

Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua, León

Facultad de Ciencias Médicas

Departamento de Microbiología y Parasitología

Carrera de Bioanálisis Clínico



Tesis para optar al título de Licenciada en Bioanálisis Clínico.

***Escherichia coli* enterohemorrágica O157 en pacientes con diarrea severa atendidos en el Hospital Materno Infantil de la ciudad de Chinandega.**

Autoras:

- Br. Melania Gabriela López Garay
- Br. Luisa Adela López Mercado.

Tutores:

Dr. Samuel Vílchez.

Profesor Titular

Dpto. Microbiología y Parasitología

Lic. Yaoska Reyes, MSc

Profesora

Dpto. Microbiología y Parasitología

Mayo, 2013

“A LA LIBERTAD POR LA UNIVERSIDAD”

Dedicatoria:

Esta tesis se la dedico a mi Padre Celestial el que me ha dado la vida, me ha llenado de gozo, paz, confianza, es solamente por Él que hoy he llegado hasta donde estoy. Él me ha guiado y ha sido el mejor consejero que he tenido, de su mano me ha llevado para emprender mis camino; al tropezar me ha levantado, con su tierno amor me ha enseñado, y con su dulce corrección me ha hecho a su voluntad. Lo precioso de esta vida es estar en sus caminos Gracia PADRE lo que soy yo es por Ti.

De: Luisa Adela López Mercado.

Dedicatoria:

A Dios que me ha dado la vida, sabiduría y el entendimiento para poder culminar con éxito esta tesis, ÉL siempre ha estado a mi lado en los momentos en que más lo he necesitado, me ha dado las fuerzas para no desistir y seguir siempre adelante para alcanzar todas las metas que me he propuesto, este nuevo triunfo que formara parte de mi vida también se lo dedico a mi hijo Santiaguito López que él me ha dado las fuerzas y la perseverancia, desde que llego a mi vida ha sido mi más grande motivación para brindarle un mejor futuro y ser un ejemplo para él.

De: Melania G, López Garay.

Agradecimiento:

Doy gracias a DIOS que me ha dado las fuerzas y sabiduría para poder culminar mis estudios.

Mi madre por siempre estar a mi lado apoyándome, dándome consejos, gracias por inculcar en mí el deseo de superación y el deseo de siempre seguir adelante sin importar los obstáculos que se pusieran en mi camino.

A mi abuelo por apoyarme siempre, su apoyo ha sido de gran ayuda para lograr culminar mis estudios, más que un abuelo es mi padre y siempre le estaré muy agradecida por tantos sacrificios que ha hecho por nosotros.

A toda mi familia que me ha brindado su apoyo y confianza en todo el trascurso de mi vida.

A Luis López por su paciencia, confianza, comprensión y por todo el apoyo que me has brindado en este tiempo que llevamos juntos.

A nuestro tutores Dr. Samuel Vílchez y Lic. Yaoska Reyes, que durante este estudio y parte de toda nuestra carrera, nos permitieron su tiempo y parte de sus conocimientos. Gracias por la paciencia, apoyo y confianza.

Docentes que laboran en el campus medico gracias por su esmero para educar tantas generaciones de Bioanalistas Clínicos de los que hoy tenga la dicha formar parte.

A todo el personal del Hospital Materno Infantil de Chinandega por apoyarnos para la realización de este estudio.

De: Melania G, López Garay.

Agradecimiento:

Doy gracias a DIOS quien es el único que me ha dado las fuerzas y sabiduría para poder culminar mis estudios.

Mi mami por haberme enseñado siempre con sus palabras, ejemplo y amor la importancia de la vida, lo importante de ponerme metas y poder alcanzarlas siempre poniendo a Dios en primer lugar, eso es lo que hoy me hace mejor persona. “Gracias MAMI porque con su ejemplo de confiar solamente en Dios para poder sacarnos adelante a mi hermana y a mi; me inspira cada día a seguir su ejemplo”.

Mi mamita que con su amor, apoyo y firmeza me ha enseñado a salir adelante esforzándome y levantándome en cada caída para poder terminar lo que me proponga.

Mi hermana la cual me ha inspirado a esforzarme y trabajar duro para poder seguir adelante siempre teniendo confianza en Dios.

Mis segundos padres (Dr. Carlos Navarrete y Lic. Ángela Mercado), gracias por ser unos padres para mi, por apoyarme siempre, por estar pendiente en cada día de mi vida y darme su amor como una hija mas de ustedes.

Quiero darles muy especialmente las gracias a mi Esposo el hombre que Dios puso en mi camino. “Gracias Amor porque con tu paciencia, apoyo, comprensión, confianza y amor me llenas de animo para luchar mas, este amor que se hace mas grande. Hoy tenemos el fruto de nuestro amor nuestra BB Luisangela de Jesús que nos completa para luchar por alguien en nuestro futuro y así seguir adelante alcanzando mas éxito.”

A mi suegrita que también con su apoyo esta ahí para mí junto con mi cuñada y doña Marina, a toda mi familia que siempre me han apoyado brindándome sus conocimientos, ayuda y amor.

A nuestros tutores Dr. Samuel Vílchez y Lic. Yaoska Reyes, que durante este estudio y parte de toda nuestra carrera, nos permitieron su tiempo y parte de sus conocimientos. Gracias por la paciencia, apoyo y confianza.

Docentes y colaboradores del Campus Médico todos ellos influyeron en parte de mi educación dándome un poco de sus conocimientos y a todo el personal del HMICH por su apoyo.

De: Luisa Adela López Mercado.

Abreviaturas.

- **ADN:** Acido Desoxirribonucleico.
- **ARN:** Acido Ribonucleico.
- **ATCC:** American Type Culture Collection.
- **CH:** Colitis Hemorrágica.
- **dNTPs:** Dinucleótidos Trifosfatos.
- **EDA:** Enfermedad Diarreica Aguda.
- **ECAD:** *Escherichia coli* adherente difusa.
- **ECEA:** *Escherichia coli* enteroagregativa.
- **ECEH:** *E. coli* enterohemorrágica.
- **ECEI:** *Escherichia coli* enteroinvasiva.
- **ECEP:** *Escherichia coli* enteropatogénica.
- **ECET:** *Escherichia coli* enterotoxigénica.
- **ELISA:** Ensayo Inmuno Enzimático (Enzyme Linked Immunoassay).
- **OMS:** Organización Mundial de la Salud.
- **PCR:** Reacción en Cadena de la Polimerasa (Polimerase Chain Reaction).
- **PTT:** Púrpura Trombótica Trombocitopenica.
- **rpoS:** factor de transcripción sigma.
- **Stx:** Toxina Shiga.
- **SUH:** Síndrome Urémico Hemolítico.

Resumen

En los últimos años la enfermedad diarreica aguda (EDA) ha sido considerada una patología de gran impacto de salud pública a nivel mundial. En Nicaragua esta enfermedad es la segunda causa de morbilidad infantil. Uno de los agentes entéricos asociados a diarrea es la *Escherichia coli* enterohemorrágica (ECEH), principalmente el serogrupo O157, del cual existe poca información en el país. En el presente estudio se identificó la frecuencia de ECEH O157, en 95 casos de diarrea severa en niños menores de 5 años del municipio de Chinandega; Encontrándose un 11.6% (11/95) de muestras positivas para ECEH, ya sea solas o en asociación con otros agentes. Al realizar la caracterización molecular de las 11 cepas, el 90.9% (10/11) fueron *vt1* y la cepa faltante presentó el fragmento correspondiente al gen *rfb* O157 (339 bp), además de *vt1-vt2*. Siendo este un hallazgo de gran relevancia clínico-epidemiológico, ya que es el primer reporte de ECEH O157 asociada a un cuadro de diarrea en niños de nuestro país. El total de casos positivos para ECEH ocurrieron en niños entre las edades de 0-24 meses ($P=0.001$), por lo que se puede especular que los niños menores de 2 años están más propensos a presentar una infección por este tipo de bacteria en nuestro medio.

Índice.

1. INTRODUCCION	1
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	4
3. OBJETIVOS	5
5. MARCO TEÓRICO	6
6. DISEÑO METODOLOGICO	14
7. RESULTADO	19
8. DISCUSIÓN	24
9. CONCLUSIÓN	28
10. RECOMENDACIONES	29
11. BIBLIOGRAFÍA	30
12. ANEXOS	34

Introducción.

En los últimos años la enfermedad diarreica aguda (EDA) ha sido considerada una patología de gran impacto en la salud pública, y una causa muy importante de desnutrición. La mortalidad por EDA en los niños ha descendido de 4,5 millones en 1979 a 1,4 millones en el 2004. A partir de 1978 la Organización Mundial de la Salud (OMS) inicio un Programa de Control de las Enfermedades Diarreicas (CED) con el objetivo de disminuir la mortalidad, morbilidad y desnutrición. Sin embargo, sigue cobrando muchas víctimas entre los niños de los países en vía de desarrollo ocupando el segundo lugar entre las principales causas de morbi-mortalidad infantil a nivel mundial. ⁽¹⁻³⁾

La gran variedad de manifestaciones clínicas que se observan en las enfermedades diarreicas agudas es equiparable a la gran diversidad de agentes infecciosos que las originan. La mayoría de estos agentes entéricos se transmiten por vía fecal-oral, a través de contactos directos personales, o con mayor frecuencia, al ingerir alimentos y agua contaminadas con los microorganismos patógenos que están en las heces de humanos o de animales. Los principales agentes entéricos asociados a diarrea son virus, bacterias, levaduras y parásitos patógenos. ⁽¹⁾ Entre las bacterias patógenas asociadas a la EDA están las *Escherichia coli* diarreogénicas, pudiéndose clasificar en 6 patotipos:

- a) *E. coli* productora de verocitotoxinas (ECVT)/*E. coli* enterohemorrágica (ECEH)
- b) *E. coli* enterotoxigénica (ECET)
- c) *E. coli* enteropatógena (ECEP)
- d) *E. coli* enteroinvasora (ECEI)
- e) *E. coli* enteroagregativa (ECEA)
- f) *E. coli* adherente difusa (ECAD)

La ECEH fue descrita por primera vez como patógeno humano en 1982, en brotes caracterizados por diarreas sanguinolentas o colitis hemorrágicas (CH). Estos ocurrieron en Michigan y Oregón, EE.UU relacionados con la ingesta de hamburguesas en restaurantes de comidas rápidas. El serogrupo de las ECEH más asociado a la EDA y/o CH es el O157. Reportándose éste hoy en día como una causa común de brotes de diarrea con sangre y síndrome urémico hemolítico (SUH) en los Estados Unidos. ^(3,4) Dos brotes en personas Estadounidenses con diarrea por *E. coli* O157 encontrados en la literatura

son: el de Enero de 1993 y el ocurrido entre Marzo y Julio del 2009 afectando en su mayoría a niños (5, 6)

A nivel mundial las ECEH están asociadas a brotes causantes de CH y SUH, por ejemplo en el viejo continente un brote reciente fue reportado por el Instituto Robert Koch en junio del 2011 en Alemania. En este ocurrieron 39 casos fatales, 810 casos de SUH y 2,684 casos de diarrea con o sin sangre en pacientes infectados por una cepa ECEH del serogrupo O104. Datos de la OMS indican que esta cepa se esparció al resto de Europa, inclusive reportándose casos en Canadá y los Estados Unidos ⁽⁷⁾

En nuestro continente, específicamente en Argentina, el SUH es endémico y una importante causa de insuficiencia renal aguda en niños <5 años. De igual manera en Chile y Uruguay, el SUH ocurre en 4-5 por cada 100.000 niños <5 años, en quienes constituye la principal causa de fallo renal. Sin embargo, los serotipos más comúnmente aislados antes del 2004 en Uruguay fueron O111, O26 y O145. Por otro lado, en Chile un estudio realizado por *Zambrano y cols* en el 2005, encontró en pacientes internados por SUH en 5 hospitales de Santiago entre 1990 - 2002 un agente etiológico en 17% de los casos. El 69% de estos estaba relacionado a *E. coli*, distribuyéndose de la siguiente manera el 9 % O157:H7, 2% O125, 2% O114, 9% O142 y un 47% no tipificable. ⁽⁸⁻¹¹⁾

En 1996 en Costa Rica, se reporta el primer caso de *E. coli* O157:H7 como causa de diarrea asociada a SUH. En este estudio, se analizaron cuatro muestras de heces de niños menores de dos años con sospecha de SUH, aislándose en dos de los casos *E. coli* O157:H7. Otro ejemplo, es el realizado en el año 2000 siempre en Costa Rica, reportándose un caso de SUH asociado a *E. coli* O157:H7 en un paciente VIH+. ⁽¹²⁻¹³⁾

En Nicaragua la enfermedad diarreica aguda (EDA) es la segunda causa de morbilidad infantil. ⁽¹⁴⁾ Un estudio por *Vílchez y cols.*, en el 2009, demostró en Nicaragua por primera vez que las ECEH estaban asociadas al 1.9% de los casos de diarrea infantil que no requerían hospitalización y a un 2.9% de los casos de diarrea severa, en la ciudad de León. Sin embargo, en este estudio no se investigó los serogrupos a los que pertenecen las cepas ECEH identificadas. Otro estudio realizado por *Ramírez y cols.*, en el 2011 encontró ECEH O157 en muestras de heces de terneros empleando un ensayo de PCR Múltiple. Un tercer estudio, con muestras fecales de bovinos provenientes de fincas

aldeñas de la ciudad de León, realizado por *Ruiz y cols.*, en el 2012, encontró relación fenotípica entre las cepas aisladas de bovinos con cepas aisladas de niños del primer estudio aquí descrito. ⁽¹⁵⁻¹⁷⁾

Los niños nicaragüenses están altamente expuestos a una diversidad de patógenos entéricos causantes de diarrea, siendo el Rotavirus el de mayor importancia médica antes de la introducción de la vacuna RV5. Esta vacuna puede tener un impacto en la distribución etiológica de los agentes antes mencionados. Lo cual se puede especular con el hecho que el número de consultas por diarrea no ha disminuido y si ha decrecido los casos asociados a Rotavirus. El presente estudio tiene como propósito investigar casos de diarrea severa del municipio de Chinandega asociadas a ECEH casi 6 años después de la introducción de la RV5.

2. Planteamiento del problema.

¿Cuál es la frecuencia de ECEH O157 en niños menores de 5 años con diarrea severa atendidos en el Hospital Materno Infantil Mauricio Abdalah de la ciudad de Chinandega?

3. Objetivos

3.1 Objetivo General

- Investigar la frecuencia de ECEH O157 en pacientes menores de 5 años con diarrea severa atendidos en el Hospital Materno Infantil Mauricio Abdalah de la ciudad de Chinandega.

3.2 Objetivos Específicos

- a. Identificar por métodos moleculares las características de las cepas de ECEH aisladas de casos de diarrea severas y si estas pertenecen al serogrupo O157.
- b. Correlacionar las características clínicas y epidemiológicas de los pacientes estudiados con la presencia de ECEH.

4. Marco teórico.

4.1 *Escherichia coli* enterohemorrágica

Existen seis patotipos principales de la bacteria *E. coli* diarreogénicas que produce gastroenteritis en el hombre. Entre las cuales encontramos la ECEH, la cual elabora dos verocitotoxinas VT1 y VT2, que inducen severos daños en la mucosa intestinal. El prototipo es el serotipo O157 responsable de la mayoría de los casos atribuidos a esta bacteria. ⁽¹⁾

ECEH O157 fue descrita por primera vez como patógeno humano en 1982 durante dos brotes de CH ocurridos en Oregón y Michigan, EE.UU; debido al consumo de hamburguesas de restaurantes de comidas rápidas. El serotipo O157 es el prototipo de *E. coli* que produce grandes cantidades de toxinas que causan severos daños a la mucosa intestinal. Estas toxinas están muy relacionadas a las toxinas que produce la *Shigella dysenteriae* tipo 1. ^(1, 4, 19)

La ECEH agrupa a muchos serotipos aislados de casos de CH y SUH en humanos. Entre los serogrupos asociados a enfermedades en humanos y animales están: O26, O103, O111, O145, O91, O104, O113, O117, O118, O121, O128. El cuadro clínico causado por las cepas no-O157 se caracteriza por diarrea acuosa con dolor abdominal y CH, siendo capaces de causar brotes o casos aislados de diarrea. ^(1, 3, 4)

Habitualmente la infección en los seres humanos ocurre por la ingesta de alimentos contaminados. La mayoría de los brotes están asociados al consumo de productos cárnicos contaminados e insuficientemente cocidos. ^(1, 4)

Las bacterias presentes en la ubres de las vacas o en las herramientas de ordeño pueden también contaminar la leche por lo cual la leche cruda o no pasteurizada también ha estado involucrada en algunos casos de enfermedad, tanto como el agua y vegetales fertilizados con material orgánico pueden ser fuentes de la infección. ^(1, 20-22)

Otros modos de transmisión son de persona a persona por la ruta fecal-oral o por contacto directo del hombre con los animales. La mayoría de las personas expulsan ECEH O157 durante aproximadamente 7 a 9 días; una minoría puede excretar el organismo durante 3 semanas o más luego del comienzo de los síntomas. En pocos casos la excreción puede continuar durante varios meses. ^(1, 20-21, 23)

4.2 Manifestaciones Clínicas:

4.2.1 Infecciones Asintomáticas y Diarrea sin sangre: La mayoría de las infecciones aparecen después de 3-4 días. Los casos de infección asintomática por *E. coli* O157 han sido localizados en ocasiones en algunos brotes, aunque ha resultado complicado estimar su incidencia, debido a que las muestras fecales de las personas implicadas rara vez son recolectadas para su cultivo. No obstante, los análisis microbiológicos practicados a evacuaciones sin sangre asociadas a brotes han demostrado que la frecuencia de *E. coli* O157 es relativamente pequeña. ^(21, 23)

4.2.2 Colitis Hemorrágica (CH): La CH ocurre en el 90% de casos y es caracterizada por periodos de diarrea con sangre visible luego de 1-3 días de iniciada la diarrea. Los pacientes reportan náusea, vómitos, dolor abdominal normalmente más severo al aparecer la sangre, y en algunos casos, por calambres abdominales severos, fiebre de bajo grado; en otros, la fiebre está ausente, y la deshidratación es posible. Algunos casos de CH están limitados y se resuelven en aproximadamente una semana. La colitis severa puede producir afectaciones severas al colon. ^(21, 23)

4.2.3 Síndrome Urémico Hemolítico (SUH): El SUH fue descrito por primera vez por Gasser en el año 1955. Los niños menores de 5 años y los ancianos son los grupos más vulnerables. El SUH ocurre en el 15% de los niños entre las edades de 10 años diagnosticado con *E. coli* O157. Este síndrome es la causa más frecuente de insuficiencia renal aguda en la infancia y la segunda de insuficiencia renal crónica a nivel mundial. ⁽²⁴⁻²⁶⁾

El SUH se caracteriza clínicamente por anemia hemolítica aguda, trombopenia con equimosis y petequias, insuficiencia renal e hipertensión arterial puede existir afectación de otros órganos: enterocolitis, afectación neurológica, disfunción hepática, o afectación cardiaca y pancreática. Aparece generalmente en niños, sin predominio de sexo. ⁽²⁷⁾

Unas de las causas de SUH es la toxina O157:H7 de *E. coli*. La progresión de la infección por *E. coli* O157:H7 a SUH sucede en el 2% al 7% de los casos esporádicos y hasta un 30% de los casos epidémicos. La mayor parte de los brotes se producen por la ingesta de carnes poco cocidas la transmisión puede ser de persona a persona, el principal síntoma es la diarrea sanguinolenta, la mayoría de los pacientes, están oligúricos en el momento del ingreso, la duración media de los síntomas antes del diagnóstico es de 6 días, es común la hipertensión fiebre. Los hallazgos del laboratorio son trombocitopenia, anemia hemolítica microangiopática y los propios de la insuficiencia renal aguda. ⁽²⁷⁾

4.2.4 Purpura Trombocitopénica Trombótica (PTT): Es una microangiopatía trombótica caracterizada por el depósito de agregados plaquetarios que obstruyen la microcirculación que afecta a órganos vitales, tales como el cerebro, corazón, el hígado y riñones. En la patogenia se han involucrado tanto un aumento de sustancias proagregantes contenidas en el plasma de estos pacientes, como daño endotelial por fenómenos autoinmunes y toxinas. ⁽²⁷⁾

La PTT incluye cinco síntomas: anemia hemolítica microangiopática, trombopenia, fiebre, afectación renal y afectación neurológica, coexistiendo en solo el 50% de los pacientes y siendo la anemia y la trombopenia las más comunes. El diagnóstico es esencialmente clínico hematológico, no existiendo ningún dato de laboratorio específico de la enfermedad. Los signos biológicos son la anemia hemolítica microangiopática y la presencia de esquistosito, junto a la trombopenia; la insuficiencia renal suele aparecer tardíamente. ⁽²⁷⁾

4.3 Patogenia y factores de virulencia

Las verocitotoxinas juegan un papel importante en la patogenicidad de las ECEH, el más común de los serotipos de ECEH que produce verotoxina es el O157:H7 que se caracteriza principalmente por poseer un gen insertado por un bacteriófago Stxφ en el cromosoma bacteriano que codifica una potente toxina denominada “toxina Shiga” (Stx) por su relación biológica y estructural con la toxina Shiga sintetizada por *Shigella dysenteriae* tipo 1. También, se les llama verotoxinas por su actividad citotóxica sobre las células vero *in vitro*. La Stx constituye el principal factor de patogenicidad y la característica distintiva de ECEH ⁽²⁸⁻²⁹⁾.

La familia de las toxinas Stx contiene 2 miembros principales que actúan como N-glicosidasas altamente específicas que no cruzan inmunológicamente, denominados Stx1 y Stx2; una misma cepa de ECEH puede sintetizar una de ellas o ambas, e inclusive, múltiples variantes de Stx2. Estas toxinas poseen la estructura de las holotoxinas, que consta de una subunidad A central la cual puede ser fragmentada proteolíticamente, produciendo un fragmento A1 de 28 kDa, y otro A2 de 4 kDa, los cuales permanecen juntos a través de un puente disulfuro, el péptido A1 es el que posee la actividad enzimática, el A2 es responsable de la unión no covalente de la subunidad A al pentámero que integra la subunidad B la cual tiene un peso molecular de 7.500 Da y tiene la función de mediar la fijación de la toxina a las células blanco ⁽²⁸⁻²⁹⁾.

La Stx1 es similar a la toxina producida por *Shigella dysenteriae* tipo 1, excepto en algunos casos en los que se encuentra un residuo de aminoácido de diferencia; los prototipos Stx1 y Stx2 manifiestan una homología de secuencia de 55 y 57% en las subunidades A y B respectivamente, existen variantes en *vt2* designadas: *vt2c*, *vt2d*, *vt2e*, *vt2f*, mientras *vt1* es altamente conservada. ^(29,30)

La patogénesis involucra un proceso de múltiples pasos, de complejas interacciones entre la bacteria y el huésped. La etapa más temprana en el proceso de la enfermedad es la ingesta de alimento contaminado con ECEH, que es capaz de resistir la acidez gástrica. Este fenotipo es mediado por *rpoS* que codifica un factor sigma de fase estacionaria que le permite sobrevivir por más de dos horas a pH por debajo de 2.5; una vez que ha atravesado el estómago, de la ECEH se establece en las regiones terminales del intestino permaneciendo limitada a la superficie de la mucosa (sin invadir de forma sistémica); para evitar su absorción por el flujo peristáltico y así poder colonizar y multiplicarse dentro del colon, desde donde secretan sus poderosas toxinas Shiga. Esta actúa directamente a través de la subunidad B uniéndose a su receptor específico, el glucolípido globotriaosilceramida (Gb3), presente en la superficie celular de las células eucariontes y 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. ^(24, 26, 28-30)

El receptor de la gran mayoría de las Stx es el glucolípido Gb3, el de la Stx2e es el Gb4; en este sentido, la Stx2e se relaciona con el edema en cerdos, más que con diarrea en humanos aunque,

ocasionalmente, algunas cepas que expresan esta variante se han aislado a partir de pacientes con SUH o síndrome diarreico. Una vez fijada la toxina a su receptor, es internalizada y transportada al aparato de Golgi (por un mecanismo de endocitosis) y posteriormente, hasta el retículo endoplásmico rugoso donde la subunidad A es internalizada y clivada en dos partes por una proteasa. El componente A1 luego se une al ribosoma e inactiva catalíticamente la subunidad ribosomal 60S al liberar un residuo específico de adenina en el rRNA 28S bloqueando de esta forma la síntesis proteica produciendo de esta manera la muerte de las células que poseen el receptor tales como las de epitelio intestinal y endotelio renal. Se han sugerido varias formas en que la toxina puede llegar al torrente sanguíneo y de aquí al riñón: por daño al epitelio intestinal, por mediadores inflamatorios, por espacios entre las células o incluso atravesando el epitelio intestinal intacto. El daño a las células endoteliales conduce al estrechamiento de la luz de los capilares, a esto se le suma el depósito de plaquetas y fibrinas que obstruyen la microvasculatura renal disminuyendo la tasa de filtración glomerular y fragmentando los eritrocitos ⁽²⁸⁻³¹⁾.

4.4 Tratamiento

Cualquier niño que tenga diarrea con sangre o severa y desnutrición grave debe ser referido de inmediato al hospital, recibir líquidos apropiados para tratar la deshidratación y una dieta blanda. La mayoría de las personas se recuperan sin antibióticos u otro tratamiento específico en el lapso de 5 a 10 días. Los antibióticos deben evitarse ya que estos no logran reducir síntomas, ni disminuir las evacuaciones; al contrario se piensa que el tratamiento con algunos de ellos puede aumentar el riesgo a desarrollar SUH, este requiere en la mayoría de los casos hospitalización en una unidad de cuidados intensivos en la fase aguda, para la inspección de los parámetros bioquímicos y hematológicos, debido a que el tratamiento es fundamentalmente de soporte. En la mayoría se requieren transfusiones de sangre y diálisis, los pacientes que desarrollan falla renal irreversible pueden necesitar un trasplante de riñón. El 91 % de los niños con PTT causada por SUH sobreviven con cuidados médicos de apoyo, sin necesidad de tratamiento con plasma. ^(3, 20,23, 26)

4.5 Diagnóstico de infecciones por *E. coli* productoras de verocitotoxinas:

Los métodos actualmente disponibles utilizados para detectar este patógeno en muestras clínicas son:

4.5.1 Método presuntivo:

a) Aislamiento de ECEH en deposiciones utilizando el medio de cultivo selectivo MacConkey:

En este medio selectivo las colonias características de *E. coli* son lactosa positiva, miden de 2 a 4 mm, convexas, con bordes regulares y una depresión umbilical en el centro de la colonia, de color rosado intenso rodeadas de un halo de color rosado menos intensos formado por la precipitación de las sales biliares.

b) Pruebas Bioquímicas:

Luego del aislamiento en este medio el siguiente paso sería las pruebas bioquímicas correspondientes las cuales darán las siguientes reacciones de las cepas de *E. coli* ⁽¹⁸⁾:

Tabla No. 1: Características Bioquímicas de *Escherichia coli*.

PRUEBA	TSI	LIA	MOVILIDAD	INDOL	ORNITINA	UREA	CITRATO	MALONATO
REACCIÓN	A/AG	K/Kg	+	+	+/-	-	-	+

c) Aislamiento de ECEH en el medio de cultivo selectivo MacConkey Sorbitol (SMAC):

Este medio es recomendado para aislar ECEH ya que permite diferenciar cepas de *E. coli* fermentadoras de sorbitol de las no fermentadoras. La *E. coli* fermenta el sorbitol en menos de 24 horas a excepción del serotipo O157 que lo hace en más de 24 horas de incubación. En la placa de SMAC ECEH O157 desarrollan colonias pequeñas, incoloras y translúcidas. ^(18,32)

El cultivo es sensible dependiendo el período de la infección, cuando la muestra de heces es tomada dentro de los dos primeros días del comienzo de la diarrea, la recuperación del agente es del 100%, disminuye a 91.7% dentro de los 3 a 6 días y a 33% después de los 6 días. Cuando el SUH se manifiesta, la ECEH O157:H7 se encuentra presente sólo en el 30 a 50 % de los casos. ^(18,32)

4.5.2 Métodos confirmatorios:

Estos incluyen una gran diversidad de técnicas orientadas a identificar los genes de virulencia descritos para ECEH O157:H7 entre los cuales se mencionan:

- a. **Hibridación con sondas genéticas para el gen *hly*, sonda para *stx1* y *stx2* y sonda *eae*:** Sonda genética, son fragmento de ADN (o ARN), homólogo a una secuencia celular de ADN (o ARN), que es capaz de unirse por hibridación con esa secuencia celular de forma estable y altamente específica por reasociación entre bases complementarias independientemente de la concentración o abundancia de esa secuencia de ácido nucleico que se busca, de la célula. En la muestra en estudio una sola sonda puede reconocer su homólogo único entre millones. La necesidad de determinar la presencia de los genes *stx1* y *stx2*, permitió el desarrollo de las sondas de ADN para la detección de ECEH. Inicialmente, las sondas eran etiquetadas con P³² o S³⁵ y fueron utilizadas para probar una gran cantidad de aislados de *E. coli* para la presencia de genes *stx* por hibridación de un fragmento de ADN de la colonia con la sonda marcada. Estos procedimientos son altamente sensibles y específicos, y cuando son rigurosas las condiciones en las que se realiza, las cepas que poseen *stx1* y *stx2*, o ambas, pueden ser distinguidas. ⁽³³⁾

- b. **Detección de genes *vt1*, *vt2*, *hly* y *eae* por PCR:** Kary B. Mullis, en 1986 inventó un método para lograr la multiplicación *in vitro* de fragmentos definidos de ADN conocida como reacción en cadena de la polimerasa (conocida así por sus siglas en inglés “*Polymerase Chain Reaction*”). Este permite producir múltiples copias de un fragmento de ADN *in vitro* utilizando cebadores (primers) específicos. Esta amplificación se produce de forma exponencial, lo cual nos permite a partir de una sola molécula obtener más de un millón de moléculas, luego de 30 ciclos de termociclado. Estos amplímeros luego son separados a través de electroforesis y generalmente visualizados con radiación UV. En el caso específico para cepas ECEH, se utilizan primers que amplifican un fragmento de la región conservada de los genes *eae*, *vt1* y *vt2*. ⁽³⁴⁾

- c. **Ensayo de citotoxicidad en cultivo de tejidos utilizando las líneas celulares Vero y HeLa:** La sensibilidad de células Vero (células de riñón de mono verde). La citotoxicidad para esta línea celular sigue siendo el patrón de oro para la confirmación de aislamientos de *E. coli* productor de toxina

shiga. Estas células tienen una alta concentración de Gb3 y de Gb4 en sus membranas plasmáticas, y pueden ser utilizadas para detectar todas las variantes de Stx conocidas. Las células HeLa (células de carcinoma cérvicouterino) también se han utilizado, pero esta línea celular carece de Gb4 y por lo tanto es menos sensible a Stx2. ⁽³³⁾

- d. Técnica inmunoenzimática para detección de cepas de *E. coli* que están expresando la producción de las citotoxinas, usando anticuerpos específicos y un sistema de detección:** Los análisis mediante ELISA (conocida así por sus siglas en inglés Enzyme Linked Immunoassay), juegan un papel importante en el diagnóstico, porque pueden detectar la presencia de ECEH (o de otra especie que produzca Stx), de cualquier serogrupo. Actualmente se han creado muchas variantes de esta técnica diagnóstica, siendo su principal desventaja las diferentes sensibilidades de los ensayos disponibles. ⁽³³⁾
- e. Serotipificación de los aislados:** La caracterización de ECEH O157:H7 se basa en la comprobación de antígeno de la pared O157 y el antígeno flagelar H7 esto es llevado de la siguiente manera:⁽¹⁸⁾
1. Caracterización de los antígenos somáticos O: se requiere cultivo puro de 24 horas en Agar Nutritivo y Agar Tripticosa Soya, se verifica que la cepa no sea autoaglutinable en solución salina sobre una lámina de lo contrario posiblemente sea una cepa rugosa no apta para la caracterización serológica.
 2. Serotipificación polivalente somática: en menos de 1 minutos se observa la formación de grumos homogéneos al someter un pequeño inóculo de cepa fresca a una gota del antisuero O157.
 3. Caracterización del antígeno flagelar H: para la determinación de este antígeno se requiere la siembra previa de la cepa en estudio en el medio Craigy para luego tomar una colonia de este medio y realizar la aglutinación en lámina con el antisuero H7 observándose para ECEH O157:H7 una aglutinación en grumos finos.

5. Diseño metodológico.

- **Tipo de estudio:** Descriptivo de corte transversal.
- **Área de estudio:** Hospital Materno Infantil Mauricio Abdalah.
- **Población de Estudio:** Todos los pacientes con diarrea severa hospitalizados en el hospital Materno Infantil Mauricio Abdalah.
- **Muestra:** Aproximadamente 95 pacientes con diarrea severa hospitalizados en el hospital Mauricio Abdalah, seleccionados de forma aleatoria y por conveniencia.
- **Período de Estudio:** Agosto a Noviembre de 2012.

- **Definición de casos:** Episodio con más de 3 evacuaciones por día, acompañado de fiebre y/o vómito, en el cual el paciente requiere rehidratación intravenosa y ser hospitalizado.

- **Procesamiento inicial de la muestra:** Las muestras fueron colectadas en contenedores plásticos estériles. Estas fueron procesadas en el laboratorio del Hospital Materno Infantil Mauricio Abdalah en un período no mayor a 2 horas, realizando un examen general de heces donde se evaluó las características macroscópicas (aspecto, color, consistencia, presencia si o no de sangre y/o moco) y microscópica (investigando la presencia de parásitos) Paralelamente, se realizó una suspensión en PBS 1X con 0.1mL/mL de material fecal, el cual fue sembrado en Agar Sorbitol MacConkey (ASM) para el aislamiento sospechoso de *E. coli* y en Agar SS para *Salmonella* spp y *Shigella* spp. Estas fueron luego incubadas a 37°C por 18 horas. Posteriormente, toda colonia sospechosa de *E. coli*, *Salmonella* spp y *Shigella* spp, fueron almacenadas a 4°C en PBS 1X para su posterior transporte y análisis al Departamento de Microbiología del Campus Médico, UNAN-León.

- **Identificación de colonias sospechosas de *Salmonella* spp y *Shigella* spp:** Para la identificación de estas especies bacterianas se empleó las pruebas bioquímicas descritas en el manual de bacteriología médica del CNDR/MINSA. ⁽¹⁸⁾.

- **Identificación de *Escherichia coli* enterohemorrágica:** Las colonias sospechosas para *E. coli* aisladas del ASM fueron analizadas, a través de un ensayo de PCR múltiplex aquí descrito.

- **PCR múltiplex para *E. coli* enterohemorrágica:**
 1. **Extracción de ADN total:** La extracción del ADN de los aislados clínicos de *E. coli* y las cepas de referencia (tabla 2) se realizó empleando el método básico de extracción de ADN total en crudo. En el cual las cepas se recultivo en platos de Agar Maconkey-Sorbitol durante 18 horas a 37°C. Posteriormente, se tomó una asada para hacer una suspensión en PBS 1X a una densidad MacFarland 4 (~12x10⁸ UFC/ml). Luego se calentó a 100°C por 20 min, centrifugándose por 2 min a 12,000 rpm y se conservó el sobrenadante a -20°C hasta el día de su uso.

 2. **Reacción de PCR:** se utilizó PureTaqReady-To-Go PCR Beads (GE Healthcare UK), la cual contiene Tris/HCl (pH=9) a 10mM, KCl a 50 mM, MgCl₂ a 1.5 Mm, dNTP a 200µM cada uno, DNA Polimerasa 2.5U. Estas beads fueron re suspendidas hasta un volumen final de 25µl agregando 17 µL agua libre de nucleasas, 6 µL totales de los cebadores *lt-st*, *bfp*, *pCVD432*, *ial*, *rbfO157*, *vt1*, *vt2* y *eaeA* (a concentraciones de 0.2µM, excepto *vt1* a 0.4µM) y 2µL del extracto de ADN. Posteriormente, la mezcla fue amplificada en un Termociclador Applied Biosystem 2770, bajos las siguientes condiciones:

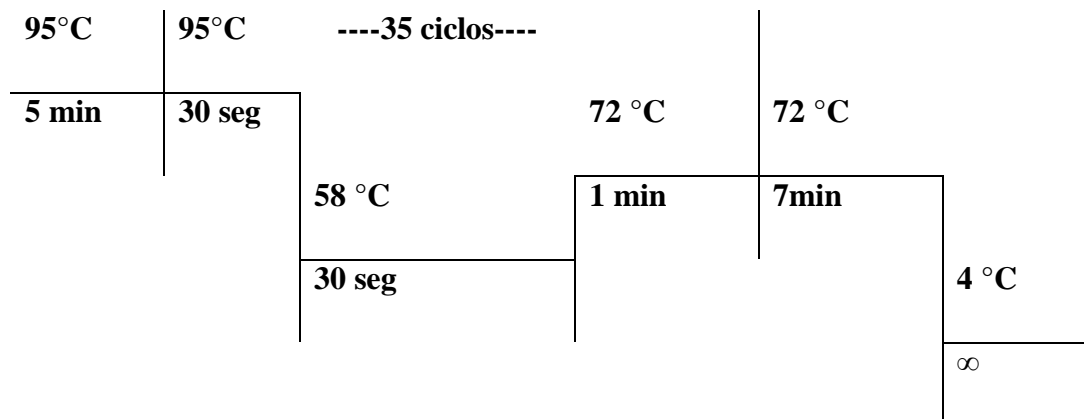


Figura 1: Condiciones de amplificación. ⁽¹⁵⁾

- **Electroforesis en gel de agarosa:** Los productos de PCR (10µl) fueron evaluados en un gel de Agarosa (Ultra Pure Agarosa; Invitrogen Life Technologies) teñido con Bromuro de Etidio haciendo una corrida de 1h:10 min a 100V usando un Marcador Molecular (TrackIt 100bp DNA Ladder; Invitrogen Life Technologies). Luego las bandas de ADN fueron visualizadas usando luz UV y fotografiadas.

Tabla 2. Cepas de referencias

	Serogrupos	Genes codificante (pb)		
ATCC 933	O157	<i>vt1</i> (130)	<i>vt2</i> (298)	<i>eae</i> (376)
ATCC 43889	O157	--	<i>vt2</i> (298)	<i>eae</i> (376)
ATCC 43890	O157	<i>vt1</i> (130)	--	<i>eae</i> (376)
ATCC 17775	O1	-	-	-

Aspectos éticos: Se solicitó la revisión y aprobación del presente estudio al comité de bioética de la Facultad de Ciencias Médicas, UNAN-León. Luego, iniciado el estudio las muestras fueron colectadas siempre y cuando los padres o guardianes de los niños firmaron un consentimiento escrito (ver anexos), en cual se describe los alcances del mismo.

Análisis estadístico: Los datos fueron analizados a través del programa SPSS 20 de acuerdo al tipo de variable de estudio empleando la prueba de *Fisher* para determinar si existían diferencias estadísticas significativas y presentadas en gráficos y tablas de valores absolutos y relativos.

– **Operacionalización de Variables:**

Variable	Definición	Indicador	Valor
Grupo etareo	Tiempo transcurrido desde el nacimiento hasta la fecha de toma de muestra.	Entrevista.	0-24 meses 25-60 meses
Genero	Característica biológica que define al macho de la hembra.	Entrevista.	Femenino. Masculino.
Procedencia	Lugar de origen donde reside actualmente del paciente.	Entrevista.	Urbana. Rural.
Leche materna.	Principal fuente de alimentación y nutrición para los niños.	Entrevista.	- Sí: a. Exclusivo. b. Mixto. - No.
Síntomas	Manifestaciones clínica asociados a la enfermedad. .	Expediente clínico	Nauseas, vómito, fiebre(>38°C), perdida de apetito, calambre abdominal, distensión abdominal
Inmunización al niño (a) contra el Rotavirus.	Defensas biológica para prevenirla infección.	Tarjeta de vacunación.	Dosis: 1 ^{ra} 2 ^{da} 3 ^{era}
Examen General de Heces	Análisis parasitológico macroscópico y microscópico.	Examen de laboratorio	<ul style="list-style-type: none"> • Moco -sangre –líquida- formada-semiformada –acuosa. • <i>E.histolytica/dispar.</i> • <i>G. Lamblia, Lumbricoides.</i> • <i>Cryptosporidios.</i> • <i>T.trichuris.</i> • Otros.

Coprocultivo	Análisis primario para el diagnóstico bacteriológico.	Examen de laboratorio.	<i>E.coli, Salmonella, Shigella y/o Otros</i>
PCR	Técnica de amplificación <i>in vitro</i> de fragmentos de ADN para <i>E.coli</i> diarregénicas: ECET ECEH ECEI ECEA ECEP	Examen de laboratorio.	<i>lt: +/- st: +/-</i> <i>vt1: +/- vt2: +/- eaeA: +/- rbfO157: +/-</i> <i>eaeA: +/- ial: +/-</i> <i>pCVD432: +/-</i> <i>eaeA: +/- bfp: +/-</i>

6. Resultados.

En Nicaragua la enfermedad diarreica aguda (EDA) es la segunda causa de morbilidad infantil y las infecciones por *E. coli* enterohemorrágica (ECEH) son de reporte obligatorio al Ministerio de Salud. ^(4,18) Sin embargo, existe muy poca información sobre ECEH en el país, y la existente ha sido generada por investigadores de la UNAN-León que han demostrado la asociación de esta bacteria a casos de diarrea y que el ganado bovino es fuente natural de las mismas. ⁽¹⁴⁻¹⁷⁾ Paralelamente, los niños nicaragüenses están altamente expuestos a una diversidad de patógenos entéricos causantes de diarrea, siendo el Rotavirus el de mayor importancia médica antes de la introducción de la vacuna RV5. Esta vacuna puede tener un impacto en la distribución etiológica de los casos de diarrea, lo cual se puede reflejar con el hecho que el número de casos asociados a Rotavirus ha decrecido, sin embargo el número de consultas por diarrea no ha disminuido. Así, los hallazgos del presente estudio podrán contribuir al conocimiento de la ECEH como causante de diarrea severa en el municipio de Chinandega.

Un total de 95 muestras fecales de niños con diarrea severa del hospital materno infantil, fueron procesadas a través de EGH, Coprocultivo y un PCR multiplex para *E. coli* diarregénicas, encontrándose ECEH en 11.6% (11/95) de las muestras investigadas. Encontrándose que una de ellas pertenece al serogrupo O157. En paralelo, la figura 3 muestra un ejemplo de la detección molecular de las ECEH investigadas. También, se identificaron otros agentes entéricos descritos en tabla 3.

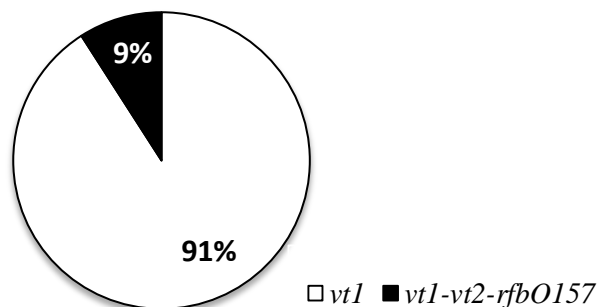


Figura 2. Características moleculares de las ECEH.

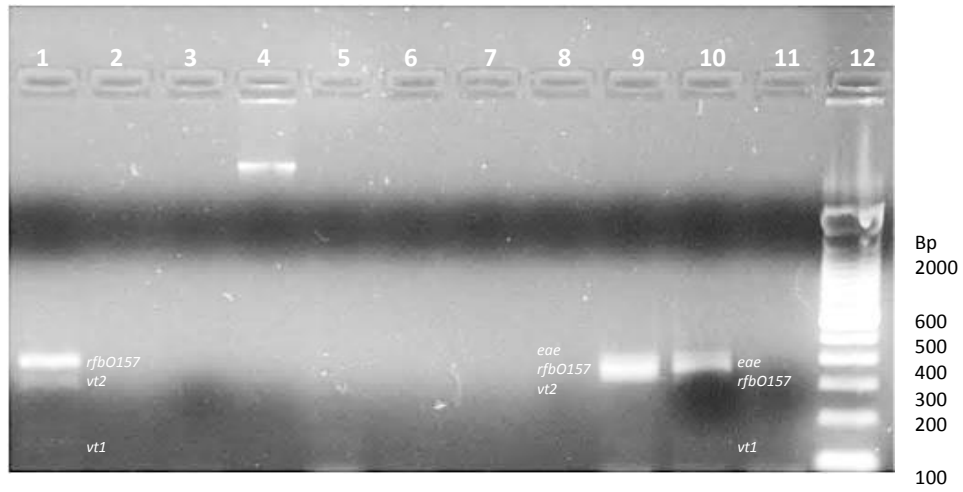


Figura 3. PCR múltiplex amplificación de *eae* (376 bp), *vt1* (130 bp), *vt2* (298 bp) y *rfbO157* (339 bp). Carriles 1 al 8 aislados clínicos, carril 9 cepa ATCC 43889, carril 10 ATCC 43890, carril 11 H₂O control negativo, carril 12 Marcado molecular (100 bp Fisher Scientific Ready to use).

Tabla 3. Distribución de agentes entéricos en niños con diarrea severa.

Agentes etiológicos	Total (n=95)
<i>Endolimax nana</i>	4 (4.2%)
<i>Entamoeba coli</i>	2 (2.1%)
<i>Entamoeba histolytica/dispar</i>	3 (3.2%)
<i>Giardia lamblia</i>	5 (5.3%)
<i>Salmonella spp</i>	8 (8.4%)
<i>ECEH</i>	• 6 (6.3%)
<i>ECEH + Salmonella spp</i>	4 (4.2%)
<i>ECEH + Giardia lamblia</i>	1 (1.1%)
<i>Salmonella spp + Endolimax nana</i>	1 (1.1%)
<i>Salmonella spp + Giardia lamblia</i>	1 (1.1%)
<i>E.histolytica/dispar + Endolimax nana</i>	1 (1.1%)
<i>Entamoeba coli + Endolimax nana</i>	1 (1.1%)
<i>Giardia lamblia + E.histolytica/dispar</i>	2 (2.1%)
<i>Giardia lamblia + Endolimax nana</i>	1 (1.1%)
<i>Giardia lamblia + Endolimax nana + Iodoameba bütschilii</i>	1 (1.1%)
<i>Endolimax nana + Iodameba bütschilii</i>	3 (3.2%)
Total	44 (46.3%)

- Una de las ECEH de este grupo pertenece al serogrupo O157

Los síntomas clínicos de niños con diarrea severa fueron náuseas, vómito, fiebre, pérdida del apetito, calambre abdominal y distensión abdominal, no observándose diferencias significativas entre la presencia de ECEH u otro agente con la sintomatología observada. También fueron registrados los números de evacuaciones por día que presentaban los niños y si estos, estaban vacunados con la RV5 y el número de dosis aplicadas a cada niño. (Tabla 4)

Tabla 4. Síntomas clínicos de niños con diarrea severa e inmunizaciones con RV5.

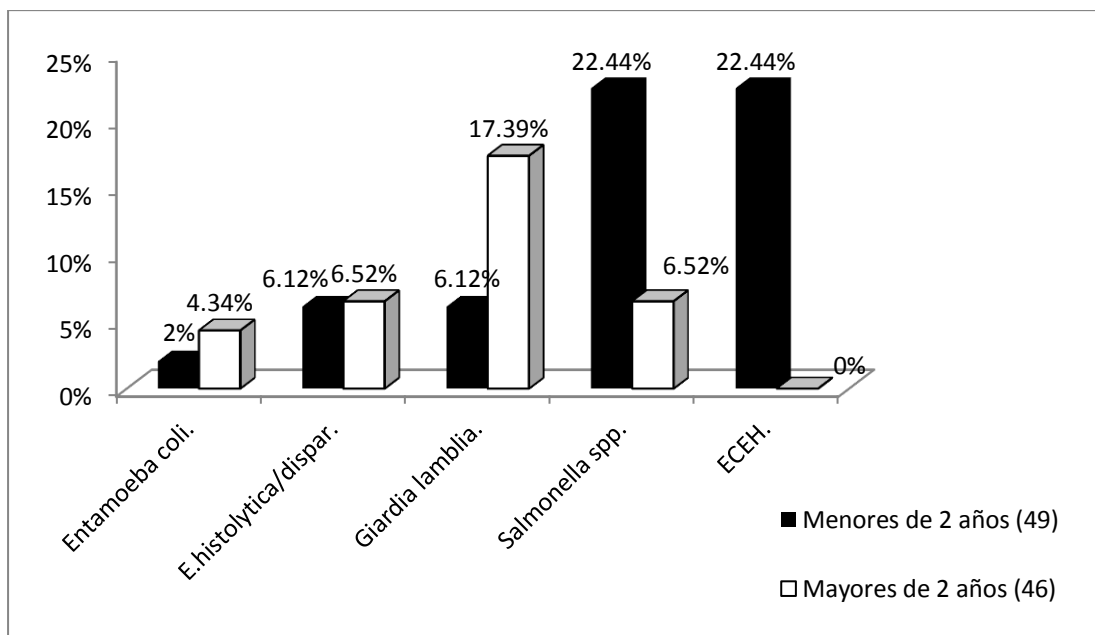
Sintomatología	<i>Principales agentes entéricos</i>					
	<i>Entamoeba coli</i> (n=3)	<i>E. histolytica/dispar</i> (n=6)	<i>G. lamblia</i> (n=11)	<i>Salmonella spp</i> (n=14)	ECEH (n=11)	
Nauseas	-	3 (50%)	4 (36.3%)	2 (14.3%)	3(27.3%)	
Vómitos	3 (100%)	4 (66.6%)	9 (81.8%)	8 (57.1%)	7 (63.6%)	
Fiebre>38°	3 (100%)	5 (83.3%)	10 (90.9%)	13 (92.9%)	8 (72.7%)	
Pérdida del Apetito	3 (100%)	6 (100%)	10 (90.9%)	13 (92.9%)	11 (100%)	
Calambre Abdominal	1 (33.3%)	2 (33.3%)	3 (27.2%)	5 (35.7%)	2 (18.2%)	
Distensión Abdominal	-	2 (33.3%)	1 (9.0%)	1 (7.1%)	-	
RV5	No	-	-	2 (14.3%)	1 (9.1%)	
	Si	3 (100%)	6 (100%)	11 (100%)	10 (90.9%)	
Dosis	NV*	-	-	2 (14.3%)	1 (9.1%)	
	1 ^{ra}	-	-	-	1 (9.1%)	
	2 ^{da}	-	-	1 (7.1%)	-	
	3 ^{ra}	3 (100%)	6 (100%)	11 (100%)	11 (78.5%)	9 (81.8%) ^δ
Evacuaciones en 24hrs	3-5	1 (33.3%)	5 (83.3%)	7 (63.6%)	8 (57.1%)	8 (72.7%)
	6-7	-	1 (16.6%)	4 (36.3%)	3 (21.4%)	3 (27.3%)
	> 8	2 (66.6%)	-	-	3 (21.4%)	-

* NV: niño(a) no vacunado contra Rotavirus

^δ La muestra positiva para ECEH O157 fue de uno de los niños con tres dosis de RV5

En el presente estudio también se investigaron datos demográficos de la población como son la procedencia, el sexo, lactancia materna, familiar con diarrea, tratamiento antibiótico y/o antiparasitario no encontrándose diferencias significativas entre estas variables y la presencia de ECEH u otros agentes. Sin embargo, en relación a la edad se pudo observar que los niños menores de 2 años están más propensos a presentar una infecciones por ECEH o por *Salmonella spp.* (Figura 3)

Figura 4. Frecuencia de agentes entéricos patógenos en niños menores de 5 años.



- *Salmonella spp.* Menores de 2 años vs Mayores de 2 años, $P= 0.041$

- *ECEH* Menores de 2 años vs Mayores de 2 años, $P= 0.001$

7. Discusión.

En Centro América existen pocos estudios que reportan datos de ECEH. Un ejemplo de ello es el primer caso de diarrea con evolución de 5 días asociado a *E. coli* O157:H7 en Costa Rica en 1996. ⁽¹²⁾ Por otro lado en Nicaragua, investigadores de la UNAN - León han realizado estudios que demuestran la circulación de dicha bacteria y que su principal reservorio es el ganado bovino en el país. ⁽¹⁵⁻¹⁷⁾ Así, *Vílchez y cols.* en el 2009 realizaron un estudio en muestras fecales de niños menores de 5 años de la ciudad de León, en el que identificaron este tipo de *Escherichia coli* en un 2.1% de los casos (niños con diarrea), pero encontrándose ECEH en 2.9% de casos de diarrea severa en los niños menores de 5 años. ⁽¹⁵⁾ Mientras que los resultados del presente estudio indican la presencia de ECEH en 11.6% de los casos de diarrea severa ya sea sola o acompañada con otros agentes entéricos, seis años después y en una ciudad diferente al estudio anterior, ***un alarmante aumento de la frecuencia de casos de diarrea severa asociados a ECEH.*** Y una sorprendente ausencia de los otros patotipos de *E. coli* diarregénicas asociados a diarrea severa a diferencia del estudio de *Vílchez y cols.*, 2009.

La población nicaragüense, especialmente los niños, se encuentran altamente expuestos a una gran diversidad de agentes patógenos entéricos, el Rotavirus era el de mayor importancia médica antes de la introducción de la vacuna RV5 en el 2006. Lo cual permite especular sobre un posible impacto de la vacuna en la distribución etiológica, hecho que se puede explicar con los siguientes hallazgos: 1) El alarmante aumento de la frecuencia de casos asociados a ECEH citado anteriormente, 2) En el estudio antes citado de *Vílchez y cols.*, la mayoría de las ECEH detectadas fueron *vt2* (87.5%) y *vt1* (12.5%), mientras que en el presente estudio estas fueron *vt1* (90.9%), *vt1-vt2* (9.1%), resultando un “***shift***” (cambio) de las características genotípicas de las cepas circulantes. Cabe resaltar a la vez que la única cepa *vt1-vt2* del presente estudio también fue positiva para el serogrupo O157, y a como la literatura refiere la mayoría de las cepas O157 presentan la verocitotoxina del tipo 2. ^(21, 30, 43) ***Así, este hallazgo es de gran relevancia clínico-epidemiológica para Nicaragua, debido que las cepas ECEH pertenecientes al serogrupo O157 son las que están más asociadas a casos de SUH. Además, este es el primer reporte en el cual se identifica una ECEH O157 asociada a un cuadro de diarrea en niños en el País.*** Otro hallazgo del presente estudio que complementa la observación aquí

mencionada es que el 90% de los niños tenía las 3 dosis de la RV5, y en la mayoría de las infecciones por cualquiera de los agentes entéricos mas importantes mencionados en la tabla 4, estos infantes contaban con las dosis de vacunación completa.

Vizcaya y cols., en Venezuela 1999, en un estudio sobre el origen bacteriano de las EDA reportó que de 311 muestras positivas, en el 45% (140/311) había la presencia de bacterias como patógenas únicas, en 24.1% (75/311) fue detectada la presencia de Rotavirus, en 6.8% (21/311) se observó la presencia de parásitos y en 24.1% (75/311) se encontraron asociaciones entre patógenos. ⁽³⁶⁾ Similarmente *Arima y cols.*, en un estudio sobre los nuevos y viejos agentes asociados a diarrea en 293 niños hondureños encontró que 11.3% (33/293) presentaron ECEH como agente único y en 16.7% (49/293) muestras se presentó asociado a otros agentes entéricos. ⁽³⁵⁾ Igualmente, en el presente estudio se observó bacterias como agente único en el 14.7% (14/95) de las muestras y el 7.4% (7/95) se presentó en asociación con otros agentes entéricos, igualmente se identificó la presencia de parásitos solos en el 14.7% (14/95) de las muestra, la presencia de virus no pudo ser verificada. Encontrándose ECEH en un 6.3% (6/95) como agente único (tabla 3).

En estudios realizados sobre ECEH, las manifestaciones clínicas de la infección causada por este grupo de agentes comienzan con dolores abdominales severos, seguido de diarrea acuosa o con sangre y puede agravarse hasta la aparición de síndrome urémico hemolítico (SUH). En el brote del 2011 en Alemania los síntomas clínicos más frecuentes encontrados en los pacientes fue dolor abdominal en 92% de los niños, vómitos en el 62% de los casos y nauseas en el 55%, no encontrándose fiebre mayor a 37.5°. ⁽⁴²⁾ Mientras que en el primer caso descrito en Paraguay por *Chamorro* el niño presento dolor abdominal, fiebre durante 24 horas, vómitos en dos ocasiones y tuvo 3 a 4 deposiciones semilíquidas. ⁽⁹⁾ Los principales síntomas clínicos presentados en el estudio realizado en la ciudad de León por *Vílchez y cols.*, fueron pérdida del apetito 87.5% y dolor abdominal 62.5%. ⁽¹⁵⁾ En el presente estudio los síntomas clínicos con mayor frecuencia en los niños con diarrea severa producida por ECEH fue vómito 63.6%, fiebre 72.7% y pérdida del apetito 100%, no encontrándose la distención abdominal como síntoma frecuente para ECEH en este estudio y la mayoría de los casos tuvieron entre 3 a 5 evacuaciones por día. Basados en estos ejemplos de hallazgos de presentación clínica donde no se puede diagnosticar con claridad, se resalta el hecho de

la necesidad imperante del diagnóstico microbiológico oportuno para los casos por ECEH, sobre todo para evitar que los pacientes evolucionen a cuadros más complicados como CH y SUH. ^(23,24)

Las infecciones por ECEH serotipo O157:H7 son las principales causas de SUH en Argentina. Estudios realizados indican que en los últimos años los más afectados son los niños menores de 4 años y afectando más a niños que a niñas con nivel socio-económico medio ^(37,38). En Chile, *Prado y cols.*, 2000-2002 realizaron un estudio sobre SUH asociado a infecciones por *Escherichia coli* productora de toxina shiga en 14 centros de atención y hospitales de dicho país, en el cual se encontró que en este grupo de pacientes hubo aislamiento de ECEH en 46 niños (38,6%), en 23 pacientes los ECEH correspondieron al serogrupo O157 y en los restantes 23 el serogrupo fue no-O157, también reporta que el 78% de los casos ocurrieron en niños entre los 6 y 48 meses no encontrándose diferencias relevantes en relación al sexo, ⁽³⁹⁾ *Huapaya y col.*, en Perú en el 2001 realiza un estudio transversal de los agentes etiológicos de diarrea aguda en la región sur del país, en el cual aislaron una cepa procedente de una muestra de heces de un lactante de 11 meses de edad con un cuadro de diarrea disintérica, identificándola como *Escherichia coli* O157 la cual fue confirmada y caracterizada por el Instituto Nacional de Salud como *E. coli* O157:H7 toxina shiga tipo II, siendo el primer aislamiento reportado sobre esta bacteria en el Perú. ⁽⁴⁰⁾ similarmente en Paraguay *Chamorro Noceda en el 2009* reporta el primer caso de diarrea muco-sanguinolenta causado por *E. coli* O157:H7, pero este en un lactante mayor de 2 años de edad, ⁽⁹⁾ a diferencia de *Hernández y cols.*, 2011, publica una revisión sobre la situación de las enfermedades gastrointestinales en México donde expresa que las infecciones por *Escherichia coli* afectan principalmente a niños menores de 2 años y particularmente durante los primeros 6 meses de vida, siendo el grupo de las ECET el de mayor frecuencia con un 43% de casos y una baja incidencia de ECEH que se presenta en tan solo el 1% de los casos ⁽⁴¹⁾. Igualmente en Costa Rica se reportan bajas incidencias de infecciones por ECEH, pero los casos positivos están asociados a *E. coli* O157:H7 presentándose estos en niños menores de 2 años. ⁽¹²⁾ A diferencia del estudio de caso y controles realizado por *Arima y col.* detecto una alta proporción de niños infectados con ECEH (49 de los 193 pacientes estudiados), en el que el grupo etario mayormente afectado fue el de 3-12 meses. ⁽³⁵⁾ Similarmente en el estudio realizado por *Vílchez y cols.*, en Nicaragua la ECEH predominaron en los grupos de niños de 13-24 meses. ⁽¹⁵⁾ Al igual que los estudios antes mencionados éste presentó una frecuencia de ECEH altamente significativo en

niños menores de 2 años en un 22.44% de los casos positivos, no encontrándose relevancias significativas en cuanto al sexo de los niños estudiados.

8. Conclusión.

Los hallazgos del presente estudio que tuvo como propósito investigar casos de diarrea severa en niños del municipio de Chinandega asociadas a ECEH O157, se presentan a continuación:

1. De 95 muestras recolectadas de diarrea severas en niños menores de 5 años de la ciudad de Chinandega, se identificó ECEH en el 11.6% de casos. Encontrándose que de las ECEH identificadas una pertenece al serogrupo O157.
2. Se investigaron las características moleculares de los aislados clínicos positivos para ECEH en los que se pudo identificar que de las 11 cepas, el 90.9% (10/11) fueron *vt1* y 9.1 (1/11) fue *vt1-vt2-rbf O157*.
3. El total de los casos positivos de ECEH se presentaron en niños menores de 2 años, teniendo en cuenta estos resultados indica que la infección por este tipo de bacteria acontece con mayor frecuencia en niños entre estas edades.

9. Recomendaciones.

1. Investigar la frecuencia de virus entéricos en las muestras estudiadas, como Rotavirus, Norovirus y Sapovirus, que no fueron investigados.
2. Realizar estudios orientados a investigar este tipo de agentes entéricos con un mayor número de muestras en el resto de la localidad, para que contribuyan a tener mayores conocimientos de esta situación y tener un mayor control de los agentes.
3. Reportar los hallazgos de este estudio a las autoridades competentes como el MINSA.

10. Bibliografía

1. Harrison, DL. Kasper, EB. Antony, SF. Stephen, LH. Dan, LL. Jameson, JL. & Kurt, JI. Principios de Medicina Interna. 16^{va} Ed. Volumen II. Editorial Macgraw- Hill Internacional. pag. 256-257 & 846-981
2. Organización Mundial de la Salud (OPS/OMS). IV Reunión de la Red de Vigilancia de Enfermedades Emergentes Infecciosas del Cono Sur. Asunción, Paraguay 2001. Disponible en: <http://www.paho.org>.
3. Benguigui, Y. Bernal, C. Figueroa, D. Manual de tratamiento de la diarrea en niños, Washington, D.C.: OPS, 2008 Organización Panamericana de la Salud, (serie PALTEX para ejecutores de programas de salud N° 48) pag. 87.
4. Jawetz, E. Melnick, J. Adelberg, A. (eds). Microbiología Médica. 18^{va} Ed. Mexico D.F. traducida de la 23^{va} edición en inglés. Editorial manual moderno 2005. pag. 247-248.
5. Bell, PA. Goldoft, M. Griffin, PM. MA Davis, Gordon, DC. Tarr, PI. Un brote multiestatal de *Escherichia coli* O157: H7 asociada a diarrea sanguinolenta y síndrome urémico hemolítico de las hamburguesas. La experiencia de Washington JAMA 1994; 272:1349-1353.
6. Biggerstaff, G. MacDonald, JK. Trees, E. Medus, C. Musser, KA. Stroika, SG. Zink, D. Sotir, MJ. A novel vehicle for transmission of *Escherichia coli* O157:H7 to humans: multistate outbreak of *E. coli* O157:H7 infections associated with consumption of ready-to-bake commercial prepackaged cookie dough--United States, 2009. Clin Infect Dis. 2012; 54:511-518.
7. Bielaszewska, M. Mellmann, A. Zhang, W. Kock, R. Fruth, A. Bauwens, A. Peters, G. Karch, H. Characterisation of the *Escherichia coli* strain associated with an outbreak of haemolytic uraemic syndrome in Germany. Lancet Infect Dis. 2011; 11:671-676.
8. Rivas, M. Miliwebsky, E. Chinen, I. Deza, N. Leotta, GA. Epidemiología del síndrome urémico hemolítico en Argentina. Diagnóstico del agente etiológico, reservorios y vías de transmisión. Medicina. 2006;66:27-32.
9. Chamorro, L. Síndrome Urémico-Hemolítico por *E. coli* enterohemorrágica O157:H7 Stx2: Primer Caso Descrito en Paraguay. Pediatr. Asunc 2009; 36: 131-137.

10. Gadea, MP. Varela, Bernabá, M. Sirok , A. Primer aislamiento en Uruguay de *Escherichia coli* productora de toxina Shiga del serotipo O157:H7 en una niña con síndrome urémico hemolítico. Rev Med Uruguay. 2004; 20:79-81.
11. Zambrano, P. Delucchi, A. Síndrome hemolítico urémico en Santiago de Chile: Evolución de la función renal y factores pronósticos. Rev Chil Pediatr. 2005; 76:48- 56.
12. Martínez, M. Herrera, M. Aislamiento de *Escherichia coli* O157:H7 a partir de heces de niños con síndrome urémico hemolítico Rev. méd. Hosp. Nac. Niños Costa Rica 1997; 32:1-2
13. García, FJ. Poves, G. Cuadros, JA. *Escherichia coli* O157:H7 and Hemolytic Uremic Syndrome in a HIV positive patient. Rev Esp Enferm Dig. 2000; 92: 820-821
14. MINSA-NIC. Indicadores de morbilidad por SILAIS, Nicaragua año 2007 http://www.minsa.gob.ni/planificacion/estadisticas/ind2006/imagenes/ind_morbilidad.jpg
15. Vílchez, S. Reyes, D. Paniagua, M. Bucardo, F. Mollby R & Weintraub A. Prevalence of diarrhoeagenic *Escherichia coli* in children from Leon, Nicaragua. J Med Microbiol 2009; 58: 630-637.
16. Ramírez, RP. Vílchez, S. *Escherichia coli* O157: Pasos hacia la Optimización de un PCR Múltiple para la Detección e Identificación de cepas Verocitotóxicas [tesis lic]. Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua, León; 2011
17. Ruiz, TE. Vílchez, S. Caracterización de cepas de *Escherichia coli* enterohemorrágica aisladas en muestras fecales de bovinos de fincas aledañas a la ciudad de León. [tesis lic]. Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua, León; 2012
18. CNDR/MINSA. Manual de Procedimiento de Bacteriología Médica. Edición 2004. MINSA. Managua. pag 213-222
19. O'Brien, AO. Lively, TA. Chen, ME. Rothman, SW. Formal, SB. *Escherichia coli* O157:H7 strains associated with haemorrhagic colitis in the United States produce a *Shigella dysenteriae* 1 (SHIGA) like cytotoxin. Lancet 1983; 1:702.
20. Karmali, M. Infection by Shiga Toxin. Producing *Escherichia Coli*. Mol Biotechnol 2004; 26:117-122.
21. Tarr, P. *Escherichia coli* O157:H7: Clinical, Diagnostic and Epidemiological aspects of Humans Infections. Clin Infect Dis 1995; 20:1-10.

22. Griffin, P. & Tauxe, R. The epidemiology of infections caused by *Escherichia coli* O157:H7, other enterohemorrhagic *E. coli*, and the associated hemolytic uremic syndrome. *Epidemiol Rev* 1991; 13:60–98.
23. Karch, H. Tarr, P. & Bielaszewska M. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* in Human Medicine. *Int J Med Microbiol* 2005; 295:405-418.
24. Gasser, C. Gautier, E. Steck, A. Hamolytisch-uramische syndrome: Bilaterale Nierenrindennekrosen bei akuten erworbenen hamolytischen Anamien. *Schweiz Med Wochenschr* 1955; 85:905-909.
25. Ostroff, SM. Kobayashi, JM. Lewis, JH. Infections with *Escherichia coli* O157:H7 in Washington State: the first year of statewide disease surveillance. *JAMA* 1989; 262:355-59
26. Chandler, WL. Jelacic, S. Boster, DR. et al. Prothrombic coagulation abnormalities associated with *Escherichia coli* O157:H7 infections. *N Engl J Med* 2002; 346:23-32.
27. Rodríguez, JL. Diagnóstico y Tratamiento Médico. Editorial MARBÁN LIBROS, S.L. 2010. pag. 1442-1443.
28. Croxen, M. & Finlay, B. Molecular Mechanisms of *Escherichia coli* Pathogenicity. *Nat Rev Micro* 2010; 8:26-38.
29. O'Brien, A. Tesh, V. Donohue-Rolfe, A. Jackson, M. Olsnes, S. Sandvig, K. Lindberg A & Keusch G. Shiga toxin: biochemistry, genetics, mode of action, and role in pathogenesis. *Curr Top Microbiol Immunol* 1992; 180:65–94.
30. Nataro, JP. Kaper, JB. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol Rev.* 1998;11:142-201.
31. Kaper, J. Nataro, J & Mobley H. Pathogenic *Escherichia Coli*. *Nat Rev Microbiol* 2004; 2:123-140
32. March, SB. Ratnam, S. Sorbitol-MacConkey medium for detection of *Escherichia coli* O157:H7 associated with hemorrhagic colitis. *J Clin Microbiol* 1986; 23: 869–872.
33. Hannaoui, EJ. Villalobos, LB y Martínez, RE. *Escherichia coli* shigatoxigénica: patogénesis, diagnóstico y tratamiento. *rev. soc. ven. microbiol.* 2009; 29:13-20.
34. Karch, H. Meyer T. Single primer pair for amplifying segments of distinct shiga- liketoxin genes by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiology.* 1989;27:2751-2577.
35. Frank C, Werber D, Cramer JP, Askar M, Faber M, and er Heiden M. Epidemic Profile of Shiga--Toxin-Producing *Escherichia coli* O104:H4 Outbreak in Germany *NEJM.org*.2011.

36. Caletti, MG. Gallo, G. Síndrome urémico hemolítico Tratamiento de la glomerulopatía secundaria. Medicina (Buenos Aires). 2005;65:528-32.
37. Crump, JA. Sulka, AC. Langer AJ. An outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections among visitors to a dairy farm. N Engl J Med. 2002;347(8):555-560.
38. Rivero, MA. Padola, NL. Etcheverria, AI. Parma, AE. *Escherichia Coli* Enterohemorrágica Y Síndrome Uremico Hemolítico En Argentina.
39. Rivas, M. Simposio: Síndrome Urémico Hemolítico. 2º Congreso Argentino de Nefrología Pediátrica. Sociedad Argentina de Pediatría, 20 al 23 de junio, 2003, Buenos Aires, Argentina.
40. Wainsztein, R. Simposio: Síndrome Urémico Hemolítico. 2º Congreso Argentino de Nefrología Pediátrica. Sociedad Argentina de Pediatría, 20 al 23 de junio, 2003, Buenos Aires, Argentina.
41. López, EL. Contrini, MM. De Rosa, MF. Epidemiology of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in South America. In: Kapar, JB and O'Brien, AD (eds), *Escherichia coli* O157:H7 and other Shiga toxin-producing *E. coli* strains. Washington DC: ASM Press 1998, pp. 30-7.
42. Prado, JV. Cavagnaro SF. Síndrome hemolítico urémico asociado a infección intestinal por *Escherichia coli* productora de shigatoxina (STEC) en pacientes chilenos: aspectos clínicos y epidemiológicos. 2000-2002, Universidad de Chile.
43. Tarr, P. Gordon, C. Chandler, W. Shiga-Toxin-producing *Escherichia coli* and haemolytic uraemic syndrome. Lancet. 2005;365:1073-86.

11. Anexos

CONSENTIMIENTO INFORMADO
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE NICARAGUA, LEÓN
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA
PROGRAMA DE ENFERMEDADES INFECCIOSA

Código Campo: /___/___/___/ -MA Código Laboratorio (identificador): /___/___/___/

Mediante la firma de este documento, Yo, _____ doy mi consentimiento voluntariamente para donar una muestra de heces de mi hijo(a) y ser entrevistado por un colaborador de un estudio sobre de diarrea, que se desarrolla en el Departamento de Microbiología de la UNAN-León. Entiendo que la entrevista está relacionada con la sintomatología clínica, así como las características epidemiológicas de la enfermedad diarreica aguda en el municipio de Chinandega.

Entiendo que fui elegido para participar en este estudio, por que mi hijo(a) presenta la sintomatología clínica de la enfermedad diarreica aguda y la donación de una muestra de heces contribuirá al entendimiento del comportamiento clínico, epidemiológico y fisio-patológico de las principales enterobacterias que causan diarrea en Nicaragua, así como, al establecimiento de mejores metodologías de diagnóstico y tipificación molecular, lo cual, permitirá en el futuro el fortalecimiento de los programas de prevención de las enfermedades diarreicas agudas.

Se me ha informado que los responsables de este estudio no están obligados a cubrir los costos médicos de esta enfermedad y que los resultados de los análisis de laboratorio me serán proporcionados por los colaboradores de este estudio en el caso que yo los solicitaré y que puedo requerir información adicional en el Departamento de Microbiología de la UNAN-León (Tel: 2311-2947).

He concedido libremente una muestra de heces y esta entrevista a un colaborador de este estudio. Se me ha notificado que es totalmente voluntario y que aún después de iniciado puedo rehusarme a responder cualesquiera preguntas o decidir darla por terminado en cualquier momento. Se me ha dicho que las respuestas a las preguntas no serán reveladas a nadie y que en ningún informe de este estudio se me identificara jamás en forma alguna.

Firma del entrevistado: _____

Fecha: ___/___/___

Firma del entrevistador: _____

Fecha: ___/___/___

FICHA DE RECOLECCIÓN DE DATOS

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE NICARAGUA- LEÓN
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA PROGRAMA DE ENFERMEDADES INFECCIOSA

Fecha de la toma de muestra: ____ / ____ / ____ /
Día Mes Año

Código Campo: /__ / __ / __ / - MA

Código Laboratorio (identificador): /__ / __ / __ /

DATOS GENERALES:

Nombres y Apellidos: _____ /

Fecha de Nacimiento: / ____ / ____ / ____ / Género: Masculino: /__ / Femenino: /__ /

Edad: (años): / ____ / (meses): / ____ / Peso (kg): / ____ /

Procedencia: Urbana: / ____ / **Rural:** / ____ /

Dirección: _____

_____ /

Localidad: / _____ /

DATOS CLÍNICOS Y EPIDEMIOLOGICOS:

Fecha inicio de la diarrea: /__ / __ / ____ / Evacuaciones en el día: / ____ /

Características de la Heces: Líquida: /__ / Semiformada: /__ / Acuosa: /__ /

Signos y Síntomas Asociados: Náuseas: /__ / Vómito: /__ / Fiebre (>38°C): /__ / Pérdida de
Apetito: /__ / Calambre Abdominal: /__ / Distensión abdominal: /__ /

Clasificación de la diarrea:

Severo: /__ /

Niño menor de 2 años recibiendo pecho materno: Sí: /__ / No: /__ / Exclusivo: /__ / Mixto:
/__ / Frecuencia en el día: / ____ /

Niño vacunado con RV5: Sí: /__ / No: /__ /; en respuesta Sí, cuántas dosis?: / ____ /

En el Hogar algún familiar del enfermo ha tenido diarrea en los últimos 4 días?

Sí: /___/ No: /___/; en respuesta Sí, pregunte parentesco: /_____/

Tiene algún animal domestico? /_____/

Tratamiento Antibiótico: Sí: /___/ No: /___/; en caso de respuesta Sí complete lo siguiente

Tipo: TMSulfa: /___/ Amoxicilina: /___/ Ampicilina: /___/ Otros: /_____/

Tratamiento Antiparasitario: /_____/

OBSERVACIONES: _____

RESULTADOS DE LABORATORIO:

Bacteriología:

Aislamiento: *E.coli*: /___/ *Salmonella*: /___/ *Shigella*: /___/ Otros: /_____/

PCR: ECEH: *rbfO157*: /___/ *eaeA*: /___/ *vt1*: /___/ *vt2*: /___/

Parasitología: Presencia de Muco: /___/ Sangre: /___/

Especie parasitaria:

E. Histolytica/dispar: /___/ *G. Lamblia*: /___/ *A. Lumbricoides*: /___/ *Cryptosporidios*: /___/ *T.trichuris*: /___/ Otros: _____

Nombre y firma del Colector de Muestra Fecha: /___/ ___/ ___/ Hora: /___/

Nombre y firma del que Recibe Muestra (Lab) Fecha: /___/ ___/ ___/ Hora: /___/
