG.22 .. CURVA DE REGRESION DE LOS VALORES DE LOS COEFICIENTES I.M.T. DE LAS CEPAS CONTROL ST(+)

En la figura 23 se representa la distribución de los coeficientes IMT obtenidos con estos filtrados. Los coeficientes IMT obtenidos con los filtrados de las cepas ST positivas (Media ( $\bar{x}$ ) = 0.1622; Desviación estándar (D.E.) = 0.02172), y de las cepas ST negativas (Media = 0.0675; D.E. = 0.0055), se han repartido en dos grupos claramente diferenciados cuyos intervalos normales (I.N.), que agrupan el 95% de los valores, han sido  $0.12 \div 0.21$ , y  $0.054 \div 0.080$  respectivamente.

Ninguno de los filtrados de las cepas ST negativas dió coeficientes IMT equiparables a los de las cepas ST positivas y viceversa. Los coeficientes de variación, (C.V.), de los coeficientes IMT que dieron las cepas ensayadas, están indicados en la TABLA 33. Están comprendidos entre 3.305 y 4.34 para las cepas negativas, y entre 12.17 y 13.67 para las cepas ST positivas.

Como se puede comprobar en la TABLA 33, las cepas ST negativas dieron coeficientes IMT comparables a los obtenidos con el medio de cultivo estéril, y a los que dieron los ratones sin inocular.

Por último, para calcular la forma de distribución de los coeficientes IMT, se ha aplicado el coeficiente de simetría ( $\beta_1$ ), y para definir el grado de aplanamiento de la distribución respecto a la curva normal de Laplace-Gauss se ha utilizado el coeficiente de curtosis de Pearson ( $\beta_2$ ).

La distribución de los coeficientes IMT

TABLA 33

REPRODUCTIBILIDAD DEL ENSAYO CON RATONES LACTANTES (IMT)  
EN LA DETECCIÓN DE LA TOXINA ST

CEPAS	FILTRADOS <sup>a</sup>	COEFICIENTE IMT <sup>b</sup>		
		MEDIA $\pm$ DE <sup>c</sup>	C/V(%) <sup>d</sup>	IN (95%) <sup>e</sup>
<u>ST POSITIVAS</u>				
B2C	17	0.1674 $\pm$ 0.02208	13.9	0.2-0.21
PB-176	33	0.1662 $\pm$ 0.02022	12.17	0.126-0.207
Gonzales-C <sub>2</sub>	15	0.1476 $\pm$ 0.02018	13.67	0.104-0.19
TOTAL	65	0.1622 $\pm$ 0.02172	13.39	0.12-0.21
<u>ST NEGATIVAS</u>				
H.10407-P	3	0.07372 $\pm$ 0.0032	4.34	0.0599-0.087
K12-185	3	0.06223 $\pm$ 0.0025	4.017	0.0514-0.0729
H-30	3	0.06555 $\pm$ 0.0022	3.305	0.057-0.076
TOTAL	9	0.0675 $\pm$ 0.0055	8.148	0.054-0.080
MEDIO DE CULTIVO	3	0.0699 $\pm$ 0.0009	1.36	0.066-0.074
RATONES SIN INOCULAR	3	0.0645 $\pm$ 0.003	5.45	0.05-0.08

a - Cada filtrado se ha obtenido a partir de una producción de toxina diferente.

b - Peso de los intestinos dividido por el peso del resto de los cuerpos, de lotes de 3 ratones.

c - Desviación estandar.

d - Coeficiente de variación: porcentaje de la desviación respecto a la media.

e - Intervalo normal (del 95%).

obtenidos tanto con las cepas ST(+), como con las cepas ST(-), es asimétrica positiva, ya que  $\beta_1$  es, en ambos, mayor de cero, (0.045366 para las primeras, y 0.466888, para las segundas). En las figuras 24 y 25 quedan reflejadas estas dos formas de distribución, pudiendo también observar en ellas, los respectivos valores de la moda (Mo) y de la mediana (Md). Para las cepas ST(+): Mo = 0.15 y 0.18; Md = 0.15. Para las cepas ST(-): Mo = 0.065; Md = 0.063.

Ambos grupos pueden ser representados en forma de una curva platicúrtica dado que  $\beta_2$  es de 0.0265 y de 0.940491, menores que 3, en cada uno de ellos.

La enterotoxina LT y la citotoxina VT, no han provocado deshidratación al ser inoculadas a ratones lactantes, lo que ha podido ser demostrado porque los filtrados de las cepas no productoras de ST, fueran LT ó VT positivas, han dado coeficientes IMT claramente negativos.

Además, los filtrados que mostraron actividad en los ratones lactantes han permanecido activos al ser calentados a 80°C durante 20 minutos, temperatura con la que se inactivan en cambio las toxinas LT y VT.

En la figura 26 se muestra un ratón inoculado con el filtrado de una cepa ST negativa y otro inoculado con el filtrado de una cepa ST positiva. La enterotoxina ST produce una dilatación del estómago de los

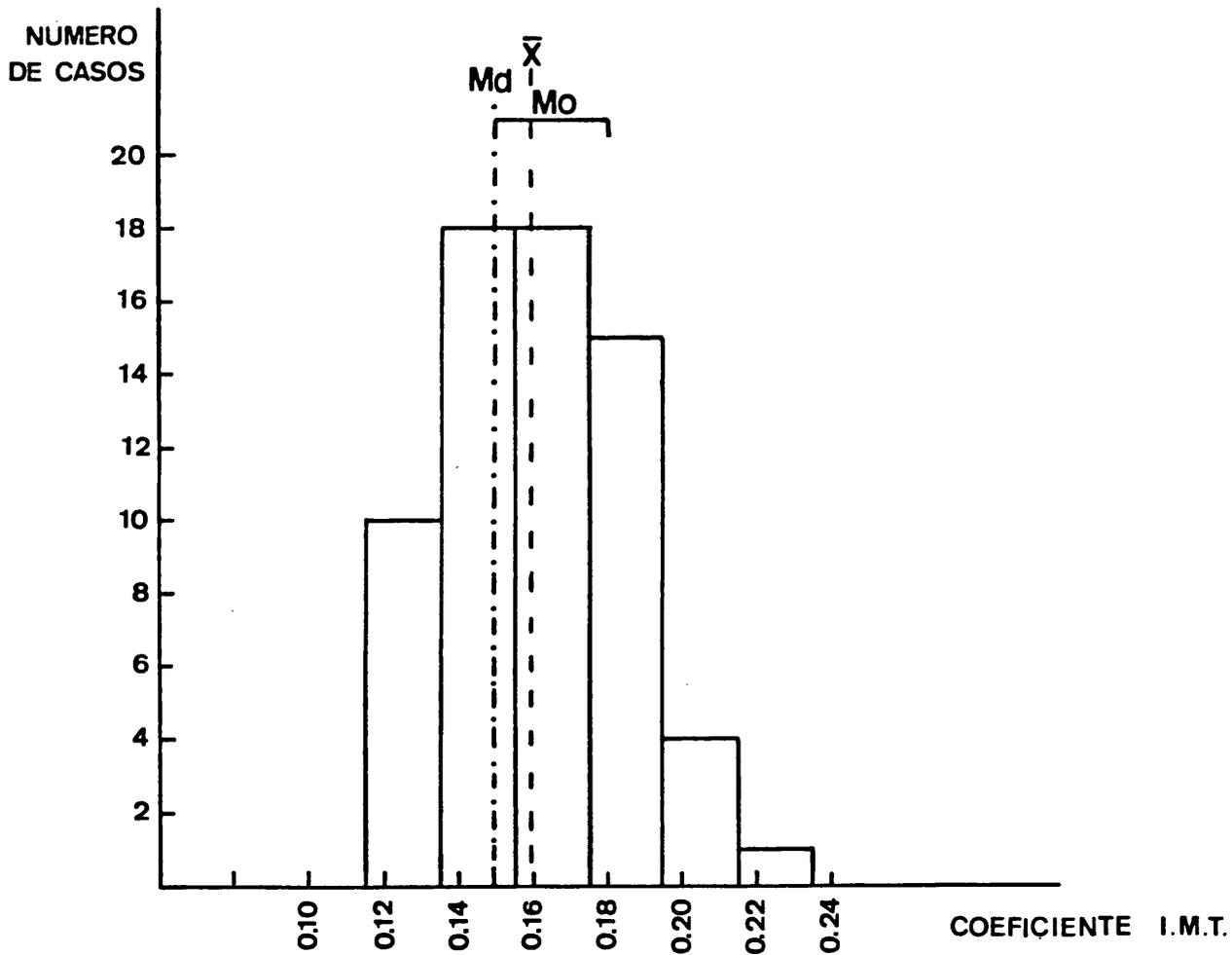


FIG.24 .. FORMA DE DISTRIBUCION DE LOS COEFICIENTES I.M.T. DE LAS CEPAS ST(+), RESPECTO A LOS VALORES DE LA  $\bar{X}$ ,  $Md$  y  $Mo$ .

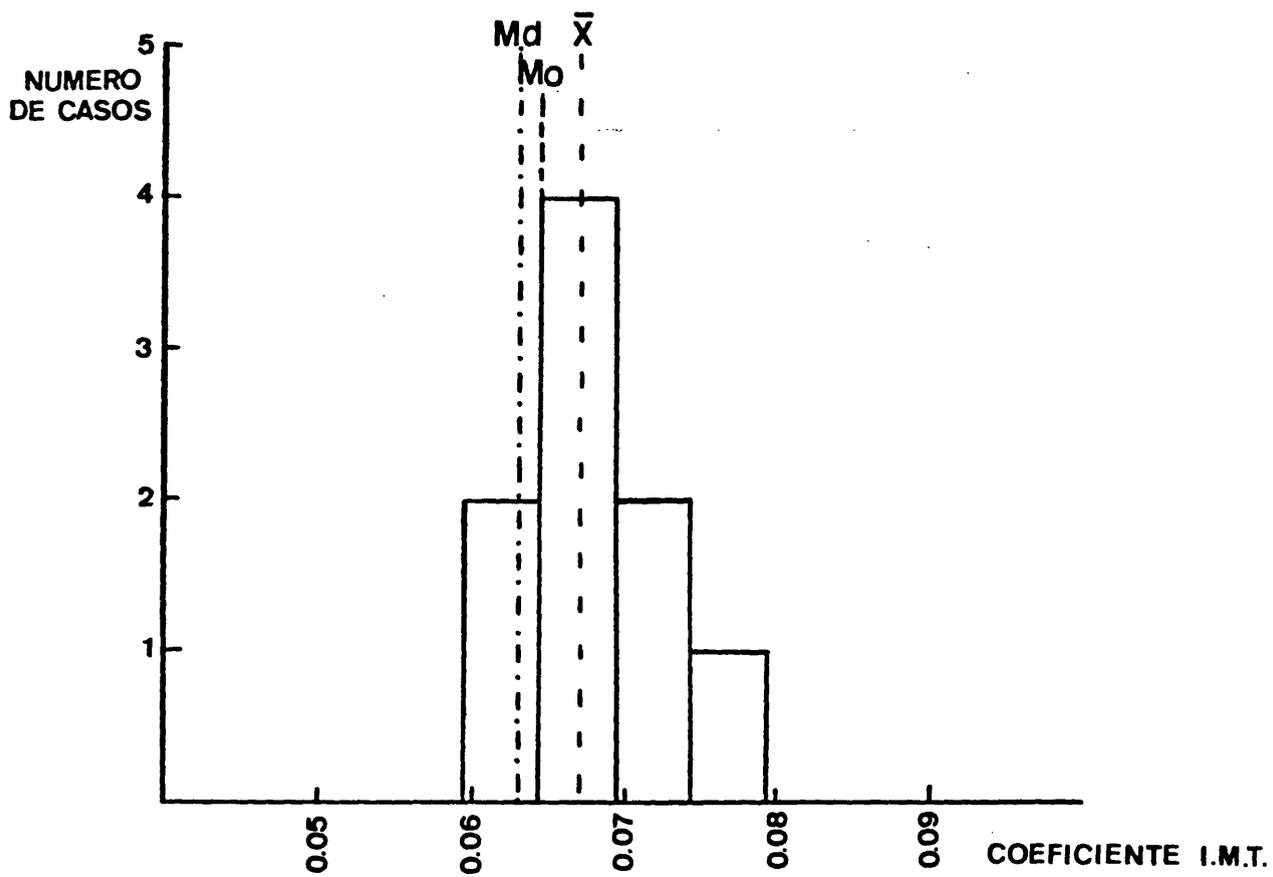


FIG. 25.\_ FORMA DE DISTRIBUCION DE LOS COEFICIENTES I.M.T. DE LAS CEPAS ST (-), RESPECTO A LOS VALORES DE LA  $\bar{X}$ , Md y Moda.



Fig. 26.- Ratones lactantes inoculados con cepas de E. coli ST(+)(izquierda) y ST(-) (derecha).

ratones, así como una acumulación de líquido en la luz intestinal. El colorante azul de Evans, que se añade al filtrado para poder comprobar la correcta inoculación del mismo, queda normalmente retenido en el estómago de los ratones que han recibido la cepa ST positiva, mientras que, en los que han sido inoculados con los filtrados de cepas no productoras de ST, el colorante se difunde también al intestino.

BYERS y DUPONT (1979), llevaron a cabo una modificación del IMT consistente en utilizar una mezcla, a partes iguales, de los sobrenadantes de los cultivos de 5 aislamientos de E. coli, demostrando que el IMT resultaba sensible a la toxina ST, incluso diluyendo los filtrados de las cepas positivas cinco veces. Con esta variante, estos investigadores reducían el número de ratones a utilizar, y acortaban el ensayo sin menoscabar los resultados finales.

En nuestro estudio se ha aplicado este método, después de realizar un ensayo previo para comprobar su validez. Para ello hemos mezclado a partes iguales los filtrados de cultivo de cada una de las cepas PB-176, Gonzales C2 y B-2c, todas productoras de ST, con los de 3 cepas ST negativas, (H-10407-P, PB-176-P y K12-185), inoculando la mezcla en lotes de 6 ratones y realizando la experiencia por duplicado. Los coeficientes IMT obtenidos se han comparado a los logrados tras la inoculación de las mismas cepas sin diluir, en lotes de 3 ratones.

En la TABLA 34 se exponen los resultados. En ella se puede apreciar que en todos los casos, los

TABLA 34

COEFICIENTES IMT OBTENIDOS CON LOS FILTRADOS DE CULTIVO  
DE CEPAS ST POSITIVAS Y ST NEGATIVAS DILUIDAS AL 1/5 Y SIN  
DILUIR. (MÉTODO DE BYERS Y DUPONT, 1979)

CEPAS	COEFICIENTE IMT			
	FILTRADOS SIN DILUIR <sup>a</sup>		FILTRADOS DILUIDOS <sup>b</sup>	
<u>ST POSITIVAS</u>				
Gonzales C <sub>2</sub>	0.1538863	0.1350769	0.110707	0.1078112
B2C	0.1857198	0.172484	0.1330209	0.114301
PB-176	0.1834319	0.155064	0.134208	0.1230209
<u>ST NEGATIVAS</u>				
H-10407-P	0.06555	0.0751558		
PB-176-P	0.080931	0.0740061	0.0685	0.0739
K12-185	0.0602892	0.0640782		

a - Filtrados obtenidos en condiciones idénticas y ensayados por duplicado, en lotes de 3 ratones.

b - El filtrado de cada cepa ST(+) se ha diluido a 1/5 con una mezcla a partes iguales de filtrados de cepas ST(-) ensayándose por duplicado en lotes de 6 ratones.

coeficientes de las cepas ST positivas, diluidas y sin diluir, fueron positivas, mientras que los de las cepas ST negativas fueron negativos.

A pesar de ello, en la aplicación del método a los 506 E. coli de nuestro estudio, cualquier coeficiente IMT con valores superiores a 0.075 obtenido con la mezcla de los filtrados de 5 colonias, fue repetido, individualizando las muestras e inoculándolas por separado en lotes de 3 ratones. Se ha tomado este coeficiente como un valor medio, considerado por diversos investigadores como límite de los coeficientes dudosos, (SACK et al. 1975; GIANELLA, 1976; ECHEVARRIA et al. 1977; GURWITH y WILLIAMS, 1977).

#### 4.3.- AISLAMIENTOS DE E. COLI SIN ENTEROTOXINAS

##### DETECTABLES

De los 104 estudios coprológicos realizados, en 96 se ha encontrado Escherichia coli de forma aislada o junto a otros microorganismos entéricos, lo que significa que 94 de los 101 niños estudiados tenían esta bacteria en sus heces.

En todos los casos, de cada una de las muestras de heces se han tomado de 5 a 10 colonias de E. coli, sobre las que se ha planteado la investigación de enterotoxigenicidad.

En total se han investigado 506 aislamientos distintos de E. coli, no habiendo podido demostrar producción de enterotoxinas en 485 de ellos.

##### 4.3.1.- Incidencia de E. coli con serotipos enteropatógenos clásicos (E.C.E.P.)

En 4 pacientes diarreicos se ha detectado E. coli cuyos serotipos son considerados clásicamente como enteropatógenos, (E.C.E.P.). Ninguna de estas cepas liberó al sobrenadante de cultivo las toxinas LT, ST ó VT. El listado de estos serotipos se muestra en la TABLA 35, y los coeficientes IMT que dieron sus filtra-

TABLA 35

E. COLI CON SEROTIPOS ENTEROPATÓGENOS CLÁSICOS

AI SLADOS EN LOS PACIENTES

ANTISUEROS <sup>a</sup> POLIVALENTES	SEROTIPOS E.C.E.P. <sup>b</sup>	NIÑOS EN LOS QUE SE ENCONTRARON
Mezcla I	0111:K58(B4)	1
	055:K59(B5)	1
	026:K60(B6)	0
Mezcla II	086a:K61(B7)	0
	0119:K69(B14)	0
	0127:K63(B8)	0
Mezcla III	0125:K70(B15)	0
	0126:K71(B16)	1
	0128:K67(B12)	1
Mezcla IV	0114:K80	0
	0124:K72(B17)	0
	0142:K86	0

a- Los antisueros poli y monovalentes son los comercializados por el Instituto Pasteur. Incluyen los serotipos más frecuentes en Europa.

b- Entre paréntesis se indica, en su caso, la denominación antigua (antígenos B) de los antígenos K.

dos en el ensayo de ratones lactantes, en la TABLA 36.

Se trata de 2 recién nacidos, con 7 días de vida, del grupo nosocomial, y de 2 lactantes, de 6 meses, que fueron controlados ambulatoriamente.

En 2 de los enfermos, un recién nacido y otro de 6 meses de edad, E.C.E.P. fue identificado como microorganismo único. En los otros 2, E.C.E.P. se presentó asociado a Rotavirus.

#### 4.3.2.- Aislamiento de E. coli no enteropatógeno, ni enterotoxigénico.

En 84 de los 94 niños en cuyas heces diarreicas ha sido encontrado E. coli, este microorganismo no aglutinó frente a los sueros monovalentes de los serogrupos clásicos que se encuentran comúnmente en nuestras latitudes, ni tampoco respondió a las pruebas de enterotoxigenicidad.

En estos casos Escherichia coli se ha identificado como microorganismo único, formando parte de la flora fecal habitual, o junto a otros patógenos entéricos, bacterianos o virales.

##### 4.3.2.1.- E. coli como microorganismo único.

E. coli no enteropatógeno ni enterotoxigénico, ha sido aislado como microorganismo único en 12 casos: 3 en niños ingresados por su proceso diarreico,

TABLA 36

COEFICIENTES IMT (ENSAYO EN RATONES LACTANTES)  
OBTENIDOS CON LAS CEPAS DE E.C.E.P.

SEROTIPO ECEP	COEFICIENTE IMT	
	MEZCLA 5 FILTRADOS	FILTRADOS INDIVIDUALIZADOS
0111:K58(B4)	0.0715499	
0126:K71(B16)	0.06468	
0128:K67(B12)	0.06297	
055:K59(B5)	0.0771332	
	0.08035	0.0775718
		0.0743505
		0.0667997
		0.082537
		0.0806858

(grupo A), 6 en pacientes con diarrea nosocomial, (grupo B), y 3 en niños controlados ambulatoriamente, (grupo C). Las edades de estos enfermos oscilan entre 2 días y 11 años.

#### 4.3.2.2.- E. coli como integrante de la flora fecal habitual

En 40 casos E. coli fue encontrado junto a otras enterobacterias, huéspedes habituales de la flora intestinal, (Proteus sp., Klebsiella sp., Enterobacter sp., Citrobacter sp....).

De los 40 casos, 14 corresponden a pacientes extrahospitalarios y 26 a hospitalizados, 12 con diarrea nosocomial, y 14 con diarrea comunitaria.

Todos estos casos, junto con los del apartado anterior, integran el grupo de diarrea inespecífica, no catalogable etiológicamente, en las que no ha podido ser demostrada la existencia de ningún patógeno entérico. A ellos hay que sumar 3 niños del grupo B, en cuyas heces sólo fue aislada flora normal, entre la que no se encontró Escherichia coli.

En conjunto no ha podido ser demostrada la existencia de patógenos en 55 de los 101 pacientes estudiados, lo que supone el 54.45% del total.

#### 4.3.2.3.- Asociación a otros patógenos entéricos

E. coli no enteropatógeno, ni enterotoxigénico fue aislado junto a otros patógenos entéricos,

(bacterias, virus y parásitos), en 32 casos.

#### 4.3.2.3.1.- Virus asociados

Rotavirus han sido los únicos agentes virales detectados, junto a E. coli, en las heces de 11 pacientes. Esta detección se ha realizado paralelamente por el método E.L.I.S.A., (Rotazyme -Abbot y E.L.I.S.A. doble sandwich con anticuerpos monoclonales anti-rotavirus A3/M4), y por microscopía electrónica, siendo los resultados concordantes en el 100% de los casos.

En la Figura nº 27 se puede observar el aspecto que, al microscopio electrónico, ofrece la partícula viral. Tiene un diámetro de 70 nm y está constituida por un núcleo central y una cápside externa de doble capa.

El núcleo, o core, de 38 nm de diámetro, contiene 11 segmentos de ARN bicatenario, con pesos moleculares que oscilan entre 24.000 y  $2.2 \times 10^6$ , y la cápside que lo rodea consta a su vez de una capa interna formada por capsómeros cilíndricos cortos dispuestos radialmente, y de una capa externa, montada sobre la anterior, que por su contorno liso se asemeja a un aro.

En muchas partículas virales, presentes en extractos fecales, falta la cápside externa, teniendo entonces la partícula un diámetro de 55 nm y un contorno espiculado e irregular, (fig. 27). Es frecuente también observar estructuras vacías, en las que ha penetrado

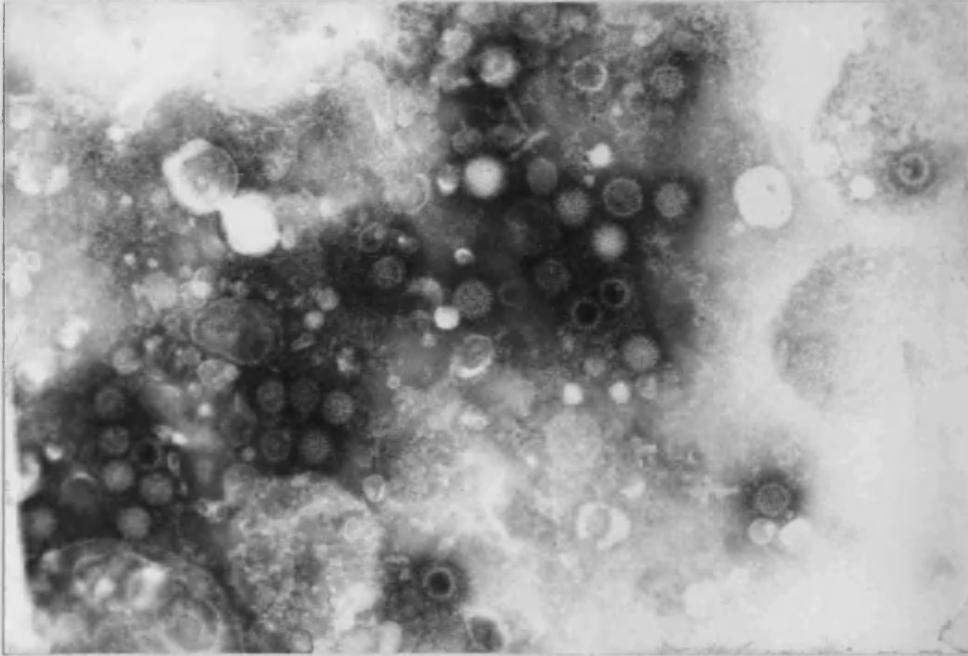


Fig. 27.- Partículas de rotavirus completas, incompletas y vacías. Tinción negativa - con ácido fosfotungstico al 3% (126.000x y 175.000x).

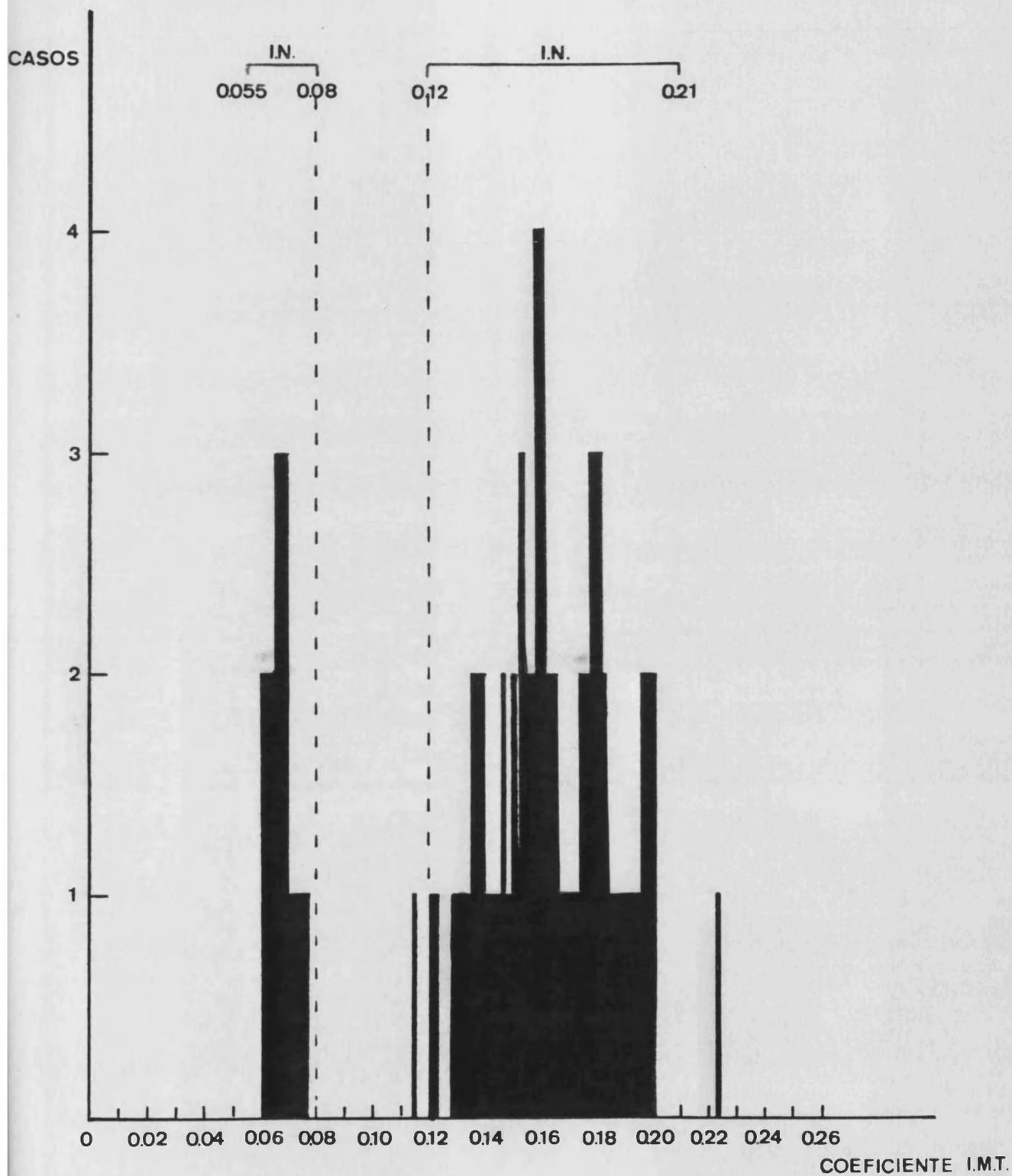


FIG. 23.- DISTRIBUCION DE LOS COEFICIENTES I.M.T. OBTENIDOS CON LOS FILTRADOS DE LAS CEPAS CONTROL ST(+) Y ST(-), EN DOS GRUPOS BIEN DIFERENCIADOS.

la tinción negativa.

#### 4.3.2.3.2.- Bacterias asociadas

E. coli ha sido encontrado junto a otras bacterias intestinales en 16 casos: 14 junto a Salmonella sp. y dos junto a Campylobacter jejuni.

El grupo asociado a Salmonella está constituido principalmente por pacientes de control ambulatorio, (9 de los 14 casos). Los 5 restantes son niños hospitalizados, de los que uno pertenece al grupo nosocomial. La edad media de estos niños es superior a la observada en otras etiologías, 3 años, aunque el rango abarca a enfermos desde 1 mes a 14 años de edad.

Los enfermos en los que se ha aislado Campylobacter jejuni son lactantes, con 6 y 8 meses de edad y de los grupos A y C.

#### 4.3.2.3.3.- Asociación con virus y bacterias

En dos niños han sido identificados conjuntamente, además de E. coli, Rotavirus y Salmonella. En un tercero, E. coli se aisló junto a Rotavirus y Shigella. Los 3 son enfermos que fueron ingresados por su proceso diarreico, con edades de 2 meses, 9 años y medio, y 8 años y 3 meses, respectivamente. En todos ellos el número de deposiciones al día fue alto, (8 a 15), existió fiebre y un aumento de la cifra de leucocitos en sangre. En 2 de ellos las heces fueron mucosas y presentaron dolor abdominal.

#### 4.3.2.3.4.- Parásitos asociados

Giardia lamblia ha sido encontrada junto a E. coli inespecífico en 2 casos. Aunque se trata de 2 pacientes muy distintos, uno de 2 años controlado ambulatoriamente, y el segundo de 12 años ingresado en cuidados intensivos pediátricos donde sufrió un brote diarréico nosocomial, ambos se han caracterizado por presentar diarrea persistente. En el primer caso se manifestó como un proceso cronicado de varios meses de evolución, y en el segundo caso, tras un primer brote agudo y grave acompañado de deshidratación hipertónica, se sucedieron nuevos brotes, cesando en los dos bajo tratamiento específico con metronidazol.

4.4.- RESULTADOS DE LAS PRUEBAS DE DETECCION DE TOXINA  
VT EN LOS E. COLI ESTUDIADOS

Ninguno de los filtrados de los 506 E. coli ensayados ha producido un efecto citotóxico sobre las células Vero en suspensión.

4.5.-  AISLAMIENTOS DE E. COLI ENTEROTOXIGENICOS

Sólo han respondido a las pruebas de enterotoxigenicidad 21 de los 506 aislamientos de E. coli examinados.

Los 21 aislamientos enterotoxigénicos encontrados corresponden a 6 niños, de cuyas heces se habían conservado y posteriormente estudiado 30 colonias distintas de E. coli. Esto significa que no todos los aislamientos obtenidos de cada uno de los niños mostraron la misma respuesta.

El porcentaje de enterotoxigenicidad encontrado respecto al número total de E. coli investigados ha sido de 4.19%, y respecto al número de niños estudiados, de 5.94%. Aplicando sobre este porcentaje el inter-

valo de probabilidad  $\alpha -1$ , se puede deducir que con un riesgo  $\alpha = 0.05$ , la probabilidad de encontrar E.C.E.T. en las heces de niños diarreicos en nuestra comunidad sería del 2 al 10%.

#### 4.5.1.- Incidencia de E.C.E.T. productores de toxina termolábil (L.T.)

De los 21 E.C.E.T. identificados sólo 1 ha producido un efecto LT sobre células  $Y_1$  cultivadas en monocapa. Todos los E. coli restantes no mostraron ningún efecto sobre ellas.

##### 4.5.1.1.- Características de la cepa LT positiva

La cepa de E. coli enterotoxigénico productor de la toxina LT, es 1 de los 5 aislamientos de E. coli tomado de las heces de un niño diarreico, en el que únicamente fue aislado este microorganismo.

Pertenece al serogrupo 0128:H49, y como ya hemos comentado no ha provocado ninguna respuesta sobre las células Vero en suspensión, ni ha causado acúmulo de líquido en las asas intestinales del ratón. Este último ensayo ha sido repetido en 2 ocasiones, obteniendo en cada una de ellas coeficientes IMT de 0.0780381 y de 0.0651697 respectivamente, inferiores al límite superior del intervalo normal que muestran las cepas control ST(-).

#### 4.5.1.2.- Características del paciente

El enfermo en el que se ha aislado E.C.E.T. LT(+) es un niño de 13 meses de edad, que fue controlado ambulatoriamente en el Departamento de Pediatría en el mes de julio, por un proceso diarreico de 12 horas de evolución caracterizado por deposiciones líquidas, abundantes, amarillentas, sin moco ni sangre, en número de 4 al día, no habiendo recibido ningún tratamiento antibiótico previo. El proceso no se acompañaba de vómitos, ni fiebre, ni pérdida de peso, ni signos clínicos de deshidratación, por lo que tan sólo con aporte de solución glucoelectrolítica oral durante las primeras 6 horas, e introducción posterior de alimentación as-tringente e hipoconcentrada, sin ningún otro tratamiento, la enfermedad evolucionó favorablemente curando en 4 días.

#### 4.5.2.- Incidencia de E.C.E.T. productores de toxina termoestable

La producción de toxina ST ha podido ser demostrada en 20 de los 21 aislamientos de E. coli enterotoxigénico encontrados. Estos 20 aislamientos pertenecen a su vez, a 5 niños diarreicos del grupo nosocomial.

La distribución de los coeficientes IMT obtenidos con los filtrados de los cultivos de los 506 E. coli que han sido ensayados en ratones lactantes, se representan en la figura 28. Doce de los ensayos

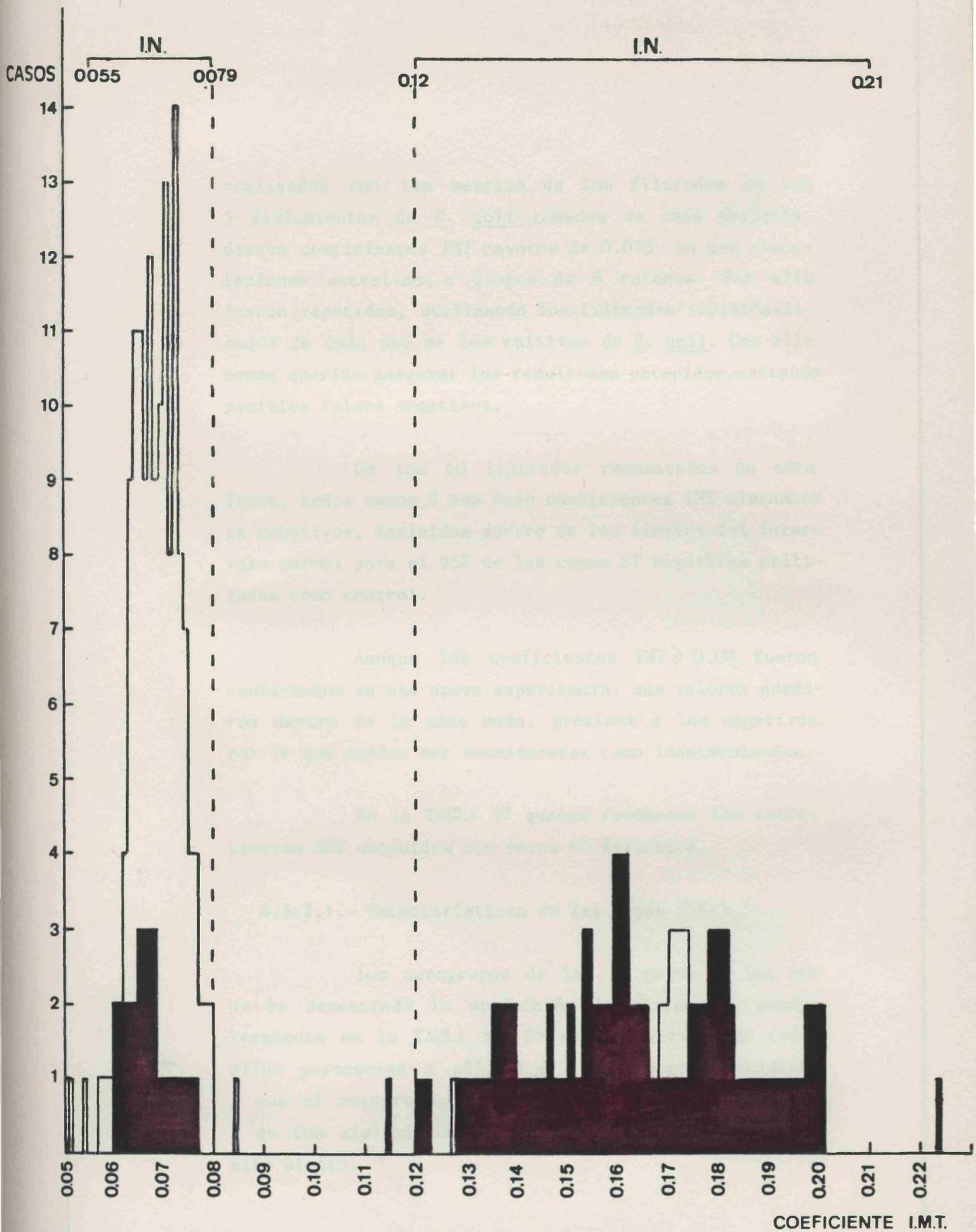


FIG. 28. \_ DISTRIBUCION DE LOS COEFICIENTES I.M.T. OBTENIDOS CON LOS FILTRADOS DE LAS CEPAS CONTROL (■), Y CON 506 FILTRADOS DE AISLAMIENTOS DE NIÑOS VALENCIANOS (□), DE LOS QUE 486 CORRESPONDEN A 89 CEPAS ST(-), Y 20 A 5 CEPAS ST(+).

realizados con las mezclas de los filtrados de los 5 aislamientos de E. coli tomados de cada paciente, dieron coeficientes IMT mayores de 0.075 en dos inoculaciones sucesivas, a grupos de 6 ratones. Por ello fueron repetidos, utilizando los filtrados individualizados de cada uno de los cultivos de E. coli. Con ello hemos querido asegurar los resultados obtenidos, evitando posibles falsos negativos.

De los 60 filtrados reensayados de esta forma, todos menos 3 han dado coeficientes IMT claramente negativos, incluidos dentro de los límites del intervalo normal para el 95% de las cepas ST negativas utilizadas como control.

Aunque los coeficientes  $IMT \geq 0.08$  fueron confirmados en una nueva experiencia, sus valores quedaron dentro de la zona muda, próximos a los negativos, por lo que pueden ser considerados como indeterminados.

En la TABLA 37 quedan reseñados los coeficientes IMT obtenidos con estos 60 filtrados.

#### 4.5.2.1.- Características de las cepas ST(+)

Los serogrupos de las 20 cepas en las que se ha demostrado la producción de toxina ST, quedan reseñadas en la TABLA 38. Se puede observar que todos ellos pertenecen a sólo 3 ó 4 serogrupos distintos, y que el serogrupo 0153:H45 está presente en al menos 1 de los aislamientos de E. coli conservados de cada niño afecto.

TABLA 37

RESULTADOS DEL ENSAYO EN RATONES LACTANTES DE LA MEZCLA DE 5  
 FILTRADOS DE AISLAMIENTOS DE E. COLI QUE DIERON  
 COEFICIENTES IMT SUPERIORES A 0.075

COEFICIENTES IMT		
MEZCLA 5 FILTRADOS		
VALOR INICIAL	VALOR REPETIDO	VALORES INDIVIDUALIZADOS
0.777959	0.083388	0.0791854 0.0780417 0.0697645 0.0646793 0.0748534
0.0779017	0.0772934	0.070778 0.072627 0.068514 0.072749 0.068878
0.0824462	0.082945	0.062859 0.0642907 0.0638247 0.0754225 0.0740352
0.0817057	0.0751439	<u>0.0801043</u> ; <u>0.0833504</u> <u>0.0859331</u> ; <u>0.0832284</u> 0.0724869 0.0787197 0.0680
0.077931	0.0807475	0.0658914 0.0640782 0.0751719 0.0790950 0.07015580

TABLA 37 (continuación)

COEFICIENTES IMT		
MEZCLA 5 FILTRADOS		
VALOR INICIAL	VALOR REPETIDO	VALORES INDIVIDUALIZADOS
0.0772972	0.0754436	0.0727664
		0.0729383
		0.0675060
		0.0703384
		0.0661234
0.0779868	0.0768082	0.0701549
		0.0629430
		0.0631254
		0.0704247
		0.0661234
0.0771332	0.08035	0.0775718
		0.0743505
		0.0667997
		0.0717764
		0.0675093
0.07714	0.0802536	0.06910
		0.0762887
		0.0682481
		0.0659262
		<u>0.0801718; 0.0858165</u>
0.08491	0.088081	0.0721529
		0.0701686
		0.0661260
		0.0679114
		0.06677097
0.0797056	0.0760692	0.0708013
		0.0681492
		0.0646932
		0.0669514
		0.0650937
0.075426	0.0760947	0.0684872
		0.0746966
		0.0701304
		0.0679158
		0.0647109

TABLA 38

RELACIÓN DE LAS CEPAS DE E.C.E.T. Y SUS SEROGRUPOS

PACIENTE (SEXO/EDAD)	CEPAS <sub>(a)</sub>	SEROGRUPOS	TOXINAS
V.M. (varón/7 días)	422262-(1)	0153:H45	ST
	422262-(2)	0153:H45	ST
	422262-(3)	0153:H45	ST
	422262-(4)	0153:H45	ST
B.P. (mujer/7 días)	422605-(1)	0102:K2:H6	ST
	422605-(2)	0153:H45	ST
	422605-(3)	0102:K2:H6	ST
	422605-(4)	Ospag:H45	ST
B.G. (mujer/7 días)	423070-(1)	0153:H45	ST
	423070-(2)	0153:H45	ST
	423070-(3)	06:K13:H1	ST
	423070-(4)	0153:H45	ST
S.T.A.(varón/47 días)	423707-(1)	0153:H45	ST
	423707-(2)	0153:H45	ST
	423707-(3)	0153:H45	ST
	423707-(4)	0153:H45	ST
	423707-(5)	0153:H45	ST
S.T.J.(varón/47 días)	423735-(1)	0153:H45	ST
	423735-(2)	0153:H45	ST
	423735-(4)	0153:H45	ST
P.C. (varón/11 meses)	422967-(1)	0128:H49	LT

(a) nº de cada aislamiento ensayado (5 por paciente)

El diagnóstico de enterotoxigenicidad se ha establecido, como para el resto de E. coli ensayados, observando individualizadamente y por duplicado, la acción de cada uno de los filtrados sobre minicultivos de células  $Y_1$  en monocapa y de células Vero en suspensión, (apartados 3.5.2.1.1. y 3.5.2.2.), lo que ha dado para todas ellas resultados negativos. Paralelamente se ha utilizado a partes iguales, la mezcla de los filtrados de las 5 colonias de E. coli aisladas en cada paciente, inoculándolas sobre lotes de 6 ratones. Los coeficientes IMT obtenidos y repetidos para su confirmación, fueron claramente positivos, o dieron cifras mayores que los valores superiores del intervalo normal de las cepas ST negativas-control.

Para comprobar estas positivities e identificar cuál o cuales de los 5 filtrados de E. coli de la mezcla eran los productores de enterotoxina, se planteó de nuevo el ensayo, inoculando separadamente cada filtrado en grupos de 3 ratones. De este modo, con el ensayo individualizado, se han identificado las 20 cepas ST(+), que han vuelto a ser confirmadas en una nueva prueba posterior, y cuyos coeficientes quedan enumerados en las TABLAS 39, 40, 41, 42 y 43. En ellas se hacen constar los pesos del grupo de ratones antes de ser sacrificados, (4 horas después de la inoculación), los pesos de los intestinos una vez extraídos, y los pesos de los ratones sin intestino, en cada uno de los ensayos, que como se puede observar se han realizado siempre por duplicado, en momentos diferentes, y utilizando filtrados obtenidos de producciones realizadas en idénticas condiciones.

TABLA 39

RESULTADOS DEL ENSAYO EN RATONES LACTANTES DE LOS FILTRADOS  
DE E. COLI DEL NIÑO V.M. (FUENTE DE CONTAGIO)

CEPA	PESOS (en g)			COEFICIENTE IMT
	RATONES ENTEROS	INTESTINOS	RESTO CUERPOS	
422262 <sup>a</sup>	13.839 <sup>c</sup>	2.0607	11.7783	0.17495
	12.6577	1.8141	10.8436	0.1672968
422262(1) <sup>b</sup>	7.1753 <sup>d</sup>	1.0224	6.1529	0.1661655 <sup>d</sup>
	8.0562	1.1451	6.9111	0.1656899
422262(2)	7.2672	0.9957	6.2715	0.1587658
	7.4325	1.0102	6.4223	0.1572956 <sup>e</sup>
422262(3)	6.8172	0.8768	5.9409	0.1475994 <sup>e</sup>
	10.1069	1.2342	8.8727	0.1391008 <sup>e</sup>
422262(4)	6.8657	1.149	5.7167	0.20099
	7.79865	1.1335	6.6673	0.1696863
422262(5)	6.2813	0.4242	5.8571	0.0724249

a. Ensayo con la mezcla de los filtrados de los aislamientos 1,2,3,4 y 5 de E. coli.

b. Ensayo de cada aislamiento de E. coli por separado.

c. Lote de 6 ratones.

d. Lote de 3 ratones.

e. Todos los ratones presentaron diarrea a lo largo de la prueba.

TABLA. 40

RESULTADO DEL ENSAYO EN RATONES LACTANTES DE  
LOS FILTRADOS DE E. COLI DEL NIÑO B.P.

CEPAS	PESOS (en g)			COEFICIENTE IMT
	RATONES ENTEROS	INTESTINOS	RESTO CUERPOS	
422605 <sup>a</sup>	14.7788 <sup>c</sup>	2.0278	12.751	0.1590306
	13.4827	2.2176	11.2651	0.19685
422605(1) <sup>b</sup>	6.6756 <sup>d</sup>	1.1104	5.5652	0.1995256
	6.8566	1.049	5.8076	0.1806253
422605(2)	5.8558	0.8038	5.052	0.1591053
	7.6466	0.9993	6.6473	0.1503317
422605(3)	5.6606	0.8141	4.8465	0.1679768
	6.5541	0.8117	5.7424	0.141352
422605(4)	6.398	0.9732	5.4248	0.1793983
	7.3082	1.0276	6.2806	0.1636149
422605(5)	6.2684	0.4713	5.7971	0.0812992

a. Ensayo con la mezcla de los filtrados de los aislamientos  
1,2,3,4 y 5 de E. coli.

b. Ensayo de cada aislamiento de E. coli por separado.

c. Lote de 6 ratones.

d. Lote de 3 ratones.

TABLA 41

RESULTADO DEL ENSAYO EN RATONES LACTANTES DE  
LOS FILTRADOS DE E. COLI DEL NIÑO B.G.

CEPA	PESOS (en g)			COEFICIENTE IMT
	RATONES ENTEROS	INTESTINOS	RESTO CUERPOS	
423070 <sup>a</sup>	14.4389	1.4577	12.9812	0.1122931
	15.3487	1.298	14.0507	0.0923797 <sup>e</sup>
	11.9823	1.8047	10.1776	0.1773207
423070(1) <sup>b</sup>	6.4627	0.862	5.6007	0.1539093
	6.9089	1.0244	5.8845	0.1740844 <sup>e</sup>
423070(2)	6.476	0.7286	5.7474	0.1267703
	6.9868	0.9329	6.0539	0.154099
423070(3)	7.1081	0.9396	6.1685	0.1523222
	6.50785	0.9202	5.58765	0.1646846 <sup>e</sup>
423070(4)	7.3929	0.9475	6.4454	0.1470
	7.07685	1.0178	6.05905	0.1679801
423070(5)	7.0821	0.4701	6.612	0.071098
	6.8998	0.481	6.4188	0.0749361
	10.9574	0.7564	10.201	0.0741495

a. Ensayo con la mezcla de los filtrados de los aislamientos 1,2,3,4 y 5 de E. coli.

b. Ensayo de cada aislamiento de E. coli por separado.

c. Lote de 6 ratones.

d. Lote de 3 ratones.

e. Durante la prueba los ratones presentaron diarrea.

TABLA 42

RESULTADO DEL ENSAYO EN RATONES LACTANTES DE LOS FILTRADOS  
DE E. coli DEL NIÑO S.T.A.

CEPA	PESOS (en g)			COEFICIENTE IMT
	RATONES ENTEROS	INTESTINOS	RESTO CUERPOS	
423707 <sup>a</sup>	15.1781 <sup>c</sup>	1.9012	13.2769	0.143196
	14.5713	1.6813	12.89	0.1304344 <sup>e</sup>
423707(1) <sup>b</sup>	7.14145 <sup>d</sup>	0.95735	6.1841	0.15480
	7.90785	1.29215	6.6157	0.1953156
423707(2)	7.0236	0.852	6.1716	0.13805 <sup>e</sup>
	6.676	0.9702	5.7058	0.1700375
423707(3)	6.9461	0.9732	5.9729	0.1629359
	7.4973	0.9841	6.5132	0.1510931
423707(4)	6.451	0.9998	5.4512	0.1834
	5.97795	0.69105	5.2869	0.1307098 <sup>e</sup>
423707(5)	6.3896	0.9025	5.4871	0.16447
	6.8085	0.9614	5.8471	0.1644233

a. Ensayo con la mezcla de los filtrados de los aislamientos 1,2,3,4 y 5 de E. coli.

b. Ensayo de cada aislamiento de E. coli por separado.

c. Lote de 6 ratones.

d. Lote de 3 ratones.

e. Durante la prueba los ratones presentaron diarrea.

TABLA 43

RESULTADOS DEL ENSAYO EN RATONES LACTANTES DE LOS FILTRADOS  
DE E. COLI DEL NIÑO S.T.J.

CEPA	PESOS (en g)			COEFICIENTE IMT
	RATONES ENTEROS	INTESTINOS	RESTO CUERPOS	
423735 <sup>a</sup>	15.0395 <sup>c</sup>	1.2425	13.795	0.0902138 <sup>e</sup>
	13.4819	1.3108	12.1711	0.1076977 <sup>e</sup>
423735(1) <sup>b</sup>	6.8164 <sup>d</sup>	0.773	6.0434	0.1279081
	6.3184	0.7499	5.5685	0.13466
423735(2)	6.33615	0.92025	5.4159	0.1699163
	6.2883	0.8929	5.2981	0.1685321
423735(3)	7.1205	1.0358	6.0692	0.17066
	6.0606	0.6589	5.4017	0.1219801
423735(4)	7.0773	0.4325	6.6448	0.06508
	5.9071	0.361	5.5461	0.0650907
423735(5)	7.07485	0.48095	6.5939	0.07293

a. Ensayo con la mezcla de los filtrados de los aislamientos de 1.2.3.4 y 5 de E. coli.

b. ensayo de cada aislamiento de E. coli por separado.

c. Lote de 6 ratones.

d. Lote de 3 ratones.

e. Durante la prueba los ratones presentaron diarrea.

#### 4.5.2.2.- Asociación de E.C.E.T. ST(+) con otros patógenos

En 3 de los 5 casos señalados E.C.E.T. ST(+) se ha aislado formando parte de la flora bacteriana habitual del intestino, (junto a Klebsiella pneumoniae o/y Klebsiella oxytoca). En un caso ha sido encontrado junto a Rotavirus, y en otro ha sido identificado de forma aislada.

#### 4.5.2.3.- Características de los pacientes

Los 5 pacientes afectados fueron diagnosticados a partir de un pequeño brote diarreico nosocomial, que tuvo lugar en la sala de neonatos del Departamento de Pediatría, durante los últimos días del mes de julio del pasado año.

Uno de ellos, el considerado como hipotético origen del foco, ingresó en el centro neonatal con 7 días de vida, por presentar desde 32 horas antes, vómitos y deposiciones diarreicas líquidas abundantes, verdosas, sin moco, ni sangre, en número de 10 al día que no había respondido a un tratamiento dietético, y que habían condicionado pérdida de peso y distensión abdominal. No existía fiebre, ni deshidratación. No se produjo alteración del equilibrio hidroelectrolítico, pero sí se evidenció una acidosis metabólica y una intolerancia transitoria a monosacáridos, así como neutrofilia con desviación izquierda. El estudio coprológico mostró E. coli como microorganismo único.

La diarrea curó a los 8 días, sin recidivas ni secuelas, tras un periodo de 48 horas de ayuno, e introducción posterior de leche, exenta de lactosa, a baja concentración. Además se instauró tratamiento con colistina oral, y ampicilina y gentamicina parenterales.

Tras el ingreso de este niño, y a lo largo de las 2 semanas siguientes, otros 6 neonatos iniciaron una sintomatología similar, aunque más leve. En 4 de ellos fue identificado E.C.E.T. ST(+), encontrándose en los 4, al menos 1 aislamiento de E. coli con el mismo serogrupo de la cepa considerada como fuente infectante.

Las características de la enfermedad en estos niños se exponen en la TABLA 44.

Por último, como resumen global, en la TABLA 45 se recogen los resultados sobre la incidencia de E. coli enterotoxigénicos y enteropatógenos clásicos, en los niños valencianos estudiados.

TABLA 44

CARACTERÍSTICAS DE LA ENFERMEDAD DIARREICA EN LOS NIÑOS CON E.C.E.T.

PACIENTE (edad)	GRUPO	FECHA	PATOLOGIA SUBYACENTE	INFECCION CONCOMITANTE	HORAS EVOLUCION	TRATAMIENTO ANTIBIOTICO	FIEBRE	VOMITOS	PERDIDA PESO	DESHIDRATAACION
V.M. (7 días)	A	Julio	NO	NO	36	NO	NO	SI	SI	NO
B.P. (7 días)	B	Julio	Hijo Madre diabetica	NO	12	NO	NO	NO	SI	NO
B.G. (7 días)	B	Julio	Bajo Peso (PEG)	NO	48	NO	NO	NO	SI	NO
S.T.A. (47 días)	B	Agosto	Bajo Peso (AEG)	NO	24	NO	Febricula	NO	SI	NO
S.T.J. (47 días)	B	Agosto	Bajo Peso (AEG)	NO	72	NO	NO	NO	NO	NO
P.C. (11 meses)	C	Julio	NO	NO	18	NO	NO	NO	NO	NO

P.E.G.: Pequeño edad gestacional

A.E.G.: Adecuado edad gestacional

TABLA 44 (continuación)

CARACTERÍSTICAS DE LAS DEPOSICIONES EN LOS NIÑOS CON E.C.E.T.

PACIENTE	<u>Nº DEPOSICIONES</u> DIA	COLOR	CONSISTENCIA	VOLIMEN	MOCO	SANGRE	FROTIS	ESTUDIO COPROLOGICO
V.M.	10	Verdoso	Líquida	Abundante	NO	NO	Flora Gram (-) NO P.M.N.	E.C.E.T. ST(+)
B.P.	2-3	Amarillo	Semilíquida	Abundante	NO	NO	/	E.C.E.T. ST(+) <u>E. coli</u> <u>Klebsiella pneumoniae</u>
B.G.	6	Amarillo	Líquida	Normal	NO	NO	Escasos P.M.N.	E.C.E.T. ST(+) <u>Klebsiella pneumoniae</u>
S.T.A.	8	Amarillo- verdoso	Líquida	Abundante	NO	NO	/	E.C.E.T. ST(+) Rotavirus
S.I.J.	4	Verdoso	Líquida	Normal	NO	NO	Flora abundante NO P.M.N.	E.C.E.T. ST(+) <u>Klebsiella pneumoniae</u>
P.C.	4	Amarillo	Líquida	Abundante	NO	NO	/	E.C.E.T. LT(+) Flora habitual

P.M.N.: Polimorfonucleares.

TABLA 44 (continuación)

CARACTERÍSTICAS DE LA ENFERMEDAD DIARREICA EN LOS NIÑOS CON E.C.E.T.

PACIENTE	DOLOR DISTENSION ABDOMINAL	ACIDOSIS METABOLICA	INTOLERANCIA H. de C. ó PROTEINAS	TRATAMIENTO DIETETICO		ANTIBIOTICOS		DURACION
				AYUNO Sol. orales glucoelectrolíticos	ALIMENTACION	ORALES	PARENTERAL.	
V.M.	SI/NO	SI	MONOSACARIDOS	48 horas/NO	FORMULA EXENTA de LACTOSA	Colistina	Ampicilina Gentamicina	8.5 días
B.P.	SI/NO	NO	NO	NO/SI	FORMULA ADAPTADA HIPOCONCENTR.	Colistina	NO	4 días
B.G.	NO/NO		NO	6 horas/NO	FORMULA ADAPTADA HIPOCONCENTR.	Colistina	NO	5 días
S.T.A.	NO/SI	SI	NO	120 h.(A.P.T.)/NO	FORMULA ELEMENTAL	Colistina	NO	6 días
S.T.J.	NO/NO	SI	MONOSACARIDOS	120 h.(A.P.T.)/NO	FORMULA SEMIELEMENTAL	Colistina	NO	5.5 días
P.C.	NO/SI		NO	NO/SI	ASIRINGENTE	NO	NO	4 días

A.P.T.: Alimentación parenteral total

TABLA 45

RESULTADOS GLOBALES SOBRE LA INCIDENCIA DE E. COLI  
ENTEROTOXIGENICOS EN LOS NIÑOS ESTUDIADOS

---

NIÑOS EN LOS QUE SE AISLÓ AL MENOS 1 CEPA

---

NIÑOS	E.C.E.T. LT(+)	E.C.E.T. ST(+)	E.C.E.P.	<u>E. coli</u> VT(+)
101	<u>1/101 (0.99%)</u>	<u>5/101 (4.9%)</u>	4/101 (3.96%)	0/101
	(5.9%)			

---

#### 4.6.- INCIDENCIA GLOBAL DE PATOGENOS ENTERICOS

Uno o más patógenos entéricos han sido aislados en 46 de los 101 niños examinados, lo que supone que en el 45.54% de los pacientes, la diarrea ha podido ser atribuida a algún agente etiológico.

La presencia de patógenos en las heces de los niños diarreicos ha sido ligeramente inferior entre los niños hospitalizados que entre los no hospitalizados, ya que han sido diagnosticados en el 48.48% (16/33) de los enfermos del grupo A, en 36.36% (12/33) de los del grupo B, y en el 51.42% (18/35) de los del C. Sin embargo existe una diferencia significativa entre el porcentaje de patógenos encontrado en las diarreas comunitarias, (50%), y nosocomiales, (36.36%) ( $X^2 = 8.20$ ,  $p < 0.05$ ).

En las TABLAS 46, 47 y 48 se especifican, en cada uno de los grupos, los hallazgos microbiológicos, distribuyéndolos de acuerdo a las edades de los pacientes en los que fueron encontrados. En la TABLA 49, queda resumido el conjunto de patógenos.

##### 4.6.1.- Virus

Han sido detectados Rotavirus en 17 de los 58 casos en los que fue investigada la etiología

TABLA 46

HALLAZGOS MICROBIOLÓGICOS EN LAS HECEs DE LOS  
PACIENTES DEL GRUPO A

PACIENTES DEL GRUPO A						
AISLAMIENTOS	0-6m	7-12m	13-24m	25m-5a	> 5a	TOTAL(%)
<u>NO PATOGENOS</u>						17(51.51%)
<u>E. coli inespecifico</u>						
. unico	1	1	1			3
. con Flora habitual	5	2	2	4	1	14
<u>PATOGENOS</u>						16(48.48%)
<u>Virus</u>						4(18.18%) <sup>a</sup>
. Rotavirus	1	3				4
<u>Bacterias</u>						9(27.27%)
. E.C.E.T.(ST+)	1					1
. <u>Salmonella</u>	1	2	2		2	7
. <u>Campylobacter</u>		1				1
<u>Virus+Bacterias</u>						3(9.9%)
. Rot <u>Salmonella</u>	1				1	2
. Rot <u>Shigella</u>					1	1

a. % referido al total de pacientes investigados (4/22)(El % total de virus identificados en este grupo es de 31.8%).

TABLA 47

HALLAZGOS MICROBIOLÓGICOS EN LAS HECES DE LOS  
PACIENTES DEL GRUPO B

PACIENTES DEL GRUPO B						
AISLAMIENTOS	0-6m	7-12m	13-24m	25m-5a	> 5a	TOTAL(%)
<u>NO PATOGENOS</u>						21 (63.63%)
<u>E. coli inespecífico</u>						
. único	6					6
.con Flora habitual	12					12
Flora habitual	3					3
<u>PATOGENOS</u>						12(36.36%)
<u>Virus</u>						
. Rotavirus	4					4(20%) <sup>a</sup>
<u>Bacterias</u>						
. E.C.E.T.(ST)	3					3
. E.C.E.P.	1					1
. <u>Salmonella</u>			1			1
<u>Virus+Bacterias</u>						2(10%)
. E.C.E.T.+Ro	1					1
. E.C.E.P.+Ro	1					1
<u>Parásitos</u>						
. <u>G. lamblia</u>					1	1(5%)

a. Porcentaje referido al n° de pacientes investigados (4/20)

(El porcentaje total de virus identificados en este grupo es 30%).

TABLA 48

HALLAZGOS MICROBIOLÓGICOS EN LAS HECE DE LOS  
PACIENTES DEL GRUPO C

PACIENTES DEL GRUPO C						
AISLAMIENTOS	0-6m	7-12m	13-24	25m-5a	5a	TOTAL(%)
<u>NO PATOGENOS</u>						17(48.57%)
<u>E. coli inespecífico</u>						
. único	1				2	3
. con flora habitual	4	2	3	3	2	14
<u>PATOGENOS</u>						18(51.43%)
<u>Virus</u>						3(18.75%) <sup>a</sup>
. Rotavirus		2	1			3
<u>Bacterias</u>						13(37.11%)
. E.C.E.T.(LT+)			1			1
. E.C.E.P.	1					1
. <u>Salmonella</u>	6	2		1	1	10
. <u>Campylobacter</u>	1					1
<u>Virus+Bacterias</u>						1(2.85%)
. E.C.E.P.+Ro	1					1
<u>Parásitos</u>						1(2.85%)
. <u>G. lamblia</u>				1		1

a. Porcentaje referido al total de pacientes investigados (3/16).

(El porcentaje total de virus identificados en este grupo es de 25%).

TABLA 49

PACIENTES EN LOS QUE SE HAN AISLADO PATÓGENOS ENTÉRICOS JUNTO A, Ó SIN E. COLI,  
O EN LOS QUE E. COLI HA SIDO EL PATÓGENO ENCONTRADO

Nº NIÑOS/AISLAMIENTOS	MICROORGANISMOS ENCONTRADOS							
	<u>E. coli</u>			<u>Virus</u> <sup>d</sup>	<u>Salmonella</u>	<u>Shigella</u>	<u>Campylobacter</u>	<u>Giardia</u>
	<u>E. coli</u> <sup>a</sup>	<u>ECEP</u> <sup>b</sup>	<u>ECET</u> <sup>c</sup>					
<u>PATOGENOS</u>								
<u>Virus</u>								
11/ <u>E. coli</u> y Rotavirus	11			11				
<u>Bacterias</u>								
2/ <u>ECEP</u>		2						
5/ <u>ECET</u> (1LT y 4ST)			5					
14/ <u>E. coli</u> y <u>Salmonella</u>	14				14			
2/ <u>E. coli</u> y <u>Campylobacter</u>	2						2	
4/ <u>Salmonella</u>					4			

TABLA 49 (continuación)

PACIENTES EN LOS QUE SE HAN AISLADO PATÓGENOS ENTÉRICOS JUNTO A, Ó SIN E. COLI,  
O EN LOS QUE E. COLI HA SIDO EL PATÓGENO ENCONTRADO

Nº NIÑOS/AISLAMIENTOS	MICROORGANISMOS ENCONTRADOS							
	<u>E. coli</u>			<u>Virus</u> <sup>d</sup>	<u>Salmonella</u>	<u>Shigella</u>	<u>Campylobacter</u>	<u>Giardia</u>
	a <u>E. coli</u>	b ECEP	c ECET					
<u>Virus y Bacterias</u>								
2/ <u>ECEP</u> y Rotavirus		2		2				
1/ <u>ECET</u> y Rotavirus			1	1				
1/ <u>E. coli</u> , Rotavirus y <u>Shigella</u>	1			1		1		
2/ <u>E. coli</u> , Rotavirus y <u>Salmonella</u>	2			2	2			
<u>Parásitos</u>								
2/ <u>E. coli</u> y <u>G. lamblia</u>	2							2
TOTAL DE NIÑOS CON PATOGENOS = 46	32	4	6	17	20	1	2	2
	(3.96%)	(5.9%)	(29.31%)	(19.8%)	(0.99%)	(1.98%)	(1.98%)	
	10							
(45.54% del total)	(9.9%)							

a = E. coli no enterotoxigénico, ni enteropatógeno.

b = E. coli enteropatógeno.

c = E. coli enterotoxigénico.

d = Sólo se investigan en 58 niños. (Porcentaje referido al nº niños investigados).

viral, lo que supone un porcentaje del 29.31%.

En relación con la edad, la mayor parte de los niños con virus en sus heces son menores de 1 año, (14/17 = 87.1%), ( $X^2 = 79.56$ ,  $p < 0.001$ ), entre los que se encuentran 1 recién nacido, 8 con edades entre 1 y 6 meses y 5 comprendidos entre 7 meses y 1 año.

El niño más pequeño en el que ha sido detectado Rotavirus tiene 23 días. Se encontraba ingresado en la sala de neonatos por bajo peso, y desarrolló una diarrea nosocomial en la que se aisló también E.C.E.P.

El paciente de mayor edad tiene 9 años y 5 meses, y en sus heces ha sido encontrado además Salmonella junto a E. coli no enteropatógeno, ni enterotoxigénico.

La detección de Rotavirus en los distintos grupos y su asociación con otros aislamientos coprológicos se expresan en las TABLAS 46, 47 y 48. En ellas se puede comprobar, que los aislamientos virales se han producido en mayor número entre los pacientes hospitalizados, (13/17), que entre los extrahospitalarios, con una diferencia significativa, ( $X^2 = 16.54$ ,  $p < 0.001$ ), que no existe en cambio cuando se comparan las diarreas de los grupos A y C, ambas comunitarias, pero con distinta forma de control. ( $X^2 = 1.1629$ ,  $p < 0.05$ ).

Respecto al número de detecciones realizadas en los distintos meses que ha abarcado el periodo de

estudio, si establecemos una comparación entre los hallazgos positivos de los meses fríos, (enero y febrero), y los obtenidos en los meses calurosos, (julio y agosto), observamos que aunque en valores absolutos el mayor número se produce en estos últimos, el porcentaje de aislamientos de Rotavirus en relación al número de pacientes en los que se efectuó la investigación viral, (TABLA 13), es similar, (42.85% y 32.25% respectivamente), sin diferencias significativas entre ellos, ( $\chi^2 = 2.0989$ ,  $p < 0.05$ ). Durante los meses de marzo y abril no se ha producido ningún aislamiento viral.

Si aplicamos el intervalo de probabilidad  $\alpha - 1$ , en base al porcentaje de Rotavirus detectados durante los 8 meses de nuestro estudio, podemos suponer, con un error  $\alpha = 0.05$ , que del 17 al 41% de los niños diarreicos examinados en idénticas condiciones en nuestra comunidad, podrían tener Rotavirus en sus heces.

Entre los 17 niños con Rotavirus. sólo 5 presentaban o habían presentado signos o síntomas de infección de vías altas, 11 tuvieron fiebre en algún momento de la enfermedad, 11 vómitos y 9 pérdida de peso, pero sólo 3 sufrieron deshidratación, que fue isotónica y de carácter leve o moderado. En 6 pacientes existía acidosis metabólica, y en 6 intolerancia a monosacáridos.

Refiriéndonos a las características de la diarrea el número de deposiciones ha oscilado entre 4 y 15, (media de 8 deposiciones/día), con heces totalmente líquidas en 12 casos y semilíquidas en 5, sin

moco, (sólo 3 de 17, 1 de ellas asociada a Salmonella), ni sangre, (sólo en 2, y en ambos asociados a Salmone-lla).

En todos los casos en los que se efectuó un examen directo de las heces se apreció la existencia de escasos polimorfonucleares, sin que este hallazgo se relacionase o no con la presencia de otros patógenos asociados. Sin embargo, en la analítica efectuada, no se aprecia alteración de la cifra de leucocitos, ni de la fórmula leucocitaria cuando Rotavirus se aísla como agente único en heces, observándose leucocitosis cuando el virus se asocia a Salmonella sp. o Shigella sp.

La duración de la diarrea ha oscilado entre 3 y 8 días, con una media de 5 días y medio en los casos con Rotavirus como agente único, y de 5.58 días, en los que existió asociación con bacterias.

#### 4.6.2.- Bacterias enteropatógenas

Si incluimos como patógenos a los aislamientos de E. coli con serogrupo considerado como tal, han sido encontradas bacterias enteropatógenas en 33 de los 101 pacientes, lo que supone un porcentaje de 32.67%. Si E.C.E.P. no se incluyen como tales, este porcentaje desciende al 29.7%.

Además de los aislamientos de E. coli, (ya comentados en los apartados 4.3.1. y 4.5.), Salmonella sp. ha sido identificada en 20 casos, Shigella sp. en

uno, y Campylobacter sp. en 2, no habiéndose encontrado ninguna otra bacteria patógena.

#### 4.6.2.1.- Salmonella sp

El grupo de niños en cuyas heces han sido identificadas cepas de Salmonella, está constituido por 20 pacientes, aislándose en 18 como patógeno único y en 2 junto a Rotavirus. Salmonella sp. es por tanto, en la mayor parte de los casos, el único agente causal y el agente bacteriano identificado con mayor frecuencia, con un intervalo de probabilidad, para un riesgo  $\alpha = 0.05$ , de 12 al 28%.

La edad media de los niños afectados es de 2 años y 9 meses, aunque el rango abarca desde 1 mes de edad a 14 años.

La mayor parte de los casos, (15/20), se han diagnosticado en los meses más calurosos del periodo que duró el estudio, junio, julio y agosto, y corresponden a niños que precisaron ser ingresados, (9/20, 7 de ellos con Salmonella sola), o a pacientes que fueron controlados ambulatoriamente, (10/20); sólo 1 caso de diarrea nosocomial mostró esta bacteria en sus heces.

La enfermedad diarreica con esta etiología, se ha caracterizado por heces líquidas, amarillentas o amarillo-verdosas con moco, (13/20), y sangre, (10/20), en número de 8 a 9 al día por término medio. Ha sido frecuente la presencia de fiebre, (14/20), y pérdida de peso, (11/20), y poco frecuente el dolor abdominal

(6/20), los vómitos, (5/20) y la acidosis, (6/20). Esta última acompañó a los 5 casos con deshidratación isotónica, 4 de carácter leve y 1 moderada.

En todos los casos en los que se hizo un examen directo de las heces se encontraron leucocitos, aunque no siempre en gran cantidad. Excepto en 4 casos, 2 con leucopenia y 2 con cifra de leucocitos normal, en todos los que fueron examinados ha existido leucocitosis.

La diarrea tuvo en este grupo una duración media de 8.2 días, con un rango de 4 a 13 días. Sólo 4 casos recibieron tratamiento antibiótico, (ampicilina, gentamicina o colistina), y en ellos la duración del proceso fue mayor, (9 días y medio).

Por último, en 12 casos pudieron realizarse controles coprológicos seriados tras la curación del proceso, comprobándose como a los 7 días todos los niños controlados, excepto uno, seguían eliminando Salmonella en sus heces, independientemente de que hubieran recibido o no tratamiento antibiótico. Este hallazgo se negativiza en todos, entre los 15 y 20 días. Sólo una niña de 5 meses de edad, se mantuvo como portadora durante 5 meses, sin presentar a pesar de ello ninguna sintomatología.

#### 4.6.2.2.- Shigella

Sólo en 1 caso se ha encontrado Shigella en heces. Se trata de Shigella flexneri, grupo 6, que

fue aislada junto a Rotavirus en un niño de 8 años.

La enfermedad se caracterizó en él por fiebre, dolor abdominal, vómitos y deposiciones líquidas, verdosas, en número de 15 al día, sin moco, ni sangre. El niño tuvo que ser ingresado en el hospital donde se apreció una cifra de leucocitos normal con gran desviación izquierda y aumento de la velocidad de sedimentación. En el exámen directo de las heces se observaron algunos leucocitos polimorfonucleares. El curso clínico fue favorable, sin complicaciones, curando en 7 días.

#### 4.6.2.3.- Campylobacter jejuni

En 2 casos ha sido aislado este microorganismo en heces. En ellos, la enfermedad se ha manifestado de forma diferente, por lo que no existen síntomas o signos característicos. Sólo en ambos se dió la circunstancia común, de presentar una enfermedad concomitante, (una neutropenia y una bronconeumonía respectivamente), que obligó a mantener un tratamiento antibiótico, cediendo en los 2 la diarrea, en 4 días.

#### 4.6.3.- Parásitos

Los hallazgos de Giardia lamblia ya han sido expuestos en el apartado 4.3.2.3.4.

5.- DISCUSSION

### 5.1.- POBLACION ESTUDIADA

El estudio ha abarcado un periodo de 8 meses, desde los más fríos a los más calurosos, lo que permite con algunas reservas mostrar, de forma bastante aproximada, la patología infecciosa intestinal anual en nuestra comunidad.

Esta incidencia ha sido además proyectada sobre dos tipos de diarrea bien diferenciados, diarrea nosocomial y diarrea comunitaria. Esta última se ha distribuído en otros 2 grupos, el de niños hospitalizados por esta causa, y el de pacientes controlados ambulatoriamente. Cada uno de estos grupos ha ido constituyéndose al azar, con la única particularidad de estar formados por niños con diarrea aguda, cuyas deposiciones fueran exclusiva o predominantemente líquidas, considerando este signo como la expresión patognomónica de la enterotoxigenicidad buscada.

Esta selección explica, que el porcentaje de niños hospitalizados en nuestro estudio sea tan sólo el 27.27% del número total de casos de diarrea diagnosticados entre los niños ingresados en el Departamento de Pediatría, en 1984.

La mayor parte de los pacientes diarreicos son menores de 2 años de edad (80%), (fig. 12, 13 y 14),

lo que coincide con estudios previos llevados a cabo, tanto en países subdesarrollados, (GORDON, 1971; DRACHMAN, 1974; WADSTROM, 1976; MATA, 1983), como desarrollados, (BACK et al. 1977; GURWITH y WILLIAMS, 1977; PICKERING et al. 1978; THOREN et al. 1983b; GEORGES et al. 1984; VELASCO et al. 1984).

Los niños menores de 6 meses constituyen el grupo más numeroso, debido a que de los grupos estudiados, el de diarrea nosocomial está integrado casi exclusivamente por lactantes de esta edad, que son a su vez, los que con mayor frecuencia se ven afectados por este tipo de infección intrahospitalaria (MOFFET, 1981).

El mayor número de casos se ha producido en meses opuestos por sus características climáticas: julio y febrero, (seguidos por enero), lo que podría coincidir epidemiológicamente con patología bacteriana y viral respectivamente, (RODRIGUEZ et al. 1977; BÄCK et al. 1980a; PRATS, 1985), circunstancia que será analizada posteriormente, de acuerdo a los hallazgos microbiológicos en nuestros casos.

En cuanto a la valoración de la diarrea, los procesos con mayor repercusión general fueron presentados por los pacientes del grupo A, en los que se da un gran número de casos con pérdida de peso, así como el mayor porcentaje de deshidrataciones y trastornos del equilibrio ácido-base, y en los que la enfermedad ha tenido una duración mayor ( $\bar{x}$  = 6.5 días).

En el grupo nosocomial en cambio, aunque 22 pacientes presentaron pérdida de peso, y 12 acidosis metabólica, sólo 2 sufrieron deshidratación, y la diarrea en ellos fue de menor duración, 5 días por término medio. Todo ello se puede explicar porque, aún siendo pacientes con un mayor riesgo, al tratarse de un grupo integrado casi totalmente por lactantes afectos al mismo tiempo de otros procesos patológicos, estuvieron sometidos en todo momento a una mayor vigilancia, adoptando actitudes terapéuticas, (reposición hidroelectrolítica, pautas dietéticas...etc.), más precozmente que en los otros dos grupos, independientemente de la etiología de la diarrea que será comentada después.

La mayor parte de las deshidrataciones producidas han sido de carácter leve e isotónicas, y han afectado a niños menores de 1 año de edad, lo que coincide con lo aportado por otros autores, (RUZA et al. 1979; FINBERG et al. 1982). Sólo 2, ambos de carácter moderado, presentaron cifras de sodio superiores a 150 mEq.

En resumen por tanto, podemos concluir que las diarreas estudiadas han sido procesos benignos, sin complicaciones y de fácil control, como suele ocurrir en países o zonas con condiciones higiénico-sanitarias similares a las nuestras (SILVERMAN y ROY, 1983; ELLIS et al. 1984; PRATS, 1985).

## 5.2.- EVALUACION DE LAS PRUEBAS CONVENCIONALES DE ENTEROTOXIGENICIDAD

### 5.2.1.- Actividad de las toxinas LT, VT y ST, in vitro

Las primeras experiencias de nuestro estudio tuvieron como fin poner a punto los sistemas de detección de las toxinas producidas por E. coli.

Como se puede observar en la TABLA 32, se han ensayado los filtrados de cultivo de 16 cepas de E. coli sobre monocapas y suspensiones de células Y<sub>1</sub>, CHO y Vero. Entre las cepas ensayadas, unas son productoras de enterotoxina LT y ST, otras de LT ó ST solamente, y otras no producen ninguna de las tres toxinas.

Los filtrados de las cepas productoras de enterotoxina LT han causado transformaciones citotónicas específicas en las células Y<sub>1</sub> en monocapa, en las células CHO, y en ocasiones, también sobre las células Vero, en suspensión, mientras que los filtrados que contenían la citotoxina VT destruyeron los cultivos de células Vero cuando, tras ser tripsinizadas, eran inoculadas con ellos.

Como era de esperar, ni los filtrados calentados de las cepas enterotoxigénicas, ni los filtrados de

las cepas no productoras de enterotoxina, causaron efectos citotóxicos o citotónicos sobre ninguna de las tres líneas celulares, lo que confirma que tanto la toxina LT, como la verotoxina son productos termolábiles, y que las células no se ven alteradas por ninguno de los componentes del medio.

A pesar de que tanto las células Y<sub>1</sub>, como las células CHO reaccionan de forma similar frente a las cepas LT(+), (GUERRANT et al. 1974; SPEIRS et al. 1977; GONZALEZ, 1984), en nuestra valoración preliminar observamos que la respuesta de las células CHO no ha sido siempre fácilmente cuantificable, y que incluso en ocasiones, ha resultado difícil la interpretación de los resultados, debiendo en general posponer la lectura hasta 48 horas, para hacer más patente la inhibición del crecimiento causado por la toxina LT.

SPEIRS et al. 1977, ensayaron los filtrados de 7 cepas productoras de LT, tratando de comparar los efectos que producían sobre las células Y<sub>1</sub> en monocapa y células CHO en suspensión. Encontraron que la enterotoxina LT era activa en todos los ensayos, pero que la respuesta morfológica disminuye al 25 ó 50% en la mayor parte de los casos, cuando era usado como medio de crecimiento CST, medio que ha sido el utilizado por nosotros en nuestra experiencia.

De forma similar, KETUYI et al. (1978) habían observado también la menor sensibilidad de las células CHO en monocapa frente a la acción de LT, comparándola con la de la toxina colérica. Por estos motivos, en

la aplicación posterior de las técnicas ensayadas, se ha elegido la línea celular  $Y_1$  para la detección de LT.

Por otra parte, se ha estudiado la acción de los filtrados de cepas productoras de toxina LT frente a células Vero en suspensión, obteniendo resultados dispares ya que en unas ocasiones estos filtrados fueron considerados LT(+), y en otras como LT(-).

En este sentido, dado que estos mismos filtrados ensayados sobre células  $Y_1$  siempre las alteraron específicamente, nuestros resultados no pueden ser atribuidos a la ausencia de LT, pudiendo deberse a la necesidad de una mayor cantidad de enterotoxina de la que pudiera existir en nuestras preparaciones. Sin embargo, el sistema de producción que se ha utilizado en nuestro estudio es similar al que emplearon SPEIRS *et al.* 1977, que lograron una respuesta adecuada sobre las células Vero.

Hemos comprobado, coincidiendo con SACK y SACK, 1975 y CALDERON y LEVIN, 1980, que para evitar obtener resultados falsos negativos, es necesario esperar a que la monocapa de células  $Y_1$  sea confluyente y densa, mientras que para evitar confundir las alteraciones morfológicas inespecíficas debidas a efectos citotóxicos con el redondeamiento celular específico propio de LT, es eficaz el cambio sistemático del medio antes de añadir los filtrados de las cepas a investigar, así como plantear una doble lectura, por personas diferentes.

Al igual que otros investigadores se ha observado, que si bien el efecto causado por la toxina LT sobre las células Y<sub>1</sub>, Vero y CHO comienza a las pocas horas de añadido el filtrado a las células, para lograr una lectura homogénea y comparable de los resultados, debe mantenerse el periodo de incubación de 12 a 16 horas, cuando se utilizan ensayos sobre monocapas celulares y entre 16 y 48 horas cuando se emplean células en suspensión. El hecho de que no siempre los periodos de incubación recomendados sean iguales para todos los autores, obedece a que no todos los medios y condiciones de producción de toxina utilizados son idénticos, por lo que tanto la cantidad de toxina obtenida como su acción sobre las células pueden variar, (DONTA et al. 1974; GUERRANT et al. 1974; SACK y SACK, 1975; SPEIRS et al. 1977).

En nuestro ensayo se han utilizado cultivos en agitación, (apartado 3.5.1.2.), basándonos en los resultados obtenidos por DONTA et al. (1974a) y por GONZALEZ (1984) que demuestran que la agitación potencia la producción de LT, incrementando el número de reacciones positivas, y se ha elegido el sistema de producción de toxina utilizado por GONZALEZ (1984): medio CST, pH: 7.0/37°C/20 h/200 rpm, (apartado 3.5.1.), que consigue títulos de toxina similares a los reportados por otros investigadores, (DONTA et al. 1974a; GUERRANT et al. 1974; SPEIRS et al. 1977).

El efecto de la citotoxina VT se ha estudiado utilizando los filtrados de 2 cepas (H-19 y H-30), productoras de verotoxina, sobre suspensiones de células

Vero, más sensibles según KONOWALCHUCK et al. (1977) y KARMALI et al. (1983), que las células HeLa a esta acción tóxica. Estos filtrados destruyeron las células Vero no afectando a las células Y<sub>1</sub> y CHO, lo que coincide con el efecto observado por otros investigadores, (KONOWALCHUCK et al. 1977; WADE et al. 1979; KARMALI et al. 1983; O'BRIEN et al. 1983a).

Por último, la enterotoxina termoestable, tal como se indica en la TABLA 32, no ha producido ningún efecto sobre las células eucariotas cultivadas in vitro, (DONTA et al. 1974a; GUERRANT et al. 1974; SPEIRS et al. 1977; GROSS y ROWE, 1984).

#### 5.2.2.- Actividad de la toxina ST in vitro

Para la detección de la enterotoxina ST se ha utilizado el ensayo de ratones lactantes, (I.M.T.), (DEAN et al. 1972), que en nuestra experiencia ha resultado totalmente seguro y eficaz, tal y como ya habían comprobado otros investigadores, (GUERRANT et al. 1975; EVANS et al. 1977b; BÄCK et al. 1980; BRUNTON, 1980; MAKI et al. 1980; STINTZING et al. 1981; MATA et al. 1983).

La puesta a punto del ensayo, llevada a cabo con cepas control ST(+) y ST(-), ha demostrado que los coeficientes I.M.T. obtenidos se distribuyen en 2 grupos totalmente diferenciados, (fig. 23), quedando entre ellos una amplia zona muda, en la que no existe ningún valor, con coeficientes de variación comprendidos entre 3.305 y 13.9 que impiden que existan cepas (+)

que pasen al grupo de las (-), y viceversa, (TABLA 33).

El estudio estadístico del total de extractos de toxina ensayados, (fig. 23 ) indica, con un riesgo igual a 0.05, que los coeficientes iguales o inferiores a 0.080 corresponden a cepas no productoras de enterotoxina ST, mientras que los iguales o superiores a 0.12 se deben a la actuación de la enterotoxina ST. Aquellas cepas cuyos sobrenadantes de cultivo den valores comprendidos entre los anteriormente citados, deberán ser considerados estadísticamente dudosos. No obstante, y coincidiendo con otros autores, (BLANCO et al. 1983), la experiencia nos sugiere que las cepas con coeficientes superiores a 0.10 pueden ser consideradas productoras de enterotoxinas ST.

Nuestros resultados son muy similares a los obtenidos por BLANCO et al. (1983) y se aproximan a los de EVANS et al. (1977b) ó a los de LOPEZ BREA et al. (1982), sin embargo resultan ligeramente superiores a los publicados por otros autores. Así por ejemplo, coeficientes mayores de 0.09 son considerados positivos por DEAN et al. (1972); MULLAN et al. (1978); BYERS y DUPONT, (1979); BACK et al. (1981) y OLSSON et al. (1982), que a su vez aceptan como negativos los valores inferiores a 0.07, y dudosos o indeterminados los comprendidos entre ambos. CRAVIOTO et al. (1980) dan ya como positivos coeficientes mayores de 0.08, y GIANELLA (1976), coinciden con SACK et al. (1975), MORRIS et al. (1976), ECHEVARRIA et al. (1977) ó GURWITH y WILLIAMS. (1977), en considerar como límite inferior de positividad 0.083.

Nosotros creemos que estas diferencias se deben al sistema de disección y pesada, que influye decisivamente en el cálculo de peso intestinal; por eso pensamos que no deben aceptarse coeficientes preestablecidos, debiéndose calcular estadísticamente los límites en cada laboratorio, de acuerdo a las condiciones en las que se va a aplicar la técnica I.M.T.

Nuestro ensayo ha sido desarrollado aplicando la modificación de BYERS y DUPONT (1979), que como ya hemos comentado utiliza, sobre un mismo lote de ratones, la mezcla de los filtrados de 5 colonias de E. coli de un mismo paciente. Los resultados obtenidos en el ensayo previo, utilizando la dilución al 1/5 del filtrado de una cepa ST(+), demuestran la fiabilidad del método, ya que ninguna de las cepas diluidas ha dado resultados negativos, a pesar de producirse una disminución de los coeficientes en relación a los que habían dado los filtrados sin diluir (TABLA 34). Sin embargo, esta confianza en el método no es compartida por todos los investigadores. MOON et al. (1978), encuentran que al diluir al 1/4 algunos extractos de cepas ST(+), 2 de ellas resultaban negativas en el I.M.T. BRUNTON et al. (1980) y BLANCO-ALVAREZ et al. (1983), comprueban que 2 cepas que dieron coeficientes negativos con el método de mezcla de filtrados de 5 colonias, eran positivas cuando utilizaban el ensayo convencional. Por ello, a pesar de nuestros resultados y para subsanar posibles fuentes de error, hemos repetido el ensayo convencional en todos aquellos casos en los que el coeficiente obtenido por el método de BYERS daba un valor  $\geq 0.075$ . La elección de este coeficiente como valor límite se ha basado en que, para algunos autores,

es el que separa los resultados negativos de los indeterminados, (GIANELLA, 1976), y en que está situado por debajo del límite superior del intervalo normal dado por las cepas ST negativas control. El hecho de que sólo 3 de los aislamientos de E. coli reensayados hayan dado coeficientes superiores a 0.080, y que incluso estos queden alejados del límite inferior de positividad, confirma la eficacia del método de BYERS, que al ser aplicado por nosotros ha supuesto una reducción de más del 50% del número total de ratones que se hubieran utilizado con el método de DEAN.

Durante el desarrollo del ensayo hemos podido observar que el coeficiente no siempre es representativo del grado de deshidratación de los ratones, ya que el contenido intestinal puede ser excretado al exterior, en forma de diarrea, durante el periodo de incubación, lo que incidirá negativamente en el peso posterior de los intestinos extirpados. Esto explica que GIANELLA haya encontrado filtrados ST(+) con periodos de incubación de 3-4 horas, que pasaban a ser negativos cuando se prolongaban 6 u 8 horas.

Aunque esta circunstancia no es demasiado frecuente, parece estar favorecida por la edad y por la temperatura de incubación de los ratones, (MOON et al. 1978).

En nuestro estudio, siempre que se ha producido diarrea, ha ocurrido con ratones de 4 días inoculados con extractos ST(+), a pesar de mantener la temperatura ambiente en unos 25°C. Su presentación ha repercutido

negativamente en el coeficiente obtenido, aunque sólo en una ocasión llegó a negativizarlo. En este caso, optamos por repetir la experiencia para no alterar la media de los demás coeficientes. En cambio, nunca se ha producido diarrea en ratones menores de 3 días, ni en los inoculados con filtrados de cepas ST negativas.

Por todo ello, consideramos interesante la propuesta de MOON et al. (1978) que trata de simplificar el I.M.T., manteniendo a los ratones a 37°C o eligiendo a animales mayores de 4 días, y utilizando entonces la diarrea como indicativa de respuesta positiva a la enterotoxina termoestable.

Ninguna cepa productora de enterotoxinas LT ó VT produjo dilatación y acumulación de líquidos en las asas intestinales de los ratones, lo que demuestra la alta especificidad de este ensayo para la enterotoxina ST.

5.3.- INCIDENCIA DE E. COLI ENTEROTOXIGENICO EN LAS  
DIARREAS AGUDAS INFANTILES NUESTRO MEDIO

La tasa de aislamientos de E.C.E.T. encontrada en nuestro medio aunque baja (5.94%), es ligeramente superior a las presentadas por otros investigadores en experiencias similares: GURWITH y WILLIAMS (1977), en Canadá (1.07%); PICKERING et al. (1978), en E.E.U.U. (4%); BRUNTON et al. (1980), en Canadá, y MAKI et al. (1980), en Suecia (1.7%); BÄCK et al. (1980a), en Suecia (2.1%); ALBOUY et al. (1981), en Francia (0.62%), y CAPPRIOLI et al. (1983), en Italia (3.6%). Incluso en alguna de ellas, no se produjo ningún aislamiento: DEAN et al. (1972), ECHEVARRIA et al. (1975), y KAPIKIAN et al. (1976), en E.E.U.U., ó GUINEE y JANSEN (1979), en Holanda.

En poblaciones semejantes a la nuestra tan sólo GOLDHAR et al. (1980), en Israel y OTNAESS y HALVORSEN (1981), en Noruega, encuentran porcentajes superiores, 20.5% y 17.5% respectivamente, dado que los presentados por GORBACH y KHURANA (1972) con 82.75%, y RUDOY y NELSON (1975) con 86%, no son aceptados al no adaptarse sus métodos a criterios unánimemente aceptados.

En el caso de GOLDHAR et al. (1980) ya hemos comentado anteriormente que la alta incidencia podría deberse al periodo en el que se realizó la investigación, en un país mediterráneo con altas temperaturas

veraniegas.

En el segundo caso, OTNAESS y HALVORSEN (1981) parten de una cuidadosa selección de los pacientes, de tal forma, que la investigación sólo la realizan sobre aquellas muestras de heces en las que únicamente se había aislado E. coli. Aún así, llama la atención que sólo fuera ensayada 1 colonia por paciente, y que sólo se buscara enterotoxina LT.

En España sólo hemos encontrado referencia de dos estudios realizados sobre diarreas esporádicas comunitarias, en Madrid por LOPEZ BREA et al. (1982) y en Galicia por BLANCO ALVAREZ et al. (1983a). Los primeros investigan solamente enterotoxina ST, durante un periodo de 5 meses, con 0.6% de positividades. La experiencia de los segundos dura 8 meses, durante los cuales encuentra E.C.E.T. en 2.63% de los casos, aunque sólo plantean la búsqueda de enterotoxina ST en 44% de ellos.

El hecho de que nuestros enfermos muestren un porcentaje mayor puede obedecer, a que en nuestro estudio se ha podido detectar un brote nosocomial que ha incrementado el número de aislamientos positivos, a que se han tomado al menos 5 colonias de E. coli por paciente, y a que en todas ellas, se han ensayado todas las pruebas convencionales de enterotoxigenicidad.

Respecto a la primera razón, E.C.E.T. ha sido reconocido como un patógeno entérico de gran trascendencia en brotes epidémicos de diarrea infantil que se producen en países desarrollados, (TABLA 10). En España sólo han sido comunicados dos brotes de estas caracte-

rísticas, por ESPINOSA et al. en 1983, ocurridos en la sala de neonatología de un hospital de Burgos y Madrid, que afectaron a 7 y 8 niños respectivamente, en los que sólo fue investigado y encontrado E.C.E.T. productor de enterotoxina LT. Sin embargo, generalmente, la toxina implicada en estos brotes es la enterotoxina termoestable de E. coli, (RYDER et al. 1976b y 1979; WACHMUTH et al. 1983; GROSS y ROWE, 1984), que da lugar a procesos diarreicos de grado moderado, cuyo mecanismo de transmisión suele ser por contacto, persona a persona, o a partir de un mediador contaminado, agua o leche. En nuestros casos parece claro que la fuente infectante fue uno de los 5 neonatos afectos, por lo que la transmisión se debió producir de persona a persona. En ninguno de ellos la enfermedad fue grave, no presentando por si misma ninguna característica diferenciadora que pudiera hacer sospechar clínicamente la etiología enterotoxigénica. Su duración no fue llamativamente prolongada en ningún paciente, (rango de 4 a 8.5 días), en contra de lo señalado por ROSEMBERG et al. 1977, aunque por las características de los niños afectados, el periodo de ayuno fue mayor de lo habitual, y en todos se administraron antibióticos específicos (colistina oral),(TABLA 44).

La investigación de al menos 5 colonias de E. coli por paciente podría ser, como ya hemos comentado, otra de las razones por las que puede verse incrementada la tasa de aislamientos de E.C.E.T. Este método es recomendado por la mayor parte de los investigadores (DEAN et al. 1972; SACK, 1975; DONTA et al. 1977; BYERS y DUPONT, 1979), pero sin embargo, no siempre se realiza así, (WADSTROM et al. 1976; BRUNTON et al. 1980; OTNAESS

y HALVORSEN, 1981; LOPEZ BREA et al. 1982; BLANCO ALVA-  
REZ et al. 1983a; GEORGES et al. 1983).

De los 6 pacientes con E.C.E.T. sólo en uno de ellos, los 5 aislamientos eran productores de enterotoxina ST; 3 tenían 4 aislamientos positivos; 1 tenía 3, y en el paciente con E.C.E.T. LT(+), sólo 1 de los aislamientos producía la enterotoxina. Algo similar les ocurre a DONTA et al. (1977), que toman 10 colonias por muestra y observan que de 8 casos en los que encuentran E.C.E.T., sólo 4 tienen más de 1 aislamiento positivo.

Por último, otra de las razones que favorece la identificación es la aplicación, de forma sistemática, de todas las pruebas de enterotoxigenicidad, en todos los aislamientos de E. coli recogidos. Esto no siempre es así, pues debido al elevado número de E. coli que han de ser ensayados en cualquier investigación epidemiológica, y a la necesidad de contar con un laboratorio y personal altamente cualificado, o bien no pueden ser aplicadas todas las pruebas, (DEAN et al. 1972; SHORE et al. 1974; NALIN et al. 1975; BACK et al. 1977; LOPEZ BREA et al. 1982), o bien no son investigados todos los aislamientos, (GURWITH y WILLIAMS, 1977; BACK et al. 1980 a; BRUNTON et al. 1980; MAKI et al. 1980; STINTZING et al. 1981; GEORGES et al. 1984).

Algunos autores, con ánimo de facilitar el diagnóstico y de acortar el tiempo que se precisa para llegar a él, con los métodos convencionales, recomiendan partir de la serotipificación previa de la cepa de

E. coli que va a ser investigada, realizando sólo las pruebas de enterotoxigenicidad, si el serotipo obtenido es uno de los considerados como enterotoxigénico, (EVANS et al. 1977a; ORSKOW et al. 1977a; ROWE et al. 1977; MERSON et al. 1980a; ROWE et al. 1983; GROSS y ROWE, 1984).

Sin embargo en cada área geográfica suelen predominar unos serotipos concretos que no siempre se corresponden con los que forman el grupo de enterotoxigénicos, (SACK, 1980), y que en ocasiones han sido descritos exclusivamente en esa zona o país, (REIS et al. 1980). Esto es lo que parece ocurrir con las cepas de E. coli enterotoxigénico identificadas en nuestro estudio. El serogrupo 0153:H45 no figura entre los considerados más frecuentemente como toxigénicos por ORSKOW et al. 1976, (TABLA 6), y sólo ha sido descrito, como productor de enterotoxina ST, por GEORGES et al. (1983), en la República Centroafricana, en un niño de 5 meses en el que no se encuentra ningún otro patógeno.

Llama por tanto la atención, la asociación de un serogrupo, no común en nuestro país, con unas propiedades enterotoxigénicas que tampoco son frecuentemente encontradas en él.

Otra circunstancia llamativa es la presencia, en un mismo paciente, de varias cepas de E. coli, también enterotoxigénicas, pero con serogrupos distintos entre sí. (TABLA 38). Este hallazgo, referido también por GOLDHAR et al. (1980), es atribuido por BÄCK et al. (1977), a una infección múltiple, o a la transferencia de plásmidos, lo que quizás pueda ser aplicado a

nuestros casos, dado que parece claro en ellos, que el agente infectante es la cepa 0153:H45, productora de enterotoxina ST.

En el caso del paciente con diarrea por E.C.E.T. LT(+), el serotipo detectado es el 0128:H49. En él, aunque el antígeno 0128 se encuentra con relativa frecuencia entre las cepas toxigénicas, tampoco es habitual que se presente asociado con el antígeno H49. El serogrupo 0128 suele encontrarse en cepas productoras de enterotoxina ST (MERSON et al. 1979; REIS et al. 1980), mientras que el serotipo 0128:H49 ha sido detectado por SCOTLAND et al. 1981, como productor de toxina termolábil, lo que coincide con nuestros resultados. En este caso la diarrea tampoco mostró ningún rasgo diferenciador, y el niño afectado no precisó ingreso hospitalario.

Tanto la baja incidencia de E.C.E.T. en nuestro medio, como la benignidad de la enfermedad, contrastan, como era de esperar, con la importancia del problema en países con grandes deficiencias higienico-sanitarias, (GUERRANT et al. 1975; NALIN et al. 1975; WHO SCIENTIFIC WORKING GROUP, 1980a; STINTZING et al. 1981; MATA et al. 1983). Sin embargo, la implicación de E.C.E.T. como agente causal del brote diarreico intrahospitalario detectado, corrobora el papel que este microorganismo puede tener en los brotes epidémicos de diarrea que se producen en países desarrollados.

Por último, E.C.E.T. ha sido identificado como patógeno único en todos los casos, excepto en uno,

en el que fue aislado junto a Rotavirus. A pesar de ello, creemos que el responsable de la diarrea en este último paciente ha sido E. coli, dadas las características que concurren alrededor de todos los neonatos diagnosticados. A esto se une el hecho de que rotavirus no suele producir síntomas en los recién nacidos (CHRYS-TIE et al. 1978; STEINHOFF, 1980; CAMPSAUR et al. 1984a), como comentaremos después, por lo que el aislamiento en las heces de los niños de esta edad, no implica siempre responsabilidad etiológica.

#### 5.4.- INCIDENCIA DE E. COLI ENTEROPATOGENO

Han sido encontrados serogrupos considerados clásicamente como enteropatógenos, (E.C.E.P.), en 4.9% de los pacientes, (TABLAS 35 y 45), siendo esta tasa similar a otras publicadas en estudios realizados sobre casos esporádicos de diarrea en países desarrollados (GURWITH y WILLIAMS, 1977; GOLDHAR et al. 1980; MAKI et al. 1980 y THOREN et al. 1983b). Ninguna de las 4 cepas de E.C.E.P. fue productora de las enterotoxinas LT ó ST, lo que concuerda con los resultados obtenidos por la mayoría de los investigadores que han trabajado con cepas de E. coli aisladas en países desarrollados. (GURWITH et al. 1977 y 1978; SCOTLAND et al. 1980a; ROTHBAUM et al. 1981; ROBINS-BROWNE et al. 1982).

Por otra parte, aunque E.C.E.P. son considerados como importantes agentes de diarreas epidémicas y endémicas en países en vías de desarrollo, (EVANS et al. 1977b; THOREN et al. 1983b; TOLEDO et al. 1983), y nadie pueda negar su implicación patogénica en brotes epidémicos repetidos, en salas de lactantes o neonatos, (BRAY, 1945; BRAUN, 1967; EDWARDS y LEVINE, 1972; EDELMAN y LEVINE, 1983), los investigadores de este tema tienen opiniones opuestas respecto a su papel como agentes causantes de casos esporádicos de diarrea infantil en países con buenas condiciones higiénico-sanitarias. Algunos consideran que E.C.E.P. sólo debe buscar-

se cuando se sospecha que existe un brote epidémico, basándose en que estos serotipos clásicos han sido detectados por igual en las heces de niños sanos o con diarrea. (GOLDSCHMIDT y DUPONT, 1976; NETER, 1976; GANGAROSA y MERSON, 1977; ORSKOW et al. 1977b; KLIPSTEIN et al. 1978). Otros creen que es necesario realizar nuevos estudios que clarifiquen este hecho, (FARMER et al. 1977), y por último hay investigadores que aportan datos convincentes de que E.C.E.P. están asociados a diarrea infantil endémica, (GURWITH et al. 1977 y 1978).

En nuestros casos no contamos con datos suficientes para apoyar ninguna de estas posturas dado que clínicamente la enfermedad fue indistinguible de las de otra etiología, tal y como ya observó THOREN et al. (1983b), y que en al menos uno de los 4 niños afectados, rotavirus pudo ser el verdadero agente causal de la enfermedad. (El segundo paciente con rotavirus es un recién nacido, por lo que en él, su papel etiológico puede ser también discutido).

Han sido 4 los serogrupos identificados. Tres de ellos 055, 0111 y 0126, se encuentran entre los aislados con mayor frecuencia, (TABLA 5). En España los serogrupos predominantes son 0111 y 0119, (MUNIESA, 1977), aunque existen diferencias regionales y estacionales (MUNIESA, 1977; FLOREZ ALIA et al. 1980 y BLANCO ALVAREZ et al. 1983a).

Ninguno de los E.C.E.P. detectados en nuestro estudio eran productores de enterotoxina VT. En otras

experiencias se han encontrado cepas productoras de VT con los serotipos 0128:K67 y 0111:K58, a los que pertenecen dos de nuestras cepas.

Hasta ahora todos los estudios que han investigado la producción de verotoxina por E. coli de origen humano, se han efectuado sobre cepas de E.C.E.P. Nosotros, junto con BLANCO ALVAREZ et al. (1983a,b), somos de los primeros que hemos planteado la búsqueda sistemática de esta citotoxina en cepas de E. coli enteropatógenicas y no enteropatógenicas.

Como ya hemos indicado, no se han encontrado cepas productoras de VT en los niños valencianos investigados, por lo que aparentemente esta toxina no está asociada con la diarrea infantil en nuestra comunidad.

### 5.5.- VALORACION RELATIVA DE TODAS LAS ETIOLOGIAS DE DIARREAS

En nuestro estudio se han podido diagnosticar etiológicamente el 45.54% de los casos, siendo esta tasa semejante a la obtenida por GEORGES et al. (1984), en la República Centroafricana, y superior a la de GURWITH y WILLIAMS (1977), en Suecia. Sin embargo, en otros trabajos llevados también a cabo en países con buenas condiciones higiénico-sanitarias, se dan porcentajes superiores. Así, PICKERING et al. (1978), en E.E.U.U., presentan 59% de aislamientos positivos, y MAKI et al. (1980), en Finlandia, llegan hasta el 75%. Estos últimos, realizan una concienzuda investigación viral, incluyendo en el resultado final todas las formas virales encontradas, coronavirus, calicivirus, astrovirus..., cuyo valor patogénico no es reconocido unánimemente, (WHO SCIENTIFIC WORKING GROUP, 1980b; ELLIS et al. 1984; FLEWETT, 1984). Los primeros estudian la enterotoxigenicidad de varias bacterias aisladas en heces, encontrando positividad en diversas especies: Proteus, Pseudomonas. Todo ello unido al predominio de la etiología viral en zonas higiénica y sanitariamente bien controladas, pueden explicar en parte, estas elevadas tasas.

Debemos hacer constar sin embargo, que la incidencia de patógenos entre nuestros pacientes, debe

ser superior a la detectada, ya que si la investigación viral se hubiera realizado en todos los enfermos, el porcentaje final de aislamientos sería probablemente superior. Además el hecho, estadísticamente significativo ( $X^2 = 18.085$ ;  $p < 0.001$ ), de que el número de diarreas inespecíficas sea mayor entre los pacientes en los que no se investigó etiología viral, que entre los enfermos en los que se buscaron virus (69.76%, frente a 41.37%), apoya esta hipótesis.

Dentro de las diarreas específicas se han encontrado enterobacterias en el 32.67% de los casos, (33/101), y virus en el 29.31%, (17/58), de los pacientes investigados. En ambos cálculos están incluidos 6 casos, en los que virus y bacterias fueron identificados conjuntamente.

El porcentaje de enterobacterias encontrado es mayor que el presentado por MAKI *et al.* (1980), (10%), o por SILVERMAN y ROY (1983), (15%), en estudios similares, pero se asemeja a los encontrados por PICKERING *et al.* (1978), (34.9%), BÄCK *et al.* (1980a), (33.42%), y GEORGES *et al.* (1984), (30.3%), o por PRATS, en el Hospital de Santa Cruz y San Pablo de Barcelona, en 1985 (25.5%).

En cuanto a la incidencia de virus, en países con buen nivel de desarrollo, oscila entre 10 y 60% (KAPIKIAN *et al.* 1976, 50%; GURWITH y WILLIAMS, 1977, 11%; PICKERIN *et al.* 1973, 16%; SIERRA *et al.* 1982, 45.9%; VESIKARI *et al.* 1982, 49%; THOREN *et al.* 1983b, 58%; ELLIS *et al.* 1984, 34%; GEORGES *et al.* 1984, 17.6%;

KOOPMAN et al. 1984, 16%; VELASCO et al. 1984, 21% y PRATS. 1985, 26.4%).

La presencia en heces de virus y bacterias, es considerado por VESIKARI et al. (1982) como una asociación de azar. La diarrea por rotavirus podría preceder a la infección por la bacteria enteropatógena favoreciendo su crecimiento, pero esta explicación no es siempre válida, (VESIKARI et al. 1982). En nuestros casos por ejemplo, sólo uno de los niños presentó un proceso previo de carácter viral, y en los 5 restantes la diarrea fue la única manifestación patológica común. Además, la presencia simultánea de ambos patógenos no ha alterado la evolución de la enfermedad, que es incluso de menor duración, ( $\bar{X}$  = 5.33 días), que la presentada por los pacientes en los que se aísla una bacteria sola ( $X$  = 7.33 días). Algo similar observaron PICKERING et al. (1978) y ELLIS et al. (1984), en contra de STEINHOFF (1980) que aboga por un sinergismo entre ambos patógenos, de tal forma que rotavirus aumentaría la gravedad de la diarrea bacteriana producida al mismo tiempo o inmediatamente después.

Sin embargo, el aislamiento de varios microorganismos hace difícil determinar la contribución de cada uno de ellos a la enfermedad, lo que unido al fallo para demostrar la etiología en 54.45% de nuestros casos, pone en evidencia la complejidad del diagnóstico etiológico de la diarrea en la edad pediátrica (EVANS et al. 1977b).

En nuestro estudio, el número de diarreas inespecíficas es mayor entre los pacientes del grupo B,

(63.63%), que entre los enfermos del grupo A, (51.51%), o del C, (48.57%), siendo esta diferencia significativa ( $X^2 = 8.2, p < 0.05$ ).

Al mismo tiempo, dado que en el grupo nosocomial 30% de los niños han presentado una enfermedad infecciosa concomitante, el origen "parenteral" de las diarreas inespecíficas podría explicarse a través de ellas, (NELSON, 1979; SILVERMAN y ROY, 1983). Sin embargo, esta misma patología se encuentra, incluso con mayor frecuencia, (39.39%), entre los niños del grupo A, (TABLA 31), en los que sin embargo se produce un número menor de diarreas no catalogables etiológicamente, lo que puede explicar que, aunque la mayor parte de las infecciones, (17/27), afectan a pacientes con este tipo de diarrea, no exista una relación estadísticamente significativa entre la diarrea inespecífica y la infección concomitante. ( $X^2 = 1.625; p < 0.05$ ).

Otras causas que pueden explicar el origen de este grupo de diarreas sin etiología demostrada, podemos buscarlas en las enfermedades subyacentes que acompañan a la casi totalidad de los enfermos del grupo B. Entre ellas, la hiperbilirrubinemia se ha encontrado en 3 niños, asociándose en otros 2 a distress respiratorio idiopático. Ambos procesos, o el tratamiento instaurado para combatirlos, junto con la asfixia neonatal, presente en otros 2 recién nacidos, pueden facilitar el desencadenamiento de una diarrea.

La fototerapia, una forma de tratamiento de la hiperbilirrubinemia, bien a través de la estimulación del peristaltismo intestinal que incrementa la excre-

ción de electrolitos y agua por heces (WU y MOOSA, 1978), o bien por una inhibición de la actividad enzimática de la lactasa del borde en cepillo de la célula intestinal (BAKKEN, 1976), va a provocar diarrea. El distress respiratorio o/y la asfixia neonatal, debido a la hipoxemia que provocan, pueden alterar el metabolismo de la célula intestinal y consecuentemente su funcionamiento.

Otra de las enfermedades subyacentes que puede facilitar el inicio de una diarrea es la malnutrición, que ha afectado a 5 de nuestros enfermos, 3 de los cuales no tenían patógenos en heces. En los niños malnutridos se produce una contaminación de las partes proximales del intestino delgado, (GRACEY, 1973; HEYWORTH y BROWN, 1975), donde se encuentran organismos no considerados normalmente como enteropatógenos, lo que va a ocasionar efectos desfavorables sobre la función intestinal tales como diarrea, o malabsorción de los hidratos de carbono (COELLO-RAMIREZ y LIFSHITZ, 1972). A su vez, esta última favorece el sobrecrecimiento anormal de la microflora saprófita, lo que inicia un círculo vicioso.

Por último, en este grupo de diarreas no diagnosticadas, tampoco se ha observado un aumento de la utilización previa de antibióticos, en relación con otros grupos, ni retraso en la investigación de las heces, ni cambios alimentarios capaces de provocar una alteración aguda de la flora intestinal. Es posible, que los agentes etiológicos sean microorganismos con mecanismos patogénicos distintos a la producción de enterotoxinas, como factores de colonización o adheren-

cia (EVANS et al. 1975; ORSKOV y ORSKOV 1977a; SCOTLAND et al. 1981), o cuyas toxinas no puedan ser detectadas con los métodos empleados; que se traten de enterobacterias enterotoxigénicas distintas a E. coli, (no investigadas por nosotros), o a virus entéricos que no han sido identificados. Esta última posibilidad puede ser cierta en nuestro caso, dado que no se ha generalizado la investigación viral a todos los pacientes, y a que sólo se han detectado rotavirus. Esta única detección podría ser debida, a que para la identificación de otras formas virales, sólo se ha utilizado el microscopio electrónico, técnicamente menos sensible que los métodos serológicos, (STEINHOFF, 1980; WHO SCIENTIFIC WORKING GROUP, 1980b), y con el que existía menor experiencia en aquel momento.

Si tratamos de analizar la repercusión general en relación a la etiología, observamos que globalmente, las deshidrataciones han afectado por igual a los niños con diarrea específica o inespecífica, si bien en 3 de estos últimos no se investigaron virus, lo que podría alterar esta distribución. Respecto a la duración de la diarrea se observa que ésta es mayor en las diarreas específicas, ( $\bar{X} = 6.7$  días), que en las inespecíficas, ( $\bar{X} = 4.8$  días), con una diferencia estadísticamente significativa, ( $z = 3.76$ ;  $p < 0.001$ ), que también se produce entre las diarreas virales, ( $\bar{X} = 5.79$ ), y las bacterianas, ( $\bar{X} = 7.33$ ), ( $T = 3.198$ ;  $p < 0.05$ ), a costa fundamentalmente de las diarreas por Salmonella que son las que tienen una mayor duración ( $\bar{X} = 8.2$ ).

De todos los patógenos diagnosticados, han destacado por su frecuencia Rotavirus y Salmonella.

### 5.5.1.- Virus

En nuestro estudio el 88.23% de los niños en cuyas heces se ha aislado rotavirus son menores de 2 años, tal y como ocurre habitualmente (KAPIKIAN et al. 1976; RODRIGUEZ et al. 1977 y 1980; MAKI et al. 1980; PANIKER et al. 1982; SIERRA et al. 1982; RAYNEY y YORK, 1984). Sin embargo, no hemos observado una disminución de incidencia en los niños menores de 6 meses, en contra de lo señalado en gran parte de los trabajos publicados sobre este tema (KAPIKIAN et al. 1976; STEINHOFF, 1980; SOENARTO et al. 1981). Aún así, cabe señalar, que aunque 8 aislamientos han sido encontrados en niños menores de 6 meses, 2 se han asociado a E.C.E.P., 1 a E.C.E.T., ST(+), y 1 a Salmonella, mientras que los 4 restantes presentaban diarrea nosocomial. Esta última, transmitida por el personal de enfermería, médicos o estudiantes, (STEINHOFF, 1980), se ha descrito generalmente en forma de brotes, (FLEWETT et al. 1975; RYDER et al. 1977), pero también se produce de forma aislada, (SOENARTO et al. 1981), como ha ocurrido en nuestros casos. En ellos, el curso de la enfermedad ha sido leve o moderado, lo que es habitual en este grupo de edad a causa de la elevada tasa de anticuerpos transmitidos por la madre (STEINHOFF, 1980; GOUEDARD et al. 1981), llegando incluso a la ausencia de síntomas, (CHYSTIE et al. 1978; RAYNEY y YORK, 1984), lo que justifica la duda esgrimida en ocasiones, sobre el valor que puede tener la presencia aislada de virus en las heces de estos lactantes (CHAMPSAUR et al. I. 1984a).

Otro hecho bastante común, que se produce también entre nuestros enfermos, es el predominio de esta etiología entre los niños hospitalizados (KAPIKIAN et al. 1976; RODRIGUEZ et al. 1980; AVEDAÑO et al. 1981; DUPONT, 1984); sin embargo la variación estacional observada en regiones templadas, en las que se produce un incremento del número de casos durante la estación invernal, (KAPIKIAN et al. 1976; STEINHOFF, 1980; WHO SCIENTIFIC WORKING GROUP, 1980; MAKI, 1981), no se ha producido en nuestro estudio. En él no existen diferencias significativas entre el porcentaje de aislamientos encontrados en meses fríos o calurosos, aunque estos resultados pueden estar expuestos a error, al no haber generalizado la investigación a todos los niños diarreicos observados durante el periodo de estudio.

Las manifestaciones clínicas no difieren significativamente de las referidas en otras series, (RODRIGUEZ et al. 1977), destacando entre ellas la frecuencia de los vómitos y fiebre, y la escasa frecuencia de complicaciones, (deshidratación, acidosis, malabsorción de hidratos de carbono, o intolerancia a proteínas vacunas), que de forma aislada han aparecido en otras publicaciones (MAKI, 1981; PIGNAL et al. 1981), y que en nuestros casos pueden no haberse producido al tratarse de enfermos con buen estado de nutrición y con aceptable nivel socioeconómico.

### 5.5.2.- Salmonella

Ha sido la bacteria intestinal aislada con mayor frecuencia, (19.8%), afectando por igual a pacientes controlados ambulatoriamente u hospitalizados. Nuestra incidencia es mayor que la reflejada por otros autores, y que oscila entre 2 y 10%, (GURWITH et al. 1977; BÄCK et al. 1980; ELLIS et al. 1984; FARFAN et al. 1984; GEORGES et al. 1984; VELASCO et al. 1984). Tan sólo SILVERMAN y ROY (1983) muestran una tasa de aislamientos que alcanza el 29% y el 40%, en dos hospitales de Montreal, y PRATS (1985) encuentra el 32.3%, en un estudio en el que se incluyen enfermos adultos. Sin embargo, nuestros resultados son concordantes con el incremento de la prevalencia de este patógeno, observado en los últimos años, en países desarrollados, (WHO SCIENTIFIC WORKING GROUP, 1980c; HORNICK, 1981b; KANTOR, 1981), lo que puede obedecer al aumento de las posibilidades de exposición, al ser cada vez mayor el consumo de alimentos preparados comercialmente.

Tanto las manifestaciones clínicas de la enfermedad, como el predominio estacional, (15 de los 20 aislamientos se han producido en los meses calurosos), han sido los propios de esta etiología (GURWITH y WILLIAMS, 1977; WHO SCIENTIFIC WORKING GROUP, 1980c; HORNICK, 1981b). Sólo cabe señalar que en la mayoría de los pacientes se dejó de aislar Salmonella en las heces a las 2-3 semanas del inicio de la enfermedad, y que incluso en el único caso en el que se mantuvieron positivos los cultivos, no persistió la sintomatología diarreica.

### 5.5.3.- Otros patógenos

El porcentaje de aislamientos de los restantes patógenos encontrados en las heces es mínimo, por lo que no merece la pena detenernos en su análisis. Sin embargo llama la atención la escasa incidencia de Campylobacter sp. (1.98%), sobre todo si la comparamos con el porcentaje encontrado en nuestro propio Departamento, en 1981, con 12 aislamientos en diarreas infantiles, producidas durante un periodo de 6 meses. (GARCIA VILA et al. 1981). Ignoramos el motivo de este descenso y tampoco hemos encontrado causas concretas que lo justifiquen, a no ser que se hubiera producido algún fallo en el método utilizado.

## 6.- CONCLUSIONES

1.- Para la detección de la enterotoxina termoestable (ST), la modificación de BYERS y DUPONT ha resultado sensible y específica, dado que en la puesta a punto del ensayo ninguna cepa ST(+) diluida al 1/5 ha dado coeficientes I.M.T. negativos, y en el estudio posterior sobre las cepas problema, todos los coeficientes positivos obtenidos se han correspondido con respuestas positivas por parte de alguno de los filtrados de la mezcla. Del mismo modo, todos los resultados negativos, al ser reensayados según el método original de DONTA, han dado coeficientes negativos.

2.- En nuestro estudio, los coeficientes I.M.T. iguales o superiores a 0.12 se han considerado estadísticamente como positivos, y los coeficientes iguales o inferiores a 0.08 como negativos. Los situados entre ambos valores son indeterminados y deben ser reensayados.

A pesar de ello, creemos conveniente señalar que en nuestra experiencia, y coincidiendo con otros investigadores, aquellos coeficientes que de forma repetida dieran cifras iguales o superiores a 0.1 deberían ser considerados como positivos.

3.- La incidencia de E.C.E.T. y E.C.E.P. en nuestro medio y durante el periodo estudiado, es escasa,

si bien ha resultado superior a la de Shigella sp, Campylobacter sp, Yersinia enterocolitica y Giardia lamblia, y menor que la de rotavirus y Salmonella sp.

- 4.- Todos los niños afectos de diarrea por E.C.E.T. o por E.C.E.P., han sido menores de 1 año.
- 5.- El proceso diarreico que desencadenan E.C.E.T. ó E.C.E.P., es de carácter leve o moderado, y no presenta rasgos propios que lo diferencien clínicamente de otras etiologías.

La diarrea se caracteriza por deposiciones líquidas, generalmente abundantes, en número variable de 2 a 10 deposiciones al día, sin sangre, ni moco. No se acompaña de vómitos, fiebre o deshidratación, aunque suele producir pérdida de peso y acidosis metabólica. No son frecuentes las complicaciones y/o secuelas, y ceden entre los 4 y 8 días.

- 6.- Los casos de E.C.E.T. detectados se dividen claramente entre los producidos por E. coli ST(+), que constituyen un brote diarreico neonatal, y un único caso producido por E. coli LT(+). El descubrimiento de este brote nosocomial explica el incremento de nuestro porcentaje de aislamientos de E.C.E.T. respecto a los registrados en otros países con condiciones higiénico-sanitarias semejantes a las nuestras.
- 7.- Pensamos que E.C.E.T. es una causa infrecuente de diarrea esporádica en nuestro país, aunque puede

dar lugar a brotes de diarrea infantil. Por eso creemos que a pesar del evidente valor epidemiológico que tiene su detección, no es necesaria la identificación sistemática de los mismos, reservándola a aquellas situaciones en que E. coli sea aislado, de forma predominante o única, como agente causal en brotes diarreicos de cualquier origen.

- 8.- La detección serológica de E.C.E.P. utilizada de forma sistemática en muchos laboratorios de Microbiología, es un método de escasa sensibilidad, ya que, como ha ocurrido en nuestro estudio, pueden existir cepas productoras de toxina con serotipos distintos a los considerados más frecuentemente como enterotoxigénicos, que no estén contenidos en el suero polivalente utilizado.

Tan sólo la utilización en cada zona geográfica de sueros conteniendo también los serotipos enterotoxigénicos más frecuentes en ella, reduciría las posibilidades de error.

- 9.- Para poder decidir el valor de la serotipificación rutinaria de E.C.E.P. deberían realizarse trabajos prospectivos, en los que se comparasen las tasas de aislamiento de cepas de E.C.E.P., en niños sanos y en casos esporádicos de diarrea infantil endémica en nuestro país.
- 10.- El porcentaje de diarreas diagnosticadas etiológicamente ha sido de 45.54%, detectándose enterobacterias en el 32.67% de los casos, y virus en el 29.31%

de los pacientes investigados.

La asociación de ambos patógenos se ha producido en el 13% de las diarreas específicas, sin que ello haya influido negativamente en la evolución de la enfermedad.

- 11.- Las diarreas inespecíficas se han dado con mayor frecuencia entre los pacientes con diarrea nosocomial, con una diferencia estadísticamente significativa respecto a los otros dos grupos de enfermos.
- 12.- Los virus, y entre ellos rotavirus, han sido la etiología detectada con mayor frecuencia, seguida por Salmonella sp.
- 13.- Rotavirus afecta fundamentalmente a niños menores de 2 años de edad, predomina entre los pacientes previamente hospitalizados o que requieren hospitalización, y en nuestra experiencia no tienen un predominio estacional, al menos estadísticamente significativo.
- 14.- Salmonella sp se ha identificado en el 19% de los casos, afectando por igual a pacientes controlados ambulatoriamente y a los que precisaron hospitalización. Predomina en niños mayores de 2 años y durante los meses veraniegos, y produce la enfermedad diarreica de mayor duración (8.2 días).

7.- BIBLIOGRAFIA

- ALDERETE, D.F. y ROBERTSON, D.C. 1978. Purification and chemical characterization of the heat stable enterotoxin produced by porcine strains of enterotoxigenic Escherichia coli. Infect. Immun. 19: 1021-1030.
- ALBOUY, C.; MEGRAUD, F.; GARNIER, M. y LATRILLE, J. 1981. Escherichia coli entérotogène et diarrhées infantiles des régions tempereés. Recherche d' un rôle eventuel. Pathol. Biol. 29: 237-239.
- AVEDAÑO, L.F.; CALDERON, A. y VARGAS, S. 1981. Rotavirus en diarrea aguda. Estudio comparativo en lactantes hospitalizados y ambulatorios. Rev. Med. Chile. 109: 303-305.
- BÄCK, E.; BLOMBERG, S. y WADSTRÖM, T. 1977. Enterotoxigenic Escherichia coli in Sweden. Infection. 5: 2-5.
- BÄCK, E.; SVENNERHOLM, A.M.; HOLMGREN, J. y MOLLBY, R. 1979. Evaluation of a ganglioside immunosorbent assay for detection of Escherichia coli heat labile enterotoxin. J. Clin. Microbiol. 10: 791-795.
- BÄCK, E.; MÖLLBY, R. y KAIJSER, B. 1980a. Relative importance, seasonal variation, O-and K-antigens of enterotoxigenic Escherichia coli: a three-and-a-half year review in Sweden. J. Infection. 2:302-315.
- BÄCK, E.; MÖLLBY, R.; KAIJSER, B.; STINTZING, G.; WADSTRÖM, T. y HABTE, D. 1980b. Enterotoxigenic

Escherichia coli and other Gram-negative bacteria of infantile diarrhea: surface antigens hemagglutinins, colonization factor antigen, and loss of enterotoxigenicity. J. Infect. Dis. 142: 318-327.

- BAKKEN, A.F. 1976. Intestinal lactase deficiency as a factor in the diarrhea of lighth-treated jaundiced infants. N. Engl. J. Med. 294: 615.
- BALLIVEAU, R.R.; GRAYSON, J.W. y BUTLER, T.J. 1968. A rapid simple methode of identifying Enterobacteriaceae. Amer. J. Clin. Pathol. 50: 126-128.
- BANWELL, J.G.; GORBACH, S.L.; PIERCE, N.F.; MITRA, R. y MONDAL, A. 1971. Acute undifferentiated human diarrhea in the tropics.II. Alterations in intestinal fluid and electrolyte movements. J. Clin. Invest. 50: 890-900.
- BANWELL, J.G. y SHERR, H. 1973. Effect of bacterial enterotoxins on the gastrointestinal tract. Gastroenterology. 65: 467-497.
- BEARDS, G.M.; HALL, C.H.; GREEN, J.; FLEWETT, T.H.; LAMOULIATTE, F. y PASQUIER, D.U.P. 1984. Hallazgo de un virus recubierto en las heces de los niños y adultos con gastroenteritis semejante al virus bredda de los terneros. Lancet (ed. esp.). 5: 199-202.
- BELLANTI, J.A. 1983a. Epidemiology of acute diarrhea in childhood. Discussion. In: BELLANTI, J.A., ed. Acute diarrhea: its nutritional consequences in children. pp. 29-30. Nestlé. Vevey/Raven Press. New York.

- BELLANTI, J.A. 1983b. Influence on the growth parameters of children. Discussion. In: BELLANTI, J.A. ed. Acute diarrhea: Its nutritional consequences in children. pp. 95-96. Nestlé Vevey/Raven Press. New York.
  
- BERGMAN, M.J.; UPDIKE, W.S.; WOOD, S.J.; BROWN, S.E. III y GUERRANT, R.L. 1981. Attachment factors of enterotoxigenic Escherichia coli from patients with acute diarrhea from diverse geographic areas. Infect. Immun. 32: 881-888.
  
- BERRY, R.J.; BETTELHEIM, K.A. y GRACEY, M. 1982. Identification of enterotoxigenic Escherichia coli by serogrouping. Lancet 1: 1124-1125.
  
- BETTELHEIM, K.A.; WILSON, M.W.; SHOOTER, R.A. y O' FARRELL, S.M. 1980. Studies on the enterotoxigenicity of environmental Escherichia coli, belonging to serotypes normally considered enterotoxigenic. J. Hyg. Camb. 84: 411-414.
  
- BEUTIN, L.; BODE, L.; RICHTER, T.; PELTRE, G.;STEPHAN, R. 1984. Rapid visual detection of Escherichia coli and Vibrio cholerae heat-labile enterotoxins by nitrocellulose enzyme-linked immunosorbent assay. J. Clin. Microbiol. 19: 371-375.
  
- BLACK, R.E.; MERSON, M.H.; ROWE, B.; TAYLOR, P h.R.; ALIM, A.R.M.A.; GROSS, R.J. y SACK, D.A. 1981. Enterotoxigenic Escherichia coli diarrhea acquired immunity and transmission in an endemic area. Bull W.H.O. 59: 263-268.

- BLACK, R.E.; BROWN, K.H. y BECKER, S. 1983a. Epidemiology of acute diarrhea in childhood. Comments. In BELLANTI, J.A. ed. Acute diarrhea: Its nutritional consequences in children. pp. 23-27. Nestlé. Vevey/Raven Press. New York.
  
- BLACK, R.E.; BROWN, K.H. y BECKER, S. 1983b. Influence on the growth parameters of children. Influence of acute diarrhea on the growth parameters of children. In BELLANTI, J.A. ed. Acute diarrhea: Its nutritional consequences in children. pp. 75-84. Nestlé. Vevey/Raven Press. New York.
  
- BLACK, R.E.; BROWN, K.H. y BECKER, S. 1984. Effects of diarrhea associated with specific enteropathogens on the growth of children in rural Bangladesh. Pediatrics, 73: 799-805.
  
- BLACKLOW, N.R. y CUKOR, G. 1981. Viral gastroenteritis. N. Engl. J. Med. 304: 397-406.
  
- BLANCO, J.; GONZALEZ, E.A.; BERNARDEZ, I y VARELA, B.R. 1983a. Enterotoxigenic and enteropathogenic Escherichia coli in Galicia (North-west Spain). Med. Microbiol. Immunol. 172: 165-169.
  
- BLANCO, J.; GONZALEZ, E.A.; BERNARDEZ, I. y REGUEIRO, B. 1983b. Differentiated biological activity of VERO cytotoxins (VT) released by human and porcine Escherichia coli strains. FEMS Microbiol. Lett. 20: 167-170.

- BLANCO ALVAREZ, J.; GONZALEZ GARCIA, E.A.; BERNARDEZ HERMIDA, J.; REGUEIRO VARELA, B. 1983c. Modificación del ensayo con ratones lactantes para la detección de la enterotoxina termoestable (ST) de Escherichia coli. Enf. Infecc.y Microbiol. Clin. 1: 107-114.
  
- BOEDEKER, E.C. 1984. Mechanisms of adherence of Escherichia coli to enterocytes. Their possible role in intractable infant diarrhea. In LEBENTHAL, E. Chronic diarrhea in children. vol. 6. pp. 329-345. Nestlé. Vevey /Raven Press.
  
- BOLLAG, V. 1980. Social and nutritional parameters of acute diarrhea. Arch. Dis. Child. 55: 711-714.
  
- BOTTONE, E.J. y ROBIN, T. 1977. Yersinia enterocolitica: Recovery and characterization of two unusual isolates from a case of acute enteritis. J. Clin. Microbiol. 5: 341-345.
  
- BOTTONE, E.J. 1981. Yersinia enterocolitica and Yersinia pseudotuberculosis. In STARR, M.P.; STOLP, H.; TRÜPER, H.G.; BALOWS, A.; SCHLEGEL, H.G. The prokaryotes. A handbook on habitats, isolation and identification of bacteria. Vol. II. pp. 1225-1239. Springer-Verlag. Berlin.
  
- BOYER, K.M.; PETERSEN, N.J.; FARZANEH, I.; PATTISON, CH. P.; HART, M.C. y MAYNARD, J.E. 1975. An outbreak of gastroenteritis due to E. coli 0142 in neonatal nursery. J. Pediatr. 86: 919-927.

- BRADLEY, R.; SACK, D.A.; MEHLMAM, I.J.; ORSKOV, F. y ORSKOV, I. 1977. Enterotoxigenic Escherichia coli isolated from food. J. Infect. Dis. 135 (2): 313-317.
  
- BRAUN, D.H. 1967. Infecciones infantiles por Escherichias. In OPITZ, H. y SCHMID, F. Enciclopedia pediátrica. pp. 452-467. Ed. Morata. Madrid.
  
- BRAY, J. 1945. Isolation of antigenically homogenous strains of Bacterium coli neapolitanum from summer diarrhoea of infants. J. Pathol. 57: 239-247.
  
- BRILL, B.M.; WASILAUSKAS, B.L. y RICHARDSON, S.H. 1979. Adaptation of the staphylococcal coagglutination technique for detection of heat-labile enterotoxin of Escherichia coli. J. Clin. Microbiol. 9: 49-55.
  
- BRINTON, C.C. 1959. Non-flagellar appendages of bacteria nature (London) 183: 782-786.
  
- BRISOU, J. 1971. Techniques d'enzymologie bacterienne. Masson et Cie. Paris.
  
- BRUNTON, J.; HINDE, D.; LANGSTON, C.; GROSS, R.; ROWE, B. y GURWITH, M. 1980. Enterotoxigenic Escherichia coli in Central Canada. J. Clin. Microbiol. 11: 343-348.
  
- BRYDEN, A.S.; THOULESS, M.E.; HALL, CH. J.; FLEWETT, T.H.; WHARTON, B.A.; MATHEW, P.M. y CRAIG, I. 1982. Rotavirus infections in a special-care baby unit. J. Infect. 4: 43-48.

- BULLOW, P. 1964. The ONPG test in diagnostic bacteriology. I. Methodological investigations. Acta Pathol. Microbiol. Scand. B. 60: 376-386.
- BURGESS, M.N.; BYWATER, R.J.; COWLEY, C.M.; MULLAN, N.A. y NEWSOME, P.M. 1978. Biological evaluation of a methanol soluble, heat-stable Escherichia coli enterotoxin in infant mice, pigs, rabbits and calves. Infect. Immun. 21: 526-531.
- BURGESS, M.N.; COWLEY, C.M.; MELLING, J.; MULLAN, N.A. y NEWSOME, P.M. 1979. Assay of the heat labile enterotoxin of Escherichia coli in infant rabbits. J. Med. Microbiol. 12: 291-302.
- BURNS, T.W.; MATHIAS, J.R.; CARLSON, G.M.; MARTIN, J.L. y SHIELDS, R.P. 1978. Effect of toxigenic Escherichia coli on myoelectric activity of small intestine. Am. J. Physiol. 235: 311-315.
- BUTZLER, J.P. y SKIRROW, M.B. 1979. Campylobacter enteritis. Clin. Gastroenterol. 8: 737-765.
- BYERS, P.A. y DUPONT, H.L. 1979. Pooling method for screening large numbers of Escherichia coli for production of heat-stable enterotoxin, and its application in field studies. J. Clin. Microbiol. 9: 541-543.
- CALDERON, R.L. y LEVIN, M.A. 1981. Quantitative method for enumeration of Enterotoxigenic Escherichia coli. J. Clin. Microbiol. 13: 130-134.

- CANDY, D.C.A. 1980. Adhesion of bacteria to mucosal surfaces an area of increasing importance in diarrhoeal disease. *Eur. J. Pediatr.* 134: 3-8.
- CANDY, D.C.A. y MCNEISH, A.S. 1984. Human Escherichia coli diarrhoea. *Arch. Dis. Child.* 59: 395-396.
- CANTEY, J.R. y BLAKE, R.K. 1977. Diarrhoea due to Escherichia coli in the rabbit: a novel mechanism. *J. Infect. Dis.* 135: 454-462.
- CAPRIOLI, A.; FALBO, V.; RODA, L.G.; RUGGERI, F.M. y ZONA, C. 1983. Partial purification and carachterization of an Escherichia coli toxic factor that induces morphological cell alterations. *Infect. Immun.* 39: 1300-1306.
- CARLQUIST, P.R. 1956. A biochemical test for separating paracolon groups. *J. Bacteriol.* 71: 339-341.
- CARPENTER, CH.C.J. 1980. Clinical and pathophysiologic features of diarrhoea caused by Vibrio cholerae and Escherichia coli. In FIELD, M.; FORDTRAN, J.S. y SCHULTZ, S.G. eds. Secretory diarrhoea. Clinical phisiology series. pp. 79-100. American physiological society. Bethesda.
- CHAMPSAUR, H.; QUESTIAUX, E.; PREVOT, J.; HENRY-AMAR, M.; GOLDSZMIDT, D.; BOURJOUANE, M. y BACH, C. 1984a. Rotavirus carriage, asymptomatic infection, and disease in the first wo years of life I. Virus Shedding. *J. Infect. Dis.* 149: 667-674.

- CHAMPSAUR, H.; HENRY-AMAR, M.; GOLDSZMIDT, D.; PREVOT, J.; BOURDOUANE, M.; QUESTIAUX, E. y BACH, C. 1984b. Rotavirus carriage, asymptomatic infection and disease in the first two years of life. II. Serological response. *J. Infect. Dis.* 149: 675-682.
- CHAN, S.K. y GIANELLA, R.A. 1981. Amino acid sequence of heat-stable enterotoxin produced by Escherichia coli pathogenic for man. *J. Biol. Chem.* 256:7744-7746.
- CHARNEY, A.N.; GOTS, R.E.; FORMAL, S.B. y GIANELLA, R.A. 1976. Activation of intestinal mucosal adenylate cyclase by Shigella dysenteriae I enterotoxin. *Gastroenterology.* 70: 1085-1090.
- CHRYSTIE, I.L.; TOTTERDELL, B.M. y BANATVALA, J.E. 1978. Asymptomatic endemic rotavirus infections in the newborn. *Lancet.* 1: 1176-1178.
- CLARKE, P.H. 1953. Hydrogen sulphide production by bacteria. *J. Gen. Microbiol.* 8: 187-197.
- CLAUSEN, C.R. y CHRISTIE, D.L. 1982. Chronic diarrhoea in infants caused by adherent enteropathogenic Escherichia coli. *J. Pediatr.* 100: 358-361.
- CLEARY, T.G.; CHAMBERS, J.P. y PICKERING, L.K. 1983. Protection of suckling mice from the heat-stable enterotoxin of Escherichia coli by human milk. *J. Infect. Dis.* 148: 1114-1119.

- CLEMENTS, J.D. y FINKELSTEIN, R.A. 1979. Isolation and characterization of homogeneous heat-labile enterotoxins with high specific activity from Escherichia coli cultures. Infect. Immun. 24: 760-769.
  
- COELLO-RAMIREZ, P. y LIFSHITZ, F. 1972. Enteric microflora and carbohydrate intolerance in infants with diarrhea. Pediatrics. 49: 233-238.
  
- CONNOR, J.D. y BARRETT-CONNOR, E. 1967. Diarrheas infecciosas. Clin. Ped. N. Amer. (ed. esp.). Febr.: 197-221.
  
- COOK, G.C. 1983. Travellers' diarrhoea-an insoluble problem. Gut. 24: 1105-1108.
  
- CORDANO, A.M.; RICHARD, C. y VIEU, J.F. 1971. Biotypes de Salmonella typhi-murium. Enquête sur 513 souches isolées en France en 1969-1970. Ann. Microbiol. (Paris). 121: 473-478.
  
- COWAN, S.T. y STEEL, K.L. 1974. Manual for identification of medical bacteria. 4ª ed. Cambridge at the University Press.
  
- CRAIG, J.P.; YAMAMOTO, K.; TAKEDA, T.; TAKEDA, Y. y MIWATANI, T. 1981. Vascular permeability activity of Escherichia coli heat stable enterotoxin. Infect. Immun. 33: 473-476.
  
- CRAVIOTO, A.; GROSS, R.J.; SCOTLAND, S.M. y ROWE, B. 1979. An adhesive factor found in strains of Escherichia coli belonging to the traditional infantile enteropathogenic serotypes. Curr. Microbiol. 3: 95-99.

- CRAVIOTO, A.; SCOTLAND, S.M. y ROWE, B. 1982. Hemagglutination activity and colonization factor antigens I and II, in enterotoxigenic and non-enterotoxigenic strains of Escherichia coli isolated from humans. Infect. Immun. 36: 189-197.
  
- DAGUET, G.L. 1977. Técnicas en Bacteriología. I. Aerobios. 1ª ed. JIMS. Barcelona.
  
- DALLAS, W.S. y FALKOW, S. 1979. The molecular nature of heat labile enterotoxin (LT) of Escherichia coli. Nature. 277: 406-407.
  
- DALLAS, W.S. y FALKOW, S. 1980. Amino acid sequence homology between cholera toxin and Escherichia coli heat labile toxin. Nature. 288: 499-501.
  
- DARFEUILLE, A.; LAFEUILLE, B.; JOLY, B. y CLUZEL, R. 1983. A new colonization factor antigen (CFA/III) by enteropathogenic Escherichia coli O128: B12. Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur). 134A: 53-64.
  
- DAY, N.P.; SCOTLAND, S.M. y ROWE, B. 1981. Comparison of an Hep-2 tissue culture test with the Serény test for detection of enteroinvasiveness in Shigella spp. and Escherichia coli. J. Clin. Microbiol. 13: 596-597.
  
- DE, S.N. y CHATTERJEE, D.N. 1953. An experimental study of the mechanism of action of Vibrio cholerae on the intestinal mucous membrane. J. Pathol. Biol. 66: 559-562.

- DEAN, A.G.; CHING, Y.C.; WILLIAMS, R.G. y HARDEN, L.B. 1972. Test for Escherichia coli enterotoxin using infant mice: application in a study of diarrhoea in children in Honolulu. *J. Infect. Dis.* 25: 407-411.
  
- DE BOY, J.M. II; WACHSMUTH, I.K. y DAVIS, B.R. 1980a. Hemolytic activity in enterotoxigenic and non enterotoxigenic strains of Escherichia coli. *J. Clin. Microbiol.* 12: 193-198.
  
- DE BOY, J.M. II; WACHSMUTH, I.K. y DAVIS, B.R. 1980b. Antibiotic resistance in enterotoxigenic and non enterotoxigenic Escherichia coli. *J. Clin. Microbiol.* 12: 264-270.
  
- DE BOY, J.M. II; WACHSMUTH, I.K. y DAVIS, B.R. 1980c. Serotypes of enterotoxigenic Escherichia coli isolated in the United States. *Infect. Immun.* 29: 361-368.
  
- DE MOL, P.; BRASSEUR, D.; HEMELHOF, W.; KALALA, T.; BUTZLER, J.P.; VIS, H.L. 1983a. Enteropathogenic agents in children with diarrhoea in rural Zaire. *Lancet.* 1: 516-518.
  
- DE MOL, P.; van WIJNENDAELE, F. y HAMELHOF, W. 1983b. Possible field test for ST producing Escherichia coli. *Lancet.* 1: 524-525.
  
- DENEKE, C.F.; Mc GOWAN, K.; THORNE, G.M. y GORBACH, S.L. 1983. Attachment of enterotoxigenic Escherichia coli to human intestinal cells. *Infect. Immun.* 39: 1102-1106.

- DESJEUX, J.F.; GRASSET, E. y LESTRADET, H. 1979. Physiopathologie des diarrhées aiguës infectieuses. Arch. Fr. Pédiat. 36: 69-79.
- DOMENECH, I.; MASSONS, J.M. 1980. Bioestadística. Métodos estadísticos para investigadores. Ed. Herder. Barcelona.
- DONTA, S.T.; MOON, H.W. y WHIPP, S.C. 1974a. Detection of heat-labile Escherichia coli enterotoxin with the use of adrenal cells in tissue culture. Science. 183: 334-336.
- DONTA, S.T.; SACK, D.A.; WALLACE, R.B.; DUPONT, H.L. y SACK, R.B. 1974b. Tissue-culture assay of antibiotics to heat-labile Escherichia coli enterotoxins. N. Engl. J. Med. 291: 117-121.
- DONTA, S.T.; WALLACE, R.B.; WHIPP, S.C.; OLARTE, J. 1977. Enterotoxigenic Escherichia coli and diarrheal disease in Mexican children. J. Infect. Dis. 135: 482-485.
- DOUGLAS, G.W.; O'CONNOR, C. y YOUNG, V.M. 1966. Diagnosis of Enterobacteriaceae in the Hospital Laboratory. Amer. J. Clin. Pathol. 45: 497-501.
- DREYFUS, L.A.; FRANTZ, J.C. y ROBERTSON, D.C. 1983. Chemical properties of heat-stable enterotoxins produced by enterotoxigenic Escherichia coli different host origins. Infect. Immun. 42: 539-548.

- DREYFUS, L.A.; JASO-FRIEDMANN, L. y ROBERTSON, D.C. 1984. Characterization of the mechanism of action of Escherichia coli heat-stable enterotoxin. Infect Immun. 44: 493-501.
  
- DUCHET-SUCHAUX, M. 1980. Le souriceau, modèle d'étude de la diarrhée colibacillaire. Ann. Microbiol. Inst. Pasteur. 131B: 239-250.
  
- DUGUID, J.P.; SMITH, W.; DEMPSTER, G. y EDMUNDS, P.N. 1955. Non-flagelar filamentous appendages (fimbriae) and hemagglutinating activity in Bacterium coli. J. Pathol. Bacteriol. 70: 335-348.
  
- DUPONT, H.L.; FORMAL, S.B.; HORNICK, R.B.; SNYDER, M.J.; LIBONATI, J.P.; SHEAHAN, D.G.; LABREC, E.H. y KALAS, J.P. 1971. Pathogenesis of Escherichia coli diarrhea. N. Engl. J. Med. 285: 1-9.
  
- DUPONT, H.L. 1984. Rotaviral gastroenteritis-Some recent developments. J. Infect. Dis. 149: 663-666.
  
- ECHEVARRIA, P.; BLACKLOW, N.R. y SMITH, D. 1975. Role of heat-labile toxigenic Escherichia coli and reovirus-like agent in diarrhoea in Boston children. Lancet. 2: 1113-1115.
  
- ECHEVARRIA, P.; SMITH, D. y ANDERSON, G.L. 1976. Enterotoxigenic and invasive capacity of "enteropathogenic" serotypes of Escherichia coli. J. Pediatr. 89: 8-10.

- ECHEVARRIA, P.; HO, M.T.; BLACKLOW, N.R.; QUINNAN, G.; PORTNOY, B; OLSON, J.C.; CONKLIN, R.; DUPONT, H.L. y CROSS, J.H. 1977. Relative importance of viruses and bacteria in the etiology of pediatric diarrhea in Taiwan. J. Infect. Dis. 136: 383-390.
  
- ECHEVARRIA, P. y MURPHY, J.R. 1980. Enterotoxigenic Escherichia coli carrying plasmids coding for antibiotic resistance and enterotoxin production. J. Infect. Dis. 142: 273-278.
  
- ECHEVARRIA, P.; BLACKLOW, N.R.; SANFORD, L.B. y CUKOR, G.G. 1981. Travelers' diarrhea among American Peace Corps Volunteers in rural Thailand. J. Infect. Dis. 143: 767-771.
  
- ECHEVARRIA, P.; ORSKOV, F.; ORSKOV, I. y PLIANBANG CHANG, D. 1982. Serotypes on enterotoxigenic Escherichia coli in Thailand and the Philippines. Infect. Immun. 36: 851-856.
  
- ECHEVARRIA, P.; SERIWATANA, J.; LEKSOMBOON, V.; TIRAPAT, C.H.; CHAICUMPA, W. y ROWE, B. 1984. Identification by DNA hybridisation of enterotoxigenic Escherichia coli in homes of children with diarrhoea. Lancet. 8368: 63-65.
  
- EDELMAN, R. y LEVINE, M.M. 1983. From the National Institute of allergy and infectious diseases. Summary of a workshop on Enteropathogenic Escherichia coli. J. Infect. Dis. 147: 1108-1118.

- EDITORIAL 1981. Escherichia coli and acute diarrheal disease. *Annals. Int. Med.* 94: 129-130.
  
- EDITORIAL 1983a. Enteritis por Campylobacter. *Lancet* (Ed. Esp.). 2: 54-56.
  
- EDITORIAL. 1983b. Mecanismos de la diarrea por Escherichia coli enteropatógena. *Lancet* (ed. esp.). 3: 49-51.
  
- EDITORIAL. 1984. La yersiniosis hoy. *Lancet* (ed. esp.). 4: 361-362.
  
- EDWARDS, P.R. y EWING, W.H. 1972a. The genus Escherichia. In Identification of Enterobacteriaceae. 3<sup>a</sup> ed. pp. 67-107. Burgess publishing Co. Minneapolis, E.E.U.U.
  
- EDWARDS, P.R. y EWING, W.H. 1972b. The genus Shigella. In: Identification of Enterobacteriaceae. 3<sup>a</sup> ed. pp. 108-142. Burgess Publishing Co. Minneapolis, E.E.U.U.
  
- EIDEN, J.; VONDERFECHT, S. y YOLKEN, R.H. 1985. Evidence that a novel rotavirus-like agent of rats can cause gastroenteritis in man. *Lancet*. 1: 8-10.
  
- EISS, J. 1975. Selective culturing of Yersinia enterocolitica at a low temperature. *Scand. J. Infect. Dis.* 7: 249-251.
  
- ELLIS, M.E.; WATSON, B.; MANDAL, B.K.; DUNBAR, E.M.; CRASKE, J.; CURRY, A.; ROBERTS, J. y LOMAX, J. 1984. Micro-organisms in gastroenteritis. *Arch. Dis. Child.* 59: 848-855.

- ESPINOSA, P.; MANRIQUE, A. y de la LOMA, A. 1983. Brotes intrahospitalarios de diarrea por Escherichia coli enterotoxigénica y enteropatogénica. En: Libro de resúmenes de comunicaciones del IX Congreso Nacional de Microbiología. Tomo I. pp. 241-242. RODRIGUEZ TORRES, A. ed. Soc. Esp. Microbiol.
  
- ESCHERICH, T. 1885. Die darmbakterien des neugeborenen und säuglings. Fortschr. Med. 3: 515-547.
  
- EVANS, D.J.; CHEN, L.C.; CURLIN, G.T. y EVANS, D.G. 1972. Stimulation of Adenyl cyclase by Escherichia coli enterotoxin. Nature N. Biol. 236: 137-138.
  
- EVANS, D.J. Jr.; EVANS, D.G. y GORBACH, S.L. 1973a. Production of vascular permeability factor by enterotoxigenic Escherichia coli isolated from man. Infect. Immun. 8: 725-730.
  
- EVANS, D.G.; EVANS, D.J. Jr. y GORBACH, S. 1973b. Identification of enterotoxigenic Escherichia coli and serum antitoxin activity by the vascular permeability factor assay. Infect. Immun. 8: 731-735.
  
- EVANS, D.G.; EVANS, D.J. Jr. y PIERCE, N.F. 1973c. Differences in the response of rabbit small intestine to heat-labile and heat-stable enterotoxins of Escherichia coli. Infect. Immun. 7: 873-880.
  
- EVANS, D.G.; SILVER, R.P.; EVANS, D.J. Jr.; CHASE, D.G. y GORBACH, S. 1975. Plasmid-controlled colonization factor associated with virulence in Escherichia coli enterotoxigenic for humans. Infect. Immun. 12: 656-667.

- EVANS, D.J. Jr.; EVANS, D.G. 1977. Direct serological assay for the heat labile enterotoxin of Escherichia coli using passive immune hemolysis. Infect. Immun. 16: 604-609.
  
- EVANS, D.J.; EVANS, D.G.; DUPONT, H.L.; ORSKOV, F. y ORSKOV, J. 1977a. Patterns of loss of enterotoxigenicity by Escherichia coli isolated from adults with diarrhea. Suggestive evidence for an interrelationship with serotype. Infect. Immun. 17: 105-111.
  
- EVANS, D.G.; OLARTE, J.; DUPONT, H.L.; EVANS, D.J. Jr.; GALINDO, E.; PORTNOY, B.L.; CONKLIN, R.H. 1977b. Enteropathogens associated with pediatric diarrhea in Mexico City. J. Pediatr. 91: 65-68.
  
- EVANS, D.G. y EVANS, D.J. Jr. 1978. New surface associated heat-labile colonization factor antigen (CFA/II) produced by enterotoxigenic Escherichia coli of serogroups 06 and 02. Infect. Immun. 21: 638-647.
  
- EVANS, D.J. Jr.; EVANS, D.G. y DUPONT, H.L. 1979. Hemagglutination patterns of enterotoxigenic and enteropathogenic Escherichia coli determined with human, bovine, chicken, and guinea pig erythrocytes in presence and absence of mannose. Infect. Immun. 23: 336-346.
  
- EVANS, D.J. Jr.; EVANS, D.G.; YOUNG, L.S. y PITT, J. 1980. Hemagglutination typing of Escherichia coli: Definition of seven hemagglutination types. J. Clin. Microbiol. 12: 235-242.

- EWING, W.H.; DAVIS, B.R. y REAVIS, R.W. 1957. Phen-  
talanine and malonate media and their use in enteric  
bacteriology. Public Health. 15: 153-167.
  
- FALKOW, S. 1958. Activity of lysine decarboxilase  
as an in the identification of Salmonellae and Shige-  
llae. Am. J. Clin. Pathol. 29: 598-600.
  
- FARMER, J.J. III; DAVIS, B.R.; CHERRY, W.B.; BRENNER,  
D.J.; DOWELL, V.R. Jr.; BALOWS, A. Editor's column.  
1977. Enteropathogenic serotypes of Escherichia  
coli which really are not. J. Pediatr. 90: 1047-1049.
  
- FERGUSON, W.W.; JUNE, R.C. 1952. Experiments on  
feeding adult volunteers with Escherichia coli 111:B<sub>4</sub>  
a coliform organism associated with infant diarrhea.  
Am. J. Hyg. 55: 155-169.
  
- FIELD, M. 1974. Intestinal secretion. Gastroentero-  
logy. 66: 1063-1084.
  
- FIELD, M. 1979. Mechanisms of action of cholera  
and Escherichia coli enterotoxins. Am. J. Clin.  
Nutr. 32: 189-196.
  
- FINBERG, L.; KRAVATH, R.E. y FLEISCHMAN, A.R. 1982.  
Water and electrolytes in Pediatrics. Physiology,  
pathophysiology and treatment. W.B. Saunders Co.  
Philadelphia.
  
- FINKELSTEIN, R.A.; ATTHASAMPUNNA, P.; CHULASAMAYA, M.  
y CHARUNMETHEE, P. 1966. Pathogenesis of experimental  
cholera: biologic activities of purified prochole-  
ragen A<sub>1</sub>. J. Immunol. 96: 440-449.

- FINKELSTEIN, R.A.; VASIL, M.L.; JONES, J.R.; ANDERSON, R.A. y BARNARD, T. 1976. Clinical cholera caused by enterotoxigenic Escherichia coli. J. Clin. Microbiol. 3: 382-384.
  
- FINKELSTEIN, R.A. y YANG, Z. 1983. Rapid test for identification of heat-labile enterotoxin producing Escherichia coli colonies. J. Clin. Microbiol. 18: 23-28.
  
- FISCHL, R. 1909. Enfermedades de la nutrición del niño de pecho. En: PFAUNDLER, M. y SCHLOSSMANN, A. Tratado enciclopédico de Pediatría. pp. 788-863. Vol. 2. Ed. SEIX, F. Barcelona.
  
- FISHMAN, P.H. 1980. Mechanism of action of cholera toxin: Events on the cell surface. In FIELD, M.; FORDTRAN, J.S. y SCHULTZ, S.G. (eds.). Secretory diarrhea. Clinical physiology series. pp. 85-106. American physiological society. Bethesda.
  
- FLEWETT, T.H.; BRYDEN, A.S. y DAVIES, H. 1975. Epidemic viral enteritis in a long-stay children's ward. Lancet 1: 4-6.
  
- FLEWETT, T.H. 1984. The virology of acute infectious diarrhoea. In: GOODWIN, C.S. (ed.). Microbes and infections of the gut. Blackwell Scientific Publications. Melbourne.
  
- FLOREZ ALIA, C.; BREA ZYBIGARAY, S.; DE DIEGO GARCIA, J.I. y MARTINEZ GONGORA, J. 1980. Significado clínico del aislamiento del Escherichia coli enteropatogénico. An. Esp. Pediatr. 13: 367-372.

- FORMAL, S.B.; DAMMIN, G.J.; LABREC, E.H. y SCHNEIDER, H. 1958. Experimental Shigella infections: characteristics of a fatal infection produced in guinea pigs. J. Bacteriol. 75: 604-610.
- FRANKLIN, A.; SÖDERLIND, O. y MÖLLBY, R. 1981. Plasmids coding for enterotoxins, K88 antigen and colicins in porcine Escherichia coli strains of O group 149. Med. Microbiol. Immunol. 170: 63-72.
- FRANTZ, J.C. y ROBERTSON, D.C. 1981. Immunological properties of Escherichia coli heat-stable enterotoxins: Development of a Radio immunoassay specific for heat-stable enterotoxins with suckling mouse activity. Infect. Immun. 33: 193-198.
- FRISK, C.S.; WAGNER, J.E.; OWENS, D.R. 1978. Enteropathogenicity of Escherichia coli isolated from hamsters (mesocricetus auratus) with hamster-enteritis. Infect. Immun. 20: 319-320.
- FRISK, C.S.; WAGNER, J.E.; OWENS, D.R. 1981. Hamster (Mesocricetus aureatus) enteritis caused by epithelial cell-invasive Escherichia coli. Infect. Immun. 31: 1232-1238.
- GAASTRA, W. y De GRAAF, F.K. 1982. Host-specific fimbrial adhesins of non invasive enterotoxigenic Escherichia coli strains. Microbiol. Rev. 46:129-161.
- GANGAROSA, E.J. y MERSON, M.H. 1977. Epidemiologic assessment of the relevance so-called enteropathogenic serogroups of Escherichia coli diarrhea. N. Engl. J. Med. 296: 1210-1213.

- GANGAROSA, E.J. 1978. Epidemiology of Escherichia coli in the United States. J. Infect. Dis. 137: 634-638.
  
- GARCIA, L.S.; BRUCKNER, D.A.; BREWER, T.C. y SHIMIZU, R.Y. 1983. Thecniques for the recovery and identification of Cryptosporidium oocysts from stool specimens. J. Clin. Microbiol. 18: 185-190.
  
- GARCIA VILA, A.; CODONER FRANCH, P.; MARTINEZ COSTA, C.; MULINAS SARRION, L.; GARCIA LOMAS, J. y BRINES SOLANES, J. 1981. Enteritis por Campylobacter ssp jejuni. Arch. Pediatr. 32: 435-444.
  
- GEORGES, M.C.; WACHSMUTH, I.K.; BIRKNESS, K.A.; MOSELEY, S.L. y GEORGES, A.J. 1983. Genetic probes for enterotoxigenic Escherichia coli isolated from childhood diarrhea in the Central African Republic. J. Clin. Microbiol. 18: 199-202.
  
- GEORGES, M.C.; WACHSMUTH, I.K.; MEUNIER, D.M.V.; NEBOUT, N.; DIDIER, F.; SIOPATHIS, M.R. y GEORGES, A.J. 1984. Parasitic, bacterial and viral enteric pathogens associated with diarrhea in the Central African Republic. J. Clin. Microbiol. 19: 571-575.
  
- GIANELLA, R.A.; FORMAL, S.B.; DAMMIN, G.J. y COLLINS, H. 1973. Pathogenesis of salmonellosis. Studies of fluid secretion mucosal invasion and morphologic reaction in the rabbit ileum. J. Clin. Invest. 52: 441-453.
  
- GIANELLA, R.A. 1976. Suckling mouse model for detection of heat-stable Escherichia coli enterotoxin: characteristics of the model. Infect. Immun. 14: 95-99.

- GIANNELLA, R.A.; DRAKE, K.W. y LUTTRELL, M. 1981. Development of radio immunoassay for Escherichia coli heat-stable enterotoxin: comparison with the suckling mouse bioassay. *Infect. Immun.* 33: 186-192.
- GILES, C.; SANGSTER, G.; SMITH, J. 1949. Epidemic gastroenteritis of infants in Aberdeen during 1947. *Arch. Dis. Child.* 24: 45-53.
- GILL, D.M. y RICHARDSON, S.H. 1980. Adenosine difosphate-ribosylation of adenylate cyclase catalysed by heat-labile enterotoxin of Escherichia coli: comparison with cholera toxin. *J. Infect. Dis.* 141: 64-70.
- GILL, D.M.; CLEMENTS, J.D.; ROBERTSON, D.C. y FINKELSTEIN, R.A. 1981. Subunit number and arrangement in Escherichia coli heat-labile enterotoxin. *Infect. Immun.* 33: 677-682.
- GILLIGAN, P.H. y ROBERTSON, D.C. 1979. Nutritional requirements for synthesis of heat-labile enterotoxin by enterotoxigenic strains of Escherichia coli. *Infect. Immun.* 23: 99-107.
- GILLIGAN, P.H.; BROWN, J.C. y ROBERTSON, D.C. 1983. Immunological relationships between cholera toxin and Escherichia coli heat-labile enterotoxin. *Infect. Immun.* 42: 683-691.
- GOLDHAR, J.; PERI, R.; ZILBERBERG, R. y LAHAV, M. 1980. Enterotoxigenic Escherichia coli (ETEC) isolated in the Tel-Aviv (Israel) Area. *Med. Microbiol. Immunol.* 169: 53-61.

- GOLDSCHMIDT, R. 1933. Untersuchungen zur Ätiologie der Durchfallserkrankungen des Säuglings. Jahrbuch für Kinderheilkunde. 89: 318-358.
- GOLDSCHMIDT, M.C.; DUPONT, H.L. 1976. Enteropathogenic Escherichia coli: lack of correlation of serotype with pathogenicity. J. Infect. Dis. 133: 153-156.
- GOLVAN, Y.J. 1977. Coprología parasitaria. En GOLVAN, Y.J. y DROUHET, E. Técnicas en parasitología y micología. pp. 7-94. Ed. Jims. Barcelona.
- GONZALEZ GARCIA, E.A.; BLANCO ALVAREZ, J.; BERNARDEZ HERMIDA, I.; REGUEIRO VARELA, B. 1983. Relación entre la capacidad antigénica y hemaglutinante de los factores de colonización (CFA/I y CFA/II) de Escherichia coli. Enf. Infect. y Microbiol. Clin. 1: 160-164.
- GONZALEZ GARCIA, E. 1984. Mecanismos de patogénesis de Escherichia coli: Propiedades enterotóxicas y adhesivas de los Escherichia coli enterotoxigénicos (ETEC) y enteropatogénicos (EPEC) de origen humano. Estudio prospectivo sobre la incidencia de los ETEC y EPEC en la diarrea infantil en Galicia. Tesis doctoral. Universidad de Santiago de Compostela.
- GOODGAME, R.W. y GREENOUGH, W.B. III. 1975. Cholera in Africa: a message for the west. Ann. Intern. Med. 82: 101-106.
- GORBACH, S.L.; BANWELL, J.G.; CHATTERJEE, B.D.; JACOBS, B. y SACK, R.B. 1971. Acute undifferentiated

- human diarrhea in the tropics I. Alterations in intestinal microflora. J. Clin. Invest. 50: 881-889.
- GORBACH, S.L. y KHURANA, C.M. 1972. Toxigenic Escherichia coli. A cause of infantile diarrhoea in Chicago. N. Engl. J. Med. 287: 791-799.
  - GORBACH, S.G.; KEAN, B.H.; EVANS, D.G.; EVANS, D.J. Jr.; BESSUDO, D. 1975. Travelers' diarrhea and toxigenic Escherichia coli. N. Engl. J. Med. 292: 933-936.
  - GORBACH, S.L. y HOSKINS, D.W. 1981. La diarrea del viajero, D.M. (vers. Esp.). 2. Doyma S.A. Barcelona.
  - GORDON, J. y McLEOD, J.W. 1928. Pseudomonas pigmentés. Ann. Microbiol. (París). 100. spp.
  - GORDON, J.E. 1971. Diarrheal disease of early childhood world wide scope of the problem. Ann. N. Y. Acad. Sci. 176: 9-15.
  - GOUEDARD, H.; CHASTEL, C.; QUILLIEN, M.C. y CASTEL, Y. 1981. Rotavirus et gastroentérites aiguës de l'enfant. Étude sur une année, dans un service de pédiatrie générale. Ann. Pédiat. 28: 403-407.
  - GRACEY, M. 1973. Enteric disease in young Australian Aborigines. Aust. N. Z. J. Med. 3: 576-579.
  - GRACEY, M.; BURKE, V.; ROBINSON, J. 1982. Aeromonas-associated gastroenteritis. Lancet. 2: 1304-1306.

- GRACEY, M. 1984. The challenge of childhood gastroenteritis. In: GOODWIN, C.S. (Eds). Microbes and infections of the gut. pp. 187-208. Blackwell Scientific publications. Melbourne.
  
- GRADY, G.F. y KEUSCH, G.T. 1971. Pathogenesis of bacterial diarrheas. N. Engl. J. Med. 285: 831-841 y 891-900.
  
- GREENWOOD, J.R.; FLANIGAN, S.M.; PICKETT, M.J.; MARTIN, W.J. 1975. Clinical isolation of Yersinia enterocolitica. Cold temperature enrichment. J. Clin. Microbiol. 2: 559-560.
  
- GREENBERG, H.B.; SACK, D.A.; RODRIGUEZ, W.; SACK, R.B.; WYATT, R.G.; KALICA, A.R.; HORSWOOD, R.L.; CHANOCK, R.M.; KAPIKIAN, A.Z. 1977. Microtiter solid-phase radio-immunoassay for detection of Escherichia coli heat-labile enterotoxin. Infect. Immun. 17: 541-545.
  
- GROSS, R.J. y ROWE, B. 1984. Escherichia coli diarrhoea. In: GOODWIN, C.S. Eds. Microbes and infections of the gut. pp. 79-101. Blackwell Scientific publications. Melbourne.
  
- GUERRANT, R.L.; BRUTON, L.L.; SCHNAITMAN, T.C.; REBHUN, L.I. y GILMAN, A.G. 1974. Cyclic adenosine monophosphate and alteration of chinese hamster ovary cell morphology a rapid sensitive in vitro assay for the enterotoxins of Vibrio cholerae and Escherichia coli. Infect. Immun. 10: 320-327.

- GUERRANT, R.L.; MOORE, R.A.; KIRSCHENFELD, P.M. y SANDE, M.A. 1975. Role of toxigenic and invasive bacteria in acute diarrhea of childhood. N. Engl. J. Med. 293: 567-573.
- GUERRANT, R.L. 1977. The microbial diarrheas. In: HOOK, E.W.; MANDELL, G.L.; GWALTNEY, J.M. y SANDE, M.A.. Current concepts of infection diseases. pp. 211-230. Ed. WILEY. J. and sons. N. York.
- GUGGENBICHLER, J.P. 1979. Patogenia de la enteritis por Escherichia coli. M.M.W. 7: 319-324.
- GUINEE, P.A.M. y JANSEN, W.H. 1979. Detection of enterotoxigenicity and attachment factors in Escherichia coli strains of human, porcine and bovine origin; a comparative study. Zbl. Bakt. Hyg. I. Abt. Orig. A. 243: 245-257.
- GURWITH, M. 1977. Rapid screening method for enterotoxigenic Escherichia coli. J. Clin. Microbiol. 6: 314-316.
- GURWITH, M.J.; WISEMAN, D.A. y CHOW, P. 1977. Clinical and laboratory assesment of the pathogenicity of serotyped enteropathogenic Escherichia coli. J. Infect. Dis. 135: 736-745.
- GURWITH, M.J. y WILLIAMS, T.W. 1977. Gastroenteritis in children: a two year review in Manitoba. I. Etiology. J. Infect. Dis. 136: 239-247.

- GURWITH, M.; HINDE, D.; GROSS, R. y ROWE, B. 1978. A prospective study of enteropathogenic Escherichia coli in endemic diarrheal disease. J. Infect. Dis. 137: 292-297.
- GYLES, C.; SO, M. y FALKOW, S. 1974. The enterotoxin of Escherichia coli. J. Infect. Dis. 130: 40-49.
- HALE, T.L.; SANSONETTI, P.J.; SCHAD, P.A.; AUSTIN, S.; FORMAL, S.B. 1983. Characterization of virulence plasmids and plasmid-associated outer membrane proteins in Shigella flexneri, Shigella sonnei and Escherichia coli. Infect. Immun. 40: 340-350.
- HANSON, L.A.; CARLSSON, B.; AHLSTEDT, S.; SVANBORGEDEN, C. y KAIJSER, B. 1975. Immune defense factors in human milk. Mod. Probl. Paediatr. 15: 63-72.
- HARRIES, J.T. 1976. The problem of bacterial diarrhoea. In: Acute Diarrhoea in Childhood. Ciba Foundation Symposium 42 (new series). pp. 3-25. Elsevier Excerpta Medica. Amsterdam.
- HARRIS, F. 1972. Gastroenteritis and isotonic dehydration. In: Paediatric fluid therapy. pp. 39-50. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- HEBERT, G.A.; HOLLIS, D.G.; WEAVER, R.E.; LAMBERT, M.A.; BLASER, M.J. y MOSS, C.W. 30 years of Campylobacters: Biochemical, Characteristics and biotyping proposal for Campylobacter jejuni. J. Clin. Microbiol. 15: 1065-1073.

- HEYWORTH, B. y BROWN, J. 1975. Jejunal microflora in malnourished Gambian children. Arch. Dis. Child. 50: 27-30.
  
- HIRST, T.R.; HARDY, S.J.S. y RANDALL, L.L. 1983. Assembly in vivo of enterotoxin from Escherichia coli. Formation of the B subunit oligomer. J. Bacteriol. 153: 21-26.
  
- HONDA, T.; SHIMIZU, M.; TAKEDA, Y. y MIWATANI, T. 1976. Isolation of a factor causing morphological changes of chinese hamster ovary cells from the culture filtrate of vibrio parahaemolyticus. Infect. Immun. 14: 1028-1033.
  
- HONDA, T.; GLASS, R.I.; AKHTAR, Q. y KIBRIYA, A.K.M.A. 1981a. A simple assay to detect Escherichia coli producing heat labile enterotoxin: results of a field study of the biken test in Bangladesh. Lancet. 2: 609-610.
  
- HONDA, T.; TAGA, S.; TAKEDA, Y. y MIWATANI, T. 1981b. Modified Elek test for detection of heat-labile enterotoxin of enterotoxigenic Escherichia coli. J. Clin. Microbiol. 13: 1-5.
  
- HONDA, T.; ARITA, M.; TAKEDA, Y. y MIWATANI, T. 1982. Further evaluation of the Biken test (Modified Elek test) for detection of enterotoxigenic Escherichia coli producing heat labile enterotoxin and application of the test to sampling of heat-stable enterotoxin. J. Clin. Microbiol. 16: 60-62.

- HONDA, T.; SAMAKOSES, R.; SORNCHAI, CH.; TAKEDA, Y. y MIWATANI. 1983. Detection by a staphylococcal coagglutination test of heat-labile enterotoxin producing enterotoxigenic Escherichia coli. J. Clin. Microbiol. 17: 592-595.
  
- HORNICK, R.B. 1981a. Shigella infections. In: FEIGIN, R.D. y CHERRY, J.D. Textbook of Pediatric infections diseases vol. 1. pp. 464-469. Saunders Co. Philadelphia.
  
- HORNICK, R.B. 1981b. Salmonella infections. In FEIGIN, R.D. y CHERRY, D.D. Textbook of Pediatric infections diseases, vol. 1. pp. 729-736. Saunders Co. Philadelphia.
  
- HUGH, R. y LEIFSON, E. 1953. The taxonomic significance of fermentative us oxidative metabolism of carbohydrates by various Gram-negative bacteria. J. Bacteriol. 66: 24-27.
  
- HUGHES, J.M.; MURAD, F.; CHANG, B. y GUERRANT, R.L. 1978. Role of cyclic GMP in the action of heat-stable enterotoxin of Escherichia coli. Nature N. Biol. 271: 755-756.
  
- IRONSIDE, A.G.; TUXFORD, A.D. y HEYWORTH, B. 1970. A survey of infantile gastroenteritis. Brit. Med. J. 713: 20-28.
  
- JACKS, T.M. y WU, B.J. 1974. Biochemical properties of Escherichia coli low molecular-weight, heat-stable enterotoxin. Infect. Immun. 9: 342-347.

- JOHNSON, W.M.; LIOR, H.; BEZANSON, G.S. 1983. Cytotoxic Escherichia coli 0157:H7 associated with haemorrhagic colitis in Canada. Lancet. 1: 76.
  
- JUNE, R.C.; FERGUSON, W.W.; WORFEL, M.T. 1953. Experiments in feeding adult volunteers with Escherichia coli 55:B<sub>5</sub>, acoliform organism associated with diarrhea. Am. J. Hyg. 57: 222-236.
  
- KANTOR, H.S. 1981. Bacterial enteritis. In: BRAUDE, A.I.; DAVIS, CH.E. y FIERER, J. (ed. assos). Medical Microbiology and infectious diseases. pp. 1041-1053. Saunders Co. WB. Philadelphia.
  
- KAPDERUD, G. 1980. Studies on the pathogenicity of Yersinia enterocolitica and Y. Enterocolitica-like bacteria. Acta Pathol. Microbiol. Scand. B. 88: 293-297.
  
- KAPIKIAN, A.Z.; KIM, H.W.; WYATT, R.G.; CLINE, W.L.; ARROBIO, J.O.; BRANDT, C.D.; RODRIGUEZ, W.J.; SACK, D.A.; CHANOCK, R.M. y PARROTT, R.H. 1976. Human reovirus-like agent as the major pathogen associated with "winter" gastroenteritis in hospitalized infants and young children. N. Engl. J. Med. 294: 965-972.
  
- KAPIKIAN, A.Z.; YOLKEN, R.H.; GREENBERG, H.B.; WYATT, R.G.; KALICA, A.R.; CHANOCK, R.M. y KIM, H.W. 1979. Gastroenteritis viruses. In: LENNETTE, E.H. y SCHMIDT, N.J. Eds. Diagnostic procedures for viral, rickettsial and chlamydial infections 5<sup>a</sup> Ed. pp. 927-995. American public health association. Washington.

- KARMALI, M.A. y FLEMING, P.C. 1979. Campylobacter enteritis in children. J. Pediatr. 94: 527-533.
- KARMALI, M.A.; STEELE, B.T.; PETRIC, M. y LIM, C. 1983. Sporadic cases of haemolytic-uraemic syndrome associated with faecal cytotoxin and cytotoxin-producing Escherichia coli stools. Lancet. 1: 619-620.
- KAUFFMAN, F. 1947. The serology of the Coli group. J. Immunol. 57: 71-100.
- KAUFFMAN, F. y DUPONT, A.J. 1950. Escherichia strains from infantile epidemic gastroenteritis. Acta Pathol. Microbiol. Scand. 27: 552-564.
- KAUFFMAN, F. 1975. Classification of Bacteria. A realistic schema with special reference to the classification of Salmonella and Escherichia species. Munksgaard. Copenhagen.
- KETYI I.; CZIROK, E.; VERTENYI, A.; MALOVICS, I. y PACSA, S. 1978. Comparison of Escherichia coli enterotoxin tests. Acta Microbiol. Acad. Sci. Hung. 25: 23-36.
- KETYI, I. y PACSA, A.S. 1980. Estimation of Vibrio cholerae and Escherichia coli heat-labile enterotoxin by enzyme-linked immunoabsorbent assay (ELISA). Acta Microbiol. Acad. Sci. Hung. 27: 89-97.
- KEUSCH, G.T.; GRADY, G.F.; MATA, L.J. y MC IVER, J. 1972. The pathogenesis of Shigella diarrhea I.

- Enterotoxin production by Shigella dysenteriae 1.  
J. Clin. Invest. 51: 1212-1218.
- KEUSCH, G.T. y DONTA, S.T. 1975. Classification of enterotoxins on the basis of activity in cell culture. J. Infect. Dis. 131: 58-63.
- KEUSCH, G.T. 1980. Bacterial Diarrhea: Pathogenesis and principles for control and chemotherapy. In: LIFSHITZ, F. (ed.). Clinical disorders in Pediatric Gastroenterology and Nutrition. pp. 301-313. Marcel Dekkered. Inc. New York.
- KEUSCH, G.T. 1981a. Cholera. In: FEIGIN, R.D. y CHERRY, J.D. Textbook of Pediatric infections diseases. Vol. 1. pp. 436-444. Saunders Co. Philadelphia.
- KEUSCH, G.T. 1981b. Enterotoxigenic Escherichia coli. In: FEIGIN, R.D. y CHERRY, J.D. Textbook of Pediatric infections diseases. Vol. 1. pp. 444-452. Saunders. Co. Philadelphia.
- KEUSCH, G.T. 1981c. Enteroinvasive Escherichia coli. In: FEIGIN, R.D. y CHERRY, J.D. Textbook of Pediatric infections diseases. Vol. 1. pp. 452-455. Saunders. Co. Philadelphia.
- KIDD, A.H.; CHRYSTIE, I.L. y BANATVALA, J.E. 1981. Infection by fastidious enteric adenoviruses in childhood. Lancet. 371-372.

- KLISH, W.J. 1983. Metabolic consequences. Nutritional metabolic consequences of acute diarrhea in children. In: BELLANTI, J.A. ed. Acute diarrhea: Its nutritional consequences in children. pp. 97-107. Nestlé. Vevey/ Raven Press. New York.
  
- KLIPSTEIN, F.; ROWE, B.; ENGERT, R.F.; SHORT, H.B. y GROSS, R.J. 1978. Enterotoxigenicity of enteropathogenic serotypes of Escherichia coli isolated from infants with epidemic diarrhea. Infect. Immun. 21: 171-178.
  
- KONOWALCHUK, J.; SPEIRS, J.I. y STAVRIC, S. 1977. Vero response to a cytotoxin of Escherichia coli. Infect. Immun. 18: 775-779.
  
- KOOPMAN, J.S.; TURKISH, V.J.; MONTO, A.S.; GOUVEA, V.; SRIVASTAVA, S. y ISAACSON, R.E. 1984. Patterns and etiology of diarrhea in three clinical settings. Am. J. Epidemiol. 119 : 114-123.
  
- KOPANIAK, M.M.; ISSEKUTZ, A.C. y MOVAT, H.Z. 1980. Kinetics of acute inflammation induced by E. coli in rabbits. Am. J. Pathol. 98: 485-499.
  
- KOSTER, F.T. 1983. Malnutrition and immunological response. Immunological deficiencies related to diarrheal diseases. In: BELLANTI, J.A. Acute diarrhea: Its nutritional consequences in children. pp. 151-160. Nestlé. Vevey /Raven Press. New York.
  
- KOVACS, N. 1928. Eine vereinfachte methode zum nachweis der indolbildung durch Bakterien. Z. Immunitaetsforsch. Exp. Ther. 55: 311-315.

- KOVACS, N. 1956. Identification of Pseudomonas pyocyanea by the oxidase reaction. Nature. 178: 703.
- KOYA, G.; KOSAKAI, N.; KONO, M.; MORI, M.; FUKASAWA, Y. 1954. Observations on the multiplication of Escherichia coli O111-B4 in the intestinal tract of adult volunteers in feeding experiments. The intubation study with Miller-Abbots double lumen tube. Jpn. J. Med. Sci. Biol. 7: 197-201.
- KUDOH, Y.; ZEN-YOJI, H.; MATSUSHITA, S.; SAKAI, S. y MARUYAMA, T. 1977. Outbreaks of acute enteritis due to heat-stable enterotoxin producing strains of Escherichia coli. Microbiol. Immunol. 21: 175-178.
- KUNKEL, S.L. y ROBERTSON, D.C. 1979. Factors affecting release of heat-labile enterotoxin by enterotoxigenic Escherichia coli. Infect. Immun. 23: 652-659.
- LABREC, E.H.; SCHNEIDER, H.; MAGNANI, T.J. y FORMAL, S.B. 1964. Epithelial cell penetration as an assential step in the pathogenesis of bacillary dysentery. J. Bacteriol. 88: 1503-1518.
- LACROIX, D.; DELAGE, G.; GOSSELIN, F. y CHICOINE, L. 1984. Severe protracted diarrhea due to multiresistant adherent Escherichia coli. Am. J. Dis. Child. 138: 693-696.
- LAFOURCADE, J. y GORIN, R. 1961. Diarrhées aiguës du nourrisson. Pathologie des métabolismes. In: LAFFONT, A. Ed. Encyclopedie médico-chirurgicale. VI. 4014 N<sup>10</sup>.pp. 1-13. Paris.

- LALLIER, R.; LARIVIERE, S. y ST. PIERRE, S. 1980. Escherichia coli heat stable enterotoxin. Rapid method of purification and some characteristics of the toxin. *Infect. Immun.* 28: 469-474.
  
- LEKSOMBOON, V.; ECHEVARRIA, P.; SUVONGSE, CH. y DUANGMANI, CH. 1981. Viruses and bacteria in pediatric diarrhea in Thailand a study of multiple antibiotic-resistant enteric-pathogens. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 30: 1281-1290.
  
- LE MINOR, L. y BEN HAMIDA, T. 1962. Avantages de la recherche de la beta-galactosidase sur celle de la fermentation du lactose en milieu complexe dans le diagnostique, en particulier des Enterobacteries. *Ann. Microbiol. (Paris)*. 102: 267-277.
  
- LE MINOR, L. y PICHINOTY, F. 1963a. Recherche de la TTR chez les bactéries Gram negatives anaérobies facultatives (Enterobacteriaceae, Aeromonas et Pasteurella) Méthode et valeur diagnostique. *Ann. Microbiol. (Paris)*. 104: 384-393.
  
- LE MINOR, L. y PIECHAUD, M. 1963b. Une méthode rapide de recherche de la protéolyse de la gélatine. *Ann. Microbiol. (Paris)*. 103: 551-554.
  
- LE MINOR, L. 1967. Distribution de la tetrathionate-reductase chez divers sérotypes de Salmonella. *Ann. Microbiol. (Paris)*. 113: 117-123.

- LE MINOR, L. 1972. Le diagnostic de laboratoire des bacilles à gram négatif. Tome I. Enterobactéries. 4<sup>a</sup> ed. Editions de la Tourrelle. Saint-Maudé.
- LE MINOR, L.; ROHDE, R. y ROWE, B. 1975. Supplément n<sup>o</sup> XVIII au schéma de Kauffman-white. Ann. Microbiol. (Paris). 126: 63-68.
- LE MINOR, L.; ROHDE, R. y ROWE, B. 1976. Supplément n<sup>o</sup> XIX au schéma de Kauffman-white. Ann. Microbiol. (Paris). 127: 69-74.
- LE MINOR, L.; ROHDE, R. y ROWE, B. 1977. Supplément n<sup>o</sup> XX au schéma de Kauffman-white. Ann. Microbiol. (Paris). 128: 237-242.
- LE MINOR, L.; ROHDE, R. y ROWE, B. 1978. Supplément n<sup>o</sup> XXI. Ann. Microbiol.. (Paris). 129: 209-213.
- LE MINOR, L.; BOCKENMUHL, J. et ROWE, B. 1979. Supplément n<sup>o</sup> XXII au schéma de Kauffman-white. Ann. Microbiol. (Paris). 130: 191-196.
- LESAGE, A.A. 1897. Contribution à l'étude des entérites infantiles; serodiagnostic; des races de Bacterium coli. Comptes Rendus des Seances de la Société de Biologie et ses Filiales. 49: 900-901.
- LEVEQUE, B.; LAMBERT-ZECHOVSKY, N.; BINGEN, E.; CATHLIN, C. y RAGAINÉ, A. 1977. Les enfants porteurs sains d'Escherichia coli entéropathogènes dans les crèches: fréquence, signification et conséquences. Ann. Pédiatr. 24: 780.

- LEVINE, M.M.; CAPLAN, E.S.; WATERMAN, J.; CASH, R.A.; HORNICK, R.B. y SNYDER, M.J. 1977. Diarrhea caused by Escherichia coli that produce only heat-stable enterotoxin. *Infect. Immun.* 17: 78-82.
  
- LEVINE, M.M.; BERGQUIST, E.J.; NALIN, D.R.; WATERMAN, D.H.; HORNICK, R.B.; YOUNG, CH.R. y SOTMAN, S. 1978. Escherichia coli strains that cause diarrhoea but do not produce heat-labile or heat-stable enterotoxins and are non-invasive. *Lancet.* 1: 1119-1122.
  
- LEVINE, M.M.; RISTAINO, P.; SACK, R.B.; KAPER, J.B.; ORSKOV, F. y ORSKOV, I. 1983. Colonization factor antigens I and II and type I somatic pili in enterotoxigenic Escherichia coli: relation to enterotoxin type. *Infect. Immun.* 38: 889-897.
  
- LEVINE, M.M.; YOUNG, CH.R.; BLACK, R.E.; TAKEDA, Y. y FINKELSTEIN, R. 1985. Enzyme-linked immunosorbent assay to measure antibodies to purified heat-labile enterotoxins from human and porcine strains of Escherichia coli and to cholera toxin: application in serodiagnosis and seroepidemiology. *J. Clin. Microbiol.* 21: 174-179.
  
- LODINOVA-ŽADNIKOVA, R. y TLASKALOVA-HOGENOVA, H. 1983. Role of breast-feeding in the nutritional status of infants. Role of breast-feeding for the nutrition and immunologic development of the infant. In: BELLANTI, J.A. Acute diarrhea: Its nutritional consequences in children. pp. 165-178. Nestlé. Vevey /Raven Press. New York.

- LOPEZ BREA, M.; JIMENEZ, M.L.; AYARZA, R. 1982. Enterotoxigenic Escherichia coli: incidence in Madrid. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 76: 709-710.
- LOW-BEER, T.S. y READ, A.E. 1972. Diarrhoea: Mechanisms and treatment. In: SHERLOCK, S. Progress Reports from gut. pp. 113-128. Gut B.M.A. House.London.
- LUMISH, R.M.; RYDER, R.W.; ANDERSON, D.C.; WELLS, J.G. y PUHR, N.D. 1980. Heat-labile enterotoxigenic Escherichia coli induced diarrhea aboard a miami-based cruise ship. Am. J. Epidemiol. 111: 432-436.
- MAIDIN, M.A. 1983. Enterotoxigenic Escherichia coli as a cause of paediatric diarrhoea in Ujung-Pandang, Indonesia. Trans. Roy. Trop. Med. Hyg. 77: 59-61.
- MÄKI, M.; VESIKARI, T. y GRÖNROOS, P. 1980. Enterotoxigenic and invasive Escherichia coli as causes of childhood diarrhoea in Finland. Acta Paediatr. Scand. 69: 219-224.
- MAKI, M. 1981. A prospective clinical study of rotavirus diarrhoea in young children. Acta Paediatr. Scand. 70: 107.
- MARTIN, W.J. y WASHINGTON, II, J.A. 1980. Enterobacteriaceae. In: LENNETTE, E.H. (editor-in-chief). Manual of Clinical Microbiology 3<sup>a</sup> ed. pp. 195-219. American Society for microbiology. Washington. D.C.

- MATA, L. 1983a. Epidemiology of acute diarrhea in childhood An overview. In: BELLANTI, J.A. (ed.). Acute diarrhea: its nutritional consequences in children. pp. 3-22. Nestlé. Vevey /Raven Press. New York.
  
- MATA, L. 1983b. Influence on the growth parameters of children. Comments. In: BELLANTI, J.A. (ed.). Acute diarrhea: Its nutritional consequences in children. pp. 85-94. Nestlé. Vevey /Raven Press. New York.
  
- MATA, L.; SIMHON, A.; PADILLA, R.; GAMBOA, M.M.; VARGAS, G.; HERNANDEZ, F.; MOHS, E. y LIZANO, C.1983. Diarrhea associated with rotaviruses, enterotoxigenic Escherichia coli, Campylobacter and other agents in Costa Rican children 1976-1981. Am. J. Trop. Med. Hyg. 32: 146-153.
  
- MATA, L.; URRUTIA, J.J. y SIMHON, A. 1984. Infections agents in acute and chronic diarrhea of childhood. In: LEBENTHAL, E. (ed.): Chronic diarrhea in children. pp. 237-252. Nestlé. Vevey/Raven Press. New York.
  
- MCNEISH, A.S.; TURNER, P.; FLEMING, J.; EVANS, N. 1975. Mucosa adherence of human enteropathogenic Escherichia coli. Lancet, II. 946-948.
  
- MEEROFF, M. 1978. Diarreas infecciosas. Patogénesis, prevención y tratamiento. VI Congreso Mundial de Gastroenterología. Rev. Esp. Enferm. Apar. Dig. 53: 141-164.

- MEHLMAN, I.J.; EIDE, E.L.; SANDERS, A.C.; FISHBEIN, M. y AULISIO, C.C.G. 1977. Methodology for recognition of invasive potential of Escherichia coli. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 60: 546-562.
  
- MERSON, M.H.; ORSKOV, F.; ORSKOV, I.; SACK, R.B.; HUQ, I. y KOSTER, F.T. 1979. Relationship between enterotoxin production and serotype in enterotoxigenic Escherichia coli. Infect. Immun. 23: 325-329.
  
- MERSON, M.H.; ROWE, B.; BLACK, R.E.; HUQ, I.; GROSS, R.J. y EUSOF, A. 1980a. Use of antisera for identification of enterotoxigenic Escherichia coli. Lancet, 2: 222-224.
  
- MERSON, M.H.; YOLKEN, R.H.; SACK, R.B.; FROELICH, J.L.; GREENBERG, H.B.; HUQ, I. y BLACK, R.W. 1980b. Detection of Escherichia coli enterotoxins in stools. Infect. Immun. 29: 108-113.
  
- MIDDELDORP, J.M. y WITHOLT, B. 1981. K88-mediated binding of Escherichia coli outer membrane fragments to porcine intestinal epithelial cells brush borders. Infect. Immun. 31: 42-51.
  
- MILLER, V. y HOLZEL, A. 1974. Growth and development of endodermal structures. In: DAVIS, J.A. y DOBBING, J. (eds.). Scientific foundations of Paediatrics. pp. 281-296. William Heinemann. Medical Books LTD. London.

- MINIATS, O.P. y GYLES, C.L. 1972. The significance of proliferation and enterotoxin production by Escherichia coli in the intestine of gnotobiotic pigs. *Can. J. Comp. Med.* 36: 150-159.
  
- MOFFET, H.L. 1981. Hospital-Acquired infections. In: Pediatric infections diseases. 2<sup>a</sup> ed. pp. 510-517. J.B. Lippincott Co. Philadelphia.
  
- MOON, H.W.; FUNG, P.Y.; WHIPP, S.C. y ISAACSON, R.E. 1978. Effects of age and ambient temperature on the response of infant mice to heat-stable enterotoxin of Escherichia coli: assay modifications. *Infect. Immun.* 20: 36-39.
  
- MOON, H.W.; ISAACSON, R.E. y POHLENZ, 1979. Mechanisms of association of enteropathogenic Escherichia coli with intestinal epithelium. *Am. J. Clin. Nutrit.* 32: 119-127.
  
- MORGAN, D.R.; DUPONT, H.L.; WOOD, L.V. y ERICSSON, CH.D. 1983. Comparison of methods to detect Escherichia coli heat-labile enterotoxin in stool and cell-free culture supernatants. *J. Clin. Microbiol.* 18: 798-802.
  
- MOSELEY, S.L.; ECHEVARRIA, P.; SERIWATANA, J.; TIRAPAT, C.; CHAICUMPA, W.; SAKULDAIPEARA, T. y FALKOW, S. 1982. Identification of enterotoxigenic Escherichia coli by colony hybridization using three enterotoxin gene probes. *J. Inf. Dis.* 145: 863-869.

- MOSELEY, S.L.; HARDY, J.W.; HUQ, M.I.; ECHEVARRIA, P. y FALKOW, S. 1983. Isolation and nucleotide sequence determination of a gene encoding a heat-stable enterotoxin of Escherichia coli. Infect. Immun. 39: 1167-1174.
  
- MOSS, J. y VAUGHAN, M. 1980. Mechanism of activation of adenylate cyclase by cholera toxin and Escherichia coli heat-labile enterotoxin. In: FIELD, M.; FORD-TRAN, J. S. y SCHULTZ, S.G. (eds.) Secretory diarrhea. Clinical physiology series. pp. 107-126. American physiological society. Bethesda.
  
- MULLAN, N.A.; BURGESS, M.N. y NEWSOME, P.M. 1978. Characterization of a partially purified methanol-soluble heat-stable Escherichia coli enterotoxin in infant mice. Infect. Immun. 19: 779-784.
  
- MUNDELL, D.H.; ANSELMO, C.R. y WISHNOW, R.M. 1976. Factors influencing heat-labile Escherichia coli enterotoxin activity. Infect. Immun. 14: 383-388.
  
- MUNIESA CUENCA, M<sup>a</sup> PILAR. 1977. Contribución al estudio de los serotipos de Escherichia coli enteropatógenos. Tesis Doctoral. Universidad de Zaragoza.
  
- MURRAY, B.E.; SERIWATANA, J. y ECHEVARRIA, P. 1981. Toxin detection after storage or cultivation of enterotoxigenic with colicinogenic Escherichia coli: a possible mechanism for toxin-negative pools. J. Clin. Microbiol. 13: 179-183.

- MURRAY, B.E.; EVANS D.J. Jr.; PEÑARANDA, M.E. y EVANS, D.G. 1983. CFA/I-ST plasmids: comparison of enterotoxigenic Escherichia coli (ETEC) of serogroups 025, 063, 078 and 0128 and mobilization from an R-factor-containing epidemic ETEC isolate. J. Bacteriol. 153: 566-570.
  
- MYERS, L.L.; NEWMANN, F.S.; WARREN, G.R.; CATLIN, J.E. y ANDERSON, C.K. 1975. Calf ligated intestinal segment test to detect enterotoxigenic Escherichia coli. Infect. Immun. 11: 588-591.
  
- NALIN, D.R.; Mc LAUGHLIN, J.C.; RAHAMAN, M.; YUNUS, M. y CURLIN, G. 1975. Enterotoxigenic Escherichia coli and idiopathic diarrhea in Bangladesh. Lancet, 2: 1116-1119.
  
- NALIN, D.R. 1983. Nutritional benefits related to oral therapy. An overview. In: BELLANTI, J.A. (ed.). Acute diarrhea: Its nutritional consequences in children. pp. 185-191. Nestlé, Vevey/Raven Press. New York.
  
- NAVIN, T.R. y JURANEK, D.D. 1984. Cryptosporidiosis: Clinical, epidemiologic and parasitologic review. Rev. Infect. Dis. 6: 313-327.
  
- NELSON, J.D. 1979. Diarrhea. In: VAUGHAN, V.C.; MCKAY, R.J. Jr.; BEHRMAN, R.E.; eds. Nelson Textbook of pediatrics, 11 ed. Philadelphia: Saunders: 710-712.

- NETER, E.; SHUMWAY, C.N. 1950. Escherichia coli serotype D433: occurrence in intestinal and respiratory tracts, cultural characteristics pathogenicity, sensitivity to antibiotics. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 75: 504-507.
  
- NETER, E. 1959. Enteritis due to enteropathogenic Escherichia coli. Present-day status and unsolved problems. J. Pediatr. 55: 223-239.
  
- NETER, E.. Editor's Column. 1976. Escherichia coli as a pathogen. J. Pediatr. 89: 166-168.
  
- NETER, E. 1979. Enteropathogenicity of Escherichia coli. Infection. 7: 2-4.
  
- NICOLLE, P. y LE MINOR, L. 1965. Sur le présence ou l'absence de la réductase du tetrathionate dans une collection de bacilles typhiques de provenances variées. Ann. Microbiol. (Paris). 108: 501-513.
  
- NOZAWA, R.T.; YOKOTA, T. y KUWAHARA, S. 1978. Assay method for Vibrio cholerae and Escherichia coli enterotoxins by automated counting of floating chinese hamster ovary cells in culture medium. J. Clin. Microbiol. 7: 479-485.
  
- NUNES, M.P. y RICCIARDI, I.D. 1981. Detection of Yersinia enterocolitica heat-stable enterotoxin by suckling mouse bioassay. J. Clin. Microbiol. 13: 783-786.

- O'BRIEN, A.D.; THOMSON, M.R.; CANTEY, J.R. y FORMAL, S.B. 1977. Production of a Shigella dysenteriae-like toxin by pathogenic Escherichia coli. Annual Meeting of American Society for Microbiology. Nº B103.
  
- O'BRIEN, A.D.; LA VECK, G.D.; THOMSON, M.R. y FORMAL, S.B. 1982. Production of Shigella dysenteriae 1-like cytotoxin by Escherichia coli. J. Infect. Dis. 146: 763-769.
  
- O' BRIEN, A.D. y LA VECK, G.D. 1983. Purification and characterization of a Shigella dysenteriae 1-like toxin produced by Escherichia coli. Infect. Immun. 40: 675-683.
  
- O' BRIEN, A.D.; LIVELY, T.A.; CHEN ME; ROTHMAN, S.W. y FORMAL, S.B. 1983a. Escherichia coli 0157:H7 strains associated with haemorrhagic colitis in the United States produce a Shigella dysenteriae 1 (Shiga) like cytotoxin. Lancet. 1: 702-703.
  
- O' BRIEN, A.D.; LIVELY, T.A.; CHANG, T.W. y GORBACH, S.L. 1983b. Purification of Shigella dysenteriae 1 (Shiga) like toxin from Escherichia coli 0157:H7 strain associated with haemorrhagic colitis. Lancet. 2: 573.
  
- OKAMOTO, K.; INQUE, T.; ICHIKAWA, H.; KAWAMOTO, Y. y MYAMA, A. 1981. Partial purification and characterization of heat-stable enterotoxin produced by Yersinia enterocolitica. Infect. Immun. 31: 554-559.

- OLIVIER, H.R. 1963. Traité de Biologie appliquée. tome II. Les diagnostics microbiologiques. Libraire Moloine, S.A. Paris.
  
- OLSSON, E. y SODERLAND, C. 1980. Comparison of different assays for definition of heat-stable enterotoxigenicity of Escherichia coli porcine strains. J. Clin. Microbiol. 11: 6-15.
  
- OLSSON, E. 1982. Cultural methods for the production of heat-stable enterotoxin by porcine strains of Escherichia coli and its detection by the infant mouse test. Vet. Microbiol. 7: 253-266.
  
- ORSKOV, I. y ORSKOV, F. 1966. Episome carried surface antigen K88 of Escherichia coli. J. Bacteriol. 91:69.
  
- ORSKOV, F. y ORSKOV, I.; EVANS, D.J. Jr.; SACK, D.A. y WADSTRÖM, T. 1976. Special Escherichia coli serotypes among enterotoxigenic strains from diarrhoea in adults and children. Med. Microbiol. Immunol. (Berl.). 162: 73-80.
  
- ORSKOV, I. y ORSKOV, F. 1977a. Special O:K:H serotypes among enterotoxigenic Escherichia coli strains from diarrhea in adults and children. Occurrence of the CF (colonization factor) antigen and of hemagglutination abilities. Med. Microbiol. Immunol. 163: 99-110.
  
- ORSKOV, I.; ORSKOV, F.; JANN, B. y JANN, K. 1977b. Serology, chemistry, and genetics of O and K antigens of Escherichia coli. Bacteriol. Rev. 41: 667-710.

- ORSKOV, F. 1978. Virulence factors of the bacterial cell surface. *J. Infect. Dis.* 137: 630-633.
  
- ORSKOV, F. 1981. Escherichia coli. In: STARR, M.P.; STOLP, H.; TRUPER, H.G.; BALOWS, A.; SCHLEGEL, H.G. (eds). *The prokaryotes. A handbook on habitats, isolation and identification of bacteria. Vol. II.* pp. 1128-1134. Springer-Verlag. Berlin.
  
- ORSKOV, F. y ORSKOV, I. 1981. Enterobacteriaceae. In: BRAUDE, A.I.; DAVIS, CH.E. y FIERER, J. Medical Microbiology and infectious diseases. International textbook of Medicine. Vol. II. pp. 340-352. V.B. Saunders Co. Philadelphia. London.
  
- OTNAESS, A. y HALVORSEN, S. 1981. Identification of low levels of heat-labile enterotoxin in Escherichia coli from children with diarrhoea. *Acta Pathol. Microbiol. Scand. B.* 89: 173-177.
  
- PALVA, E.T.; HIRST, T.R.; HARDY, S.J.S.; HOLMGREN, J. y RANDALL, L. 1981. Synthesis of a precursor to the B subunit of heat-labile enterotoxin in Escherichia coli. *J. Bacteriol.* 146: 325-330.
  
- PANIKER, C.K.J.; MATHEW, S.; MATHAN, M. 1982. Rotavirus and acute diarrhoeal disease in children in a southern indian coastal town. *Bull WHO.* 60:123-127.
  
- PATERSON, J.S. y COOK, R. 1963. A method for the recovery of Pasteurella pseudotuberculosis from faeces. *J. Pathol. Bacteriol.* 85: 241-242.

- PATTON, CH.M.; MITCHELL, S.W.; POTTER, M.E. y KAUFMANN, A.F. Comparison of selective media for primary isolation of Campylobacter fetus subsp. jejuni. J. Clin. Microbiol. 13: 326-330.
  
- PESTANA DE CASTRO, A.F.; SERAFILM, M.B.; RANGEL, H.A. y GUERRANT, R.L. 1978. Swiss and inbred mice in the infant mouse test for assay of Escherichia coli thermostable enterotoxin. Infect. Immun. 22: 972-974.
  
- PICKERING, L.K.; EVANS, D.J.; MUÑOZ, O.; DUPONT, H.L.; COELLO-RAMIREZ, P.; VOLLET, J.J.; CONKLIN, R.H. y OLARTE, J. 1978. Prospective study of enteropathogens in children with diarrhea in Houston and Mexico. J. Pediatr. 93: 383-388.
  
- PIERCE, N.F.; WALLACE, C.K. 1972. Stimulation of jejunal secretion by a crude Escherichia coli enterotoxin. Gastroenterology. 63: 439-448.
  
- PIGNAL, N.; AYMARD, M.; BARBE, G.; SCHERRER, R.; BLANC, J.F. y HERMIER, M. 1981. Gastroenteritis a rotavirus. Pediatrics. 36: 175-178.
  
- PRATS, G. 1985. Enteritis infecciosas. Etiologia y tratamiento. Inf. Ter. Segur. Soc. 9: 25-40.
  
- RAINEY, P. y YORK, M. 1984. Human rotavirus infection. Clin. Microbiol. Newsletter. 6: 55-56.
  
- RAO, M.C.; ORELLANA, S.A.; FIELD, M.; ROBERTSON, D.C. y GIANELLA, R.A. 1981. Comparison of the

biological actions of three purified heat-stable enterotoxins: Effects on ion transport and guanylate cyclase activity in rabbit ileum in vitro. *Infect. Immun.* 33: 165-170.

- REIS, M.E.L.; MATOS, D.P.; PESTANA DE CASTRO, A.F.; TOLEDO, M.G.F. y TRABULSI, R.L. 1980. Relationship among enterotoxigenic phenotypes, serotypes and sources of strains in enterotoxigenic Escherichia coli. *Infect. Immun.* 28: 24-27.
- REIS, M.H.L.; GUTH, B.E.C.; GOMES, T.A.T.; MURAHOUCHI, J. y TRABULSI, L.R. 1982. Frequency of Escherichia coli strains producing heat-labile toxin or heat-stable toxin or both in children with and without diarrhea in São Paulo. *J. Clin. Microbiol.* 15: 1062-1064.
- RICHARD, C. 1970. Identification rapide des sous genres de groupe Enterobacter. *Ann. Biol. Clin. (Paris)*. 28: 185-189.
- RICHARD, C. 1972. Methode rapide pour l'étude des reactions de rouge de méthyle et de Voges-Proskauer. *Ann. Microbiol. (Paris)*. 122: 979-986.
- RILEY, L.W.; REMIS, R.S.; HELGERSON, S.D.; McGEE, H.B.; WELLS, J.G.; DAVIS, B.R.; HEBERT, R.J.; OLCOTT, E.S.; JOHNSON, L.M.; HARGRETT, N.T.; BLAKE, P.A. y COHEN, M.L. 1983. Hemorrhagic colitis associated with a rare Escherichia coli serotype. *N. Engl. J. Med.* 308: 681-685.

- ROBINS-BROWNE, R.M.; LEVINE, M.M.; ROWE, B.; GABRIEL, E.M. 1982. Failure to detect conventional enterotoxins in classical enteropathogenic (serotyped) Escherichia coli strains of proven pathogenicity. Infect. Imm. 38: 798-801.
  
- RODGER, S.M.; BISHOP, R.F.; HOLMES, J.H. 1982. Detection of a rotavirus-like associated with diarrhea in an infant. J. Clin. Microbiol. 16: 724-726.
  
- RODRIGUEZ, W.J.; KIM, H.W.; ARROBIO, J.O.; BRANDT, C.D.; CHANOCK, R.M.; KAPIKIAN, A.Z.; WYATT, R.G.; PARROT, R.H. 1977. Clinical features of acute gastrointestinal associated with human reovirus-like agent in infants and young children. J. Pediatr. 91: 188-193.
  
- RODRIGUEZ, W.J.; WHA KIM, H.; BRANDT, C.D.; BISE, B.; KAPIKIAN, A.Z.; CHANOCK, R.M.; CURLIN, G. y PARROTT, R.H. 1980. Rotavirus gastroenteritis in the Washington, D.C., area. Am. J. Dis. Child. 134: 777-779.
  
- ROLLAND, F.; BOURBON, D. y SZTURM, S. 1947. Differentiation rapide des enterobactéries sans action sur la lactose. Ann. Microbiol. (Paris). 73: 914-916.
  
- ROHDE, J.E. y NORTHRUP, R.S. 1976. Taking science where the diarrhoea is. In: Acute diarrhoea in childhood. Ciba Foundation Symposium 42 (new series). pp. 339-366. Elsevier. Excerpta Medica. North-Holland. Amsterdam.

- ROSENBERG, M.L.; KOPLAN, J.P.; WACHSMUTH, I.K.; WELLS, J.G.; GANGAROSA, E.J.; GUERRANT, R.L. y SACK, D.A. 1977. Epidemic diarrhea at Crater lake from enterotoxigenic Escherichia coli. A large waterborne outbreak. *Ann. Int. Med.* 86: 714-718.
  
- ROTHBAUM, R.J.; PARTIN, J.C.; Mc ADAMS, A.J.; SHAH, D.B. y GIANELLA, R.A. 1981. Enterocyte adherent E. coli O119:B14. A novel mechanism of infant diarrhea. *Gastroenterology*. 80: 1265 (abstr.).
  
- ROTHBAUM, R.J.; GIANELLA, R.A. y PARTIN, J.C. 1982. Diarrhea caused by adherent enteropathogenic E. coli. *J. Pediatr.* 101: 486.
  
- ROUTH, W.R.; FORMAL, S.B.; DAMMIN, G.J. y GIANELLA, M.D. 1974. Pathophysiology of salmonella diarrhea in the rhesus monkey: intestinal transport, morphological and bacteriological studies. *Gastroenterology*. 67: 59-70.
  
- ROWE, B.; TAYLOR, J. y BETTELHEIM, K.A. 1970. An investigation of travellers' diarrhoea. *Lancet*. 1: 1-5.
  
- ROWE, B.; SCOTLAND, S.M. y GROSS, R.J. 1977. Enterotoxigenic Escherichia coli causing infantile enteritis in Britain. *Lancet*. 1: 90-91.
  
- ROWE, B.; GROSS, R. y TAKEDA, Y. 1983. Serotyping of enterotoxigenic Escherichia coli isolated from diarrhoeal travellers from various Asian countries. *FEMS. Microbiol. Lett.* 20: 187-189.

- ROWE, B. y GROSS, R.J. 1984. Salmonellosis, campylobacter enteritis and Shigella dysentery. In: GOODWIN, C.S. (ed.). Microbes and infections of the gut. pp. 47-77. Blackwell Scientific publications. Melbourne.
  
- RUBINO, A. y GUANDALINI, S. 1984. Mechanisms of secretory diarrhea caused by bacterial enterotoxins. In: LEBENTHAL, E. (ed.). Chronic diarrhoea in children. Vol. 6. pp. 319-329. Nestlé. Vevey/Raven Press. New York.
  
- RUDOY, R.C.; NELSON, J.D. 1975. Enteroinvasive and enterotoxigenic Escherichia coli. Occurrence in acute diarrhea of infants and children. Am. J. Dis. Child. 129: 668-672.
  
- RUIZ-PALACIOS, G. 1983. Etiologic agents of acute diarrhea: bacterial and parasitic. Comments. In: BELLANTI, J.A. Acute diarrhea. pp. 67-70. Its nutritional consequences in children. Nestlé. Vevey/Raven Press. New York.
  
- RUIZ-PALACIOS, G.M.; TORRES, J.; TORRES, N.I.; ESCAMILLA, E.; RUIZ-PALACIOS, B.R. y TAMAYO, J. 1983. Enterotoxina similar a la del cólera producida por Campylobacter jejuni. Lancet (ed. esp.). 3: 410-413.
  
- RUZA, F.; ALVARADO, F.; JARA, P.; FERRO, O.; SEGURADO, E. y RODRIGO, F. 1979. Incidencia de los diferentes tipos de deshidratación en nuestro medio. An. Esp. Pediatr. 12: 85-88.

- RYDER, R.W.; SACK, D.A.; KAPIKIAN, A.Z.; McLAUGHLIN, J.C.; CHAKRABORTY, J.; RAHMAN, A.S.M.M. 1976a. Enterotoxigenic Escherichia coli and Reovirus-like agent in rural Bangladesh. Lancet. 1: 659-663.
- RYDER, R.W.; WACHSMUTH, I.K.; BUXTON, A.E.; EVANS, D.G.; DUPONT, H.L.; MASON, E. y BARRET, F.F. 1976b. Infantile diarrhea produced by heat-stable enterotoxigenic Escherichia coli. N. Engl. J. Med. 295: 849-853.
- RYDER, R.W.; McGOWAN, J.E.; HATCH, M.H. y PALMER, E.L. 1977. Reovirus-like agents as a cause of nosocomial diarrhea in infants. J. Pediatr. 90: 698-701.
- RYDER, R.W.; KASLOW, R.A. y WELLS, J.G. 1979. Evidence for enterotoxin production by a classic enteropathogenic serotype of Escherichia coli. J. Infect. Dis. 140: 626-628.
- SACK, R.B.; GORBACH, S.L.; BANWELL, J.G.; JACOBS, B.; CHATTERJEE, B.D. y MITRA, R.C. 1971. Enterotoxigenic Escherichia coli isolated from patients with severe cholera-like disease. J. Infect. Dis. 123: 378-385.
- SACK, R.B. 1975. Human diarrheal disease caused by enterotoxigenic Escherichia coli. Annu. Rev. Microbiol. 29: 333-353.
- SACK, D.A. y SACK, R.B. 1975. Test for enterotoxigenic Escherichia coli using Y<sub>1</sub> adrenal cells in miniculture. Infect. Immun. 11: 334-336.
- SACK, R.B.; HIRSCHORN, N.; BROWNLEE, I.; CASH, R.A.; WOODWARD, W.E. y SACK, D.A. 1975a. Enterotoxigenic Escherichia coli associated diarrheal disease in apache children. N. Engl. J. Med. 292: 1041-1045.

- SANTOSHAM, M. 1983. Nutritional benefits related to oral therapy. Comments. In: BELLANTI, J.A.. Acute diarrhea: Its nutritional consequences in children. pp. 193-197. Nestlé Vevey/Raven Press. New York.
  
- SATTERWHITE, T.K.; EVANS, D.G.; DUPONT, H.L. y EVANS, D.J. Jr. 1978. Role of Escherichia coli colonisation factor antigen in acute diarrhoea. Lancet. 2: 181-184.
  
- SCHEFTEL, J.M.; MARTIN, C.; BOBER, C. y MONTEIL, H. 1980. Isolation of an enterotoxin factor elaborated by human enteropathogenic Escherichia coli. FEMS. Microbiol. Lett. 9: 125-130.
  
- SCHNEIDER, J. 1984. Gastroenteritis due to Staphylococcus aureus, Clostridium perfringens and Bacillus cereus. In: GOODWIN, C.S. (ed.). Microbes and infections of the gut. pp. 149-157. Blackwell Scientific publications. Melbourne.
  
- SCHWARTZ, D. 1972. Méthodes statistiques a l'usage des médecins et des biologistes. 3<sup>a</sup> Edic. Flammarion. Paris.
  
- SCOTLAND, S.M.; GROSS, R.J.; CHEASTY, T. y ROWE, B. 1979. The occurrence of plasmids carrying genes for both enterotoxin production and drug resistance in Escherichia coli of human origin. J. Hyg. Camb. 83: 531-538.
  
- SCOTLAND, S.M.; DAY, N.P. y ROWE, B. 1980a. Production of a cytotoxin affecting vero cells by strains of Escherichia coli belonging to traditional enteropathogenic. FEMS. Microbiol. Lett. 7: 15-17.

- SACK, D.A.; MERSON, M.H.; WELLS, J.G.; SACK, R.B. y MORRIS, G.K. 1975b. Diarrhoea associated with heat-stable enterotoxin-producing strains of Escherichia coli. Lancet. 2: 239-241.
  
- SACK, D.A.; Mc LAUGHLIN, J.C.; SACK, R.B.; ORSKOV, F. y ORSKOV, I. 1977. Enterotoxigenic Escherichia coli isolated from patients at a hospital in Dacca. J. Infect. Dis. 135: 275-280.
  
- SAK, R.B. 1978. The epidemiology of diarrhea due to enterotoxigenic Escherichia coli. J. Infect. Dis. 137: 639-640.
  
- SACK, R.B. 1980. Enterotoxigenic Escherichia coli: Identification and characterization. J. Infect. Dis. 142: 279-286.
  
- SACK, R.B. 1983. Etiologic agents of acute diarrhea. Bacterial and parasitic agents of acute diarrhea. In: BELLANTI, J.A. (ed.). Acute diarrhea: Its nutritional consequences in children. pp. 53-65. Nestlé. Vevey/Reven Press. New York.
  
- SAEED, A.M.K.; SRIRANGANATHAN, N.; COSAND, W. y BURGER, D. 1983. Purification and characterization of heat-stable enterotoxin from bovine enterotoxigenic Escherichia coli. Infect. Immun. 40: 701-707.
  
- SANSONETTI, P.J. 1985. Escherichia coli entéropathogènes données récentes sur la virulence. Bull. Inst. Pasteur. 83: 5-18.

- SCOTLAND, S.M.; DAY, N.P.; WILLSHAW, G.A. y ROWE, B. 1980b. Cytotoxic enteropathogenic Escherichia coli. Lancet. 1: 90.
  
- SCOTLAND, S.M.; DAY, N.P.; CRAVIOTO, A.; THOMAS, L.V. y ROWE, B. 1981. Production of heat-labile or heat-stable enterotoxins by strains of Escherichia coli belonging to serogroups O44, O114, O128. Infect. Immun. 31: 500-503.
  
- SEN, D.; SAHA, M.R. y PAL, S.C. 1984. Evaluation of three simple and rapid immunological tests for detection of heat-labile enterotoxin of enterotoxigenic E. coli. J. Clin. Microbiol. 19: 194-196.
  
- SERENY, B. 1955. Experimental Shigella keratoconjunctivitis. Acta Microbiol. Acad. Sci. Hung. 2: 293-296.
  
- SHORE, E.G.; DEAN, A.G.; HOLIK, K.J. y DAVIS, B.R. 1974. Enterotoxin producing Escherichia coli and diarrheal disease in adult travelers: a prospective study. J. Infect. Dis. 129: 577-582.
  
- SIERRA PEREZ, E.; PEDRON GINER, C.; CARRASCO GANDIA, S.; FERRO, O.; DE LA LOMA, A.; VAZQUEZ GONZALEZ, C. 1982. Gastroenteritis aguda por rotavirus. An. Esp. Pediatr. 16: 219-288.
  
- SILVA, R.M.; TOLEDO, M.R.F. y TRABULSI, L.R. 1980. Biochemical and cultural characteristics of invasive Escherichia coli. J. Clin. Microbiol. 11: 441-444.

- SILVA, M.L.M.; SCALETSKY, I.C.A.; REIS, M.H.L.; AFFONSO, M.H.T. y TRABULSI, L.R. 1983. Plasmid coding for drug resistance and production of heat-labile and heat-stable toxins harbored by an Escherichia coli strain of human origin. Infect. Immun. 39: 970-973.
  
- SILVERMAN, A. y ROY, C.C. 1983. Diarrheal disorders in pediatric clinical gastroenterology. pp. 190-236. Mosby Co. St. Louis.
  
- SIMMONS, J.S. 1926. A culture medium for differentiating organisms of typhoid-colon-aerogenes groups. J. Infect. Dis. 39: 209-214.
  
- SKERMAN, F.J.; FORMAL, S.B. y FALKOW, S. 1972. Plasmid associated enterotoxin production in a strain of Escherichia coli isolated from humans. Infect. Immun. 5: 622-624.
  
- SKIRROW, M.B. 1977. Campylobacter enteritis: a "new" disease. Brit. Med. J. 2: 9-11.
  
- SMITH, H.W. y HALLS, S. 1967. The transmissible nature of the genetic factor in Escherichia coli that controls haemolysin production. J. Gen. Microbiol. 47: 153-161.
  
- SMITH, H.W. y GYLES, C.L. 1970. The relationship between two apparently different enterotoxins produced by enteropathogenic strains of Escherichia coli of porcine origin. J. Med. Microbiol. 3: 387-401.

- SMITH, H.W. y LINGGOOD, M.H. 1971. Observations on the pathogenic properties of the K88, Hly and Ent plasmids of Escherichia coli with particular reference to porcine diarrhoea. J. Med. Microbiol. 4: 467-485.
  
- SMITH, H.W. 1976. Enteropathogenic E. coli. Lancet. 2: 1348-1349.
  
- SMITH, H.R.; SCOTLAND, S.M. y ROWE, B. 1983a. Plasmids that code for production of colonization factor antigen II and enterotoxin production in strains of Escherichia coli. Infect. Immun. 40: 1236-1239.
  
- SMITH, H.W.; GREEN, P. y PARSELL, Z. 1983b. Vero cells toxins in Escherichia coli and related bacteria: transfer by phage and conjugation and toxic action in laboratory animals chickens and pigs. J. Gen. Microbiol. 129: 3121-3137.
  
- SOENARTO, Y.; SEBODO, T.; RIDHO, R.; ALRASJID, H.; ROHDE, J.E.; BUGG, H.C.; BARNES, G.L. y BISHOP, R.F. 1981. Acute diarrhea and rotavirus infection in newborn babies and children in Yogyakarta, Indonesia, from june 1978 to june 1979. J. Clin. Microbiol. 14: 123-129.
  
- SOUTH, M.A. 1971. Enteropathogenic Escherichia coli disease. New developments and perspectives. J. Pediatr. 79: 1-11.
  
- SPEIRS, J.I.; STAVRIC, S. y KONOWALCHUCK, J. 1977. Assay of Escherichia coli heat-labile enterotoxin with Vero cells. Infect. Immun. 16: 617-622.

- SPICER, E.K.; KAVANAUG, W.M.; DALLAS, W.S.; FALKOW, S.; KONIGOBE, W.H. y SCHAFER, D.E. 1981. Secuence homologies between A subunits of Escherichia coli and Vibrio cholerae enterotoxins. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 78: 50-54.
  
- STAPLES, S.J.; ASHER, S.E. y GIANELLA, R.A. 1980. Purification and characterization of heat-stable enterotoxin produced by a strain of E. coli pathogenic for man. J. Biol. Chem. 10: 4716-4721.
  
- STARK, P.L. y LEE, A. 1982. Clostridia isolated from feces on infants during the first year of life. J. Pediatr. 100: 362-365.
  
- STAVRIC, S. y JEFFREY, D. 1976. A modified bioassay for heat-stable Escherichia coli enterotoxin. Can. J. Microbiol. 23: 331-336.
  
- STEINHOFF, M.C. 1980. Rotavirus: The first five years. J. Pediatr. 96: 611-622.
  
- STIEGLITZ, H.; FONSECA, R.; OLARTE, J. y KUPERSZTOCH-PORTNOY, Y.M. 1980. Linkage in heat-stable enterotoxin activity and ampicillin resistance in a plasmid isolated from an Escherichia coli strain of human origin. Infect. Immun. 30: 617-620.
  
- STINTZING, G.; BÄCK, E.; TUFVESSON, B.; JOHNSON, T.; WADSTRÖM, T. y HABTE, D. 1981. Seasonal fluctuations in the ocurrence of enterotoxigenic bacteria and rotavirus in paediatric diarrhoea in Addis Ababa. Bull WHO. 59: 67-73.

- STOLL, B.J.; ROWE, B.; GLASS, R.I.; GROSS, R.J.; HUQ, I. 1983. Changes in serotypes of Enterotoxigenic Escherichia coli in Dhaka over time: usefulness of polyvalent antisera. J. Clin. Microbiol. 18: 935-937.
- STUART, C.A.; VAN STRATUM, E. and RUSTIGIAN, R. 1945. Futher studies on urease production by Proteus and related organism. J. Bacteriol. 49: 437-444.
- SVENNERHOLM, A.M. y WIKLUND, G. 1983. Rapid GM1-enzyme linked immunosorbent assay with visual reading for identification of Escherichia coli heat labile enterotoxin. J. Clin. Microbiol. 17: 596-600.
- TAKEDA, Y.; TAKEDA, T.; YANO, T.; YAMAMOTO, K. y MIWATANI, T. 1979. Purification and partial characterization of heat-stable enterotoxin of enterotoxigenic Escherichia coli. Infect. Immun. 25: 978-985.
- TAO, H.; GUANGMU, CH.; CHANGAN, W.; HENLI, Y.; ZHAO-YING, F.; TUNGXIN, CH.; ZINYI, CH.; WEIWE, CH.; XUEJIAN, CH.; SHUANSEN, D.; XIAOQUANGS, L. y WEI-CHENG, CH. 1984. Waterborne: outbreak of rotavirus diarrhea in adults in China caused by a novel rotavirus. Lancet. 8387: 1139-1142.
- TAYLOR, J.; POWELL, B.W. y WRIGHT, J. 1949. Infantile diarrroea and vomiting: a clinical and bacteriological investigation. Brit. Med. J. 2: 117-125.
- TAYLOR, J. 1961. Host-specificity and enteropathogenicity of Escherichia coli. J. Appl. Bacteriol. 24: 316-325.

- TAYLOR, W.R.; SCHELL, W.L.; WELLS, J.G.; CHOI, K.; KINNUEN, D.E.; HEISER, P.T.; HELSTAD, A.G. 1982. A foodborne outbreak of enterotoxigenic Escherichia coli diarrhea. N. Engl. J. Med. 306: 1093-1095.
  
- TAYLOR, D.N.; ECHEVARRIA, P.; BLASER, M.J.; PITARANGSI, CH.; BLACKLOW, N.; CROSS, J. y WENIGER, B.G. 1985. Etiología polimicrobiana de la diarrea de los viajeros. Lancet (ed. esp.). 6: 430-433.
  
- THIBAUT, P. y LE MINOR 1957. Méthodes simples de recherche de la lysine décarboxylase et de la tryptophane-désaminase á l'acide des milieux pour différenciation rapide des entérobactériacées. Ann. Microbiol. Paris. 92: 551-554.
  
- THIBAUT, P. 1958. La notion d'espece dans le groupe Shigella. Ann. Inst. Pasteur. 94: 213-223.
  
- THOMAS, L.V.; CRAVIOTO, A.; SCOTLAND, S.M. y ROWE, B. 1982. New fimbrial antigenic type (E8775) that may represent a colonization factor in enterotoxigenic Escherichia coli in humans. Infect. Immun. 35: 1119-1124.
  
- THOMSON, S. 1955. The role of certain varieties of Bacterium coli in gastroenteritis of babies. J. Hyg. Camb. 53: 357-367.
  
- THOREN, A. 1983a. Enterotoxin production invasive ability and surface antigens of enteropathogenic Escherichia coli. Eur. J. Clin. Microbiol. 2:478-479.

- THOREN, A. 1983b. The role of enteropathogenic E. coli infantile diarrhoea. Aspects on bacteriology, epidemiology and therapy. Scand. J. Infect. Dis. S37: S1-S50.
  
- THORNE, G.M.; DENEKE, C.F. y GORBACH, S.L. 1979. Hemagglutination and adhesiveness of toxigenic Escherichia coli isolated from humans. Infect. Immun. 23: 690-699.
  
- TOLEDO, M.G. y TRABULSI, L.R. 1983. Correlation between biochemical and serological characteristics of Escherichia coli and results of the Serény test. J. Clin. Microbiol. 17: 419-421.
  
- TOLEDO, M.R.F.; ALVARIZA, M.C.B.; MURAHOVSKI, J.; RAMOS; S.R.T.S. y TRABULSI, L.R. 1983. Enteropathogenic Escherichia coli serotypes and endemic diarrhea in infants. Infect. Immun. 39: 586-589.
  
- TRABULSI, L.R.; FERNANDES, M.R.F. y ZULIANI, M.E. 1967. Novas bacterias patogénicas para o intestino o homem. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo. 9: 31-39.
  
- TSUKAMOTO, T.; KINOSHITA, Y.; TAGA, S.; TAKEDA, Y. y MIWATANI, T. 1980. Value of passive immune hemolysis for detection of heat-labile enterotoxin produced by enterotoxigenic Escherichia coli. J. Clin. Microbiol. 12: 768-771.
  
- TURNER, J.A. 1981. Giardiasis. In FEIGIN, R.D. y CHERRY, J.D. Textbook of Pediatric infectious diseases. 2. pp. 476-481. Saunders W.B. Co. Philadelphia.

- ULSHEN, M.H. y ROLLO, J. 1980. Pathogenesis of Escherichia coli gastroenteritis in man. Another mechanism. N. Engl. J. Med. 302: 99-101.
- VELASCO, A.C.; MATEOS, M.L.; MAS, G.; PEDRAZA, A.; DIEZ, M. y GUTIERREZ, A. 1984. Three-year prospective study of intestinal pathogens in Madrid, Spain. J. Clin. Microbiol. 20: 290-292.
- VESIKARI, T.; MÄKI, M.; SARKKINEN, H.K.; ARSTILA, P.P. y HALONEN, P.E. 1981. Rotavirus, adenovirus and non-viral enteropathogens in diarrhoea. Arch. Dis. Child. 56: 264-270.
- VIEDMA, J.A. 1976. Bioestadística (Métodos estadísticos en Medicina y Biología). Gráfica Internacional. Madrid.
- VOLLER, A.; BIDWELL, D.E. y BARTLETT, A. 1977. The enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). A guide with abstracts of microplate applications. Dynatech Europe. Borough house. Guernsey. G.B.
- WACHSMUTH, I.K.; STAMM, W.E. y Mc GOWAN, J.E. Jr. 1975. Prevalence of toxigenic and invasive strains of Escherichia coli in a hospital population. J. Infect. Dis. 132: 601-603.
- WACHSMUTH, K.; DE BOY, J.; BIRKNESS, K.; SACK, D. y WELLS, J. 1983. Genetic transfer of antimicrobial resistance and enterotoxigenicity among Escherichia coli strains. Antimicrob. Agents Chemother. 23: 278-283.

- WADE, W.G.; THOM, B.T.; EVANS, N. 1979. Cytotoxic enteropathogenic Escherichia coli. Lancet. 2: 1235-1236.
- WADSTRÖM, T.; AUST-KETTIS, A.; HABTE, D.; HOLMGREN, J.; MEEUWISSE, G.; MÖLLBY, R. y SODERLIND, O. 1976. Enterotoxin-producing bacteria and parasites in stools of Ethiopian children with diarrhoeal disease. Arch. Dis. Child. 51: 865-870.
- WALLACE, G.I. y MEAVE, S.L. 1927. The nitrite test as apphed to bacterial cultures. J. Bacteriol. 14: 377-384.
- WEISSFELD, A.S. y SONNENWIRTH, A.C. 1980. Yersinia enterocolitica in adults with gastrointestinal disturbances. Need for cold enrichment. J. Clin. Microbiol. 11: 196-197.
- WELCH, D.F. y MARKS, M.I. 1982. Is Clostridium difficile pathogenic in infants? J. Pediatr. 100: 393-395.
- W.H.O. 1974. The ten leading causes of death for selected countries in North America, Europe and Oceania, 1969, 1970 and 1971. World Health Statistics Report. 27: 563-652.
- W.H.O. SCIENTIFIC WORKING GROUP. 1980a. Escherichia coli diarrhoea. Bull W.H.O. 58: 23-26.

- W.H.O. SCIENTIFIC WORKING GROUP. 1980b. Rotavirus and other viral diarrhoeas. Bull W.H.O. 58: 183-198.
- W.H.O. SCIENTIFIC WORKING GROUP. 1980c. Enteric infections due to Campylobacter, Yersinia, Salmonella and Shigella. BULL, W.H.O. 58: 519-537.
- W.H.O. SCIENTIFIC WORKING GROUP. Parasite related diarrhoeas. Bull W.H.O. 1980d. 58: 819-830.
- WILLIAMS-SMITH, H. y JONES, J.E.T. 1963. Observations on the alimentary tract and its flora in healthy and diseased pigs. J. Pathol. Bacteriol. 86: 387-412.
- WILSON, M.W. y BETTELHEIM, K.A. 1980. Cytotoxic Escherichia coli serotypes. Lancet. 1: 201.
- WOLFE, M.W. y AMSTERDAM, D. 1968. New diagnostic system for the identification of lactose fermentins Gram-negative rods. Appl. Environ. Microbiol. 16: 1528-1531.
- WOLFE, M.S. 1979. GIARDIASIS. In: SPECK, W.T.. Infecciones poco frecuentes. Clin. Ped. N. Amer. (ed. esp.). 2: 293-301.
- WOOD, L.V.; WOLFE, W.F.; RUIZ-PALACIOS, G.; FOSHEE, W.S.; CORMAN, L.I.; Mc CLESKEY, F.; WRIGHT, J.A. y DUPONT, H.L. 1983. An outbreak of gastroenteritis due to heat-labile enterotoxin producing strain of Escherichia coli. Infect. Immun. 41: 931-934.

- WU, Y.K. y MOOSA, A. 1978. Effect of phototherapy on nitrogen and electrolyte levels and water balance in jaundiced preterm infants. *Pediatrics*. 61:193-198.
- YAMAMOTO, T. y YOKOTA, T. 1982. Release of heat-labile enterotoxin subunits by Escherichia coli. *J. Bacteriol.* 150: 1482-1484.
- YOH, M.; YAMAMOTO, K.; HONDA, T.; TAKEDA, Y. y MIWATANI, T. 1983. Effects of lincomycin and tetracycline on production and properties of enterotoxins of enterotoxigenic Escherichia coli. *Infect. Immun.* 42: 778-782.
- YOLKEN, R.H.; GREENBERG, H.B.; MERSON, M.H. y SACK, R.B. y KAPIKIAN, A.Z. 1977a. Enzyme linked immunosorbent assay for detection of Escherichia coli heat-labile enterotoxin. *J. Clin. Microbiol.* 6: 439-444.
- YOLKEN, R.H.; KIM, H.W. y CLEM, T. 1977b. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for detection of human reovirus-like agent of infantile gastroenteritis. *Lancet*. 1: 263-266.
- YOLKEN, R.H. 1983. Etiologic agents of acute diarrhea. Adenoviruses as etiologic agents of acute gastroenteritis. In: BELLANTI, J.A. Acute diarrhea: Its nutritional consequences in children. pp. 39-42. Nestlé Vevey/Raven Press. New York.

- ZELLER, H.; RASOLOFONIRINA, N. y LHUILLIER, M. 1979. Étude de la production d'entérotoxines par différentes bactéries enteropathogènes a l'aide du test de l'anse ligaturée de lapin. Arch. Inst. Pasteur. Madagascar. 47: 49-63.
  
- ZOBELL, C.E. y FELTHAM, C.B. 1934. A comparison of lead bismuth and iron as detectors of hydrogen sulphide produced by bacteria. J. Bacteriol. 28: 169-176.