



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO**



**FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES ZARAGOZA**

**IDENTIFICAR Y ESTABLECER LA PREVALENCIA
DE ENTEROBACTERIAS Y VIRUS ENTÉRICOS QUE
CAUSAN DIARREA, EN LAS HECES DE LOS
HABITANTES DE COMUNIDADES INDÍGENAS DE LA
REGIÓN DE LA MONTAÑA, EN EL ESTADO DE
GUERRERO**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

Químico Farmacéutico Biológico

PRESENTA

Erick Christian Ivan Espindola Arriaga

DIRECTORA DE TESIS

Dra. María Teresa Estrada García

ASESOR DE TESIS

Dr. Rubén Marroquín Segura



**F E S
ZARAGOZA**

MÉXICO D.F., FEBRERO DE 2014

AGRADECIMIENTOS

A la **Universidad Nacional Autónoma de México**, donde crecí, aprendí, amé y viví. Mi *Alma Máter*.

Al **Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional**, que me proporcionó todos los medios para la realización de éste trabajo, mi segunda casa.

A la **Dra. María Teresa Estrada García**, cuya guía y paciencia hicieron posible éste trabajo.

Al **Dr. Rubén Marroquín Segura**, su dedicación y responsabilidad siempre me permitieron seguir adelante en éste proyecto.

A la **M. en C. Catalina López Saucedo**, quién brindo incondicionalmente su apoyo durante la realización de todo el proyecto.

A la **señora Margarita**, cuyo excepcional trabajo es primordial en el funcionamiento del laboratorio.

A **Izita**, su experiencia, paciencia y conocimientos, me brindaron los cimientos técnicos y teóricos durante todo el proyecto.

Al **Fofó**, que siempre me brindó su amistad y apoyo cuando lo necesité.

A **Nad**, quién sin su rara personalidad y apoyo, hubieran sido más largos los días pasados en el laboratorio.

A la **Rosita**, su compañía y jovialidad hicieron una fiesta, mi breve estancia en el laboratorio.

A **Sammy**, amigo incondicional en las buenas y sobretodo en las malas.

ÍNDICE GENERAL

AGRADECIMIENTOS.....	I
1.- INTRODUCCIÓN	1
2.- MARCO TEÓRICO.....	2
2.1.- Agentes bacterianos y virales asociados a diarrea.	3
2.1.1.- Agentes Bacterianos Causantes de Diarrea.....	3
2.1.1.1.- <i>Escherichia coli</i> (<i>E. coli</i>)	3
2.1.1.1.1.- <i>E. coli</i> enterotoxigénica (<i>ETEC</i>).....	4
2.1.1.1.2.- <i>E. coli</i> enteropatógena (<i>EPEC</i>)	5
2.1.1.1.3.- <i>E. coli</i> productora de toxina Shiga (<i>STEC</i>)	6
2.1.1.1.4.- <i>E. coli</i> enteroinvasiva (<i>EIEC</i>)	7
2.1.1.1.5.- <i>E. coli</i> enteroagregativa (<i>EAEC</i>)	7
2.1.1.1.6.- <i>E. coli</i> de adherencia difusa (<i>DAEC</i>).....	8
2.1.1.1.7.- Otros factores de patogenicidad descritos en <i>E. coli</i>	9
2.1.1.1.7.1.- Toxina EAST1	9
2.1.1.1.7.2.- Toxina Pet	10
2.1.1.1.7.3.- Toxina CDT.....	11
2.1.1.1.7.4.- Subtilasa AB (<i>SubAB</i>)	12
2.1.1.2.- <i>Salmonella</i> sp	13
2.1.1.3.- <i>Shigella</i> sp.	14
2.1.1.4.- <i>Vibrio cholerae</i>	16
2.1.2.- Agentes Virales Causantes de Diarrea	17
2.1.2.1.- Rotavirus	17
2.1.2.2.- Norovirus	17
3.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	19
4.- OBJETIVO GENERAL	20
4.1.- Objetivos Particulares	20
5.- HIPÓTESIS.....	21
6.- METODOLOGÍA	22
6.1.- Recolección de datos y obtención de muestras.....	22
6.2.- Aislamiento e identificación de bacterias	22

6.2.1.- Aislamiento	22
6.2.1.1.- Preenriquecimiento para el aislamiento del género <i>Salmonella</i>	22
6.2.1.2.- Preenriquecimiento para el aislamiento del género <i>Vibrio</i>	23
6.2.2.- Identificación bioquímica de las cepas aisladas.....	23
6.2.2.1.- Identificación de <i>E. coli</i>	23
6.2.2.2.- Identificación de las cepas morfológicamente diferentes a <i>E. coli</i>	23
6.2.2.2.1.- Preparación de la galería	24
6.2.2.2.2.- Preparación del inóculo.....	24
6.2.2.2.3.- Inoculación de la galería.	24
6.2.2.2.4.- Lectura de la galería.....	24
6.2.2.2.5.- Interpretación de los resultados	24
6.3.- Caracterización molecular de los factores de virulencia de <i>E. coli</i>	25
6.3.1.- Preparación de los lisados bacterianos para utilizarlos como moldes para las PCRs	25
6.3.2.- PCRs para la identificación de los grupos de <i>E. coli</i> diarreogénicos.....	25
6.3.2.1.- PCR multiplex (Patotipos ETEC, EPEC, EIEC y EHEC)	27
6.3.2.2.- PCR multiplex (Patotipos EAEC y DAEC)	27
6.3.2.3.- PCR multiplex (Genes para las toxinas subAB, Pet, Cdt y EAST1)	27
6.3.3.- Detección de productos amplificados	28
6.4.- Detección de Virus Entéricos.....	30
6.4.1.- Detección de Rotavirus por aglutinación con látex.	30
6.4.2.- Identificación de Norovirus por RT-PCR	30
6.4.2.1.- Extracción de RNA de heces	30
6.4.2.2.- Retrotranscripción del RNA obtenido durante la extracción	31
6.4.2.3.- PCR para identificación de Norovirus.....	31
6.4.2.4.- Detección de productos amplificados	32
6.5.- Estimación de los Estados Nutricionales	32
6.6.- Análisis estadístico.....	34
7.- RESULTADOS.....	35
7.1.- Río Grande	35
7.1.1.- Descripción de la comunidad.....	35

7.1.2.- Descripción de la población de Río Grande.....	36
7.1.3.- Estudio de prevalencia de enteropatógenos (bacterianos y virales) en Río Grande.....	37
7.1.3.1.- <i>Características del grupo de estudio</i>	37
7.1.3.2.- <i>Características clínicas del grupo de estudio</i>	38
7.2.- Llano de la Parota	39
7.2.1.- Descripción de la comunidad.....	39
7.2.2.- Descripción de la población de Llano de la Parota	41
7.2.3.- Estudio de prevalencia de enteropatógenos (bacterianos y virales) en Llano de la Parota	41
7.2.3.1.- <i>Características del grupo de estudio</i>	41
7.2.3.2.- <i>Características clínicas del grupo de estudio</i>	42
8.- DISCUSIÓN	44
9.- CONCLUSIONES	50
10.- PROPUESTAS.....	52
11.- BIBLIOGRAFÍA	53
12.- ANEXOS	61
12.1.- Preparación de medios	61
12.1.1.- Agar Mac Conkey (MCDLAB)	61
12.1.2.- Agar XLD (MCDLAB).....	61
12.1.3.- Agar Salmonella Shigella (MCDLAB).....	62
12.1.4.- Agar TCBS (MCDLAB).....	62
12.1.5.- Agar sulfito de bismuto (CONDA).....	63
12.1.6.- Citrato de Simmons (Bioxon, BD).....	63
12.1.7.- Medio MIO (Bioxon, BD)	64
12.1.8.- Caldo tetraciónato (DIFCO)	64
12.1.9.- Agua peptonada alcalina	65

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Mecanismos de patogenicidad de los patotipos de <i>E. coli</i>	4
Figura 2. Imagen electrónica de la estructura denominada pedestal producida por EPEC.....	6
Figura 3. Imagen donde se muestra la característica adherencia en forma de “ladrillos apilados” de EAEC.	8
Figura 1. Imagen donde se muestra la característica adherencia difusa de DAEC.....	9
Figura 5. Esquema general de trabajo	26
Figura 6. Foto satelital de la comunidad de Río Grande.	35
Figura 7. Foto satelital de la comunidad de Llano de la Parota.	40

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Iniciadores seleccionados para los ensayos de PCR durante el estudio para genes de <i>E. coli</i> .	29
Tabla 2. Genes asociados a los patotipos diarreogénicos de <i>E. coli</i> .	29
Tabla 3. Iniciadores seleccionados para los ensayos de PCR de Norovirus	32
Tabla 4. Tabla de referencia para estimar el estado nutricional de los niños menores de 5 años según su índice antropométrico, Peso para la Edad.	33
Tabla 5. Tabla de referencia para estimar el estado de nutrición los niños menores de 5 años según su índice antropométrico, Peso para la Talla.	33
Tabla 6. Ejemplo de la tabla utilizada para estimar el estado de nutrición de los individuos de 5 a 18 años, IMC para la Edad.	33
Tabla 7. Tabla de referencia para clasificar a los individuos mayores de 18 años, según IMC.	34
Tabla 8. Indicadores de marginación durante el año de 2010 de Río Grande.	36
Tabla 9. Distribución de la población total de Río Grande por edad y sexo, del censo realizado en diciembre de 2011.	37
Tabla 10. Estatus nutricional de 30 sujetos de la comunidad de Río Grande.	38
Tabla 11. Bacterias identificadas en las muestras de heces de Río Grande.	39
Tabla 12. Indicadores de marginación durante el año 2010 de Llano de la Parota.	40
Tabla 13. Estatus nutricional de 108 sujetos de la población de Llano de la Parota, por edad y género.	41
Tabla 14. Estatus nutricional de los sujetos que entregaron heces.	42
Tabla 15. Bacterias identificadas en las muestras de heces de Llano de la Parota.	43
Tabla 16. Tabla comparativa de los grados de marginación y de rezago social entre diferentes comunidades indígenas del país. Se muestran sombreadas las dos comunidades del estudio.	46

1.- INTRODUCCIÓN

La población indígena en México es uno de los sectores de la sociedad más desprotegidos. Sus condiciones de higiene, alimentación, vivienda, educación, etcétera, son precarias y en algunos casos, casi nulas. Esto es un grave problema social en México ya que se estima que más del 10% de la población total (12 – 13 millones de habitantes) pertenece a la población indígena¹.

A pesar de la mejoría de la calidad de los alimentos, de la calidad del agua, del nivel de sanidad, del implemento de campañas de promoción de terapias no invasivas (por ejemplo la terapia de rehidratación) y estrategias de prevención, la diarrea sigue siendo la segunda causa de muerte provocada por enfermedades infecciosas en el mundo; se estiman alrededor de 1.8 millones de muertes en niños menores de 5 años. El tipo de síndrome clínico estará determinado por los factores de defensa del huésped, las propiedades de virulencia del serotipo específico y de la cepa, así como del número de microorganismos ingeridos².

Los principales agentes etiológicos responsables de causar diarrea son bacterias, virus y parásitos, siendo los rotavirus la principal causa de diarrea en niños menores de 5 años en el mundo. En los últimos años se han realizado estudios epidemiológicos, donde se ha demostrado que los patotipos de *E. coli* diarreogénicos son la principal causa bacteriana de diarrea en niños³; sin embargo solo son estimaciones, porque éstos patotipos no se buscan rutinariamente en hospitales y laboratorios clínicos. Otros agentes etiológicos importantes relacionados que causan diarrea son: *Salmonella sp.*, *Shigella sp.*, *Campylobacter jejuni*, *Vibrio cholerae* y Norovirus.

En México, los estudios en comunidades indígenas relacionados con enfermedades infecciosas han sido muy limitados y han estado principalmente enfocados a tuberculosis^{4,5}. Los estados de Chiapas, Oaxaca y Guerrero están dentro de los estados que reportan las tasas más elevadas de morbilidad por diarrea². Con respecto a estudios de agentes infecciosos asociados a diarrea se han reportado muy pocos; dos se realizaron en población Maya del estado de Chiapas^{6,7} y otro en población Mixe del estado de Oaxaca⁸.

Con base en el hecho de que no se han realizado estudios epidemiológicos en éstas comunidades, es que se planteó el presente proyecto, cuyo objetivo principal fue identificar y establecer la prevalencia de enterobacterias y virus entéricos que causan diarrea,

presentes en las heces de 63 habitantes de dos comunidades de la Región de la Montaña de Guerrero, además de determinar si la prevalencia de estos microorganismos tiene relación con la desnutrición de estas comunidades.

2.- MARCO TEÓRICO

La población indígena en México, está compuesta por comunidades que asumen una identidad étnica con base en su cultura, sus instituciones y una historia que los define como los pueblos autóctonos del país. La población indígena mexicana tiene una gran diversidad cultural y lingüística la cual incluye al menos 85 lenguas y dialectos⁹. En la actualidad existe un debate con respecto a los criterios que deben considerarse para definir esta población. Las propuestas incluyen considerar únicamente a la población que habla alguna lengua indígena que se estima que son 6,3 millones, es decir, el 6,5% de la población mexicana; o considerar como indígenas a todos los miembros de un hogar en donde al menos uno los integrantes habla alguna lengua indígena, lo que resulta en 12 a 13 millones, lo que representa el 12% al 13% de la población mexicana¹.

Desafortunadamente, la población indígena en México como en toda Latinoamérica continúa viviendo bajo condiciones muy desfavorables presentando los mayores índices de marginación del país. Por ejemplo, el índice de mortalidad de la población indígena para 1990 se estimó que era de 41/1000 indígenas comparada con la población abierta que era del 24/1000 sujetos¹⁰. Los estados del país con mayor número de grupos indígenas son Chiapas, Oaxaca y Guerrero y representan el 34% de la población nacional¹; estos estados conforman el triángulo de la pobreza extrema más importante del país, de acuerdo con los indicadores socioeconómicos del año 2000 del Consejo Nacional de Población (CONAPO)¹¹.

El estado de Guerrero cuenta con más de 3 millones de habitantes de los cuales 17,2 % son indígenas (529,780 personas). La población indígena en Guerrero se encuentra esencialmente en la denominada Zona de la Montaña y en menor medida en la Costa Chica, siendo estas las zonas más marginadas del estado. La población indígena del estado se divide en 4 grupos principalmente: los nahuatl (nauas) representan el 40% (212 000 habitantes), los mixtecos (na savi) el 28% (148 000 hab.), los tlapanecos el 22% (116 000 hab.) y los amuzgos (suljaa´) el 9% (47 500) de la población indígena total del estado¹¹. En

el año de 2012 se reportaron 212,054 casos de enfermedades infecciosas intestinales en Guerrero, siendo la primera causa de morbilidad del estado¹².

2.1.- Agentes bacterianos y virales asociados a diarrea.

Los principales agentes etiológicos asociados a diarrea son:

- Bacterias
- Grupos de *Escherichia coli* diarreogénicos (EPEC, ETEC, EIEC, STEC, DAEC, EAEC)
- *Salmonella sp.*
- *Shigella sp.*
- *Campylobacter jejuni*
- *Vibrio cholerae*
- Virus
- Norovirus
- Rotavirus

E. coli, *Salmonella* y *Shigella* pertenecen a la familia *Enterobacteriaceae*, la cual es un grupo de bacterias Gram negativas. Los miembros de la familia *Enterobacteriaceae* no son bacterias exigentes, por lo que crecen fácilmente en medios de primoaislamiento; son oxidasa negativas, reducen los nitratos a nitritos, son aerobios y anaerobios facultativos y fermentan carbohidratos en condiciones anaeróbicas. Éstas no son esporuladas y algunas presentan motilidad por medio de flagelos peritricos. En la actualidad la clasificación de estas bacterias se basa en la homología de su ADN¹³.

2.1.1.- Agentes Bacterianos Causantes de Diarrea

2.1.1.1.- *Escherichia coli* (*E. coli*)

E. coli es la primera bacteria colonizadora de nuestro intestino. Esta bacteria fue descubierta en 1885 en heces de bebés con enteritis por Theodor Escherich, pediatra y bacteriólogo, quien la denominó inicialmente *Bacterium coli commune*, y luego fue nombrada *E. coli* en su honor. Después de muchas observaciones, concluyó que esta bacteria se encontraba como comensal en el tracto gastrointestinal, pero podía estar relacionada con diarrea y otros problemas digestivos. También demostró la participación de *E. coli* como agente responsable de infecciones extraintestinales, puesto que también aisló esta bacteria frecuentemente de infecciones urinarias, principalmente en niñas¹³.

En 1927, por tipificación en suero, Adam demostró que algunos serogrupos de *E. coli* estaban relacionados con episodios de diarrea infantil en Alemania. Existe la hipótesis de que las cepas de *E. coli* comensales se han vuelto patógenas por adquisición horizontal de genes. En la actualidad las *E. coli* asociadas con diarrea, con base en sus factores de patogenicidad, se han clasificado en seis patotipos¹⁴ (Figura 1).

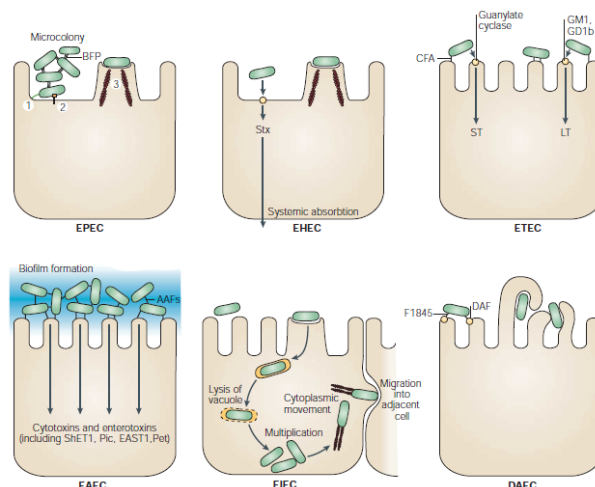


Figura 1. Mecanismos de patogenicidad de los patotipos de *E. coli*¹⁴.

2.1.1.1.1.- *E. coli* enterotoxigénica (ETEC)

Estas cepas son causa frecuente de diarrea severa en niños durante el periodo de destete en países en vías de desarrollo, así como la causa más común de diarrea del viajero¹⁵. La Organización Mundial de la Salud (OMS), en 1990 estimó que ETEC produce más de 840 millones de casos de diarrea y 380,000 muertes en el mundo. Las cepas de ETEC elaboran al menos una de las dos enterotoxinas: toxina termolábil (LT) y toxina termoestable (ST).

La toxina termolábil (LT) es una proteína dimérica de 86 kDa de peso molecular, compuestas por dos subunidades conocidas como A y B; la subunidad B es un pentámero que tiene la propiedad de unirse a las células del epitelio intestinal a través de receptores de la superficie celular (gangliósido GM1)¹⁶. La molécula y su actividad son parecidas a las de la toxina colérica (CT). La subunidad A tiene actividad de ADP ribosil transferasa y actúa transfiriendo un ADP-ribosil del NAD hacia la unidad alfa de la proteína de unión GTP (Gs), la cual estimula la actividad de adenilato ciclasa. La ribosilación del ADP de la subunidad Gs estimula la activación permanente de adenilato ciclasa, produciendo un incremento del AMP cíclico (AMPC). La proteína cinasa A dependiente del AMPC es

activada, induciendo la fosforilación de canales de Cl^- localizados en la membrana apical de las células epiteliales. El resultado final es la estimulación de la secreción de iones Cl^- de las células de las criptas hacia el lumen intestinal y la inhibición de la absorción del Na^+ por las microvellosidades intestinales. El incremento de la concentración de iones Cl^- en el lumen, conlleva a la salida pasiva de agua de las células a través de la vía paracelular, resultando en una diarrea osmótica. Además LT puede inducir la producción de las prostaglandinas de la serie E (PGE_1 y PGE_2) y del factor activador de las plaquetas.

La toxina termoestable (ST) es un péptido de bajo peso molecular (entre 1-6 kDa), que puede ser o no soluble en metanol y como su nombre lo dice es resistente al calentamiento¹⁷. La toxina ST incrementa los niveles de la guanosina monofosfato cíclico (GMPc) al estimular la enzima guanilato ciclasa¹⁸. Dicha actividad tiende a estimular la secreción de iones Cl^- al lumen y/o inhibición de la absorción de Na^+ y Cl^- , resultando en una secreción del fluido intestinal.

2.1.1.1.2.- *E. coli enteropatógena (EPEC)*

EPEC produce diarrea principalmente en niños menores de 6 meses de edad y junto con ETEC son la causa principal de diarrea bacteriana en niños en países en vías de desarrollo¹⁹. Las cepas de EPEC se adhieren a las células HEP-2 en cultivo con un patrón de adherencia localizada²⁰, caracterizada por la formación de microcolonias en la superficie celular. Esta adherencia está mediada por el gen *eaeA*, que codifica para una proteína llamada intimina, la cual es necesaria para la adherencia con las células epiteliales²¹. El gen *bfpA* codifica el pili tipo IV, encargado de la unión bacteria-bacteria; a él se debe la adherencia localizada en microcolonias en el epitelio intestinal. Las cepas de EPEC que tienen tanto el gen *bfpA* y el gen *eaeA* se les denomina EPEC típicas (EPEC_t). Existen cepas de EPEC que no cuentan con el gen *bfpA* y se les conoce como cepas EPEC atípicas²².

Se ha observado en necropsias de niños fallecidos a consecuencia de diarrea severa causada por estas cepas EPEC_t , se observó la destrucción del epitelio del intestino delgado. Estas lesiones se conocen como de “adherencia y esfacelamiento” (A/E), la mayoría de las moléculas involucradas en esta lesión, están codificadas en el locus del esfacelamiento del enterocito (LEE, por sus siglas en inglés). Este locus codifica para las moléculas del sistema de secreción tipo III (TTSS, por sus siglas en inglés); el cual se caracteriza por

producir una estructura de aguja la cual traspasa la membrana celular e inyecta ciertas proteínas a la célula epitelial del intestino, lo que da como resultado la desaparición de las microvellosidades y la formación de una estructura denominada pedestal (Figura 2)²³; este evento es tal vez lo que provoque la diarrea.

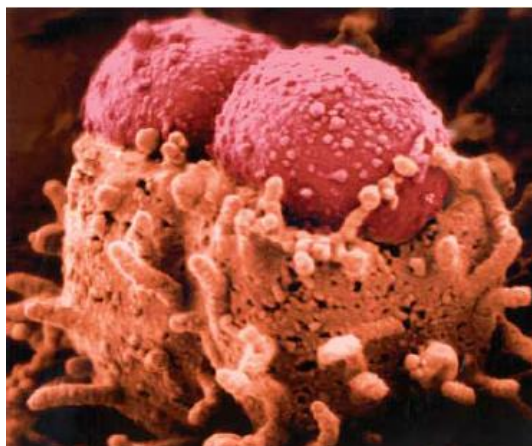


Figura 2. Imagen electrónica de la estructura denominada pedestal producida por EPEC¹⁴.

2.1.1.1.3.- E. coli productora de toxina Shiga (STEC)

Las STEC producen por un lado, la enterotoxina semejante a la producida por *Shigella dysenteriae* tipo 1 (stx1), debido a que solo se diferencia de la toxina producida por esta misma (STX) en un aminoácido; antes era denominada verotoxina 1 (VT1) por su efecto citotóxico sobre monocapas de células Vero. Por otro lado, también produce la enterotoxina semejante a la producida por *S. dysenteriae* tipo 2 (stx2) o verotoxina 2 (VT2), que es genética y funcionalmente semejante a stx1 y a STX, pero inmunológicamente distinta²⁴

Dentro de las STEC están incluidas las cepas de EHEC, incluyendo el serotipo O157:H7; las EHEC están asociadas a casos de diarrea hemorrágica y con el Síndrome Urémico Hemolítico (SUH) en países industrializados y en vías de desarrollo. El SUH está considerado la principal causa de insuficiencia renal aguda (IRA) en niños en los Estados Unidos²⁵. Las EHEC además de producir las toxinas Shiga también, al igual que EPEC, poseen el LEE; por lo que las EHEC también producen la lesión A/E.

2.1.1.1.4.- *E. coli* enteroinvasiva (EIEC)

Las cepas de EIEC tienen características bioquímicas, genéticas y patogénicas relacionadas con el género *Shigella*. En 1986, Sansonetti y colaboradores realizaron estudios de cinética de crecimiento intracelular de EIEC, demostrando que estas cepas contienen un plásmido de 140 MDa, en donde se encuentran los genes responsables de la capacidad de invadir los enterocitos²⁶.

El modelo de la patogénesis de EIEC comprende los siguientes pasos: 1. Adherencia al epitelio intestinal. 2. Endocitosis y lisis de la vacuola endocítica. 3. Multiplicación intracelular. 4. Movimiento a través del citoplasma. 5. Muerte de la célula huésped y movimiento a las células adyacentes. Cuando la infección es severa estos eventos provocan una fuerte inflamación, la cual se manifiesta como ulceración del tejido epitelial. Las infecciones de EIEC se caracterizan por producir una diarrea acuosa seguida de una diarrea con sangre y moco²⁷.

2.1.1.1.5.- *E. coli* enteroagregativa (EAEC)

Las cepas enteroagregativas derivan su nombre por su patrón de adherencia característico sobre células HEp-2 en cultivo, denominado de ladrillos apilados²⁸ (Figura 3). EAEC ha sido implicado como agente etiológico causal de diarrea persistente tanto en niños en países en vías de desarrollo como en países industrializados²⁹.



Figura 3. Imagen donde se muestra la característica adherencia en forma de “ladrillos apilados” de EAEC³⁰.

Las características clínicas de la infección producida por EAEC es una diarrea secretora acuosa con moco, fiebre y en ocasiones vómito³¹. La presencia de sangre en heces se ha reportado en un poco más de la tercera parte de pacientes con diarrea³². Un estudio en voluntarios adultos en Estados Unidos, demostró que la cepa prototipo O42 (O44:H18) provocó diarrea con moco, sin sangre en más del 50% de los pacientes y el periodo de incubación fue de 8 a 18 horas³³.

Varios de los factores de patogenicidad de EAEC se encuentran codificados en un plásmido, de entre 60 a 65 MDa, llamado AA. Dentro de este plásmido se encuentran codificados: el activador transcripcional *aggR*, las enterotoxinas PET y EAST, el canal de membrana TolC y una proteína denominada dispersina³⁴.

2.1.1.1.6.- *E. coli* de adherencia difusa (DAEC)

El término *E. coli* de adherencia difusa fue usado inicialmente para referirse a cualquier cepa de *E. coli* que al adherirse a células Hep-2 en cultivo, no formaban ni microcolonias como las cepas EPEC, ni el patrón de ladrillos apilados como las EAEC (Figura 4).

En 1993, Levine y colaboradores demostraron que existe una asociación entre el aumento de la edad y el incremento de diarrea en niños de entre 1 a 5 años; la razón de tal fenómeno relacionado con la edad aún se desconoce³⁵. Por otro lado, en 1993, Jallat y colaboradores también demostraron que las cepas de DAEC son responsables de una gran cantidad de casos de diarrea en pacientes franceses, a quienes no se les encontró otro enteropatógeno; esto sugiere que las cepas de DAEC pueden ser importantes patógenos diarreogénicos en países desarrollados³⁶.

Poco se conoce de las moléculas asociadas a patogenicidad de las DAEC. Hasta el momento solo se ha identificado una fimbria denominada F1845, sin embargo, se desconoce a ciencia cierta su papel en la patogenicidad de DAEC³⁷. El gen *afa* codifica una serie de adhesinas afimbriales (AFA) expresadas por DAEC³⁸. Es responsable de la biosíntesis de adhesinas Afa de la familia Afa/Dr de las adhesinas. Las adhesinas Afa/Dr son utilizadas por la bacteria para colonizar a las células epiteliales del intestino, las cuales se unen a los receptores DAF (Decay-acelerating factor, una proteína de membrana

reguladora del complemento), CEACAMs (una molécula de adhesión célula-célula) y a la región 7S del colágeno tipo IV³⁹.

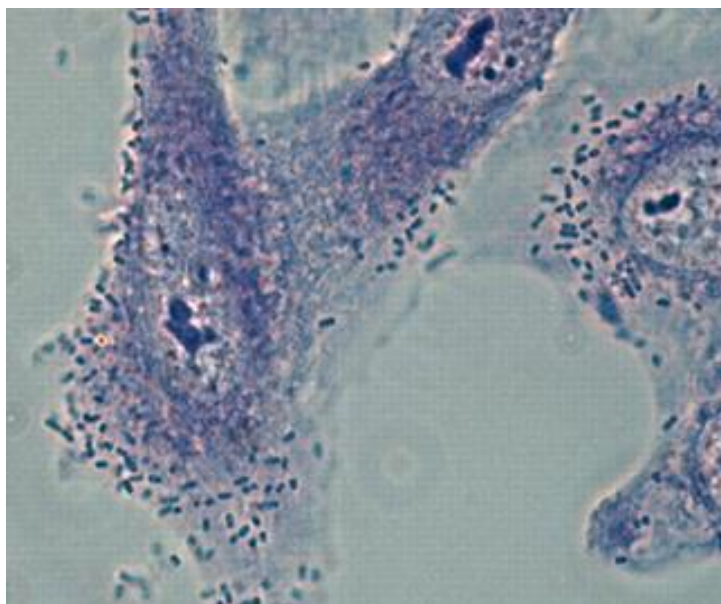


Figura 4. Imagen donde se muestra la característica adherencia difusa de DAEC³⁰.

Las cepas de *E. coli* diarreogénicas no se caracterizan de manera rutinaria en los laboratorios clínicos, ya que estas requieren para su caracterización de métodos moleculares. Por lo cual desconocemos su prevalencia en población mestiza e indígena a nivel nacional, pero los pocos estudios de prevalencia que se han reportado indican que éstas cepas aparentemente son la primera causa de diarrea bacteriana en nuestra población^{40, 41}.

2.1.1.1.7.- Otros factores de patogenicidad descritos en E. coli

Se han identificado algunas toxinas en cepas de *E. coli* relacionadas con cuadros severos de diarrea, y éstas son descritas a continuación.

2.1.1.1.7.1.- Toxina EAST1

La toxina termoestable de *E. coli* enteroagregativa 1 (EAST1, por sus siglas en inglés) fue descrita por primera vez en la cepa de referencia 17-2, la cual fue aislada en Chile de un niño con diarrea y se observó que era capaz de producir diarrea e incluso la muerte en conejos⁴².

EAST1 tiene un 50% de identidad con el dominio enterotóxico de la toxina termoestable (ST) de ETEC, y es estructural y funcionalmente similar a la Guanilina. Estudios en células T84 transfectadas con Guanilato Ciclasa C (GC-C) sugieren que EAST1 interactúa con esta molécula para inducir un incremento de cGMP al igual que ST. La toxina se une primero a la GC-C, esto activa la conversión de GTP en cGMP, el incremento de cGMP activa la proteína cinasa G lo que disminuye la absorción del Na^+ e incrementa la secreción de aniones como el Cl^- , lo cual iniciaría la diarrea secretora⁴².

A pesar de haber sido descrita en EAEC, estudios demostraron que no todas las EAEC poseen esta toxina, con una prevalencia del 26 al 86%. Sin embargo se ha reportado que pueden ser causantes de brotes epidémicos⁴³, casos esporádicos⁴⁴ y cuadros de diarrea del viajero⁴⁵. Las cepas productoras de esta toxina también se han visto implicadas en casos de diarrea persistente. Como ya se mencionó, esta toxina primero se asoció con cepas de EAEC, pero estudios posteriores demostraron que EAST1 estaba presente en otros patotipos de *E. coli*⁴⁶. Las cepas productoras de EAST1 se han asociado especialmente con diarrea en niños, pero también hay estudios en los que se han encontrado en diarrea de adultos⁴⁷. En muchos estudios no se han encontrado otros factores de virulencia más que EAST1. Estudios comparativos han reportado que no se encuentran cepas productoras de EAST1 en personas sanas⁴⁸; otros por el contrario, demuestran la presencia del gen de esta toxina en heces de niños y adultos sanos^{46,47,49}. La presencia de la toxina en pacientes sanos sugiere que podrían existir portadores asintomáticos y que EAST1 tal vez causaría diarrea en ciertas condiciones.

2.1.1.1.7.2.- Toxina Pet

La toxina codificada por plásmidos (Pet, por sus siglas en inglés) se describió como una proteína de aproximadamente 104kDa producida por *E. coli* enteroagregativa (EAEC), la cual era capaz de inducir la acumulación de líquido y de causar daño en la mucosa en asas del íleon de ratas.

Villaseca y colaboradores, demostraron que la toxina Pet actúa sobre la espectrina para causar daño celular⁵⁰. Una vez que se produce la toxina, es secretada mediante un sistema de secreción tipo V y llega a las células epiteliales. Para esto la toxina depende de otros factores de virulencia como las fimbrias de adhesión. La internalización de Pet es un

requisito para producir las alteraciones del citoesqueleto⁵¹. Una vez que Pet se une a su receptor, ingresa a la célula vía endocitosis mediada por clatrina⁵². Dentro la célula, Pet se dirige al aparato de Golgi de ahí pasa al retículo endoplásmico (RE) por tráfico vesicular retrógrado⁵³ y finalmente, utilizando el translocador Sec61, pasa intacta al citosol⁵⁴. Las alteraciones del citoesqueleto producidas por Pet se caracterizan por la pérdida de fibras de estrés de actina, contracción del citoesqueleto y desprendimiento celular⁵⁵.

Betancourt-Sánchez y colaboradores, demostraron que EAEC secreta esta toxina *in vivo* y que ésta secreción es favorecida por la presencia de triptona en el medio, lo cual podría exacerbar las manifestaciones clínicas en niños amamantados que son infectados por EAEC⁵⁶. Es importante recalcar que no todas las EAEC expresan Pet, pero aquellas que si la expresan podrían tener una mayor virulencia.

2.1.1.1.7.3.- Toxina CDT

La toxina citoletal distensora (CDT, por sus siglas en inglés) fue detectada por primera vez en 1987 y fue descrita como una toxina termolábil⁵⁷.

Mao y colaboradores, demostraron que solamente CdtA (subunidad A de CDT) era capaz de unirse a la superficie de células CHO, sin embargo su internalización no producía efectos citotóxicos, mientras que, la internalización tanto de CdtB o CdtC producía distensión celular y eventualmente muerte celular⁵⁸. La internalización se produce vía clatrina, se trasloca al Golgi y finalmente CdtB pasa al núcleo. El daño que produce CdtB al DNA es similar al producido por radiaciones ionizantes, dando lugar a rupturas en la doble hebra⁵⁹.

Diversos estudios han demostrado que solo un bajo porcentaje de las cepas aislada de pacientes con diarrea son productoras de CDT (0.5-3.1%); sin embargo, estos porcentajes son mayores que en cepas de *E. coli* aisladas de casos sin diarrea^{60,61,62}. Por otro lado, estudios realizados por Pandey y colaboradores, reportaron que se encontraron niveles elevados de CDT-I en niños con diarrea en India⁶³. Sin embargo, no se ha demostrado una diferencia significativa en la presencia de esta toxina en casos de diarrea, cabe mencionar que en estos estudios no se buscaron todas las variantes de CDT⁶⁴.

Sin embargo, el rol de CDT en *E. coli* no está totalmente definido. Se ha demostrado que los genes de CDT coexisten con otros genes de virulencia como el del factor citotóxico

necrotizante (*cnf*) o con el de la intimina (*eaeA*)⁶⁵. Aun no se ha establecido si esta toxina es capaz de producir diarrea, sin embargo, experimentos con ratones utilizando una *E. coli* no diarrogénica recombinante clonada con el operón de *cdt* de *Shigella dysenteriae*, demostraron que es capaz de producir daño al epitelio del colon descendente y acumulación de fluidos⁶⁶.

2.1.1.1.7.4.- Subtilasa AB (SubAB)

La toxina subtilasa fue descubierta por primera vez en una cepa de STEC del serotipo O113:H21 en un brote en niños de síndrome urémico hemolítico (SUH) en Australia⁶⁷.

Para ejercer su mecanismo de toxicidad, la toxina SubAB necesita unirse a su receptor en la superficie celular, en este caso se ha descrito que SubAB es capaz de unirse a glicoproteínas incluyendo a las $\alpha 2\beta 1$ integrinas pero parece que tiene una gran afinidad a los glicanos que contienen al finalácido N-glicolilneranímico (Neu5Gc). Una vez unido al receptor, la toxina ingresa a la célula de forma dependiente de clatrina y se dirige hacia el retículo endoplásmico (RE) a través del aparato de Golgi por vía retrógrada⁶⁸. La toxina SubAB rompe el enlace entre Leu₄₁₆ y Leu₄₁₇ en la región que conecta los extremos amino y carboxilo terminal de la proteína BiP (Binding immunoglobulin protein). Esta ruptura juega un papel importante en el mecanismo de citotoxicidad⁶⁹, ya que produce una importante respuesta a stress por el RE lo que da lugar a una serie de cambios en la actividad celular llevando finalmente a la apoptosis⁷⁰.

Los efectos de SubAB solo han sido probados en modelos murinos. La colonización intestinal con cepas productoras de esta toxina no produjo diarrea, pero si se asoció con una importante pérdida de peso⁷¹. Por otro lado, cuando se administró la toxina de forma intraperitoneal se produjo anemia hemolítica microangiopática, trombocitopenia y daño renal, triada característica de SUH, además se presentaron lesiones histológicas en cerebro, hígado y riñones también asociadas con este síndrome⁷².

El operón que codifica esta toxina está ampliamente distribuido en las cepas de STEC. Hasta el momento se ha identificado en más de 30 serogrupos, en su mayoría en cepas que no poseen LEE y se ha visto una asociación entre la presencia de esta toxina con las toxinas Stx1, Stx2 o la presencia de ambas. Además, también se ha demostrado la presencia de subtilasa en cepas carentes incluso de toxinas las Stx⁷³.

2.1.1.2.- *Salmonella* sp

La salmonelosis es la infección causada por *Salmonella*. El género *Salmonella* está formado por un grupo muy heterogéneo de bacterias que colonizan el intestino del hombre y de muchas especies animales, causando patología intestinal. Las tres especies principales de *Salmonella* son: *S. typhi*, *S. choleraesuis* y *S. enteritidis*. La mayoría de las infecciones en el humano son resultado de la ingestión de microorganismos presentes en el agua o alimentos contaminados. La infección puede conducir a varios síndromes clínicos, que incluyen infecciones asintomáticas, gastroenteritis aguda, bacteriemia sin foco aparente de infección, bacteriemia con la subsecuente localización supurativa, fiebre tifoidea o un estado de portador crónico asintomático.

El género *Salmonella* pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*, son bacilos gramnegativos, no encapsulados, flagelados peritricos, con fimbrias y pilis. Algunos forman una microcápsula delgada y no produce esporas. Pueden ser aerobios o anaerobios facultativos, fermentan la glucosa, la maltosa y el manitol, pero no fermentan la lactosa ni la sacarosa. Son viables en diferentes condiciones ambientales, sobreviven a la refrigeración y congelación, además de que pueden resistir el calentamiento (hasta 62° C).

Tres son los tipos principales de antígenos que determinan el serotipo de *Salmonella*: el antígeno somático (O), el antígeno flagelar (H) y el antígeno de virulencia (Vi). Los antígenos somáticos son lipopolisacáridos que componen la pared celular, los antígenos flagelares son proteínas localizadas en el flagelo móvil y el antígeno de virulencia es un polisacárido termolábil localizado en la cápsula.

Salmonella se localiza exclusivamente en el intestino y tienen un mecanismo patogénico de tipo enteroinvasivo. Esto se debe a que *Salmonella* tiene la capacidad de colonizar la pared intestinal, donde da lugar a desprendimientos de la mucosa y en ocasiones produce pequeñas úlceras que pueden sangrar, lo que se manifiesta por un color más oscuro de las materias fecales semilíquidas o líquidas. Generalmente las materias fecales son muy fétidas y espumosas, y son datos clínicos que pueden inducir a la sospecha de infección por *Salmonella*. A menudo se refieren a este síndrome como “intoxicación por alimentos”¹³.

En México en el año de 2012 se reportaron 181,493 casos de salmonelosis, siendo la segunda causa de diarrea en el país; en Guerrero se reportaron 6,647 casos en el mismo

año¹². Por otro lado, Estrada-García *et al* en un estudio en 2004 analizaron muestras de salsas de puestos callejeros de comida rápida en el DF., encontrando en el 5% de las muestras la presencia de *Salmonella* (*S. Enteritidis* fagotipo 8, *S. Agona* y *Salmonella* del grupo B)⁴⁰.

2.1.1.3.- *Shigella* sp.

Shigella fue descubierta por Shiga en 1986; esta bacteria pertenece al grupo *Enterobacteriaceae*, es un bacilo de 1 a 3 micras por 0.6 micras, gramnegativo, que se presenta solo o en parejas, inmóvil, no capsulado y no forma esporas. No produce ácido sulfhídrico, ni desdoblan a la urea, reducen los nitratos a nitritos, Voges-Proskauer negativo, citrato negativo, lactosa negativo. Son fermentadores, de la glucosa con producción de ácido pero no de gas. También son aerobios o anaerobios facultativos, con temperatura óptima de crecimiento de 37°C, y pH de 7.6 a 7.8. Son cepas que requieren medios especializados para su correcto crecimiento (microorganismos fastidiosos).

Tiene cuatro especies: *S. dysenteriae*, *S. flexneri*, *S. Boudii* y *S. sonnei*. El serotipo está determinado por los lipopolisacáridos de la pared celular (antígenos O).

En la pared celular *Shigella* posee peptidoglicano y en la membrana externa, que es una bicapa de fosfolípidos, contiene proteínas, lipoproteínas y lipopolisacárido (LPS). El LPS es importante en la virulencia.

En México *Shigella* es causa del 10 al 20% de la diarrea en general, del 30 al 50% de la diarrea con sangre y del 5 al 10% de la diarrea secretora. Los porcentajes de infección por *Shigella* son similares en varios países en vías de desarrollo. La shigelosis es más frecuente en niños menores de 10 años. En 2012 se reportaron 8,085 casos de shigelosis en toda la república; en Guerrero se reportaron 1,365 casos en el mismo año¹².

Los únicos huéspedes naturales de *Shigella* son el humano y algunas especies de primates. La transmisión se hace a través de alimentos contaminados con heces, por las manos, fómites e inclusive por las moscas. Se considera que los organismos tienen la capacidad de sobrevivir en la leche, huevos, quesos y camarones, hasta por 30 días.

Los factores principales de patogenicidad incluyen la capacidad de invasividad y la producción de una exotoxina llamada toxina de Shiga.

La invasión de las células epiteliales de la mucosa intestinal depende del plásmido que codifica un conjunto de proteínas, los antígenos plasmídicos de invasión (Ipa) –uno de éstos funciona como adhesina. La bacteria penetra por fagocitosis inducida en el fagosoma, pasan a las vacuolas fagocíticas, son liberados en el citoplasma, donde se multiplican hasta llenar la célula. Posteriormente se recubren de actina polimerizada y pasan de célula a célula¹³.

La toxina de Shiga (STX o VT) está compuesta por dos subunidades (designadas A y B). La subunidad B es un pentámero que se une a glicolípidos específicos en la célula del hospedador, específicamente globotriaosilceramida (Gb3). Luego de esto, la subunidad A es internalizada y dividida en dos partes. El componente A1 luego se une al ribosoma, interrumpiendo la síntesis de proteínas. Se ha descubierto que Stx-2 es aproximadamente 400 veces más tóxica (según lo cuantificado por la DL50 en ratones) que Stx-1. El Gb3 está, por razones desconocidas, presente en mayor cantidad en tejidos del epitelio renal, a lo cual puede ser atribuida la toxicidad renal de la toxina Shiga. La toxina requiere receptores altamente específicos en la superficie celular para atacar e ingresar dentro de la célula; especies como ganado, cerdos y ciervos que no transportan estos receptores pueden abrigar bacterias toxigénicas sin ningún efecto perjudicial, vertiéndolas en sus heces, de donde pueden diseminarse a los seres humanos.

La toxina de Shiga tiene dos efectos: 1) de enterotoxina con producción de diarrea acuosa profusa, a nivel de intestino delgado, inhibe la absorción de azúcares y aminoácidos, daña los capilares de la lámina propia de las vellosidades del colon, origina isquemia y colitis hemorrágica; y 2) de neurotoxina, con alteraciones en el sistema nervioso central y manifestaciones de meningitis y coma, lo que contribuye a la gravedad de la enfermedad por esta especie.

Los eventos patológicos son: inflamación de la mucosa con formación de microabscesos; posteriormente se presenta necrosis, sangrado y ulceración, que se cubre por una pseudomembrana integrada por leucocitos polimorfonucleares, bacterias englobadas en una trama de fibrina y restos celulares, se da una liberación de endotoxinas por autólisis, que localmente produce la inflamación de la pared intestinal. Esta patología es la responsable de las evacuaciones con sangre y pus, finalmente las lesiones ulcerosas son ocupadas por tejido de granulación y llegan a cicatrizar.

2.1.1.4.- *Vibrio cholerae*

El agente bacteriano causal del cólera es *V. cholerae*. El cólera ha sido endémico de la India por siglos. Los romanos le dieron este nombre por el color de las evacuaciones, a partir de las palabras griegas *chole* = “bilis” *yrhein* = “fluir”. Los últimos casos de cólera del siglo XIX en México ocurrieron durante la sexta pandemia, en 1883. Gracias a la rehidratación oral y a la cloración del agua, bajaron los casos de cólera a nivel nacional. En el año 2012 se reportaron dos casos de cólera en el país, en el estado de Sinaloa; en Guerrero no se reportaron casos de cólera en el mismo año¹².

V. cholerae es un bacilo gramnegativo curvo, de 0.5 a 1 micra de longitud, posee un flagelo polar. Produce oxidasa, a diferencia de las enterobacterias, y fermenta glucosa, lo que lo distingue de *Pseudomonas*. Crece óptimamente cuando las condiciones del pH, salinidad y temperatura son las adecuadas. Este microorganismo no es parte de la biota normal del intestino.

Para que comience la enfermedad se requiere de la adhesión y colonización de *V. cholerae* en la mucosa intestinal. Una vez adheridos los bacilos, probablemente mediante fimbrias, comienza la producción de una potente enterotoxina, denominada toxina colérica. La toxina tiene una subunidad A, la cual contiene el componente activo, rodeado de cinco subunidades B, que median la unión de la toxina al receptor específico gangliósido GM₁, encontrado en la superficie del enterocito. Después de la unión, la subunidad A se divide y uno de sus componentes, la fracción A1, penetra en la célula, donde actúa como una enzima catalizadora, estimulando el componente G de la enzima adenilato ciclasa. Esta estimulación incrementa la producción intracelular del adenosin monofosfato cíclico (AMP_C), el cual produce una secreción activa de cloro e inhibe la absorción de sodio. El resultado es la secreción de un líquido isotónico que contiene sodio, potasio, cloro y bicarbonato dentro del lumen intestinal. Esto conduce rápidamente a deshidratación, aumento de la densidad del plasma y acidosis. Sin embargo, el transporte de glucosa unida a sodio hacia el interior de la célula no se altera. La bacteria no invade los tejidos ni la sangre. El espectro clínico de *V. cholerae* va desde una infección asintomática hasta un proceso diarreico severo acompañado de choque hipovolémico y muerte¹³.

2.1.2.- Agentes Virales Causantes de Diarrea

2.1.2.1.- Rotavirus

Los *Rotavirus* miden alrededor de 80 nanómetros, el cual es un virión icosaédrico, ARN de doble cadena fragmentado, once filamentos y doble cápside, interna y externa. No tienen envoltura y su aspecto es de una rueda dentada, de ahí el origen de su denominación. Existen 5 tipos de Rotavirus denominadas A, B, C, D y E, siendo el tipo A la más común¹³.

Los virus del género *Rotavirus* son la principal causa de gastroenteritis severa en niños menores de 5 años, así como de muertes producidas por diarrea en países en vías de desarrollo. Prácticamente todos los niños se encuentran infectados por *Rotavirus* entre los 2 y 3 años, presentándose principalmente los síntomas más graves entre los 2 meses y los 2 años. Los síntomas son diarrea acuosa, náusea, vómito, dolor abdominal y deshidratación. La infección se adquiere principalmente por vía oral-fecal o por fómites contaminados (por ejemplo juguetes contaminados en guarderías). La introducción en 2006 de la vacuna de Rotavirus en México (Rotarix), redujo para el año de 2009 un 65% las muertes en niños causadas por este agente².

Los *Rotavirus* infectan el intestino delgado, principalmente el duodeno y el yeyuno. Las lesiones que se presentan son leves, que al parecer no tienen relación con los síntomas que causan durante la enfermedad. Las lesiones son vacuolización y pérdida de enterocitos, disminución de las vellosidades intestinales e hiperplasia de las células de las criptas. Las infecciones por *Rotavirus* alteran el funcionamiento del intestino delgado causando diarrea. La diarrea es causada por la mala absorción, derivada de la pérdida de enterocitos⁷⁴.

2.1.2.2.- Norovirus

Los Norovirus (NoV) forman parte de la familia *Caliciviridae* junto con los géneros *Sapovirus*, *Lagovirus* y *Vesivirus*. Los calicivirus son ARN-virus (7,700 kb) desnudos de simetría icosaédrica y con una cápside compuesta de un polipéptido. Se denominan calicivirus debido a que su morfología en microscopía electrónica, tiene aspecto de cáliz o copa¹³.

Los NoV son una de las principales causas de gastroenteritis aguda no bacteriana en el mundo; son la principal causa en gastroenteritis en adultos en asilos, hospitales, hoteles y restaurantes⁷⁵. En países industrializados son la segunda causa de gastroenteritis aguda no

bacteriana, con una incidencia de alrededor del 12% en niños menores de 5 años. Solamente en los Estados Unidos, los casos de NoV suman cada año más de 235,000 visitas médicas, 91 000 visitas a urgencias y 23 000 hospitalizaciones en niños menores de 5 años. Su papel en países en vías de desarrollo no ha sido bien establecido. Las principales fuentes de contaminación de los NoV son agua, mariscos y comida contaminados⁷⁶.

Estudios recientes de biopsias de voluntarios indican que los NoV infectan principalmente la parte proximal del intestino delgado (yeyuno), observándose cambios histopatológicos de la vellosidad intestinal, hiperplasia celular de las criptas, vacuolización del citoplasma celular, infiltrado celular de la lámina propia con mononucleares y polimorfonucleares, pero sin daño evidente de la mucosa. La lisis de las células de la vellosidad intestinal, da como resultado la reducción de la capacidad de absorción del intestino, siendo probablemente la causa de la diarrea producida⁷⁶.

3.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las comunidades indígenas continúan siendo las poblaciones más marginadas del país, con altas tasas de mortalidad por enfermedades infecciosas. Por ésta misma razón no existen estadísticas del número de casos de diarrea en estas comunidades, así como también se desconoce la prevalencia de los principales agentes asociados a diarrea. Guerrero tiene numerosas comunidades indígenas, dado que el 17% de su población es indígena y pertenece a los 3 estados que conforman el triángulo de la pobreza extrema en México. El conocer la prevalencia de las enterobacterias y virus entéricos asociados a diarrea en comunidades indígenas de Guerrero, permitirá proporcionar tratamientos adecuados y efectivos contra estos patógenos, así como realizar campañas de vacunación contra rotavirus para disminuir la incidencia de morbilidad de las diarreas en estas comunidades.

4.- OBJETIVO GENERAL

Identificar y establecer la prevalencia de enterobacterias y virus entéricos que causan diarrea, en las heces de los habitantes de comunidades indígenas de la Región de la Montaña, Guerrero.

4.1.- Objetivos Particulares

Recolectar muestras de heces de los habitantes de comunidades indígenas de la Región de la Montaña.

Recopilar los datos generales de los habitantes de las poblaciones del estudio.

- a) Elaborar una base de datos con la siguiente información de los individuos: sexo, edad, talla y peso.
- b) Estimar el estado nutricional de los habitantes de ambas poblaciones.

Aislar e identificar las siguientes enterobacterias de las heces colectadas: *Salmonella sp*, *Shigella sp*, *Vibrio sp* y *E. coli*.

- a) Identificar especies de los géneros *Salmonella*, *Shigella*, *Vibrio* y otras utilizando el microsistema de identificación API20E.
- b) Identificar los 6 grupos de *E. coli* diarreogénicos: ETEC (*lt*, *st*), STEC (*stx1*, *stx2*, *eaeA*), EPEC (*bfpA*, *eaeA*), EIEC (*ial*), DAEC (*afa*) y EAEC (*aa*, *aap* y *aggR*), utilizando la técnica de PCR.
- c) Identificar cepas de *E. coli* productoras de las toxinas: EAST1 (*astA*), CDT (*cdt*), PET (*pet*) y Subtilasa (*subAB*).

Identificar en las heces colectadas los siguientes virus: Rotavirus y Norovirus.

- a) Identificar Rotavirus mediante reacciones de aglutinación.
- b) Identificar Norovirus por la técnica de RT-PCR.

Analizar estadísticamente los datos obtenidos.

5.- HIPÓTESIS

Algunos estudios realizados en la población mexicana, han demostrado que los principales agentes bacterianos asociados a diarrea son los patotipos de *E. coli* diarreogénicos^{40, 41}; con base en esto se espera que los patotipos de *E. coli* diarreogénicos, sean los agentes bacterianos asociados a diarrea con mayor prevalencia en las heces de los habitantes de las comunidades indígenas de la Región de la Montaña del estado de Guerrero.

Por otro lado, el Rotavirus es el principal agente etiológico de gastroenteritis infantil en el mundo; por lo que se espera que éste sea el principal agente viral asociado a diarrea encontrado en las heces de éstas comunidades.

6.- METODOLOGÍA

6.1.- Recolección de datos y obtención de muestras

Durante la revisión médica, se recolectaron los datos generales de los habitantes que acudieron a la comisaría: nombre, sexo, edad, peso y talla.

De cada individuo se tomó una muestra de heces y con un hisopo se colocó en medio de transporte Cary-Blair (Deltalab), también se tomó una muestra de heces y se colocó dentro de un criotubo para la búsqueda de virus. Ambas muestras se transportaron al laboratorio.

Al llegar al laboratorio las muestras en el criotubo se congelaron a -70 °C, hasta su procesamiento.

6.2.- Aislamiento e identificación de bacterias

6.2.1.- Aislamiento

Se sembraron por estría cruzada cada una de las muestras de los medios de transporte, en los siguientes medios de cultivo de primoaislamiento:

- Agar MacConkey (MCDLAB)
- Agar Salmonella Shigella (SS) (MCDLAB)
- Agar XLD (MCDLAB)
- Agar TCBS (MCDLAB)
- Agar sulfito de bismuto (SB) (CONDA)

Se incubaron a 37° C entre 18 y 24 horas. En agar MacConkey se buscaron colonias con morfología parecida a *E. coli*, así como todas las colonias con características morfológicas diferentes a éstas. En los agares XLD y SS se buscaron cepas con morfología característica de los géneros *Salmonella* y *Shigella*. Por último en agar SB se buscaron colonias que presentaran la morfología del género *Salmonella*.

6.2.1.1.- Preenriquecimiento para el aislamiento del género *Salmonella*.

Se tomó un hisopo de la muestra original y se sumergió en caldo tetraciónato (DIFCO) y se incubó de 12 a 24 horas. Las muestras que fueron enriquecidas en caldo tetraciónato se sembraron por estría cruzada en los siguientes medios:

- Agar Mac Conkey.

- Agar XLD.
- Agar SS.
- Agar SB.

Las placas se incubaron entre 18 y 24 horas y se aislaron todas las cepas de diferente morfología que se observaron en medio Mac Conkey, excepto colonias con morfología de *E. coli*. En los agares XLD y SS se buscaron cepas con morfología característica de los géneros *Salmonella* y *Shigella*. En agar SB se buscaron colonias cuya morfología fuera sospechosa del género *Salmonella*.

6.2.1.2.- Preenriquecimiento para el aislamiento del género *Vibrio*.

Se tomó un hisopo de la muestra original y se sumergió en agua peptonada alcalina (APA) (MCDLAB) y se incubó por 5 a 8 horas. Las muestras enriquecidas en APA se sembraron por estría cruzada en medio TCBS, incubándolas entre 18 y 24 horas. Se buscaron colonias con morfología sospechosa de *Vibrio*.

6.2.2.- Identificación bioquímica de las cepas aisladas

6.2.2.1.- Identificación de *E. coli*

Se seleccionaron 5 colonias con morfología parecida a *E. coli*, para aumentar la probabilidad de aislar una cepa patógena, y se les realizaron las siguientes pruebas bioquímicas para confirmar que sean *E. coli*:

- Citrato de Simmons (Bioxon, BD)
- MIO (MCDLAB)

Se incubaron de 18 a 24 horas. Las cepas indol positivas y citrato de Simmons negativas son identificadas como *E. coli*.

6.2.2.2.- Identificación de las cepas morfológicamente diferentes a *E. coli*

Las cepas morfológicamente diferentes a *E. coli* se identificaron utilizando las tiras de identificación API-20E (Biomérieux), siguiendo los siguientes pasos:

6.2.2.2.1.- Preparación de la galería

1. Se llenaron con aproximadamente 5 mL de agua Elix los alveolos en el fondo de cada cámara de incubación, para crear una atmosfera húmeda.
2. Se inscribió la referencia en la lengüeta lateral de la cámara.
3. Se colocó la galería en la cámara de incubación.

6.2.2.2.2.- Preparación del inóculo.

1. Usando siempre el mechero para mantener la asepsia del área de trabajo, se tomó una colonia grande (2-3 mm o mayor) o 5 más pequeñas y se suspendieron en 5 mL de solución salina estéril contenidos en un tubo falcon.
2. Se homogenizaron las bacterias cuidadosamente.

6.2.2.2.3.- Inoculación de la galería.

1. Se introdujo la suspensión bacteriana en los pozos de la galería con la ayuda de una pipeta Pasteur estéril desechable, evitando la formación de burbujas de aire.
2. Para las pruebas citrato (CIT), Voges-Proskauer(VP) y gelatinasa (GEL), se llenó el pozo y la cúpula.
3. Para las otras pruebas, se llenaron únicamente los pozos.
4. Para las pruebas de arginino dihidrolasa(ADH), lisina descarboxilasa (LDC), ornitina descarboxilasa (ODC), ácido sulfhídrico(H₂S) y ureasa (URE), se creó una atmosfera anaeróbica añadiendo aceite mineral estéril.
5. Con la tapa se cerró la cámara de incubación.
6. Se incubaron a 36 °C entre 18 y 24 horas.

6.2.2.2.4.- Lectura de la galería.

1. Después de la incubación, la lectura de la galería se hizo remitiéndose a la tabla de lectura contenida en el inserto.
2. En el caso de que 3 o más ensayos resultaron positivos, se anotaron en la hoja de resultados todas la reacciones espontáneas.
3. Después se revelaron los ensayos que necesitaban la adición de reactivos (TDA, IND, VP, NIT).
4. Si el número pruebas positivas a las 24 horas de incubación eran menor a 3, se reincubó la galería 24 horas más.

6.2.2.2.5.- Interpretación de los resultados

1. La identificación se realizó a partir del perfil numérico obtenido (bionúmero) y una base de datos de Biomérieux.

6.3.- Caracterización molecular de los factores de virulencia de *E. coli*

6.3.1.- Preparación de los lisados bacterianos para utilizarlos como moldes para las PCRs

Los lisados de bacterias con los cuales se hicieron las diferentes PCR, se prepararon de la siguiente manera: se sembró cada cepa en agar MacConkey, se incubó de 18 a 24 h a 37° C; posteriormente se seleccionó una colonia y se resembró por estría abierta en agar MacConkey, se incubó de 18 a 24 h; de la estría abierta se tomó una asada pequeña y se colocó en 1 mL de agua milliQ, contenida en un tubo eppendorf, de esa misma estría abierta se tomó otra asada pequeña y se colocó en otro tubo eppendorf con 1 mL de agua milliQ en donde se va a preparar un pool de las cinco colonias picadas de un solo individuo. Se homogenizó perfectamente usando un vortex, se hirvió el tubo por un minuto y se colocó inmediatamente en hielo. Se guardaron los tubos a -20° C hasta su uso.

6.3.2.- PCRs para la identificación de los grupos de *E. coli* diarreogénicos

Las cepas que fueron identificadas como *E. coli* mediante pruebas bioquímicas (MIO, Citrato de Simmons), se les realizaron 3 PCR distintas para identificar los siguientes patotipos y los genes para algunas toxinas:

- Patotipos:
 - ETEC
 - EPEC
 - EIEC
 - EHEC
 - DAEC
 - EAEC
- Toxinas:
 - cdt
 - pet
 - astA
 - subtilasa AB

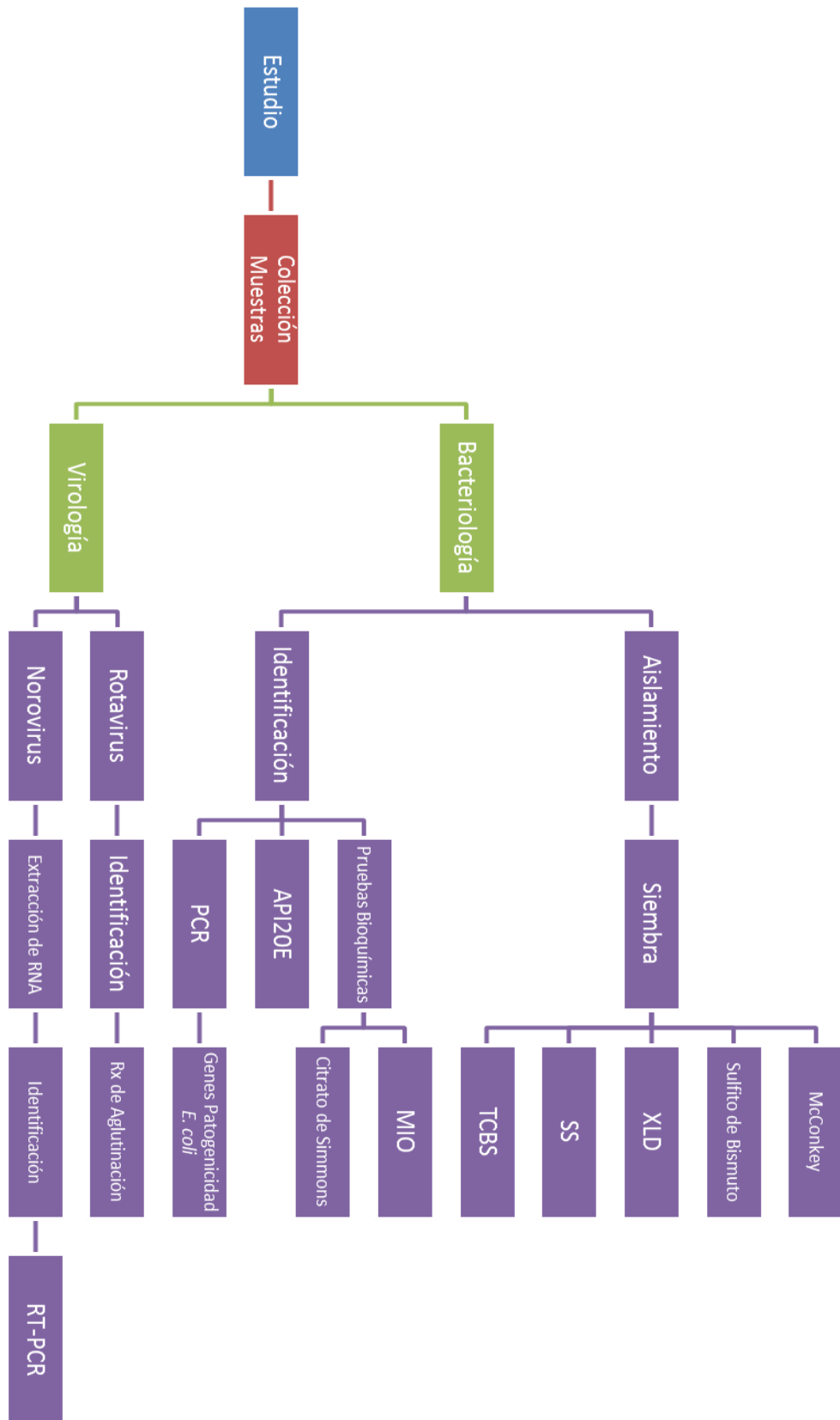


Figura 5. Esquema general de trabajo

6.3.2.1.- PCR multiplex (Patotipos ETEC, EPEC, EIEC y EHEC)

Cada tubo de PCR contuvo 25 µL de volumen total, 2 µL de DNA bacteriano (lisado) y 23 µL de una mezcla que estaba compuesta en concentraciones finales por: regulador con Tris-HCl pH 8.5 10 mM, KCl 50 mM, gelatina 100 µg/mL y 5% de glicerol (Invitrogen); MgCl₂ 2 mM (Invitrogen), 200 µM de cada nucleótido dATP, dCTP, dGTP y dTTP (Roche, Boehringer Mannheim), 0.5 U de Ampli Taq polimerasa (Invitrogen) y una mezcla de los 14 iniciadores seleccionados (Tabla 1). Se utilizó como control positivo de la reacción la mezcla de las 4 cepas de referencia (ETEC, EPEC, STEC y EIEC) y como control negativo la mezcla de PCR sin DNA.

Las mezclas de reacción se colocaron en un termociclador (Biorad, iCycler) con el siguiente programa de amplificación: calentamiento a 50° C durante 2 min y a 95° C durante 5 min, posteriormente se sometieron a 40 ciclos (95° C/45 s, 50° C/45 s y 72° C/45 s) y por último a una extensión final a 72° C durante 10 min⁷⁷.

6.3.2.2.- PCR multiplex (Patotipos EAEC y DAEC)

Cada tubo de PCR contuvo 25 µL, 2 µL de DNA bacteriano y 23 µL de una mezcla que estaba compuesta en concentraciones finales por: regulador con Tris-HCl pH 8.5 10 mM, KCl 50 mM, gelatina 100 µg/mL y 5% de glicerol (Invitrogen); MgCl₂ 2 mM (Invitrogen), 200 µM de cada nucleótido dATP, dCTP, dGTP y dTTP (Roche, Boehringer Mannheim), 0.5 U de Ampli Taq polimerasa (Invitrogen) y una mezcla de los 8 iniciadores seleccionados (Tabla 1). Se utilizaron como control positivo 1 µL de un lisado de la cepa de *E. coli* 042 (EAEC) y 1 µL de un lisado de la cepa *E. coli* C1845 (DAEC); como control negativo se utilizó la mezcla de PCR sin DNA.

Las mezclas de reacción fueron colocadas en un termociclador (Biorad, iCycler) con el siguiente programa de amplificación: calentamiento a 50° C durante 2 min y a 95° C durante 5 min, posteriormente se sometieron a 40 ciclos (95° C/45 s, 55.5 C/45 s y 72° C/45 s) y por último a una extensión final a 72° C durante 10 min⁷⁸.

6.3.2.3.- PCR multiplex (Genes para las toxinas subAB, Pet, Cdt y EAST1)

Cada tubo de PCR contuvo 25 µL, 2 µL de DNA bacteriano y 23 µL de una mezcla que estaba compuesta en concentraciones finales por: regulador con Tris-HCl pH 8.5 10

mM, KCl 50 mM, gelatina 100 µg/mL y 5% de glicerol (Invitrogen); MgCl₂ 2 mM (Invitrogen), 200 µM de cada nucleótido dATP, dCTP, dGTP y dTTP (Roche, Boehringer Mannheim), 0.5 U de Ampli Taq polimerasa (Invitrogen) y una mezcla de los 10 iniciadores seleccionados (Tabla 1). Se utilizó como control positivo 1.5 µL de un lisado con la mezcla de las cepas de *E. coli* 042, O86:H34 y 0.5 µL de DNA plasmídico de un fragmento del gen de la subtilasa AB (0.106 ng/µL); como control negativo se utilizó la mezcla de PCR sin DNA.

Las mezclas de reacción fueron colocadas en un termociclador (Biorad, iCycler) con el siguiente programa de amplificación: calentamiento a 95° C durante 1 min, posteriormente se sometieron a 35 ciclos (95° C/1 min, 62° C/1 min y 72° C/1 min 20 s) y por último a una extensión final a 72° C durante 10 min⁷⁹.

6.3.3.- Detección de productos amplificados

Para todas las PCR se tomaron 5 µL de cada producto de PCR amplificado, se colocaron en un gel de agarosa al 2.5 % (3% para los genes de toxinas) y se sometieron a electroforesis en regulador TAE 1X, a 80 V durante 1 h. Se utilizó un marcador de peso molecular de 1 Kb plus (Invitrogen). Para revelar el gel se colocó en una charola con 200 mL de agua mili Q con 20 µL de bromuro de etidio (1 µg/mL) (Invitrogen) durante 15 min. Se revelaron con luz UV y se les tomó una fotografía en un fotodocumentador (DNR, Mini Bis Pro).

PCR	Gen	Secuencia Iniciadores		Tamaño del Amplicón (pb)
EPEC, ETEC, EIEC, STEC	<i>stx1</i>	F	5'-CTGGATTTAATGTCGCATAGTG-3'	150
		R	5'-AGAACGCCCACTGAGATCATC-3'	
	<i>st</i>	F	5'-ATTTTCTTTCTGTATTGCTT-3'	190
		R	5'-CACCCGGTACAAGCAGGATT-3'	
	<i>stx2</i>	F	5'-GGCACTGTCTGAAACTGCTCC-3'	255
		R	5'-TCGCCAGTTATCTGACATTCTG-3'	
	<i>bfpA</i>	F	5'-AATGGTGCTTGCCTTGCTGC-3'	324
		R	5'-GCCGCTTTATCCAACCTGGTA-3'	
	<i>eaeA</i>	F	5'-GACCCGGCACAAGCATAAGC-3'	384
		R	5'-CCACTGCAGCAACAAGAGG-3'	
	<i>lt</i>	F	5'-GGCAGCAGATTATACCGT GC-3'	450
		R	5'-CGGTCTCTATATCCCTGTT-3'	
	<i>ial</i>	F	5'-GGTATGATGATGATGAGTCCA-3'	650
		R	5'-GGAGGCCAACAAATTATTTCC-3'	
EAEC Y DAEC	<i>afa</i>	F	5'-GGCTTTTCTGCTGAACTGG-3'	809
		R	5'-CGGTCTCATAATCATGTCC-3'	
	<i>aa</i>	F	5'-CTGGCGAAAGACTGTATCAT-3'	629
		R	5'-CAATGTATAGAAATCCGCTGTT-3'	
	<i>aggR</i>	F	5'-CTAATTGTACAATCGATGTA-3'	457
		R	5'-AGAGTCCATCTCTTGATAAG-3'	
Genes Toxinas	<i>cdt1</i>	F	5'-GAAAGTAAATGGAATATAAATGTCCG-3'	467
		R	5'-AAATCACCAAGAATCATCCAGTTA-3'	
	<i>cdt2</i>	F	5'-GAAAATAAATGGAAACACACATGTCCG-3'	467
		R	5'-AAATCTCTCGCAATCATCCAGTTA-3'	
	<i>pet</i>	F	5'-GGCACAGAATAAAGGGGTGTTT-3'	300
		R	5'-CCTCTTGTTCCACGACATAC-3'	
	<i>subAB</i>	F	5'-TATGGCTTCCCTCATTGC-3'	500
		R	5'-TATAGCTGTGCTTCTGACG-3'	
	<i>astA</i>	F	5'-GCCATCAACACAGTATATCC-3'	100
		R	5'-GAGTGACGGCTTTGTAGTC-3'	

Tabla 1. Iniciadores seleccionados para los ensayos de PCR durante el estudio para genes de *E. coli*.

Gen	Proteína	Patotipos de <i>E. coli</i>
<i>bfp</i>	Bfp	EPEC
<i>eaeA</i>	Intimina	EPEC/EHEC
<i>stx1</i>	Stx1	STEC/EHEC
<i>stx2</i>	Stx2	STEC/EHEC
<i>lt</i>	Lt	ETEC
<i>st</i>	St	
<i>ial</i>	Locus asociado a invasividad	EIEC
<i>afa</i>	Afa	DAEC
<i>aggR</i>	AggR	EAEC
<i>aap</i>	Dispersina	
<i>aa</i>	TolC	

Tabla 2. Genes asociados a los patotipos diarreogénicos de *E. coli*.

6.4.- Detección de Virus Entéricos

6.4.1.- Detección de Rotavirus por aglutinación con látex.

Se realizó utilizando el kit de detección de rotavirus humano en heces Pastorex Rotavirus (BioRad), siguiendo los siguientes pasos:

1. Se hizo una dilución de una muestra de heces al 1/10 en el buffer de dilución R1 (incluido en el kit).
2. Se agitó en el vortex durante 1 min.
3. La dilución fue centrifugada a 10,000 rpm durante 10 min.
4. Después se homogenizaron perfectamente los reactivos R2 y R3.
5. Se colocaron en dos pocillos diferentes de una placa, una gota de R2 (incluido en el kit) y otra de R3 (incluido en el kit).
6. Se colocaron 50 µL del sobrenadante obtenido en el paso 3 en cada pocillo.
7. Se mezcló con un agitador.
8. Después de 2 minutos, se observó si existía o no aglutinación.
9. El reactivo R3 es el control positivo del kit.

6.4.2.- Identificación de Norovirus por RT-PCR

6.4.2.1.- Extracción de RNA de heces

Para la extracción de RNA a partir de heces, se realizaron los siguientes pasos:

1. Se procesaron 200 µL de la muestra.
2. Se adicionaron 400 µL de PBS 1X filtrado.
3. Se centrifugó 1 min a 13,000 rpm y luego se pasó el sobrenadante a otro tubo a 4° C.
4. Se agregó al sobrenadante 500 µL de reactivo trizol (Invitrogen) y luego se dejó en hielo 5 min.
5. Se adicionaron 100 µL de cloroformo y se dejó en hielo aproximadamente 5 min.
6. Se centrifugó 15 min a 12,000 rpm a 4 °C.
7. A la fase acuosa se le colocó isopropanol volumen-volumen.
8. Se dejó por 10 min a -20° C para precipitar el RNA.
9. Se centrifugó 10 min a 13,000 rpm a 4° C.
10. Se eliminó el isopropanol y se lavó el botón con 1 mL de etanol al 75% (preparado con agua con Dietilpirocarbonato [DEPC]). Se agitó ligeramente con vórtex.
11. Se centrifugó a 10,000 rpm durante 5 min a 4° C.
12. Se desechó el alcohol y se dejó boca abajo 15 min, en papel absorbente.
13. Se resuspendió con agua DEPC (30 µL) y se alicuotaron 10 µL en 3 tubos.

14. Se cuantificó el RNA en el espectrofotómetro Nanodrop 2000 (Thermo Scientific) y se guardó a -70° C.

6.4.2.2.- Retrotranscripción del RNA obtenido durante la extracción

1. Se agregaron de 5 a 10 µg de RNA en un tubo eppendorf.
2. Se adicionaron 4 µL de oligo dT (Invitrogen) 10 µM al tubo.
3. Se calentó durante 10 min a 70° C.
4. Mientras se calentaba, se preparó la siguiente mezcla para cada tubo:
5. 8 µL amortiguador 5X (Invitrogen)
6. 4 µL DTT (Invitrogen) 0.1 M
7. 4 µL dNTPs (Roche, Boehringer Mannheim) 2.5 mM
8. 40 µL agua
9. Se agregó esta mezcla a cada tubo con RNA y oligo dT.
10. Se colocó a 22° C por 10 min.
11. Se agregaron 2 µL de enzima Superscript II (Invitrogen).
12. Fueron colocados a 42° C durante 90 min.
13. El cDNA obtenido se alícuotó en partes iguales en 3 tubos.
14. Se cuantificó el cDNA obtenido en el espectrofotómetro Nanodrop 2000 (Thermo Scientific) y se guardó a -20° C hasta su uso.

6.4.2.3.- PCR para identificación de Norovirus

PCR 4 multiplex (Norovirus) Cada tubo de PCR contuvo 25 µL, 1 µL de cDNA viral y 24 µL de una mezcla que estaba compuesta en concentraciones finales por: regulador con Tris-HCl pH 8.5 10 mM, KCl 50 mM, gelatina 100 µg/mL y 5% de glicerol (Invitrogen); MgCl₂ 2 mM (Invitrogen), 200 µM de cada nucleótido dATP, dCTP, dGTP y dTTP (Roche, Boehringer Mannheim), 0.5 U de Ampli Taq polimerasa (Invitrogen) y una mezcla de los 8 iniciadores seleccionados (Tabla 2). Se utilizó como control positivo 1µL de DNA clonado a partir de una muestra positiva (GM249 = 88.23 ng/µL, diluido 1:100) y como control negativo la mezcla de PCR sin DNA.

Las mezclas de reacción se colocaron en un termociclador (Biorad, ICycler) con el siguiente programa de amplificación: se calentaron a 92° C durante 5 s, posteriormente se sometieron a 50 ciclos (92° C/20 s, 50° C/20 s y 72° C/40 s) y por último a una extensión final a 72° C durante 7 min⁸⁰.

6.4.2.4.- Detección de productos amplificados

Se tomaron 5 µL de cada producto de PCR amplificado, se colocaron en un gel de agarosa al 2 % y se sometieron a electroforesis en regulador TAE 1X, a 80 V durante 1 h. Se utilizó un marcador de peso molecular de 1 Kb plus (Invitrogen). Para revelar el gel se colocó en una charola con 200 mL de agua mili Q con 20 µL de bromuro de etidio (1 µg/mL) (Invitrogen) durante 15 min. Se revelaron con luz UV y se les tomó una fotografía en un fotodocumentador (DNR, Mini Bis Pro).

Iniciador	Secuencia	Tamaño del Amplicón (pb)
P290	5'-ATAAAAGTTGGCATGAACA-3'	331
P289	5'-TGACAATGTAATCATCACCATA-3'	
P290H	5'-GATTACTCCAGGTGGGACTCCAC-3'	
P290J	5'-GATTACTCCAGGTGGGATTCAAC-3'	
P289H	5'-TGACGATTTTCATCATCACCATA-3'	
P289I	5'-TGACGATTTTCATCATCCCGTA-3'	
P290I	5'-GATTACTCCAGGTGGGACTCAAC-3'	
P290K	5'-GATTACTCCAGGTGGGATTCCAC-3'	

Tabla 3. Iniciadores seleccionados para los ensayos de PCR de Norovirus

6.5.- Estimación de los Estados Nutricionales

Para estimar el estado nutricional de los habitantes de las comunidades del estudio, ambas poblaciones se distribuyeron en 3 intervalos de edad: de 0 a 4 años, de 5 a 18 años y mayores a 18 años.

Para estimar el estado de desnutrición de los niños menores de 5 años, se utilizaron las tablas 1 y 2 del apéndice C de la NORMA Oficial Mexicana NOM-031-SSA2-1999, Para la atención a la salud del niño (Peso para la talla). En caso de los niños en que solo se registró el peso, pero no la talla, se estimó el estado nutricional utilizando las tablas 1 y 2 del apéndice A de la misma norma (Peso para la edad) (Tablas 4 y 5)⁸¹.

Desviaciones estándar con relación a la mediana	Indicador Peso / Edad
+ 2 a + 3	Obesidad
+ 1 a + 1.99	Sobrepeso
más-menos 1	Peso normal
- 1 a - 1.99	Desnutrición leve
- 2 a - 2.99	Desnutrición moderada
- 3 y menos	Desnutrición grave

Tabla 4. Tabla de referencia para estimar el estado nutricional de los niños menores de 5 años según su índice antropométrico, Peso para la Edad.

Desviaciones estándar con relación a la mediana	Indicador Peso / Talla
+ 2 a + 3	Obesidad
+ 1 a + 1.99	Sobrepeso
más-menos 1	Peso normal
- 1 a - 1.99	Desnutrición leve
- 2 a - 2.99	Desnutrición moderada
- 3 y menos	Desnutrición grave

Tabla 5. Tabla de referencia para estimar el estado de nutrición los niños menores de 5 años según su índice antropométrico, Peso para la Talla.

Para estimar el estado nutricional de los individuos de 5 a 18 años se utilizaron las tablas de percentiles del índice de masa corporal (IMC) para la edad, de la OMS (2007) (Tabla 6)⁸².

Tablade IMC Para la Edad, de NIÑAS de 5 a 18 años (OMS 2007)

Edad (años:meses)	Obesidad ≥ + 2 SD (IMC)	Sobrepeso ≥ + 1 a < + 2 SD (IMC)	Normal ≥ -1 a < + 1 SD (IMC)	Desnutrición leve ≥ -2 a < -1SD (IMC)	Desnutrición moderada ≥ -3 a < -2SD (IMC)	Desnutrición severa < -3 SD (IMC)
5:1	≥18.9	16.9–18.8	13.9–16.8	12.7–13.8	11.8–12.6	< 11.8
5:6	≥19.0	16.9–18.9	13.9–16.8	12.7–13.8	11.7–12.6	< 11.7
6:0	≥19.2	17.0–19.1	13.9–16.9	12.7–13.8	11.7–12.6	< 11.7
6:6	≥19.5	17.1–19.4	13.9–17.0	12.7–13.8	11.7–12.6	< 11.7
7:0	≥19.8	17.3–19.7	13.9–17.2	12.7–13.8	11.8–12.6	< 11.8
7:6	≥20.1	17.5–20.0	14.0–17.4	12.8–13.9	11.8–12.7	< 11.8

Tabla 6. Ejemplo de la tabla utilizada para estimar el estado de nutrición de los individuos de 5 a 18 años, IMC para la Edad.

Para estimar el estado nutricional de los individuos mayores de 18 años se utilizó la tabla del apéndice informativo C, de la Norma Oficial Mexicana NOM-043-SSA2-2005, Servicios básicos de salud. Promoción y educación para la salud en materia alimentaria. Criterios para brindar orientación (Tabla 7)⁸³.

CLASIFICACION	TIPO DE OBESIDAD según IMC	IMC Kg/m ²	RIESGO DE ENFERMEDAD* EN RELACION CON EL PESO Y EL PERIMETRO DE CINTURAS NORMALES	
			Hombres ≤ 102 cm Mujeres ≤ 88 cm	Hombres > 102 cm Mujeres > 88 cm
Bajo peso		< 18.5	--	--
Normal		18.5-24.9	--	--
Sobrepeso		25.0-29.9	Aumentado	Alto
Obesidad	I	30.0-34.9	Alto	Muy alto
	II	35.0-39.9	Muy alto	Muy alto
Obesidad extrema	III	≥ 40	Extremadamente alto	Extremadamente alto

Tabla 7. Tabla de referencia para clasificar a los individuos mayores de 18 años, según IMC.

6.6.- Análisis estadístico

Para realizar el análisis estadístico se utilizó la prueba exacta de Fisher, utilizando un valor $P > 0.05$ para considerar que existe significancia estadística.

7.- RESULTADOS

7.1.- Río Grande

7.1.1.- Descripción de la comunidad

La comunidad indígena de Río Grande se encuentra en el municipio de Acatepec, Guerrero, en la zona de la montaña. Se localiza en las coordenadas Longitud 99.03° O, Latitud 17.10° N, a una altura aproximada de 650 m sobre el nivel del mar (Figura 5). En un censo por parte la Secretaria de Desarrollo Social (SEDESOL) Río Grande contaba en el 2010 con 75 habitantes (39 hombres, 36 mujeres), con 12 viviendas y con altos grados de marginación y rezago social (Tabla 8)⁸⁴. Su principal actividad económica es la agricultura de subsistencia (maíz) y la mayoría de los hombres acuden a otras comunidades para trabajar como jornaleros.

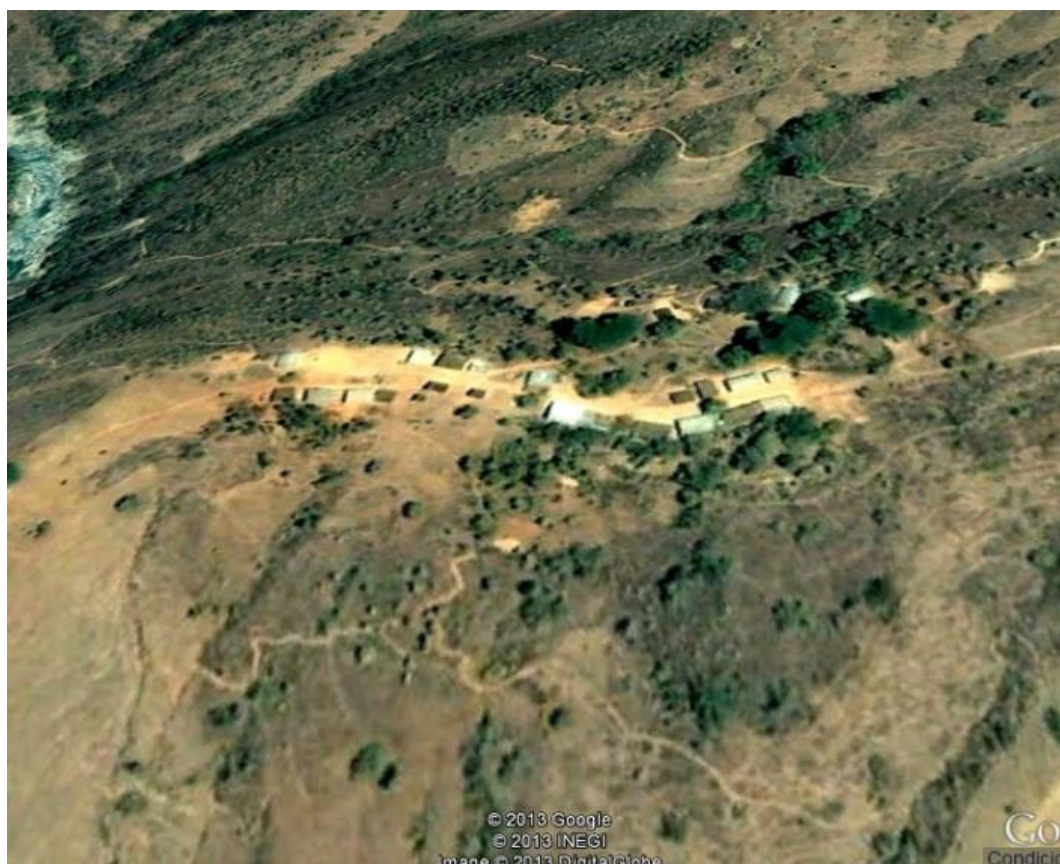


Figura 6. Foto satelital de la comunidad de Río Grande.

Río Grande	2010
Población total	75
% Población de 15 años o más analfabeta	36.36
% Población de 15 años o más sin primaria completa	60.61
% Viviendas particulares habitadas sin excusado	75.00
% Viviendas particulares habitadas sin energía eléctrica	83.33
% Viviendas particulares habitadas sin agua entubada	16.67
% Ocupantes por cuarto en viviendas particulares habitadas	2.50
% Viviendas particulares habitadas con piso de tierra	91.67
% Viviendas particulares habitadas que no disponen de refrigerador	100.00
Índice de marginación	2.09075
Grado de marginación	Muy alto
Lugar que ocupa en el contexto nacional	4,700

Tabla 8. Indicadores de marginación durante el año de 2010 de Río Grande⁸⁴.

Esta comunidad es la más chica, tanto en superficie como en número de habitantes, de las dos comunidades que se visitaron durante el estudio. Hasta donde pudimos observar, no cuentan con drenaje, luz eléctrica y agua entubada. No cuentan con ningún centro de salud cercano y en la comunidad no hay alguna persona que se dedique a atender los problemas de salud de la comunidad.

7.1.2.- Descripción de la población de Río Grande

En el mes de diciembre de 2011 una brigada médica acudió a la comunidad de Río Grande, dónde se dieron consultas médicas y se realizó un censo de la comunidad. En ese momento la comunidad contaba con 79 habitantes, 43 (54.4%) del sexo femenino y 36 (45.6%) del sexo masculino. Como se muestra en la tabla 9 la mayoría de la población estaba en el grupo etario de los 5 a los 18 años (44.3%).

Distribución de la Población de Río Grande			
Intervalo de Edad	Masculino	Femenino	Total
<5 años	10	9	19 (24%)
5 - 18 años	15	20	35 (44.3%)
> 18 años	11	14	25 (31.7%)
Total	36	43	79 (100%)

Tabla 9. Distribución de la población total de Río Grande por edad y sexo, del censo realizado en diciembre de 2011.

Río Grande, con base en las observaciones realizadas durante la visita, es la comunidad más pequeña tanto en tamaño y en población. También es la que tiene menor desarrollo, debido a que no se observaron instalaciones eléctricas, agua entubada o drenaje. Las casas son de adobe y utilizan una de las casas como comisaría. Además que no cuentan con un centro de salud cercano.

Durante las consultas se recabaron historias clínicas de algunos habitantes de la comunidad, y se observó que la mayoría de la población no presentaba cuadros de diarrea. Durante estas entrevistas una mujer adulta reportó haber presentado repetidos cuadros de diarrea y las madres de dos niños reportaron que los niños habían presentado diarrea disintérica de larga evolución, pero al momento del examen médico no presentaban cuadros de diarrea ninguno de los tres sujetos.

7.1.3.- Estudio de prevalencia de enteropatógenos (bacterianos y virales) en Río Grande

7.1.3.1.- Características del grupo de estudio

Debido a la barrera lingüística, la falta de cooperación de los habitantes, en particular de los varones y la falta de personal calificado, no todos los habitantes estuvieron dispuestos a proporcionar muestras de heces. En total 38 de los 79 habitantes (48%) proporcionaron muestras de heces, de este grupo la distribución por edad es la siguiente: 6/20 (30%) son niños menores de 5 años, 20/35 (57%) sujetos de 5 a 18 años y 12/24 (50%) adultos mayores de 18 años. De los 38 sujetos se obtuvieron datos clínicos de 30 (79%) de ellos y se determinó su estatus nutricional con base en los parámetros de la OMS (Tabla 10).

Estatus Nutricional	<5 años		5 - 18 años		> 18 años		Total
	Masculino	Femenino	Masculino	Femenino	Masculino	Femenino	
Desnutrición Grave	1	0	0	0	0	0	1 (3.3%)
Desnutrición Moderada	1	1	0	0	0	0	2 (6.7%)
Desnutrición Leve	0	1	0	0	0	0	1 (3.3%)
Sin Desnutrición	0	0	4	7	1	4	16 (53.3%)
Sobrepeso	2	0	1	3	0	3	9 (30%)
Obesidad I	0	0	0	0	0	1	1 (3.3%)
Total	4	2	5	10	1	8	30 (100%)

Tabla 10. Estatus nutricional de 30 sujetos de la comunidad de Río Grande.

7.1.3.2.- Características clínicas del grupo de estudio

Ninguno de los sujetos reportó presentar diarrea durante la recolección de muestras de heces. En su totalidad las muestras fueron sólidas y ninguna presentaba sangre macroscópica o moco. Todas las muestras fueron sembradas y procesadas para identificar bacterias de los géneros *E. coli*, *Shigella*, *Salmonella*, *Vibrio cholerae* y virus (Rotavirus y Norovirus).

En 36 de las 38 (94.7%) muestras se aislaron cepas de *E. coli* y se picaron 5 colonias de éstas. Las 5 colonias de *E. coli* aisladas de cada una de las muestras fueron procesadas para la identificación de los patotipos de *E. coli* y de otros genes de patogenicidad (Toxinas). En 4/36 (11.1%) de las muestras se identificaron patotipos, de los cuales 3/36 (8.33%) presentaron DAEC que codifican para *afa* y 1/36 (2.8%) EAEC que codifican para Dispersina, el regulón y TolC. Cinco de las 36 muestras (13.9%) también fueron positivas para genes de patogenicidad (Dispersina, TolC o ambas), pero no pertenecían a ningún patotipo en particular. Así mismo, se encontraron en diez de las 36 muestras (27.8%) el gen de la toxina EAST1. También se puede observar que una de las tres cepas de DAEC (33.3%) y la cepa de EAEC son positivas al gen que codifica para la toxina EAST1 (Tabla 11).

Sujeto	Edad	Sexo	Estatus Nutricional	Bacterias
11	1a	Femenino	Desnutrición Moderada	DAEC
17	1a7m	Femenino	Desnutrición Moderada	<i>E. coli</i> (EAST1 + Dispersina), DAEC (EAST1 + Dispersina)
15	3a	Masculino	Desnutrición Grave	DAEC
13	4a	Masculino	Normal	<i>E. coli</i> (EAST1)
4	6a	Masculino	Sin datos	<i>E. coli</i> (EAST1 + Dispersina)
5	7a	Masculino	Sin datos	<i>E. coli</i> (TolC + Dispersina)
14	7a	Femenino	Normal	<i>E. coli</i> (TolC)
12	8a	Femenino	Normal	<i>C. freundii</i>
7	10a	Masculino	Normal	<i>E. coli</i> (EAST1 + Dispersina)
18	12a	Masculino	Normal	<i>C. freundii</i>
24	12a	Femenino	Sin datos	EAEC (TolC + Dispersina)
19	16a	Femenino	Normal	<i>E. coli</i> (EAST1)
40	40a	Femenino	Sobrepeso	<i>C. freundii</i>
9	51a	Masculino	Sin datos	<i>E. coli</i> (EAST1)
44	51a	Femenino	Sin datos	<i>E. coli</i> (EAST1)
2	53a	Femenino	Normal	<i>E. coli</i> (EAST1)
1	68a	Femenino	Normal	<i>E. coli</i> (EAST1)

EAST1: Toxina Termoestable de EAEC

Tabla 11. Bacterias identificadas en las muestras de heces de Río Grande.

Como muestra la tabla 11, tres de los 38 sujetos (7.8%) también se les aisló *Citrobacter freundii*. En ninguna de las muestras se identificó Rotavirus o Norovirus. En éstos pacientes no se presentaron infecciones mixtas. Por otra parte, los integrantes del grupo de investigación de la Dra. Enedina Jiménez del Hospital Infantil de México, quienes realizaron los análisis coproparasitoscópicos de las mismas muestras, encontraron que la mayoría de los habitantes se encuentran parasitados por *Ascaris lumbricoides* principalmente (comunicación personal).

7.2.- Llano de la Parota

7.2.1.- Descripción de la comunidad

La comunidad indígena de Llano de la Parota se encuentra en el municipio de Acatepec, Guerrero, en la zona de la montaña. Se localiza en las coordenadas Longitud 98.98° O, Latitud 17.14° N, a una altura aproximada de 1150 m sobre el nivel del mar (Figura 6). En un censo de Llano de la Parota realizado por la SEDESOL en el 2010, se reportó que en la comunidad habían 158 habitantes (81 hombres, 77 mujeres), con 38 viviendas y con altos grados de marginación y rezago social (Tabla 12)⁸⁵. Su principal actividad económica, al igual que en Río Grande, es la agricultura de subsistencia (maíz) y también la mayoría de los hombres acuden a otras comunidades para trabajar como jornaleros.

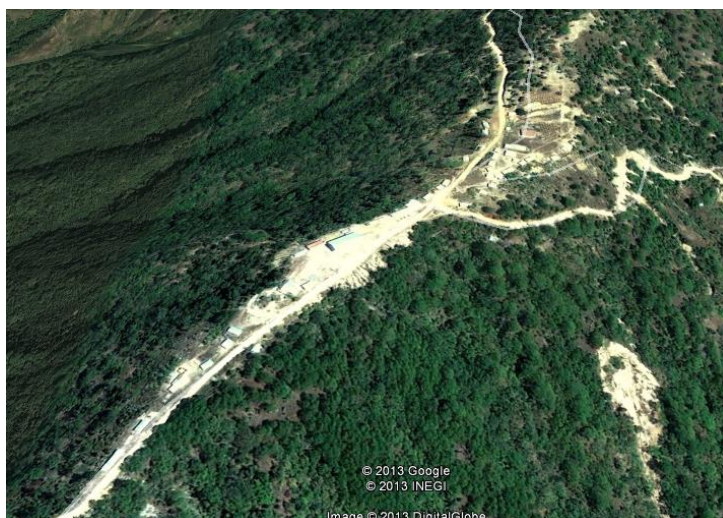


Figura 7. Foto satelital de la comunidad de Llano de la Parota.

Con base en las observaciones durante la visita, Llano de la Parota es más grande en superficie que Río Grande, tiene una población mayor, está mejor establecida y cuenta con una mayor infraestructura. A pesar que en esta comunidad tuvimos mucho más actividades que realizar y menos tiempo para hacerlas, se observó que algunas casas contaban con electricidad y con agua entubada, pero no comprobamos que tuvieran drenaje. Además cuentan con una comisaría bien establecida, aunque tampoco cuenta con un centro de salud cercano.

Llano de la Parota	2010
Población total	158
% Población de 15 años o más analfabeta	45.07
% Población de 15 años o más sin primaria completa	72.46
% Viviendas particulares habitadas sin excusado	57.89
% Viviendas particulares habitadas sin energía eléctrica	57.89
% Viviendas particulares habitadas sin agua entubada	57.89
% Ocupantes por cuarto en viviendas particulares habitadas	1.95
% Viviendas particulares habitadas con piso de tierra	81.08
% Viviendas particulares habitadas que no disponen de refrigerador	97.37
Índice de marginación	1.95317
Grado de marginación	Muy alto
Lugar que ocupa en el contexto nacional	5,659

Tabla 12. Indicadores de marginación durante el año 2010 de Llano de la Parota⁸⁵.

7.2.2.- Descripción de la población de Llano de la Parota

Durante el mes de abril de 2012 una brigada médica acudió a la comunidad de Llano de la Parota. Solamente los habitantes que acudieron a la comisaría fueron censados y se les tomaron datos clínicos. Se reunieron datos de 108 habitantes (aproximadamente el 68% de la población), los cuales 59 son mujeres (54.6%) y 49 son hombres (44.4%) y se determinó su estatus nutricional según los parámetros de la OMS (Tabla 13).

Estatus Nutricional	<5 años		5 - 18 años		>18 años		Total
	Masculino	Femenino	Masculino	Femenino	Masculino	Femenino	
Desnutrición Grave	1	0	0	0	0	0	1 (0.9%)
Desnutrición Moderada	1	0	0	0	0	0	1 (0.9%)
Desnutrición Leve	4	4	4	1	0	3	16 (14.8%)
Sin Desnutrición	9	6	16	17	8	19	75 (69.4%)
Sobrepeso	1	0	1	2	3	4	11 (10.2%)
Obesidad	0	3	1	0	0	0	4 (3.7%)
Total	16	13	22	20	11	26	108

Tabla 13. Estatus nutricional de 108 sujetos de la población de Llano de la Parota, por edad y género.

Durante las consultas se recabaron historias clínicas de algunos habitantes de la comunidad y se observó que la mayoría de la población no presentaba cuadros de diarrea. El médico tratante comentó que la población en general presentaba marcadas características de desnutrición. Durante estas entrevistas sólo un bebe recién nacido presentaba diarrea acuosa.

7.2.3.- Estudio de prevalencia de enteropatógenos (bacterianos y virales) en Llano de la Parota

7.2.3.1.- Características del grupo de estudio

Al igual que en Río grande, debido a la barrera lingüística, la falta de cooperación de los habitantes, en particular de los varones y la falta de personal calificado, no todos los habitantes estuvieron dispuestos a proporcionar muestras de heces. En total 25 de los 108 habitantes (23.1%) proporcionaron muestras de heces. De estos 25 sujetos la distribución por edad es la siguiente: 3/29 (10.3%) son niños menores de 5 años, 10/42 (23.8%) sujetos de 5 a 18 años y 12/37 (32.4%) adultos mayores de 18 años. De este grupo de estudio se obtuvieron los datos clínicos de todos ellos y se determinó su estatus nutricional con base en los parámetros de la OMS (Tabla 14).

Estatus Nutricional	<5 años		5 - 18 años		>18 años		Total
	Masculino	Femenino	Masculino	Femenino	Masculino	Femenino	
Desnutrición Leve	0	1	0	1	0	0	2 (8%)
Sin desnutrición	1	1	5	4	1	9	21 (84%)
Sobrepeso	0	0	0	0	1	1	2 (8%)
Total	1	2	5	5	2	10	25 (100%)

Tabla 14. Estatus nutricional de los sujetos que entregaron heces.

7.2.3.2.- Características clínicas del grupo de estudio

Como ya se mencionó, sólo un niño presentó diarrea durante el muestreo; su muestra de heces era líquida sin moco o sangre. Las demás muestras fueron sólidas y ninguna presentaba sangre macroscópica o moco. De manera intencionada las muestras se buscaron *E. coli*, *Shigella*, *Salmonella*, *V. cholerae* y virus (Rotavirus y Norovirus).

En todas las muestras se aislaron cepas de *E. coli* y se picaron 5 colonias de éstas. Las 5 colonias de *E. coli* aisladas de cada una de las muestras fueron procesadas para identificación de patotipos de *E. coli* y de otros genes de patogenicidad (Toxinas). En 3 de las 25 muestras (12%) se identificaron patotipos, de los cuales 2/25 (8%) presentaron DAEC que codifican para *afa* y 1/25 (4%) EAEC que codifican para dispersina, el regulón y TolC. Dos de las 25 muestras (8%) también fueron positivas para genes de patogenicidad (Dispersina, TolCo ambos), pero no pertenecían a ningún patotipo en particular. También se encontraron en 11/25 (44%) de estas muestras el gen de la toxina EAST1. Cabe destacar que una de las cepas de DAEC (50%) y la cepa de EAEC también fueron positivas para el gen que codifica la toxina EAST1 (Tabla 15).

En el niño que presentó diarrea (sujeto 25, Tabla 15) se aislaron cepas de *E. coli* que no pertenecían a ningún patotipo y con ningún marcador de patogenicidad, pero en sus muestras se aisló una cepa de *K. oxytoca*. Además en 8/25 (32%) de éstas mismas muestras se aisló *C. freundii* y en 3/25 (12%) *K. oxytoca*. Se puede observar que en los pacientes 20 y 22 se presentan infecciones mixtas (Tabla 15). No se encontraron Rotavirus o Norovirus en ninguna de las muestras. En ésta comunidad también se realizó el análisis coproparasitológico de las mismas muestras, sin embargo en ésta ocasión no nos fueron proporcionados los datos.

Sujeto	Edad	Sexo	Estatus Nutricional	Bacterias
25	1m	Masculino	Normal	<i>K. oxytoca</i>
22	2a	Femenino	Desnutrición Moderada	<i>E. coli</i> (EAST1), <i>C. freundii</i>
21	3a	Femenino	Desnutrición Moderada	<i>E. coli</i> (EAST1), <i>C. freundii</i> , <i>K. oxytoca</i>
23	5a	Masculino	Desnutrición Moderada	<i>E. coli</i> (EAST1)
9	6a	Femenino	Normal	DAEC (EAST1), <i>E. coli</i> (Dispersina + EAST1)
24	6a	Masculino	Normal	<i>E. coli</i> (EAST1)
5	7a	Masculino	Normal	<i>C. freundii</i>
7	7a	Femenino	Normal	<i>E. coli</i> (EAST1), <i>C. freundii</i>
10	10a	Masculino	Normal	<i>C. freundii</i>
15	14a	Femenino	Normal	<i>E. coli</i> (EAST1)
6	20a	Femenino	Normal	<i>E. coli</i> (EAST1)
8	20a	Masculino	Normal	<i>C. freundii</i>
20	26a	Femenino	Normal	DAEC, <i>C. freundii</i>
2	38a	Femenino	Normal	<i>C. freundii</i>
13	40a	Femenino	Normal	<i>E. coli</i> (ToxC), <i>K. oxytoca</i>
18	40a	Femenino	Normal	EAEC (ToxC + Dispersina + EAST1)
12	57a	Masculino	Sobrepeso	<i>C. freundii</i>
1	79a	Femenino	Normal	<i>E. coli</i> (EAST1)

EAST1: Toxina Termoestable de EAEC

Tabla 15. Bacterias identificadas en las muestras de heces de Llano de la Parota.

8.- DISCUSIÓN

Las poblaciones indígenas son unas de las más marginadas y desprotegidas en México. Esto tal vez se deba al difícil acceso a las comunidades indígenas, la discriminación racial, la ineficiencia de los programas sociales nacionales. Por estas razones, estas comunidades han tenido y continúan teniendo poco acceso a los medios de producción y a los servicios básicos (luz, drenaje, agua, educación, salud, etc.), impidiendo así su integración social. Como es de esperarse prácticamente no se han realizado estudios epidemiológicos que describan el estatus nutricional, así como de las enfermedades infecciosas gastrointestinales en comunidades indígenas.

La desnutrición y las enfermedades infecciosas gastrointestinales van de la mano y se combinan en un círculo vicioso, es decir, un cuadro clínico de diarrea conlleva a la disminución de la absorción de nutrientes, lo que a su vez provoca desnutrición y ésta incrementa la susceptibilidad de adquirir otra enfermedad gastrointestinal, iniciando así el ciclo nuevamente. Por lo tanto, el desconocimiento de la situación actual de las comunidades indígenas es un tema de preocupación en materia de la salud pública en México.

En el presente trabajo, se realizó un estudio descriptivo transversal de dos comunidades indígenas de la zona de la montaña de Guerrero, en donde se tomaron datos de talla y peso de los integrantes de las comunidades, y cuando fue posible, se tomaron muestras de heces para su posterior caracterización microbiológica. Durante el estudio solo presentó diarrea un bebé de un mes de nacido.

El grado o índice de marginación (IM) permite caracterizar y diferenciar entidades federativas, municipios y localidades según el impacto global de las carencias de la población. El IM considera cuatro aspectos de la marginación: vivienda, educación, ingresos por trabajo y distribución de la población. Para calcular el IM se utilizan 9 indicadores que describen los 4 aspectos antes mencionados, los cuales son: 1) Porcentaje de población analfabeta de 15 años o más, 2) porcentaje de población sin primaria completa de 15 años o más, 3) porcentaje de la población con viviendas particulares sin agua entubada, 4) porcentaje de la población con viviendas particulares sin drenaje ni servicio sanitario exclusivo, 5) porcentaje de la población con viviendas particulares con piso de tierra, 6) porcentaje de la población con viviendas particulares sin energía eléctrica, 7)

porcentaje de viviendas particulares con algún nivel de hacinamiento, 8) porcentaje de la población trabajadora con ingresos de hasta 2 salarios mínimos y 9) porcentaje de población según el tamaño de la localidad⁸⁶.

El grado o índice de rezago social (IRS) resume varias carencias en un solo resultado, el cual asigna diferentes valores o ponderadores para cada indicador. El IRS tiene la virtud de poder ordenar entidades federativas, municipios y localidades de mayor a menor rezago social en un momento en el tiempo, pero con la desventaja que no permite la comparación de los valores del índice a lo largo del tiempo. Este índice proporciona el resumen de cuatro carencias sociales de la medición de pobreza del CONEVAL: rezago educativo, acceso a los servicios de salud, acceso a los servicios básicos en la vivienda, así como la calidad y los espacios en la vivienda⁸⁷. Ambos índices clasifican a las poblaciones en 5 categorías: muy alto, alto, medio, bajo y muy bajo.

Según datos del INEGI, en el 2010 las dos comunidades presentaban muy altos IM así como altos IRS^{84, 85}. En la tabla 16 (Pág. 46) se muestra la comparación de los datos de IM e IRS, de las comunidades del estudio con otras comunidades indígenas de la zona y de otras zonas del país. Durante la revisión se pudo observar que en general la situación de las comunidades indígenas en el sur es similar, con altos y muy altos grados IM e IRS. En cambio, la situación es diferente en las comunidades indígenas del norte, donde en su mayoría tienen IM e IRS bajos y muy bajos⁸⁸. Sin embargo, al comparar las comunidades del estudio con otras comunidades de la misma región, se observó que Río Grande y Llano de la Parota tienen IM e IRS más elevados. Esto se debe posiblemente, a que estas comunidades se encuentran en zonas de muy difícil acceso, lejos de la cabecera municipal y de las vías de comunicación, como carreteras.

Uno de los objetivos del estudio fue establecer el estado nutricional de las dos poblaciones. Se observó que en Río grande había una prevalencia de desnutrición del 13.3% y en Llano de la Parota era del 16.6%. Estos datos son muy similares por lo que no hay diferencia en la prevalencia de desnutrición.

En Río Grande se encontró que 3 de los 4 niños menores de 5 años presentaban algún grado de desnutrición (66.67%), mientras que los otros dos grupos etarios (sujetos de 5 a 18 años y sujetos mayores de 18 años) no presentaron individuos con desnutrición. En Llano de la Parota, la prevalencia de desnutrición en niños menores de 5 años fue

significativamente mayor (del 34.5%) que en los otros dos grupos (11.29% en sujetos de 5 a 18 años y del 8.11% en sujetos mayores de 18 años).

Localidad	Entidad	Etnia	Grado de Marginación	Grado de Rezago Social
Tosanachi	Chihuahua	Tarahumaras	Alto	Medio
Cristo Rey	Sinaloa	Mayos	Alto	Bajo
Banámichi	Sonora	Yaquis	Muy bajo	Muy bajo
Bechijtic	Chiapas	Mayas	Muy alto	Alto
Coicoyán de las Flores	Oaxaca	Mixtecos	Muy alto	Medio
Caxitepec	Guerrero	Tlapanecos	Alto	Medio
Tierra Blanca	Guerrero	Tlapanecos	Muy alto	Alto
Plan de Buena Vista	Guerrero	Tlapanecos	Alto	Medio
Río Grande	Guerrero	Tlapanecos	Muy alto	Alto
Llano de la Parota	Guerrero	Tlapanecos	Muy alto	Alto

Tabla 16. Tabla comparativa de los grados de marginación y de rezago social entre diferentes comunidades indígenas del país. Se muestran sombreadas las dos comunidades del estudio⁸⁸.

Con respecto al sobrepeso y obesidad, se observó que el 33% y el 14% de la población de Río Grande y Llano de la Parota, respectivamente, presentaban sobrepeso u obesidad, pero esta diferencia no fue significativa. Tampoco se encontraron diferencias significativas al realizar el análisis estadístico entre los 3 grupos etarios de ninguna de las dos poblaciones.

La mayoría de los estudios de desnutrición en comunidades indígenas se han realizado en niños menores de 5 años, y en todos ellos se describe una alta prevalencia de desnutrición en comparación con la población no indígena^{89, 90, 91,92}. En 1998, Ávila-Curiel y colaboradores, describieron que la desnutrición afectaba principalmente las regiones del sur del país, donde existe una mayor presencia de comunidades indígenas⁹⁰. Por otro lado, Chávez y colaboradores describieron una polarización de la desnutrición en el país: mientras que en la zona del norte del país se encuentran una mayor prevalencia de desnutrición por sobrepeso, en el sur se encuentra una mayor prevalencia de desnutrición por bajo peso⁹¹. Como lo indican los datos de éste estudio, la polarización descrita en la literatura del estatus nutricional de los habitantes de las comunidades indígenas, coinciden con la polarización de los IM y de IRS de las mismas comunidades^{86, 87}.

Los datos obtenidos en este estudio revelan que la desnutrición en niños menores de 5 años sigue siendo un problema grave en estas comunidades. También, se puede observar que el grupo de 5 a 18 años es el que presenta menos problemas de desnutrición y

sobrepeso, el cual es un dato interesante ya que casi no se han reportado trabajos que estudien a este grupo etario en comunidades indígenas⁹¹.

Con respecto al análisis microbiológico, ya se había mencionado que sólo un niño de un mes de nacido había presentado diarrea durante el muestreo. De la muestra de heces de este niño únicamente se aisló *K. oxytoca*. Se ha descrito que *K. oxytoca* es parte de la microbiota normal del ser humano, sin embargo, se la ha visto relacionada con casos de colitis hemorrágica asociada a antibióticos^{93,94,95}. Es por ello que Joainig y colaboradores, describen a *K. oxytoca*, no sólo como parte de la microbiota normal, sino como un patógeno oportunista que es capaz de provocar enfermedad en determinadas circunstancias⁹⁶. Tal vez en comunidades en condiciones de extrema pobreza este patógeno sea en realidad un agente causal de diarrea, principalmente en niños menores de 1 año. Esta observación se apoyó con el hecho de que también se encontraron otras dos cepas de *K. oxytoca* en dos sujetos asintomáticos, una niña de 3 años y una mujer adulta de 40 años, lo cual apoya la descripción de Joainig de éstas cepas. Con base en esto, sugerimos que el agente etiológico causante de los síntomas de diarrea del niño puede ser *K. oxytoca*. Por lo que se sugiere la búsqueda intencionada de este microorganismo.

El análisis microbiológico de las otras muestras de heces revelaron que la prevalencia de los patotipos de *E. coli* diarreogénicos (PED) fue muy baja, ya que en ambas poblaciones solamente se aislaron 7 cepas de PED (4 DAEC y 3 EAEC), de un total de 63 muestras (11.1%). Esta baja prevalencia estaba prevista debido a que ninguno de estos sujetos presentaba diarrea durante la toma de muestras. Se han aislado cepas de EAEC tanto de sujetos con cuadros de diarrea, como de sujetos asintomáticos^{97, 98,99}. Esto se puede deber a una mayor susceptibilidad de los individuos a diversos factores (edad, calidad de vida, medio ambiente, etc.) y a que actualmente es difícil diferenciar cepas patógenas de EAEC de cepas no patógenas, debido a la gran heterogeneidad de los genes de virulencia que presentan. Es por ello que encontrar marcadores moleculares que discriminen ambos grupos de cepas de EAEC, es uno de los grandes retos que existen hoy día⁹⁷. Por otro lado, aún existe el debate sobre el papel de DAEC y su asociación con cuadros de diarrea. Se ha descrito que las cepas DAEC que son positivas a la sonda *daaC* (que reconoce una región conservada de las adhesinas Afa/Dr) se identifican más frecuentemente en casos de diarrea que en controles, de ahí que se les haya prestado atención recientemente¹⁰⁰. DAEC

aparentemente en México no solo está relacionada en casos de diarrea⁶, sino también en casos de diarrea con sangre (Patz-Vargas, 2013). Sin embargo, se ha encontrado la presencia de estas cepas en la misma proporción tanto en casos como controles¹⁰⁰.

Al comparar los datos de desnutrición con los datos del análisis microbiológico por comunidades, se observó que, en Río Grande, 50% de los niños menores de 5 años tenían desnutrición y de tres de éstos individuos se aislaron cepas de DAEC, encontrándose una correlación significativa entre la presencia de DAEC y desnutrición. Mientras que en Llano de la Parota las cepas de DAEC solamente se identificaron en 2, en un niño de 6 años y en un adulto de 26 años, ambos con estatus nutricional normal. Por lo que estos datos sugieren que DAEC está circulando en ambas comunidades y se tendrían que diseñar otro tipo de estudios, para saber si existe una asociación de DAEC con diarrea en niños en ésta comunidad.

Como ya se había mencionado en el marco teórico, las cepas de *E. coli* que presentan el gen que codifica la toxina termoestable de EAEC (EAST1,) se han asociado con brotes epidémicos de diarrea, en casos esporádicos de diarrea, así como en la llamada diarrea del viajero^{43, 44,45}. Sin embargo, el papel de las cepas de *E. coli astA* (gen que codifica para al toxina EAST1) positivas en diarrea, no está muy claro, debido a que algunos autores mencionan que éstas cepas no se encuentran en individuos sanos, mientras que otros reportan el aislamiento de éstas cepas en sujetos asintomáticos. Por un lado, Yamamoto y colaboradores mencionan que las cepas de *E. coli* que tienen el gen de la toxina EAST1 no se encuentran en individuos sanos⁴⁸, pero los datos de este estudio coinciden con otros estudios en los que demuestran la presencia del gen en cepas de *E. coli* aisladas de individuos asintomáticos^{46,47,49}.

En el estudio, el patógeno con mayor prevalencia encontrado fue *Citrobacter freundii*. En Río Grande, sólo se identificó *C. freundii* en tres sujetos (10%), en una menor de 8 años, en un menor de 12 años, ambos con estatus nutricional normal, y en una señora de 40 años de edad con sobrepeso. Mientras que en Llano de la Parota *C. freundii* se aisló en nueve sujetos (36%): de dos niñas, de 2 y 3 años con desnutrición, las cuales representan el 40% de la población de niños menores de 5 años. Además en esta misma comunidad se aisló *C. freundii* de tres sujetos con estatus nutricional normal, una niña y un niño de 7 años y un niño de 10 años, los cuales representan el 37% de la población de 5 a 18 años. Estos

datos demuestran significativamente, una mayor prevalencia de *C. freundii* en Llano de la Parota que en Río Grande. Sin embargo, la infección por *C. freundii* no se encontró asociada a desnutrición.

Se ha descrito que *Citrobacter freundii* forma parte de la microbiota normal del ser humano¹⁰², sin embargo, algunos autores han asociado a *C. freundii* con brotes esporádicos de diarrea^{102,103,104} y en ellos se han aislado cepas que contienen genes de patogenicidad previamente identificadas en cepas de PED, como la toxina Shiga y la toxina termoestable (St)¹⁰⁵. Es por ello, que Bai y colaboradores consideran a *C. freundii* como un agente etiológico causante de diarrea, pero con muy baja frecuencia de aparición¹⁰⁵; esto puede deberse a que se realiza poco la búsqueda de éste patógeno en casos de diarrea.

Una de las grandes limitaciones de éste estudio es que fue transversal y sólo se pudo hacer una visita a cada una de las comunidades, y por ello se desconoce si los sujetos tuvieron episodios de diarrea recientes o posteriores a la visita. Por lo tanto, se sugiere la realización de un estudio de cohorte para identificar de manera sistemática de sujetos con diarrea y realizar la búsqueda intencionada de enteropatógenos tradicionales y de otros enteropatógenos menos buscados como, los patotipos diarreogénicos de *E. coli*, *K. oxytoca* y *C. freundii*.

Finalmente, con respecto a Norovirus y Rotavirus, que fueron también buscados durante éste estudio, se encontró que hay cero prevalencia de éstos patógenos.

9.- CONCLUSIONES

Como ya se ha mencionada a lo largo del estudio, casi no existen estudios epidemiológicos de agentes causales de diarrea y su relación con el estatus nutricional en comunidades indígenas en México, además que no hay estudios en comunidades indígenas tlapanecas. El presente trabajo fue un estudio descriptivo transversal de la prevalencia de enteropatógenos que causan diarrea y de la prevalencia de desnutrición.

Se encontró que en ambas comunidades hay una muy baja prevalencia de enteropatógenos que causan diarrea. Sin embargo, se encontraron 4 datos muy interesantes. El único caso de diarrea de las comunidades durante el muestreo, se asoció con *K. oxytoca*. Por otro lado, se observó que existe una correlación significativa de cepas de DAEC con niños menores de 5 años con desnutrición, en la comunidad de Río Grande., mientras que en Llano de la Parota no se aislaron cepas de DAEC de niños menores de 5 años. Por último, también se encontró que *C. freundii* tiene una prevalencia significativamente mayor en Llano de la Parota, que en Río Grande. Además, se encontró que la infección por *C. freundii* en niños menores de 5 años, solo se presentó en niños con desnutrición. Los datos de este estudio sugieren la importancia de realizar estudios epidemiológicos, donde se realice la búsqueda intencionada de enteropatógenos tanto tradicionales, como no tradicionales en comunidades indígenas (como lo son los PED, *K. oxytoca* y *C. freundii*, entre otras), debido a su posible asociación con diarrea y desnutrición.

Uno de los datos más importantes del estudio, es que se encontró que la prevalencia de desnutrición en la población menor de 5 años, en comunidades indígenas, sigue siendo un problema serio en materia de salud pública en México. Se encontró que la prevalencia de desnutrición en niños menores de 5 años de las comunidades del estudio, es muy superior a la media nacional, que es del 5%. Por otro lado, un hallazgo interesante del estudio, es que los individuos de 5 a 18 años en estas comunidades, son la población con menos problemas de desnutrición y sobrepeso. En cambio, se observó que la población mayor de 18 años tiende a tener problemas de sobrepeso.

Con base en estos resultados, se sugiere la realización de estudios diferentes, como por ejemplo estudios de cohorte, dado que no se conoce la estacionalidad de los enteropatógenos en estas comunidades.

Tomando en cuenta todas las dificultades que se tuvieron durante la realización de este proyecto y en los resultados del mismo, se puede concluir que aún hace falta realizar mucho trabajo en comunidades marginadas, tanto indígenas como no indígenas. Gracias a éste proyecto se pudieron identificar las necesidades durante la planeación de éste tipo de estudios para realizarlos de manera completa e integral. De esta forma se dejan las bases para seguir realizando estudios epidemiológicos en comunidades indígenas de la Región de la Montaña de Guerrero y poder hacer frente a este gran problema social y de salud en México.

10.- PROPUESTAS

La mayor cantidad de incidentes que sucedieron durante la realización de este proyecto, fue en la toma de muestras y en el transporte de las mismas. Por lo tanto se proponen los siguientes puntos a tomar en cuenta para la realización de estudios epidemiológicos, en este tipo de comunidades, posteriores:

- Como no se conocen la prevalencia, la incidencia y la estacionalidad de los diferentes agentes etiológicos asociados a diarrea, se recomienda realizar estudios de cohorte en estas comunidades y en diferentes épocas del año.
- Conjuntar una brigada multidisciplinaria de trabajo que tenga como objetivo común el estudio de éstas comunidades, pero con sus objetivos particulares a cada rama bien definidos.
- Capacitación de todos los miembros de la brigada, para poder brindar buena atención a los habitantes de las comunidades y al mismo tiempo realizar correctamente la recolección de muestras y datos clínicos.
- Diseñar encuestas completas, fáciles y rápidas para la recolección de los datos clínicos.
- Para la estimación del estatus nutricional se recomienda también medir los parámetros de reservas grasa y magra.
- Realizar una buena planeación de los estudios, incrementando el tiempo de cada estancia. Esto permitirá solventar los problemas que se presenten en las diferentes comunidades y así lograr la recolección de la mayor cantidad de muestras y datos clínicos.
- Contar con sistemas de refrigeración y congelación, para garantizar la estabilidad de las muestras durante su transporte.

11.- BIBLIOGRAFÍA

1. Castro R, Erviti J, Leyva R, Globalización y enfermedades infecciosas en las poblaciones indígenas de México. *Cad. Saúde Pública*. 2007;23(1):S41-S50.
2. Richardson V, Hernandez-Pichardo J, Quintanar-Solares M, Esparza-Aguilar M, Johnson B, Gomez-Altamirano CM, Parashar U, Patel M, Effect of Rotavirus Vaccination on Death from Childhood Diarrhea in Mexico. *New england journal of medicine*. 2010;362: 299-305.
3. Long KZ, Santos JI, Rosado JL, Lopez-Saucedo C, Thompson-Bonilla R, Abonce M, DuPont HL, Hertzmark E, Estrada-Garcia T, Impact of Vitamin A on Selected Gastrointestinal Pathogen Infections and Associated Diarrheal Episodes among Children in Mexico City, Mexico. *The Journal of Infectious Diseases*. 2006;194:1217–1225.
4. Sánchez-Rodríguez C, Estrada-Chávez C, García-Vigil J, Laredo-Sánchez F, Halabe-Cherem J, Pereira-Suárez A, Mancilla R, An IgG antibody response to the antigen 85 complex is associated with good outcome in Mexican Totonaca Indians with pulmonary tuberculosis. *Int. J. Tuberc Lung Dis*. 2002;6(8):706–712
5. Na´jera-Ortiz JC, Sánchez-Pérez HJ, Ochoa-Díaz H, Arana-Cedeño M, Salazar-Lezama MA, Martín-Mateo M, Demographic, health services and socioeconomic factors associated with pulmonary tuberculosis mortality in Los Altos Region of Chiapas, Mexico. *International Journal of Epidemiology*. 2008;37:786–795
6. Girón JA, Jones T, Millán-Velasco F, Castro-Muñoz E, Zárate L, Fry J, *et al*, Diffuse-Adhering *Escherichia coli* (DAEC) as a putative cause of diarrhea in mayan children in Mexico. *Journal of Infection Diseases*. 1991;163:507–513
7. Granich R, Cantwell MF, Long K, Maldonado Y, Parsonnet J, Patterns of health seeking behavior during episodes of childhood diarrhea: a study of Tzotzil-speaking Mayans in the highlands of Chiapas, Mexico. *Soc Sci Med*. 1999;48(4):489-95.
8. Heinrich M, Rimpler H, Barrera NA, Indigenous phytotherapy of gastrointestinal disorders in a lowland Mixe community (Oaxaca, Mexico): ethnopharmacologic evaluation. *J Ethnopharmacol*. 1992;36(1):63-80.
9. Naciones Unidas. Pueblos indígenas. Temas mundiales. Disponible en: <http://www.un.org/es/globalissues/indigenous/index.shtml>. Acceso el 19 de marzo de 2011.
10. Torres JL, Villoro R, Ramírez T, Zurita B, Hernández P, Lozano R, Franco F, La salud de la población indígena en México. *Caleidoscopio de la Salud México*. México DF.: FUNSALUD;2003:41-54.
11. Consejo Nacional de Población. Índice absoluto de marginación, 1990-2000. México: CONAPO;2004
12. Secretaria de Salud. Sistema Único de Información para la Vigilancia Epidemiológica. México: Dirección General de Epidemiología;2012.

13. Romero-Cabello R, Microbiología y parasitología humanas. México, DF.: Editorial médica Panamericana;2007.
14. Nataro JP, Kaper JB, Diarrheogenic *Escherichia coli*. Clin. Microbiol. Rev. 1998;1(1): 142-201.
15. Hyams KC, Bourgeois AL, Merrell BR, Escamilla J, Thornton SA, Burke A, Echevarria P, Green KY, Diarrheal disease during Operation Desert Shield. N. Engl. J. Med. 1991;325:1423-1428
16. Spangler BD, Structure and function of of cholera toxin and the related *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. Microbiol. Rev. 1992;33: 1054-1059
17. Kuperstoch YM, Tachias K, Moomaw CR, dreyfus LA, Urban R, Slaughter C, Whipp S, Secretion of methanol insoluble heat-stable enterotoxin (STB): energy-and-secA-dependent conversion of pre STB to an intermediate indistinguishable from the extracellular toxin. J. Bacteriol. 1990;172: 2427-2432
18. Sears CL, Kaper JB, Enteric bacterial toxins: mechanisms of action and linkage to intestinal secretion. Microbiol. Rev. 1996;60: 167-215
19. Donnenberg MS, Kaper JB, Enteropathogenic *Escherichia coli*. Infect. Immun. 1992;60:3953–3961
20. Cravioto AR, Gross J, Scotland SM, Rowe B, An adhesive factor found in strains of *Escherichia coli* belonging to the traditional enteropathogenic serotypes. Curr. Microbiol. 1979;3: 95-99
21. Knutton S, Lloyd DR, McNeish AS, Adhesion of enteropathogenic *Escherichia coli* to human intestinal enterocytes and cultured human intestinal mucosa. Infect. Immun. 1987;55:69-77
22. Müller D, Hagedorn P, Brast S, Heusipp G, Bielaszewska M, Friedrich AW, Helge Karch, *et al.* Rapid Identification and Differentiation of Clinical Isolates of Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC), Atypical EPEC and Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* by a One-Step Multiplex PCR Method. J. Clin. Microbiol. 2006;44(7):2626–2629
23. Zhang L, Chaudhuri RR, Constantinidou C, Hobman JL, Patel MD, Jones AC, Sarti D, Roe AJ, Vlisidou I, Shaw RK, Falciani F, Stevens MP, Gally DL, Knutton S, Frankel G, Penn CW, Pallen MJ, Regulators encoded in the *Escherichia coli* type III secretion system 2 gene cluster influence expression of genes within the locus for enterocyte effacement in enterohemorrhagic *E. coli* O157:H7. Infect Immun. 2004;72(12):7282-93.
24. Newland JW, Neill RJ, DNA Probes for Shiga-Like Toxins I and II and for Toxin-Converting Bacteriophages. J. Clin.Microbiol. 1988;26 (7): 1292-1297
25. Jackson MP, Detection of shiga toxin producing *Shigella dysenteriae* type 1 and *Escherichia coli* by using polymerase chain reaction with incorporation of digoxigenin-11-dUTP. J. Clin. Microbiol. 1991;29 (9): 1910-1914

26. Sansonetti PJ, Ryter A, Clerc P, Maurelli AT, Mounier J, Multiplication of *Shigella flexneri* within HeLa cells: lysis of the phagocytic vacuole and plasmid mediated contact hemolysis. *Infect. Immun.* 1986;51: 461-469
27. Giono CS, Escobar GA, Valdespino GJ, Diagnóstico de Laboratorio de Infecciones Gastrointestinales. México, DF.: Secretaría de salud;1994:251-266
28. Nataro JP, Scaletsky IC, Kaper, JB, Levine MM, Trabulsi LR, Plasmid-mediated factors conferring diffuse and localized adherence of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 1985;48: 378-283
29. Liebchen A, Benz I, Mellmann A, Karch H, Gomes TA, Yamamoto D, Hernandez RT, Sampaio J, Sampaio SC, Fruth A, Schmidt MA. Characterization of *Escherichia coli* strains isolated from patients with diarrhea in Sao Paulo, Brazil: identification of intermediate virulence factor profiles by multiplex PCR. *J Clin Microbiol.* 2011;49(6):2274-8.
30. Sheikh J, Czeizulin JR, Harrington S, Hicks S, Henderson IR, Le Bouguenec C, *et al*, A novel dispersin in enteroaggregative *Escherichia coli*. *J. Clin. Invest.* 2002;110:1329-1337
31. Paul M, Tsukamoto T, Ghosh AR, Bhattacharya SK, Manna B, Nair GB, *et al*, The significance of enteroaggregative *Escherichia coli* in the etiology of hospitalized diarrhea in Calcutta, India, and the demonstration of a new honey-combed pattern of aggregative adherence. *FEMS. Microbiol. Lett.* 1994;117: 319-326
32. Cravioto A, Tello A, Navarro A, Ruiz J, Villafan H, Uribe F, Eslava C, Association of *Escherichia coli* HEP-2 adherence patterns with type and duration of diarrhea. *Lancet.* 1991;337: 262-264
33. Nataro JP, Deng Y, Cookson S, Cravioto A, Savarino SJ, *et al*. Heterogeneity of enteroaggregative *Escherichia coli* virulence demonstrated in volunteers. *J Infect Dis.* 1995;171:465–468.
34. Cerna JF, Nataro JP, Estrada-Garcia T, Multiplex PCR for detection of three Plasmid-Borne Genes of Enteroaggregative *Escherichia coli*. *J. Clin. Microbiol.* 2003;41(5):2138–2140
35. Levine MM, Ferreccio C, Prado V, Cayazzo M, Aprego P, Martinez J, *et al.*, Epidemiological studies of *Escherichia coli* diarrheal infections in a low socioeconomic level peri-urban community in Santiago, Chile. *Am. J. Epidemiol.* 1993;30:849-869
36. Jallat C, Livrelli V, Darfeuille-Michaud A, Rich C, Joly B, *Escherichia coli* strains involved in diarrhea in France: high prevalence and heterogeneity of diffusely adhering strains. *J. Clin. Microbiol.* 1993;31:2031-2037
37. Bilge SS, Clausen CR, Lau W, and Moseley SL, Molecular characterization of a fimbrial adhesin, F1845, mediating diffuse adherence of diarrhea-associated *Escherichia coli* to HEp-2 cells. *J. Bacteriol.* 1989;171:4281–4289

38. Levine MM, Prado V, Robins-Browne R, Lior H, Kaper JB, Moseley SL, Gicquelais K, Nataro JP, Vial P, Tall B, Use of DNA probes and HEp-2 cell adherence assay to detect diarrheagenic *Escherichia coli*. J Infect Dis. 1988;Jul;158(1):224-8.
39. Servin AL, Pathogenesis of Afa/Dr Diffusely Adhering *Escherichia coli*. Clin. Microbiol. Rev. 2005;18(2):264-292
40. Estrada-Garcia T, Lopez-Saucedo C, Arevalo C, Flores-Romo L, Luna O, Perez-Martinez I, Street-vended seafood: a risk for foodborne diseases in Mexico. Lancet Infect Dis. 2005;5(2):69-70.
41. Paniagua GL, Monroy E, García-González O, Alonso J, Negrete E, Vaca S, Two or more enteropathogens are associated with diarrhoea in Mexican children. Ann Clin Microbiol Antimicrob. 2007;28(6):17
42. Savarino SJ, Fasano A, Watson J, Martin BM, Levine MM, Guandalini S, Guerry P, Enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1 represents another subfamily of E. coli heat-stable toxin. Proc Natl Acad Sci U S A. 1993;90(7):3093-7.
43. Itoh Y, Nagano I, Kunishima M, Ezaki T. Laboratory investigation of enteroaggregative *Escherichia coli* O untypeable:H10 associated with a massive outbreak of gastrointestinal illness. J Clin Microbiol. 1997;35(10):2546-50.
44. Kawano K, Yamada T, Yagi T, Ito K. Detection of enteroaggregative *Escherichia coli* from sporadic diarrhea patients. Kansenshogaku Zasshi. 1998;72(12):1275-82.
45. Gascón J, Vargas M, Quintó L, Corachán M, Jimenez de Anta MT, Vila J. Enteroaggregative *Escherichia coli* strains as a cause of traveler's diarrhea: a case-control study. J Infect Dis. 1998;177(5):1409-12.
46. Savarino SJ, McVeigh A, Watson J, Cravioto A, Molina J, Echeverria P, Bhan MK, Levine MM, Fasano A. Enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin is not restricted to enteroaggregative E. coli. J Infect Dis. 1996;173(4):1019-22.
47. Yamamoto T, Echeverria P. Detection of the enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1 gene sequences in enterotoxigenic E. coli strains pathogenic for humans. Infect Immun. 1996;64(4):1441-5.
48. Vila J, Vargas M, Henderson IR, Gascón J, Nataro JP. Enteroaggregative *Escherichia coli* virulence factors in traveler's diarrhea strains. J Infect Dis. 2000;182(6):1780-3.
49. Ménard LP, Dubreuil JD, Enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1 (EAST1): a new toxin with an old twist. Crit Rev Microbiol. 2002;28(1):43-60.
50. Villaseca JM, Navarro-García F, Mendoza-Hernández G, Nataro JP, Cravioto A, Eslava C, Pet toxin from enteroaggregative *Escherichia coli* produces cellular damage associated with fodrin disruption. Infect Immun. 2000;68(10):5920-7.
51. Navarro-García F, Canizalez-Roman A, Luna J, Sears C, Nataro JP, Plasmid-encoded toxin of enteroaggregative *Escherichia coli* is internalized by epithelial cells. Infect Immun. 2001;69(2):1053-60.
52. Navarro-García F, Canizalez-Roman A, Vidal JE, Salazar MI, Intoxication of epithelial cells by plasmid-encoded toxin requires clathrin-mediated endocytosis. Microbiology. 2007;153(Pt 9):2828-38.

53. Navarro-García F, Canizalez-Roman A, Burlingame KE, Teter K, Vidal JE, Pet, a non-AB toxin, is transported and translocated into epithelial cells by a retrograde trafficking pathway. *Infect Immun*. 2007;75(5):2101-9.
54. Scaglione P, Nemec KN, Burlingame KE, Grabon A, Huerta J, Navarro-Garcia F, Tatulian SA, Teter K, Structural characteristics of the plasmid-encoded toxin from enteroaggregative *Escherichia coli*. *Biochemistry*. 2008;47(36):9582-91.
55. Navarro-García F, Sears C, Eslava C, Cravioto A, Nataro JP, Cytoskeletal effects induced by pet, the serine protease enterotoxin of enteroaggregative *Escherichia coli*. *Infect Immun*. 1999;67(5):2184-92.
56. Betancourt-Sanchez M, Navarro-Garcia F. Pet secretion, internalization and induction of cell death during infection of epithelial cells by enteroaggregative *Escherichia coli*. *Microbiology*. 2009;155(Pt 9):2895-906.
57. Johnson WM, Lior H, A new heat-labile cytolethal distending toxin (CLDT) produced by *Campylobacter spp*. *Microb Pathog*. 1988;4(2):115-26.
58. Mao X, DiRienzo JM, Functional studies of the recombinant subunits of a cytolethal distending holotoxin. *Cell Microbiol*. 2002;4(4):245-55.
59. Ceelen LM, Decostere A, Ducatelle R, Haesebrouck F, Cytolethal distending toxin generates cell death by inducing a bottleneck in the cell cycle. *Microbiol Res*. 2006;161(2):109-20.
60. Albert MJ, Faruque SM, Faruque AS, Bettelheim KA, Neogi PK, Bhuiyan NA, Kaper JB. Controlled study of cytolethal distending toxin-producing *Escherichia coli* infections in Bangladeshi children. *J Clin Microbiol*. 1996;34(3):717-9.
61. da Silva AS, da Silva Leite D. Investigation of putative CDT gene in *Escherichia coli* isolates from pigs with diarrhea. *Vet Microbiol*. 2002;89(2-3):195-9.
62. Marques LR, Tavechio AT, Abe CM, Gomes TA. Search for cytolethal distending toxin production among fecal *Escherichia coli* isolates from Brazilian children with diarrhea and without diarrhea. *J Clin Microbiol*. 2003;41(5):2206-8.
63. Pandey M, Khan A, Das SC, Sarkar B, Kahali S, Chakraborty S, Chattopadhyay S, Yamasaki S, Takeda Y, Nair GB, Ramamurthy T. Association of cytolethal distending toxin locus *cdtB* with enteropathogenic *Escherichia coli* isolated from patients with acute diarrhea in Calcutta, India. *J Clin Microbiol*. 2003;41(11):5277-81.
64. Heywood W, Henderson B, Nair SP. Cytolethal distending toxin: creating a gap in the cell cycle. *J Med Microbiol*. 2005;54(Pt 3):207-16.
65. Tóth I, Oswald E, Mainil JG, Awad-Masalmeh M, Nagy B. Characterization of intestinal *cnf1+* *Escherichia coli* from weaned pigs. *Int J Med Microbiol*. 2000;290(6):539-42.
66. Okuda J, Fukumoto M, Takeda Y, Nishibuchi M. Examination of diarrheagenicity of cytolethal distending toxin: suckling mouse response to the products of the *cdtABC* genes of *Shigella dysenteriae*. *Infect Immun*. 1997;65(2):428-33.
67. Paton AW, Woodrow MC, Doyle RM, Lanser JA, Paton JC, Molecular characterization of a Shiga toxigenic *Escherichia coli* O113:H21 strain lacking *eae* responsible for a

- cluster of cases of hemolytic-uremic syndrome. *J Clin Microbiol.* 1999;37(10):3357-61.
68. Chong DC, Paton JC, Thorpe CM, Paton AW, Clathrin-dependent trafficking of subtilase cytotoxin, a novel AB5 toxin that targets the endoplasmic reticulum chaperone BiP. *Cell Microbiol.* 2008;10(3):795-806.
 69. Paton AW, Beddoe T, Thorpe CM, Whisstock JC, Wilce MC, Rossjohn J, Talbot UM, Paton JC, AB5 subtilase cytotoxin inactivates the endoplasmic reticulum chaperone BiP. *Nature.* 2006;443(7111):548-52.
 70. Lass A, Kujawa M, McConnell E, Paton AW, Paton JC, Wójcik C, Decreased ER-associated degradation of alpha-TCR induced by Grp78 depletion with the SubAB cytotoxin. *Int J Biochem Cell Biol.* 2008;40(12):2865-79.
 71. Paton AW, Srimanote P, Talbot UM, Wang H, Paton JC. A new family of potent AB(5) cytotoxins produced by Shiga toxigenic *Escherichia coli*. *J Exp Med.* 2004;200(1):35-46.
 72. Wang H, Paton JC, Paton AW. Pathologic changes in mice induced by subtilase cytotoxin, a potent new *Escherichia coli* AB5 toxin that targets the endoplasmic reticulum. *J Infect Dis.* 2007;196(7):1093-101.
 73. Tozzoli R, Caprioli A, Cappannella S, Michelacci V, Marziano ML, Morabito S. Production of the subtilase AB5 cytotoxin by Shiga toxin-negative *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol.* 2010;48(1):178-83.
 74. Yang D, RNA Viruses. Host gene responses to infection. London: World Scientific Publishing Co., 2009.
 75. Gallimore CI, Barreiros MA, Brown DW, Nascimento JP, Leite JP, Noroviruses associated with acute gastroenteritis in a children's day care facility in Rio de Janeiro, Brazil. *Braz. J. Med. and Biol. Res.* 2004;37: 321-326
 76. World Health Organization. Caliciviruses. Diarrhoeal Diseases. Disponible en: http://www.who.int/vaccine_research/diseases/diarrhoeal/en/index1.html. Acceso el 19 de marzo de 2011.
 77. López-Saucedo C, Cerna JF, Villegas-Sepulveda N, Thompson R, Velazquez FR, Torres J, Tarr PI, Estrada-García T, Single multiplex polymerase chain reaction to detect diverse loci associated with diarrheagenic *Escherichia coli*. *Emerg Infect Dis.* 2003;9(1):127-31
 78. Cerna JF, Nataro JP, Estrada-Garcia T, Multiplex PCR for Detection of Three Plasmid-Borne Genes of Enteropathogenic *Escherichia coli* Strains. *J. Clin. Microbiol.* 2003;41(5): 2138-2140
 79. Le Bougué' nec C, Lalioui L, Du Merle L, Jouve M, Courcoux P, Bouzari S, *et al.*, Characterization of AfaE Adhesins Produced by Extraintestinal and Intestinal Human *Escherichia coli* Isolates: PCR Assays for Detection of Afa Adhesins That Do or Do Not Recognize Dr Blood Group Antigens. *J. Clin. Microbiol.* 2001;39(5): 1738-1745
 80. Farkas T, Zhong WM, Jing Y, Huang PW, Espinosa SM, Martínez N, *et al*, Genetic diversity among sapoviruses. *Arch. Virol.* 2004;149: 1309-1323

81. Diario Oficial de la Nación: "Norma Oficial Mexicana NOM-031-SSA2-1999, PARA LA ATENCION A LA SALUD DEL NIÑO." (9 de junio de 2000).
82. Food and Nutrition Technical Assistance III Project (FANTA), Tablas de IMC y Tablas de IMC Para la Edad, de niños(as) y adolescentes de 5 a 18 años de edad y Tablas de IMC para adultos(as) no embarazadas, no lactantes ≥ 19 años de edad. Washington, DC.: FHI 360, 2012.
83. Diario Oficial de la Nación: "Norma Oficial Mexicana NOM-043-SSA2-2005, SERVICIOS BÁSICOS DE SALUD. PROMOCIÓN Y EDUCACIÓN PARA LA SALUD EN MATERIA ALIMENTARIA. CRITERIOS PARA BRINDAR ORIENTACIÓN." (18 de octubre de 2004).
84. Catálogo de comunidades, Río Grande (SEDESOL). Disponible en: <http://www.microrregiones.gob.mx/catloc/contenido.aspx?refnac=120760080>. Acceso el 13 de marzo de 2013.
85. Catálogo de comunidades, Llano de la Parota (SEDESOL). Disponible en: <http://www.microrregiones.gob.mx/catloc/contenido.aspx?refnac=120760053>. Acceso el 13 de marzo de 2013.
86. Bustos A, Niveles de marginación, una estrategia multivariada de clasificación. Realidad, datos y espacio. 2011;2(1): 169-186.
87. Presenta coneval estimaciones del índice de rezago social 2010, a nivel municipal y por localidad. Dirección de información y comunicación social. Comunicado de prensa No. 012. (Oct 4, 2010).
88. Consejo Nacional de Población, Índice de marginación por localidad 2010. México, DF.: Consejo Nacional de Población, 2012.
89. Avila-Curiel A, Chávez-Villasana A, Shamah-Levy T, Madrigal-Fritsch H. Child malnutrition in the Mexican rural environment: an analysis of national nutrition surveys. Salud Pública Mex, 1993;35(6):658-66.
90. Avila-Curiel A, Shamah-Levy T, Galindo-Gómez C, Rodríguez-Hernández G, Barragán-Heredia LM. Child malnutrition in the Mexican rural setting. Salud Publica Mex, 1998;40(2):150-60.
91. Chávez Zúñiga MC, Madrigal Fritsch H, Villa AR, Guarneros Soto N. High prevalence of malnutrition among the indigenous early childhood population in Mexico. National Nutrition Survey 1999. Rev Esp Salud Publica, 2003;77(2):245-55.
92. Rivera JA, Monterrubio EA, González-Cossío T, García-Feregrino R, García-Guerra A, Sepúlveda-Amor J. Nutritional status of indigenous children younger than five years of age in Mexico: results of a national probabilistic survey. Salud Publica Mex, 2003;45 Suppl 4:S466-76.
93. Philbrick AM, Ernst ME. Amoxicillin-associated hemorrhagic colitis in the presence of *Klebsiella oxytoca*. Pharmacotherapy. 2007;27(11):1603-7.
94. Cheng VC, Yam WC, Tsang LL, Yau MC, Siu GK, Wong SC, Chan JF, To KK, Tse H, Hung IF, Tai JW, Ho PL, Yuen KY. Epidemiology of *Klebsiella oxytoca*-associated

- diarrhea detected by Simmons citrate agar supplemented with inositol, tryptophan, and bile salts. *J Clin Microbiol*, 2012;50(5):1571-9.
95. Hoffmann KM, Deutschmann A, Weitzer C, Joainig M, Zechner E, Högenauer C, Hauer AC. Antibiotic-associated hemorrhagic colitis caused by cytotoxin-producing *Klebsiella oxytoca*. *Pediatrics*, 2010;125(4):e960-3.
 96. Joainig MM, Gorkiewicz G, Leitner E, Weberhofer P, Zollner-Schwetz I, Lippe I, Feierl G, Krause R, Hinterleitner T, Zechner EL, Högenauer C. Cytotoxic effects of *Klebsiella oxytoca* strains isolated from patients with antibiotic-associated hemorrhagic colitis or other diseases caused by infections and from healthy subjects. *J Clin Microbiol*. 2010;48(3):817-24.
 97. Estrada-Garcia T, Navarro-Garcia F. Enteroaggregative *Escherichia coli* pathotype: a genetically heterogeneous emerging foodborne enteropathogen. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2012;66(3):281-98.
 98. Elias WP, Uber AP, Tomita SK, Trabulsi LR, Gomes TA. Combinations of putative virulence markers in typical and variant enteroaggregative *Escherichia coli* strains from children with and without diarrhoea. *Epidemiol Infect*. 2002;129(1):49-55.
 99. Ochoa TJ, Mercado EH, Durand D, Rivera FP, Mosquito S, Contreras C, Riveros M, Lluque A, Barletta F, Prada A, Ruiz J. Frequency and pathotypes of diarrheagenic *Escherichia coli* in Peruvian children with and without diarrhea. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*. 2011;28(1):13-20.
 100. Mansan-Almeida R, Pereira AL, Giugliano LG. Diffusely adherent *Escherichia coli* strains isolated from children and adults constitute two different populations. *BMC Microbiol*. 2013;13:22.
 101. Guerrant RL, Dickens MD, Wenzel RP, Kapikian AZ. Toxigenic bacterial diarrhea: nursery outbreak involving multiple bacterial strains. *J Pediatr*. 1976;89: 885–891
 102. Guerrant RL, Dickens MD, Wenzel RP, Kapikian AZ. Toxigenic bacterial diarrhea: nursery outbreak involving multiple bacterial strains. *J Pediatr*. 1976;89: 885–891.
 103. Warner RD, Carr RW, McCleskey FK, Johnson PC, Elmer LM, et al. A large nontypical outbreak of Norwalk virus. Gastroenteritis associated with exposing celery to nonpotable water and with *Citrobacter freundii*. *Arch Intern Med*, 1991;151: 2419–2424.
 104. Tschape H, Prager R, Streckel W, Fruth A, Tietze E, et al. Verotoxinogenic *Citrobacter freundii* associated with severe gastroenteritis and cases of haemolytic uraemic syndrome in a nursery school: green butter as the infection source. *Epidemiol Infect*, 1995;114: 441–450.
 105. Bai L, Xia S, Lan R, Liu L, Ye C, Wang Y, Jin D, Cui Z, Jing H, Xiong Y, Bai X, Sun H, Zhang J, Wang L, Xu J. Isolation and characterization of cytotoxic, aggregative *Citrobacter freundii*. *PLoS One*. 2012;7(3):e33054.

12.- ANEXOS

12.1.- Preparación de medios

12.1.1.- Agar Mac Conkey (MCDLAB)

Fórmula por Litro

Peptona gelatina	17.0 g
Mezcla de peptonas	3.0 g
Lactosa	10.0 g
Mezcla de sales biliares	1.5 g
Cloruro de sodio	5.0 g
Agar	13.5 g
Rojo neutro	0.03 g
Cristal violeta	0.001g

En un matraz, suspender 50 gramos de medio en un litro de agua destilada y calentar en ebullición agitando continuamente hasta disolver. Hervir durante un minuto. Esterilizar a 121 °C por 20 minutos. Dejar enfriar 45 a 50 °C, vaciar en cajas Petri unos 20 mL por placa. Dejar solidificar para evitar que se deposite un exceso de humedad en la superficie del medio.

12.1.2.- Agar XLD (MCDLAB)

Fórmula por Litro

Xilosa	3.5 g
L-lisina	5.0 g
Lactosa	7.5 g
Sacarosa	7.5 g
Cloruro de sodio	5.0 g
Extracto de levadura	3.0 g
*Rojo de fenol	0.08 g
Agar	15.0 g
Desoxicolato de sodio	2.5 g
Tiosulfato	6.8 g
Citrato de hierro y amonio	0.8 g
pH final	7.2 ± 0.2

En un matraz, suspender 55 gramos de medio en un litro de agua destilada y calentar en ebullición agitando continuamente hasta disolver. Hervir durante un minuto. Esterilizar a 121 °C por 20 minutos. Dejar enfriar 45 a 50 °C, vaciar en cajas Petri unos 20 mL por

placa. Dejar solidificar para evitar que se deposite un exceso de humedad en la superficie del medio.

*Si se prepara por ingredientes se agrega 40 mL de solución al 0.2% a 960 mL de medio base.

12.1.3.- Agar Salmonella Shigella (MCDLAB)

Fórmula por Litro

Extracto de carne de buey	5.0 g
Peptona o triptosa	8.5 g
Lactosa	5.0 g
Sales biliares	8.5 g
Citrato de sodio	8.5 g
Tiosulfato férrico	10.0 g
Citrato férrico	13.5 g
Verde brillante (solución acuosa peso/vol. V/a al 0.1%)	2.5 mL
Rojo Neutro (solución peso/vol. Al 1%)	0.33 g
Agar	1.0 g

En un matraz, suspender 60 gramos de medio en un litro de agua destilada y calentar en ebullición agitando continuamente hasta disolver. Hervir durante un minuto. Esterilizar a 121 °C por 20 minutos. Dejar enfriar 45 a 50 °C, vaciar en cajas Petri unos 20 mL por placa. Dejar solidificar para evitar que se deposite un exceso de humedad en la superficie del medio.

12.1.4.- Agar TCBS (MCDLAB)

Fórmula por litro

Agar	14.0 g
Azul de bromotimol	0.04 g
Azul de timol	0.04 g
Bilis de buey	5.0 g
Citrato férrico	1.0 g
Citrato de sodio	10.0 g
Cloruro de sodio	10.0 g
Desoxicolato de sodio	3.0 g
Extracto de levadura	5.0 g
Polipectona	10.0 g
Sacarosa	20.0 g
Tiosulfato de sodio	10.0 g
pH final	6.8 ± 0.2

En un matraz, suspender 88 gramos de medio en un litro de agua destilada y calentar en ebullición agitando continuamente hasta disolver. Hervir durante un minuto. Esterilizar a 121 °C por 20 minutos. Dejar enfriar 45 a 50 °C, vaciar en cajas Petri unos 20 mL por placa. Dejar solidificar para evitar que se deposite un exceso de humedad en la superficie del medio.

12.1.5.- Agar sulfito de bismuto (CONDA)

Fórmula por litro

Mezcla de peptona	10.0 g
Extracto de carne	5.0 g
Dextrosa	5.0 g
Fosfato dipotásico	4.0 g
Sulfato ferroso	8.0 g
Indicador de sulfito de bismuto	0.3 g
Verde brillante (solución acuosa al 5% p/vol)	5.0 mL
Agar	20.0 g
pH final	7.5

En un matraz, suspender 88 gramos de medio en un litro de agua destilada y calentar en ebullición agitando continuamente hasta disolver. Hervir durante un minuto. Esterilizar a 121 °C por 20 minutos. Dejar enfriar 45 a 50 °C, vaciar en cajas Petri unos 20 mL por placa. Dejar solidificar para evitar que se deposite un exceso de humedad en la superficie del medio.

12.1.6.- Citrato de Simmons (Bioxon, BD)

Fórmula por Litro

Fosfato dihidrogenado de amonio	1.0 g
Fosfato dipotásico	1.0 g
Cloruro de sodio	5.0 g
Citrato de sodio	2.0 g
Sulfato de magnesio	0.2 g
Agar	15.0 g
Azul de bromotimol	0.08 g
pH final	6.9 ± 0.2

En un matraz, suspender 24.2 gramos de medio en un litro de agua destilada y calentar en ebullición agitando continuamente hasta disolver y ajustar el pH. Hervir durante

un minuto. Distribuir en tubos de 13 X 100 un volumen de 4 mL. Esterilizar a 121 °C por 20 minutos. Medir el pH después de esterilizar, los tubos se enfrían en posición inclinada de modo que el medio de cultivo en el fondo alcance una profundidad de 1.0 a 1.5 cm.

12.1.7.- Medio MIO (Bioxon, BD)

Fórmula por Litro

Extracto de levadura	3.0 g
Peptona de gelatina	10.0 g
Peptona de caseína	10.0 g
OL-ornitina	5.0 g
Glucosa	1.0 g
Agar	2.0 g
Púrpura de bromocresol	0.02 g
pH final	6.5

En un matraz, suspender 31 gramos de medio en un litro de agua destilada y calentar en ebullición agitando continuamente hasta disolver y ajustar el pH. Hervir durante un minuto. Distribuir en tubos de 13 X 100 un volumen de 4 mL. Esterilizar a 121 °C por 20 minutos. Medir el pH después de esterilizar, dejarlos en reposo en posición vertical y ajustar las tapas.

12.1.8.- Caldo tetratiónato (DIFCO)

Fórmula por Litro

Mezcla de peptonas	5.0 g
Sales biliares	1.0 g
Carbonato de calcio	10.0 g
Tiosulfato de sodio	30.0 g
pH final	8.0

Mezclar bien y calentar a ebullición. Suspender y dejar enfriar, envasar en tubos de 16 X 150 con tapón de rosca un volumen de 10 mL cada uno. No esterilizar en autoclave. Momentos antes de usarlo agregar 0.2 mL (de 3 a 4 gotas) de la siguiente solución de yodo yodurada a cada tubo.

Yodo en cristales	6.0 g
Yoduro de potasio	5.0 g
Agua destilada	20.0 mL

12.1.9.- Agua peptonada alcalina

Fórmula por Litro

Peptona de caseína (MCDLAB)	10.0 g
Cloruro de sodio	10.0 g
pH final	9.0 ± 0.2

Pesar la cantidad con exactitud. Tal como se indica en el prospecto, rehidratar con agua destilada, calentar suavemente hasta la disolución, ajustar al pH indicado y distribuir en tubos de 16 x 150 con tapón de rosca un volumen de 10 mL. Esterilizar a 15 lb por 20 min. Tomar lectura de pH después de esterilizar. Enfriar y ajustar las tapas de roscas.