



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA  
AMAZONIA PERUANA

MAESTRIA EN SALUD PÚBLICA  
ESCUELA DE POST GRADO



Prevalencia de *Escherichia coli* enterotoxigénica en niños  
menores de cinco años con diarrea, mediante la reacción en  
cadena de la polimerasa, Iquitos – 2011

AUTORES:

**Blgo. CARLOS ROBERTO DÁVILA FLORES**

**Blgo. MARX PEÑA HIDALGO**

ASESORES:

**Dr. ÁLVARO BENJAMÍN TRESIERRA AYALA**

**Dr. JUAN CARLOS CASTRO GÓMEZ**

TESIS:

**Para optar el grado de Magister en Salud Pública**

**IQUITOS – PERÚ**

**2012**

**ASESORES:**

.....  
**Dr. ÁLVARO B. TRESIERRA AYALA**

.....  
**Dr. JUAN CARLOS CASTRO GÓMEZ**

**JURADOS:**

.....  
**Dra. HILDA MONTOYA TORRES**  
**PRESIDENTA**

.....  
**Blga. MILDRED M. GARCÍA DÁVILA, Mgr.**  
**MIEMBRO**

.....  
**Blga. JULIA BARDALES GARCÍA, M.Sc.**  
**MIEMBRO**

## **AGRADECIMIENTO**

A nuestros asesores, Dr. Álvaro Benjamín Tresierra Ayala y Dr. Juan Carlos Castro Gómez, por el incansable apoyo moral, logístico y en la elaboración de la presente tesis, sin ello la culminación de la misma no hubiese dado frutos gratificantes.

Al Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Biológicas y al Laboratorio de Biotecnología del Centro de Investigación de Recursos Naturales de la Universidad Nacional de La Amazonía Peruana, por habernos acogido en sus instalaciones y ayudarnos a cumplir con los objetivos planteados en el presente estudio.

A la Blga. María Elena Bendayán, MSc. Jefa del Departamento Académico de Microbiología y Parasitología, por el apoyo en proporcionarnos materiales para el presente estudio, al Blgo. Robertson Ramírez Saavedra y al Bach. Freddy Gutiérrez, por el apoyo brindado durante nuestra estancia en el CIRNA, que sin su ayuda no hubiese sido posible concluir con los objetivos del estudio planteado en la tesis.

A nuestros padres y familiares que cada día estuvieron dándonos aliento de proseguir en la culminación del presente estudio de tesis.

A todas aquellas personas que de una u otra manera aportaron para hacer posible esta tesis.

## **DEDICATORIA**

***En memoria a mi padre, GILBERTO DÁVILA MONTALVO, que junto con el Padre Celestial me brindan esa luz para seguir avanzado en las metas que me he propuesto seguir desde su partida.***

***A mi madre, ENEYDA FLORES CASTRO Vda. DE DÁVILA, por la enseñanza brindada, que me permitió seguir el camino correcto y no desviarme por ningún obstáculo encontrado. Te aseguro que nada será en vano lo moldeado en mi.***

***A mis hermanas, GREGORIA Y ENITH, a mi hijita XIOME, por el apoyo brindado a no desmayar a pesar de las caídas que hubo, me sirvieron de pilares para soportar las adversidades que se presentaron en nuestras vidas, gracias por estar allí, mi logro es para ustedes, les aseguro no será en vano todo esto.***

***Blgo. CARLOS ROBERTO DÁVILA FLORES***

## **DEDICATORIA**

*A Dios por la vida y la oportunidad que me brinda de aprender; de modo que mi desarrollo no sea únicamente profesional sino también personal.*

*A CARLOS PEÑA CHUMBE Y FLORENTINA HIDALGO MUÑOZ, por su apoyo incondicional en mis aspiraciones y metas que me he propuesto alcanzar.*

**Blgo. MARX PEÑA HIDALGO**

## ÍNDICE DE CONTENIDO

	<b>Pág.</b>
Firma de Asesores.....	ii
Firma de Jurados.....	iii
Agradecimiento.....	iv
Dedicatorias.....	v- vi
Resumen.....	1
Abstrac.....	2
I. Introducción.....	3
II. Antecedentes.....	6
III. Marco teórico.....	14
IV. Metodología.....	18
4.1 Tipo de investigación.....	18
4.2 Diseño de investigación.....	18
4.2.1 Población y muestra.....	18
4.3 Procedimientos, técnicas e instrumentos.....	20
4.4 Procesamiento de la información.....	22
V. Resultados.....	23
5.1 Cuadro N° 01.....	23
5.2 Gráfico N° 01.....	24
5.3 Cuadro N° 02.....	25
5.4 Gráfico N° 02.....	26

5.5 Cuadro N° 03.....	27
5.6 Gráfico N° 03.....	28
5.7 Cuadro N° 04.....	29
5.8 Gráfico N° 04.....	30
5.9 Cuadro N° 05.....	31
5.10 Gráfico N° 05.....	32
5.11 Cuadro N° 06.....	33
5.12 Gráfico N° 06.....	34
5.13 Cuadro N° 07.....	35
5.14 Gráfico N° 07.....	36
5.15 Cuadro N° 08.....	37
5.16 Gráfico N° 08.....	38
5.17 Cuadro N° 09.....	39
5.18 Gráfico N° 09.....	40
5.19 Cuadro N° 10.....	41
5.20 Gráfico N° 10.....	42
5.21 Cuadro N° 11.....	43
5.22 Gráfico N° 11.....	44
5.23 Cuadro N° 12.....	45
5.24 Gráfico N° 12.....	46
VI. Discusión.....	47



VII. Conclusiones.....	51
VIII. Recomendaciones.....	52
IX. Referencias Bibliográficas.....	53
X. Anexos.....	58
10.1 Anexo N° 1 .....	59
10.2 Anexo N° 2 .....	60
10.3 Anexo N° 3 -A .....	61
10.4 Anexo N° 3 -B .....	62
10.5 Anexo N° 3 -C .....	63
10.6 Anexo N° 3 -D .....	64
10.7 Anexo N° 4 .....	65
10.8 Anexo N° 5 .....	66
10.9 Anexo N° 6 .....	67

## **RESUMEN**

El presente estudio permitió evaluar la prevalencia de *Escherichia coli* enterotoxigénica (ECET), en 188 niños menores de cinco años con diarrea, provenientes de los centros de salud de la ciudad de Iquitos, durante el 2011. Para la recolección de las muestras se emplearon frascos estériles en los cuales se colocaron aproximadamente, 2 g de heces diarreicas. Las muestras fueron llevadas al laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Biológicas – UNAP para realizar el aislamiento e identificación fenotípica del agente etiológico, para luego realizar la identificación molecular empleando la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa – PCR, que se realizó en el Laboratorio de Biotecnología del Centro de Investigación de Recursos Naturales – CIRNA. Para el análisis estadístico se empleó la estadística inferencial, mediante un análisis univariado y bivariado.

En 28 de las muestras analizadas, se determinó la presencia de *E. coli* enterotoxigénica, de las cuales 19 presentaban el gen *LT* y 9 presentaban el gen *ST*.

Palabras clave: diarrea, *Escherichia coli* enterotoxigénica, PCR, identificación molecular, niños.

## **ABSTRACT**

This study allowed to assess the prevalence of enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) in 188 children under five years old with diarrhea, who attend the health centers in Iquitos city, during 2011. Diarrheal stool samples were collected in sterile bottles, were collected in sterile bottles and then, these were transported to microbiology laboratory (Biological sciences faculty – UNAP), for the isolation and phenotypic identification of the etiologic agent, and the molecular identification using the polymerase chain reactions – PCR, which was performed in the biotechnology laboratory (CIRNA), inferential statistical analysis was used for univariate and bivariate.

The presence of *E. coli* enterotoxigenic in 28 diarrheal stool samples was identified, 19 of them presented *LT* gene and 9 of them presented *ST* gene.

Keywords: diarrhea, enterotoxigenic *Escherichia coli*, PCR, molecular identification, children.

## I. INTRODUCCION

A nivel mundial, aproximadamente el 40% de la población carece de acceso a buenas condiciones de saneamiento básico, situación que pone en riesgo su salud, especialmente al consumir agua y alimentos contaminados, trayendo como consecuencia una serie de infecciones gastrointestinales. En la mayoría de los países del tercer mundo (México, Colombia, Ecuador, Perú, etc.), estos casos están asociados con la falta de acceso al agua potable, saneamiento inadecuado, que es la causa de enfermedades diarreicas, habiendo ocasionado 210 millones de casos en el mundo y 4,6 a 6 millones de defunciones en niños menores de cinco años en toda América Latina (Prats, G 2008) .

El Perú, no está ajeno a dicha problemática, debido a que en diversas áreas de su territorio presenta carencias de servicios de saneamiento básico, razón por la cual las familias de las zonas urbanas y rurales, se ven expuestas a ser infectadas por un sin número de microorganismos enteropatógenos (SUNASS, 2007). Los microorganismos originan enfermedades que constituyen un problema de salud pública, representando una importante causa de morbilidad (originando desnutrición y retardo del crecimiento) y mortalidad en la población infantil (Vidal, *et al.* 2007).

Casi 200 especies de bacterias son patógenas causantes de enfermedades diarreicas; entre ellas destacan las cepas de *Escherichia coli* enteropatógenas. El efecto patógeno varía mucho en función de la especie microbiana, por lo que depende tanto de su virulencia como de las condiciones propias del hospedero. (Blanco, *et al.* 2007). Hasta la fecha se conocen, seis categorías patógenas de *Escherichia coli* como agentes etiológicos de diarreas y diferentes cuadros clínicos. Dentro de estas categorías patogénicas, destaca la *Escherichia coli* enterotoxigénica (ECET), que puede afectar a niños menores de 5 años (Arias, *et al.* 2004; Vidal, *et al.* 2007).

La mayoría de los niños contraen la infección durante su primer año de vida y la prevalencia de la enfermedad disminuye con la edad. Por ello, se ha establecido que la ECET ocasiona una enfermedad infantil debido a que es más prevalente en niños menores de cinco años, que en los grupos etáreos siguientes (Chávez, *et al.* 2007).

La región Loreto, no es la excepción a esta problemática, ya que continuamente se presentan casos de infecciones diarreicas agudas (IDA) en los centros de salud; tal es así que en el año 2010, se ha reportado una frecuencia de 6 605 casos aproximadamente de infecciones diarreicas causadas por microorganismos en niños menores de 5 años, de los cuales 2 364 casos correspondieron a la ciudad de Iquitos. Pudiendo ser la ECET la causa de diarrea, de allí que sería importante conocer su prevalencia(DIRESA, 2010).

El empleo de la técnica de PCR, posibilitaría su identificación molecular de y conocer mejor los aspectos epidemiológicos, asimismo, su importancia como agente causal de diarrea y muerte infantil. Esta información permitirá poner en alerta a las autoridades de salud, a fin de implementar estrategias para la vigilancia epidemiológica de la ECET. Así mismo, los resultados de esta investigación aportarán elementos de juicio para investigaciones posteriores relacionadas con la prevalencia de bacterias causantes de IDA.

Además, el empleo de la técnica de PCR brindaría una gran oportunidad para su aplicación como herramienta analítica en los laboratorios de microbiología, debido a su rapidez, alta sensibilidad y eficiencia para la detección temprana de los patógenos (Fernández F, 2006). De ese modo, se contribuiría notablemente a la prevención de infecciones diarreicas agudas (IDA) y de enfermedades de transmisión alimentaría (ETA) (Prado V., *et al.* 2005).

Por lo expuesto, en el presente trabajo se planteó determinar la prevalencia de *E. coli* enterotoxigénica en niños menores de cinco años con diarrea, empleando la reacción en cadena de la polimerasa, Iquitos – 2011.

## II. ANTECEDENTES

En diversos países se han realizado estudios en torno a la presencia de *E. coli* como agente causal de diarrea en niños menores de 5 años, tal es el caso de:

**GONZÁLEZ, C. (2004)**, efectuaron un estudio sobre el “Diagnóstico y tratamiento de la diarrea persistente en un servicio de Enfermedades Diarreicas Agudas”, el que fue de tipo descriptivo, transversal y retrospectivo; para lo cual trabajaron con 1257 pacientes menores de 2 años con diarrea persistente, ingresados en el Servicio del Hospital Infantil Sur de Santiago de Cuba; a todos los pacientes les hicieron exámenes microscópicos de heces, coprocultivo, hemograma y análisis de orina, reportando a *E. coli* como el agente causal más prevalente de cuadros diarreicos.

**RODRÍGUEZ, A. (2004)**, determinó las principales características y el diagnóstico de los grupos patógenos de *E.coli* en niños menores de 5 años con diarreas agudas de la ciudad de México. De las 41 cepas aisladas, el 14.63 % no fermentaron lactosa y 9.75 % no decarboxilaron lisina. Para determinar la especie también ensayaron la fermentación de xilosa y utilización de acetato como fuente de carbono. También determinó que el 58.53 % de las cepas no metabolizaron el sorbitol, pero el 41.47 % de cepas sí lo hicieron. Adicionalmente, resaltó la importancia de la identificación de esta bacteria como agente patógeno capaz de causar casos clínicos aislados o brotes de diarrea, a los que denominaron “síndrome urémico hemolítico, colitis hemorrágica o cuadros de disentería”, con ocurrencia principalmente en niños y sugirió la necesidad de conocer mejor a esta bacteria y mantener la vigilancia epidemiológica.

**ARIAS I, et al. (2004)**, estudiaron a la “*Escherichia coli* enteroagregativa (ECEA) en niños con diarrea del Hospital María Auxiliadora de Lima”. En sus resultados determinaron la presencia de ECEA en un porcentaje relevante (17.16%), en comparación al resto de cepas que no fueron identificadas,

pudiendo estar presentes las cepas de *E. coli* enteropatógena (ECEP) y *E. coli* enterotoxigénica (ECET), implicadas en diarrea aguda en población infantil.

**ORBERA, T. (2004)**, Afirmó que la PCR contribuye al desarrollo de la Identificación filogénica y su aplicación clínica en la detección de microorganismos enteropatógenos que causan diarreas, esta aplicación es útil como método alternativo para mejorar la eficiencia en la detección de agentes causales de IDAs.

**ARIAS, I. (2005)**, indicó que existen seis grupos patógenos o patotipos de *E. coli* que ocasiona diarrea en sujetos sanos, entre ellas se encuentran: *E. coli* enterotoxigénica (ECET), enteroinvasiva (ECEI), enterohemorrágica (ECEH), enteroagregativa (ECEA), adherente difusa (ECDA) y enteropatógena (ECEP), Además, a través de una continua vigilancia epidemiológica llevada cabo por las autoridades de salud de México, se ha demostrado que ECET y ECEP son dos de los principales patógenos aislados en casos de diarrea infantil.

**SALAS, R. (2005)**, desarrolló un estudio acerca de la resistencia bacteriana a los antibióticos en pacientes de consulta externa que padecían de infecciones diarreicas aguda (IDA), en el área de salud de Palmares (Costa Rica); para ello, recolectaron 902 muestras, de las cuales 205 resultaron positivas para *E. coli*, llegando a caracterizar a esta especie bacteriana como el agente etiológico más común en dichos procesos infecciosos

**PADILLA, C. (2005)**, indicó que en los últimos años se han desarrollado nuevas técnicas moleculares de tipificación basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), las cuales permitieron un importante avance en el estudio de las enfermedades infecciosas. En los países desarrollados, tanto la PCR que utiliza cebadores arbitrarios (AP – PCR) y la PCR que emplea cebadores que hibridan con secuencias de ADN repetidas (rep – PCR), son las técnicas más utilizadas para identificar bacterias y hongos.



**ESTRADA, T. et al. (2005)**, realizaron un estudio sobre la presencia de “*Escherichia coli* diarreogénica droga resistente”, a partir de 62 casos de niños menores de cinco años internados por diarrea aguda en hospitales de Ciudad de México, Villahermosa y Tabasco, reportando que de la totalidad de cepas de *E. coli* aisladas, el 27% correspondió a ECET y el 21% correspondió a ECEP atípicas (cepas del tipo II).

**GONZÁLEZ, T. (2005)**, desarrolló en la ciudad de México, un estudio sobre “Enfermedades transmitidas por alimentos y PCR: prevención y diagnóstico”, sugiriendo el empleo de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), donde aislaron e identificaron *E. coli*, *Shigella* sp. y *Salmonella* sp.; lo que sugiere, que es un procedimiento alternativo para la identificación y tipificación de bacterias de una manera eficaz y rápida, en comparación con otros análisis como: el asa intestinal de conejo y las determinación de líneas celulares mediante la reacción de antígeno anticuerpo.

**LEOTTA, G. et al. (2005)**. indicaron que la diarrea producida por ECET puede ser leve, breve y autolimitada; pero también puede ser grave y que la contaminación fecal de agua y alimentos es la principal fuente de infección, siendo la dosis infectiva de  $10^8$  UFC (Unidades Formadoras de Colonias).

**PRADO, V. et al. (2005)**, estudiaron la situación epidemiológica de las enfermedades transmitidas por alimentos en Santiago de Chile y reportaron que ECET se asociaba al 38% de las diarreas en niños menores de 5 años, considerándola como el principal responsable de mortalidad en aquellas edades.

**MALORNY, B. et al. (2005)**, realizaron la detección molecular de toxinas termoestable y termolábil de *E. coli* mediante hibridación con sondas específicas para los genes *LT* y *ST* de esta especie bacteriana. Sus resultados indicaron que de 233 cepas, el 27.9% poseía el gen *LT*, 3.0% el gen *ST* y 1.3% tenía ambos genes.

**ESLAVA, C. et al. (2006)**, indicaron que las ECET colonizan la mucosa del intestino delgado por medio de pili o fimbrias que tienen diversas formas denominadas CFA (*colonization factor antigens*). Estas toxinas son codificadas por genes presentes en un plásmido, el cual también puede tener información genética para los CFA, aunque algunos genes de ST, se han encontrado en transposones. Además se determinaron que la utilización del medio de cultivo de Mac Conkey – sorbitol, era específico para detectar el serotipo O<sub>157</sub>:H<sub>7</sub>, a diferencia del resto de cepas de *E. coli*.

**FERNÁNDEZ, F. (2006)**, investigó la patogénesis molecular, epidemiología y diagnóstico de *Escherichia coli* enteropatógena (ECEP), logrando aislar *E. coli* con adherencia localizada (LA, cepas del tipo I), en el 7% de 208 casos de niños con cuadro diarreico grave. Asimismo, en el 12% de casos se identificaron cepas con adherencia parecida a la localizada (LA, cepas del tipo II). Adicionalmente, estos resultados sugirieron que las cepas ECET (tipos I y II), eran la causa del 17% de los casos graves de diarrea en niños que acuden al servicio de urgencias del Hospital Infantil de México.

**NOHEMÍ, C. et al. (2006)**, realizaron la tipificación metabólica y genético molecular de *Escherichia coli* diarreogénica, demostrando que la técnica de la PCR es la más eficaz para determinar la presencia de enterobacterias, en un tiempo corto, permitiendo evaluar la presencia de los 6 grupos patógenos causantes de infecciones diarreicas agudas (IDA), reportando que de las 18 cepas de *enterobacterias* estudiadas, el 72% correspondieron a *Escherichia coli*, 17% a *Morganella morganii* ssp. *morganii* y el 11% de *Salmonella cholerae-suis*.

**ROSENDE, V. (2006)**, afirmó que la técnica de PCR es la más eficaz y rápida para la detección de microorganismos teniendo en cuenta sus genes que causan patogenicidad. En los últimos años se han desarrollado y estandarizado técnicas de PCR, de detección específica, para determinar genes *LT* y *ST*, teniendo en cuenta la categoría patogénica de ECET.

**REGUA, A. et al. (2006)**, realizaron estudios descriptivos en poblaciones rurales, donde indican que solo un 15% de casos fueron ECET positiva en Tanzania, mientras que en Brasil fue de un 5%. Estas diferencias están marcadas por las condiciones socioeconómicas de cada país.

**BLANCO, J. et al. (2007)**, estimaron que alrededor de 200 especies de bacterias patógenas causantes de enfermedades diarreicas; entre las que destacaban las cepas de *E. coli* enteropatógenas; determinando que su efecto patogénico variaba mucho en función de las especies, Manifestaron que hasta la fecha se conocen, seis categorías patógenas de *E. coli*, las cuales ocasionan diferentes cuadros clínicos. Dentro de estas categorías patogénicas, sobresale la ECET, causante de IDA tanto en niños como en adultos.

**URRUTIA, T. et al. (2007)**, efectuaron un estudio relacionado con el aislamiento de *Escherichia coli* O<sub>157</sub>, en la ciudad de Gualeygachu; de las 279 muestras procesadas, 75 cepas resultaron positivas por PCR y concluyeron que la optimización y posterior validación de la PCR múltiple es una técnica rápida, precisa, segura y selectiva para la detección de ECEH O<sub>157</sub> y no-O<sub>157</sub> en muestras clínicas luego de un primer aislamiento y en muestras de alimentos después de un enriquecimiento y posterior aislamiento.

**VIDAL, J. et al. (2007)**, definieron que la ECET es una de las principales causantes de diarrea en niños menores de cinco años y que ha ocasionado muchas muertes en los hospitales de Ciudad de México y Villahermosa. Además, determinaron que la frecuencia de aislamiento de este grupo patógeno, en niños con diarrea fluctuaba entre el 10 al 30%. En niños en edad escolar y en adultos, este agente puede pasar inadvertido y pocas veces puede producir la diarrea del viajero. La enfermedad tiene un periodo de incubación de 14 a 50 h. El cuadro clínico se caracteriza por producir

diarrea aguda, generalmente sin sangre, sin moco, sin pus y en pocos casos se presentan fiebre y vómito.

**CHÁVEZ, B. et al. (2007)**, identificaron cepas de ECET en diferentes ambientes, reportando que el 75% de las cepas aisladas de aire y agua, el 73.52% de las cepas aisladas de niños, el 61.11% de las cepas obtenidas de alimentos y el 42.85% de cepas aisladas de adultos, correspondían a este tipo de *E. coli*.

**MAVES, R. (2007)**, observó una marcada disminución de la resistencia de *E. coli* enterotoxigénica a los mismos antibióticos estudiados el 2004, en la cual, el 41% de las cepas aisladas en este periodo fue resistente a ampicilina, el 9% al amoxicilina-clavulanato, 0% a la azithromycina, ciprofloxacina y ceftriaxona, el 9% al cloramfenicol y el 38% al cotrimoxazol.

**SUNASS, (2007)**, indica que Perú presenta carencias en servicios de saneamientos básico, razón por la cual tanto las familias de las zonas urbanas y más aún, las rurales, se ven expuestas fácilmente a ser infectadas por un sin número de microorganismos patógenos intestinales, principalmente bacterias.

**CORIA, J. et al. (2008)**, mencionaron que cada año a nivel mundial, de un billón de casos de diarrea resultan en 4 millones de muertes entre niños menores de 5 años. Esta cifra se ha observado principalmente en países en vías de desarrollo. Así mismo, las IDAs se constituyen entre las principales causas de enfermedad y muerte en los lactantes, incluyendo al recién nacido, y se calculan en más del 85% de la población mundial. La incidencia de gastroenteritis neonatal se eleva durante las dos primeras semanas de vida y la mortalidad es mayor si el agente causal es una bacteria.

**PRATS, G. (2008)**, afirmó que a nivel mundial, el 40% de la población carece de acceso a saneamientos básicos, situación que pone en riesgo su salud, especialmente al consumir agua y alimentos contaminados, trayendo

como consecuencia una serie de infecciones gastrointestinales y que estos casos están asociados con la falta de acceso al agua potable, saneamiento inadecuado e insalubridad.

**VILA, J. et al. (2009)**, describieron que ante un cuadro de IDA debe hacerse una detallada historia clínica y un correcto estudio microbiológico para determinar al agente etiológico causante de morbilidad y mortalidad en niños menores de cinco años. Además realizaron un estudio descriptivo de los factores socioeconómicos y nutricionales en menores de cinco años, donde indicaron que dichos factores son uno de las causas para adquirir la IDAs en esas edades.

**DIRECCIÓN REGIONAL DE SALUD (DIRESA, 2010)**, reportó que en ese año, en la región Loreto se registraron aproximadamente 6 605 casos de diarrea, siendo 2 364 casos presentes en la ciudad de Iquitos. Cabe mencionar que en esta ciudad continuamente se reportan casos de IDA, causando desnutrición y problemas de salud en la población infantil, pudiendo ser la causa más común la presencia de la ECET, la cual podría estar afectando la salud de niños menores de 5 años.

**GABRIEL M. et al. (2010)**, Indicaron que *E. coli* enterotoxigénico (ECET) es la causa de casos de IDAs en población infantil de países en vías de desarrollo, y la virulencia de este grupo está dada por la producción de una toxina termoestable (ST) y una termolábil (LT), que dan como resultado una diarrea de tipo acuosa. Además en el presente estudio se detectó ECET en 10 muestras (8,2 %).

**COSTA, J. (2011)**, Indicó que la técnica de la PCR, es un método eficaz y rápido para la detección de microorganismos patógenos causantes de diversas enfermedades entre estas la diarrea en niños menores de cinco años. Lo que contribuiría a una acción positiva en combatir a los brotes epidemiológicos.

**Gil, E. (2011) & Soto, M. (2011)**, Mencionaron que la PCR en comparación con la Hibridación suele ser económica y rápida, pues en la PCR se genera copias de fragmentos del ADN haciendo la factible el análisis de cualquier microorganismo. Sin embargo, la hibridación utiliza materiales costosos pues trate de adherirse al ADN mediante métodos complicados.

### III. MARCO TEORICO

A nivel mundial, las enfermedades diarreicas constituyen un problema de salud pública, especialmente en los países de Asia, África y América Latina, donde representan una importante causa de morbilidad, produciendo desnutrición y retardo del crecimiento en niños menores de cinco años, que pueden padecer hasta 10 episodios diarreicos por año, en cuanto a la mortalidad representando el 50% del total de casos en la población (González, C 2004; Blanco, *et al.* 2007). Así mismo, su transmisión y frecuencia se relaciona con la falta de higiene y la pobreza, así como con la desnutrición y las malas condiciones sanitarias. Rodríguez, A. (2004); desde 1920, *E. coli* es uno de los agentes causantes de diarreas en dichas poblaciones (Blanco, J. *et al.* 2007).

En México, las enfermedades diarreicas ocupan uno de los primeros lugares en la morbilidad de niños menores de cinco años, y generan 7.4% en la demanda de consultas en los servicios de salud y 10% de las hospitalizaciones pediátricas. Así mismo, su transmisión y frecuencia se relaciona con la falta de higiene y la pobreza, al igual como la desnutrición y malas condiciones sanitarias (Rodríguez, A. 2004; Prats, G. 2008).

Además, estos episodios de infecciones diarreicas agudas (IDA) en niños menores de 5 años, causadas muchas veces por bacterias, originan problemas colectivos en la sociedad debido al surgimiento de nuevas formas de transmisión, provocando diarreas persistentes en grupos vulnerables, causada presumiblemente por agentes infecciosos, que a pesar de su carácter agudo tiene una duración de 14 días o más (Vidal, *et al.* 2007).

*E. coli* puede presentarse por periodos cortos en el medio ambiente; sin embargo, para su transmisión requiere de nuevos individuos hospederos y así poder persistir por largo plazo. (Prado, V. *et al.* 2005), Al igual que otras bacterias, ésta genera cierto tipo de mecanismos biológicos que conducen a un fenotipo de resistencia que le permite sobrevivir. Estos mecanismos

pueden ser: producción de enzimas, cambios de permeabilidad, modificación de las proteínas de unión, mutaciones, eliminación de requerimientos de timina, entre otros (Vidal, J. *et al.* 2007). Esta bacteria, también ha desarrollado ciertos factores de virulencia para causar daño al hospedero, ya que promueve la colonización y facilita su sobrevivencia, destacando su adherencia mediada por pili o fimbrias, la presencia de enterotoxinas, las adhesinas no fimbriales y las cápsulas (Chávez, B. *et al.* 2007). Por tales motivos, se han realizado estudios en torno a la presencia de *E. coli* como agente causal de diarreas en niños menores de 5 años, en la que se ha precisado que existen seis grupos patógenos de *E.coli* que ocasionan diarrea en sujetos sanos, estas son: *E. coli* enterotoxigénica (ECET), enteroinvasiva (ECEI), enterohemorrágica (ECEH), enteroagregativa (ECEA), adherente difusa (ECDA) y enteropatógena (ECEP) (Blanco, J. *et al.* 2007). A través de una continua vigilancia epidemiológica llevada a cabo por las autoridades de salud de México, se ha demostrado que ECET y ECEP son los principales patógenos aislados en casos de diarrea infantil (Arias I, 2005); los que ha ocasionado muchas muertes en los hospitales de Ciudad de México y Villahermosa. Además, se ha determinado que la frecuencia de aislamiento de este grupo patógeno, en niños con diarrea fluctúa entre el 10 al 30% (Vidal, J. *et al.* 2007).

El cuadro clínico producido por la ECET, se caracteriza por presentar diarrea aguda, con un periodo de incubación de 14 a 50 h, generalmente sin sangre, sin moco, sin pus y en pocos casos se presenta fiebre y vómito (Vidal, J. *et al.* 2007). Se refiere que, la patogenicidad de ECET involucra factores de colonización, expresión de adhesinas intestinales y la producción de enterotoxinas, como la termolábil (LT), cuyo mecanismo es semejante a la enterotoxina de *Vibrio cholerae* y *Campylobacter jejuni*, también produce la enterotoxina termoestable (ST), que contiene múltiples residuos de cisteína, lo cual le confiere mayor estabilidad. Cabe mencionar que ambas toxinas pueden sintetizarse en forma simultánea (Chávez, B. *et al.* 2007). Así mismo, las ECET colonizan la mucosa del intestino delgado por medio de pili o fimbrias que tienen diversas formas denominadas CFA (*colonization factor*



*antigens*). Estas toxinas son codificadas por genes presentes en un plásmido, el cual también puede tener información genética para los CFA, aunque algunos genes de *ST* se han encontrado en transposones (Eslava C. *et al.* 2006). Las toxinas LT y ST aumentan el nivel intracelular de AMPc y GMPc, respectivamente, que se encuentran en la membrana de las células intestinales, provocando la salida de agua e iones (Chávez, V. *et al.* 2007). Además, se le atribuye a la contaminación fecal de agua y alimentos, como la principal fuente de infección, siendo la dosis infectiva de  $10^8$  UFC (Unidades Formadoras de Colonias)(Leotta, G. *et al.* 2005). Al respecto, diversos investigadores han determinado la presencia de ECET como agente causal de diarrea (Prado, V. *et al.* 2005).

El Perú, es uno de los países de mayor prevalencia de Infecciones Diarreicas Agudas (IDA), las cuales pueden ser causante de muerte u ocasionar diarrea, principalmente en la población conformada por niños menores de 5 años, esta problemática es una consecuencia de los factores socioeconómicos (pobreza, hacinamiento, falta de trabajo, etc.) y socioculturales (ignorancia, mala higiene, etc.), de la población (Prats, G. 2008). Cabe hacer mención que en la ciudad de Iquitos se han reportado 2 364 casos de niños con IDAs, originando desnutrición y problemas de salud en la población infantil, pudiendo ser el agente causal la presencia de la ECET, que podría estar afectando la salud de niños menores de 5 años (DIRESA, 2010).

Durante los últimos años, la técnica de identificación molecular de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), se ha estandarizado a fin de ser utilizada como una técnica de detección específica de genes, entre ellos, los genes *LT* termolábiles y *ST* termoestables de la ECET (Vidal, J. *et al.* 2007).

El desarrollo y la automatización de los métodos de PCR abren una gran oportunidad para su aplicación como herramientas analíticas en microbiología y control de calidad de los alimentos, debido a su rapidez, alta

sensibilidad y eficiencia para la detección temprana de los patógenos (Fernández, F. 2006). De este modo, contribuirán a la prevención de IDAs (Prado, B. *et al.* 2005).

## IV. METODOLOGIA

### 4.1 Tipo de investigación.

No experimental, porque en el estudio de investigación se limitó a observar y obtener muestras de heces diarreicas, sin intervenir o manipular las variables.

### 4.2 Diseño de Investigación.

Diseño transeccional correlacional, porque analizó el comportamiento de las variables en un momento del tiempo, para un determinado grupo social.

#### 4.2.1 Población y Muestra.

De una población de 2364 niños con diarrea de la ciudad de Iquitos (Dirección Regional de Salud – DIRESA), se efectuó el cálculo estadístico, para obtener el tamaño de una muestra representativa, para lo cual se utilizó la siguiente fórmula:

Para estimar la proporción poblacional (prevalencia)

$$n = \frac{(Z\alpha)^2 pq}{E^2}, \text{ donde:}$$

$Z\alpha$  = Coeficiente de confiabilidad, nivel de confianza 95%, es 1.96.

$pq$  = Proporción estimada.

$E$  = Error absoluto o precisión.

Si se conoce N (tamaño poblacional)

$$N_f = \frac{n}{1 + n/N}$$

Donde:

$N_f$  = tamaño final de la muestra

$n$  = tamaño estimado de la muestra

$N$  = tamaño total de la población

Donde, se obtuvo 188 niños que conformaban la muestra a estudiar. Las heces fueron colectadas durante 4 meses de los principales centros de salud de la ciudad de Iquitos (centro salud de San Juan, centro de salud 9 de Octubre, centro de salud 6 de Octubre, centro de salud de Belén, centro de salud de Moronacocha, centro de salud de Maynas, centro de salud San Antonio y centro de salud Bellavista de Nanay). El tipo de muestreo que se empleó fue estadístico inferencial, a partir de estas muestras se sacaron conclusiones generales válidas para toda la población, previa determinación del grado de fiabilidad o significancia de los resultados.

### **Criterios de exclusión**

- Niños menores de cinco años con diarrea que recibían tratamiento con antibióticos en los centros de salud y hospitales.
  
- Niños menores de cinco años con diarrea que no acudían a los centros de salud y hospitales.

### **Criterios de inclusión**

- Niños menores de cinco años con diarrea que no recibían tratamiento con antibióticos en los centros de salud.
- Niños menores de cinco años con diarrea que acudían a los centros de salud.

### **4.3 Procedimientos, técnicas e instrumentos.**

#### **Procedimientos**

El mecanismo de recolección fue el siguiente:

Se obtuvo una muestra de heces diarreicas (aproximadamente 2g), de aquellos pacientes menores de cinco años, derivados al laboratorio de análisis de cada establecimiento de salud (Anexo N° 01); la cual fue colocada en un frasco colector de polietileno, estéril, al que se le asignó un código; luego, las muestras fueron colocadas en un termo de tecknopor para mantenerlas en conservadas hasta ser llevadas al laboratorio de Análisis Clínico de la Facultad de Ciencias Biológicas - UNAP, sito en Pevas 5ta. cuadra, de la ciudad de Iquitos, para su procesamiento respectivo.

Paralelamente, los datos de cada muestra se registraron en fichas, en las que se especificó el código y datos del paciente, tales como: nombre, sexo, edad, procedencia, etc. (Anexo N° 02).

#### **Técnicas**

##### **Aislamiento microbiológico**

Las muestras fueron cultivadas en placas con Agar MacConkey y se incubaron durante 24h a 37°C. Posteriormente, se seleccionaron cinco colonias lactosa (+), las que se repicaron en Agar Tripticosa de Soya (TSA), para ser identificadas mediante pruebas bioquímicas, las cuales fueron: Oxidasa, comportamiento en el agar TSI, Indol, citrato, etc., que

se consideraron adecuadas para la caracterización fenotípica e identificación de *Escherichia coli* (Anexo N°03-A y N°03-D). Estas fueron preservadas en caldo simple con glicerol (proporción 1:1), a -20°C, para posteriormente efectuar la extracción de ADN (Eslava, C. *et al.* 2006).

## **Identificación Molecular**

Para el estudio molecular se procedió de la siguiente manera:

### **Extracción de ADN**

Se centrifugó un cultivo microbiano de 5 ml, en caldo simple, en un microtubo de 1.5 ml, a 6000 rpm, durante 10 minutos. Se repitió este procedimiento durante tres veces consecutivas, a fin de separar las células bacterianas del líquido, el cual era decantado. Posteriormente, se lavó el sedimento agregando agua ultrapura-estéril, en un volumen de 1ml, el cual fue homogenizado suavemente en vórtex durante 1 minuto; seguidamente se llevó nuevamente a centrifugar a 6000 rpm durante 10 minutos, se desechó el agua y al sedimento (células bacterianas), se le agregó agua ultrapura-estéril en un volumen de 50 µl, esto fue llevado a calentar en un baño maría de 100°C, durante 10 minutos. Durante este periodo, cada 3 minutos, se procedió a agitar ligeramente el tubo por inversión.

Después del calentamiento, se llevó a centrifugar a 14 000 rpm durante 10 minutos. Luego, se transfirió el sobrenadante a otro microtubo de 1.5 ml, el cual fue llevado a refrigeración. (Vidal, J. *et al.* 2007). (Anexo N° 03-B)

### **Reacción en Cadena de Polimerasa (PCR)**

Se identificaron los genes que sintetizan las toxinas LT y ST, mediante la técnica de la Reacción en Cadena de Polimerasa - PCR. Los

oligonucleótidos que se utilizaron fueron: uno para detectar el gen de la toxina termoestable (*ST*) y otro para detectar el gen de la toxina termolábil (*LT*) (Anexo 05). Se preparó una mezcla total de 20 µl para realizar la PCR, utilizando: Buffer 10X pH 9.0, 2 µl.; MgCl<sub>2</sub> .25 mM, 3.5µl.; desoxirribonucleótidos 5µM, 2 µl; Primers F y R de cada uno, 2 µl; Taq polimerasa 5 U/µl, 0.25 µl.: ADN, 3 µl. y agua ultrapura-estéril; c.s.p. 20 µl.

Para la amplificación, se empleó un termociclador, bajo las siguientes condiciones, desnaturalización a 98°C por 50 segundos; seguido por 20 segundos a 52 °C, 30 segundos a 72°C y 1 segundo a 74°C como extensión final.

Los productos amplificados se visualizaron en gel de agarosa al 1% con 3 µl. de bromuro de etidio, para ser observados a través de una lámpara UV, a fin de ser fotografiados para registrar los resultados (Vidal J, *et al.* 2007). (Anexo N° 06).

#### **4.4 Procesamiento de la información.**

Para el análisis de los datos se utilizó la estadística inferencial, mediante los siguientes análisis estadísticos:

- **Análisis univariado**: La Frecuencia. Este análisis permitió relacionar la presencia de ECET en los niños con diarrea según su rango de edad, sexo y procedencia.
- **Análisis bivariado**: el Chi cuadrado, con un alfa de 0.05. Este análisis permitió analizar la prevalencia de la ECET en los niños con diarrea menores de cinco años.

Para el análisis de los resultados del presente estudio se empleó el programa SPSS 16.0

## V. RESULTADOS.

A fin de obtener una mejor comprensión de los resultados del presente estudio, estos se presentan a continuación mediante cuadros y gráficos.

### CUADRO N°1

**Número de niños considerados en este estudio, según sexo y grupo etáreo, Iquitos - 2011.**

Grupo etáreo (años)	SEXO				Total	%
	Masculino	%	Femenino	%		
<1	11	13.92	15	13.04	26	13.83
1 a 2	25	31.65	52	45.22	77	40.96
2 a 3	14	17.72	25	21.74	39	20.74
3 a 4	11	13.92	7	6.09	18	9.57
4 a 5	12	15.19	16	13.91	28	14.89
<b>Total</b>	<b>73</b>		<b>115</b>		<b>188</b>	<b>100</b>

Fuente: Datos recopilados por los tesisistas

#### Interpretación

En el presente cuadro se puede observar que se estudió a un total de 188 niños menores de cinco años con diarrea, distribuidos en base al sexo y edad, donde se hace referencia que el mayor número de niños con diarrea correspondió al sexo femenino (115), mayormente en el grupo etáreo de 1 a 2 años (52), mientras que el menor número se encontró en el grupo etáreo de 3 a 4 años (7).

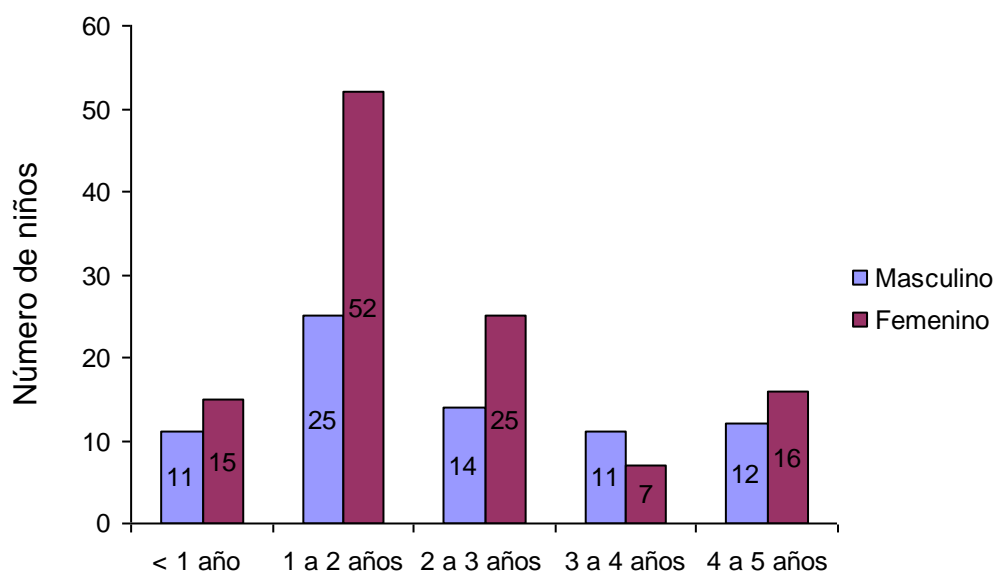
Por otro lado, la población masculina considerada en este estudio estuvo conformada por 73 niños, los que mayormente correspondieron al grupo



etáreo de 1 a 2 años (25), mientras que el menor número correspondió a los grupos etáreos < 1 y de 3 a 4 años (con 11 en ambos grupos).

### GRÁFICO N°1

**Número de niños considerados en este estudio, según sexo y grupo etáreo, Iquitos - 2011**



Fuente: Datos recopilados por los tesisistas

## **CUADRO N° 2**

**Número de niños considerados en este estudio, según sexo y procedencia,  
Iquitos - 2011**

<b>Lugar de Procedencia</b>	<b>Sexo</b>				<b>Total</b>	<b>%</b>
	<b>Masculino</b>	<b>%</b>	<b>Femenino</b>	<b>%</b>		
C.S. San Juan	17	22.67	35	30.97	52	27.66
C.S. 9 de Octubre	19	25.33	15	13.27	34	18.09
C.S. 6 de Octubre	2	2.67	9	7.96	11	5.85
C.S. MoronaCocha	6	8.00	8	7.08	14	7.45
C.S. Belén	3	4.00	3	2.65	6	3.19
C.S. Maynas	3	4.00	9	7.96	12	6.38
C.S. San Antonio	23	33.33	36	30.09	59	31.38
<b>Total</b>	<b>73</b>		<b>115</b>		<b>188</b>	<b>100.00</b>

Fuente: Datos recopilados por los tesisistas

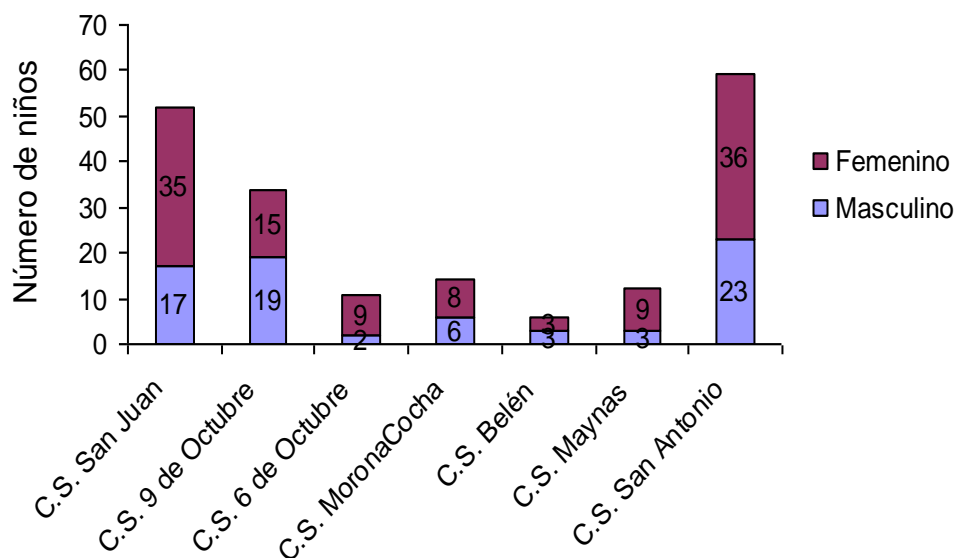
### **Interpretación**

En el presente cuadro se puede observar que se estudió a un total de 188 niños menores de cinco años con diarrea, distribuidos en base al sexo y lugar de procedencia, donde se hace referencia que el mayor número de niños con diarrea correspondió al sexo femenino (115), los que mayormente procedían del C.S. de San Antonio (36), seguido del C.S. de San Juan (35), mientras que el menor número procedían del C.S. de Belén (3).

Por otro lado, la población masculina considerada en este estudio estuvo conformada por 73 niños, los que mayormente procedían del C.S. de San Antonio (23), mientras que el menor número procedían del C.S. 6 de Octubre (2).

## GRÁFICO N° 2

**Número de niños considerados en este estudio, según sexo y procedencia, Iquitos – 2011**



Fuente: Datos recopilados por los tesisistas

### **CUADRO N° 3**

**Número de niños considerados en este estudio, según grupo etáreo y procedencia, Iquitos - 2011**

<b>Grupo etáreo (años)</b>	<b>Centro de Salud de procedencia</b>							<b>Total</b>
	<b>San Juan</b>	<b>9 de Octubre</b>	<b>6 de Octubre</b>	<b>Belén</b>	<b>Morona Cocha</b>	<b>Maynas</b>	<b>San Antonio</b>	
< 1	3	7	0	0	6	1	9	26
1 a 2	21	13	6	0	2	6	29	77
2 a 3	10	10	2	4	3	2	8	39
3 a 4	6	1	3	0	1	2	5	18
4 a 5	12	3	0	2	2	0	8	28
<b>Total</b>	<b>52</b>	<b>34</b>	<b>11</b>	<b>6</b>	<b>14</b>	<b>12</b>	<b>59</b>	<b>188</b>

Fuente: Datos recopilados por los tesisistas

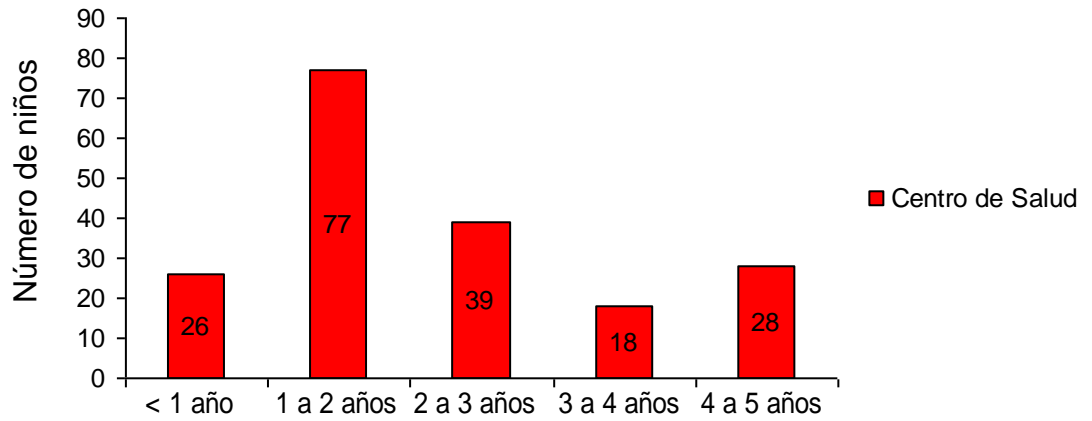
#### **Interpretación**

En el presente cuadro se puede observar la distribución de los 188 niños menores de cinco años con diarrea estudiados, en base al grupo etáreo y lugar de procedencia, donde se hace referencia que el mayor número de niños correspondió al grupo etáreo de 1 a 2 años (77), los que mayormente procedían del C.S. de San Antonio (29).

En cuanto, al menor número se niños correspondió al grupo etáreo de 3 a 4 años (18), los que en mayormente procedían del C.S. de San Juan y San Antonio (6 y 5, respectivamente).

### GRÁFICO N° 3

**Número de niños considerados en este estudio, según grupo etáreo y lugar de procedencia, Iquitos - 2011**



Fuente: Datos recopilados por los tesisistas

#### CUADRO N° 4

**Presencia de *Escherichia coli* en niños menores de cinco años con diarrea, Iquitos – 2011**

<i>Escherichia coli</i>	n	%
Presente	156	82.98
Ausente	32	17.02
Total	188	100

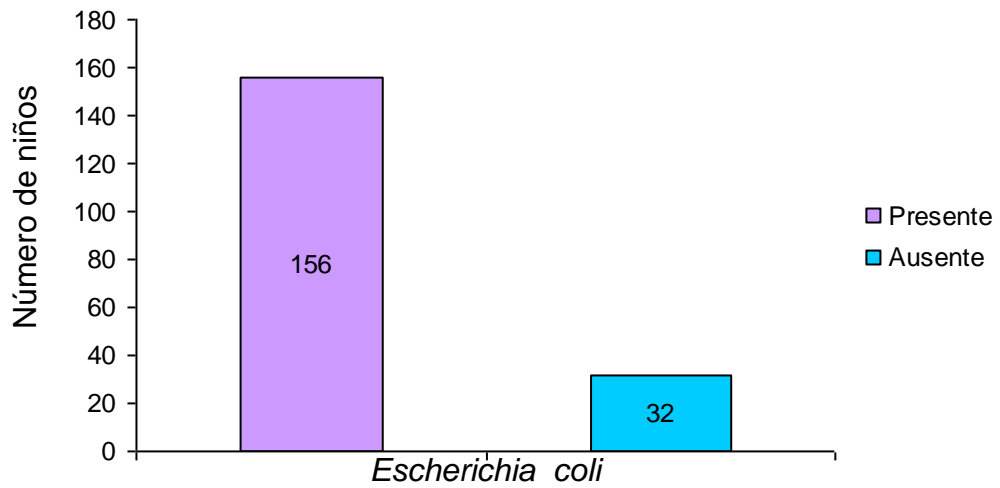
Fuente: Datos recopilados por los tesisistas

#### Interpretación

En el presente cuadro se puede observar que de las 188 muestras analizadas, provenientes del total de niños menores de cinco años con diarrea considerados en este estudio, se hace referencia que en 156 estaba presente *Escherichia coli*, mientras que en las 32 restantes se identificó otro tipo de microorganismo.

#### GRÁFICO N° 4

**Presencia de *Escherichia coli* en niños menores de cinco años con diarrea, Iquitos – 2011**



Fuente: Datos recopilados por los tesisistas

## **CUADRO N° 5**

### **Identificación Molecular de *Escherichia coli* enterotoxigénica en niños menores de cinco años con diarrea, Iquitos – 2011**

<b><i>Escherichia coli</i> enterotoxigénica</b>	<b>n</b>	<b>%</b>
Positivo	28	17.95
Negativo	128	82.05
Total	156	100

Fuente: Datos recopilados por los tesisistas

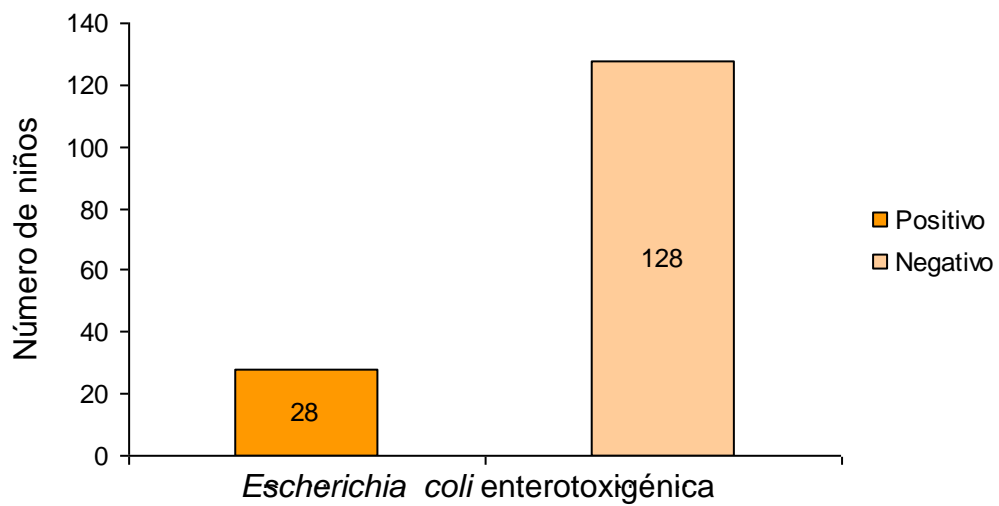
#### **Interpretación**

En el presente cuadro se puede observar que de las 156 muestras que presentaban *E. coli*, al ser analizadas molecularmente, se determinó que 28 de ellas eran positivas a *Escherichia coli* enterotoxigénica.



### GRÁFICO N° 5

#### Identificación Molecular de *Escherichia coli* enterotoxigénica en niños menores de cinco años con diarrea, Iquitos – 2011



Fuente: Datos recopilados por los tesisistas

## CUADRO N° 6

**Presencia de *Escherichia coli* enterotoxigénica en niños menores de cinco años con diarrea, según grupo etáreo y sexo de la ciudad de Iquitos – 2011**

Grupo etáreo (Años)	Presencia de <i>E. coli</i> enterotoxigénica					
	Masculino	%	Femenino	%	Total	%
< 1	2	22.22	1	5.26	3	10.71
1 a 2	3	33.33	14	73.68	17	60.71
2 a 3	1	11.11	1	5.26	2	7.14
3 a 4	2	22.22	1	5.26	3	10.71
4 a 5	1	11.11	2	10.53	3	10.71
total	9		19		28	100.00

Fuente: Datos recopilados por los tesisistas

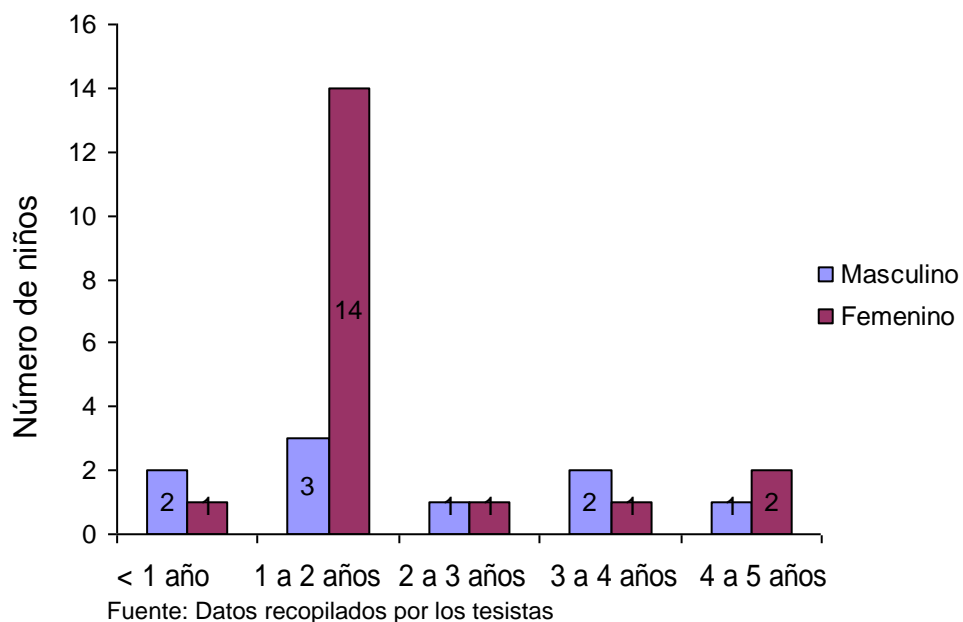
### Interpretación

En el presente cuadro se puede observar las 28 muestras de los niños estudiados que portaban *E. coli* enterotoxigénica (ECET), identificada molecularmente, distribuidos en base al sexo y grupo etáreo. Se hace referencia que el mayor número de niños portadores de ECET, correspondió al sexo femenino (19), mayormente en el grupo etáreo de 1 a 2 años (14).

Por otro lado, la población masculina portadora de ECET estuvo conformada por 9 niños, los que mayormente correspondieron al grupo etáreo de 1 a 2 años (3).

## GRÁFICO N° 6

**Presencia de *Escherichia coli* enterotoxigénica en niños menores de cinco años con diarrea, según grupo etáreo y sexo de la ciudad de Iquitos – 2011**



## CUADRO N° 7

**Presencia de *Escherichia coli* enterotoxigénica en niños menores de cinco años con diarrea, según sexo y lugar de procedencia, Iquitos – 2011**

Lugar de procedencia	Sexo				Total	%
	Masculino	%	Femenino	%		
C.S.San Juan	1	11.11	10	52.63	11	39.29
C.S.9 de Octubre	4	44.44	2	10.53	6	21.43
C.S. Maynas	0	0.00	1	5.26	1	3.57
C.S.San Antonio	4	44.44	6	31.58	10	35.71
Total	9		19		28	100.00

Fuente: Datos recopilados por los tesisistas

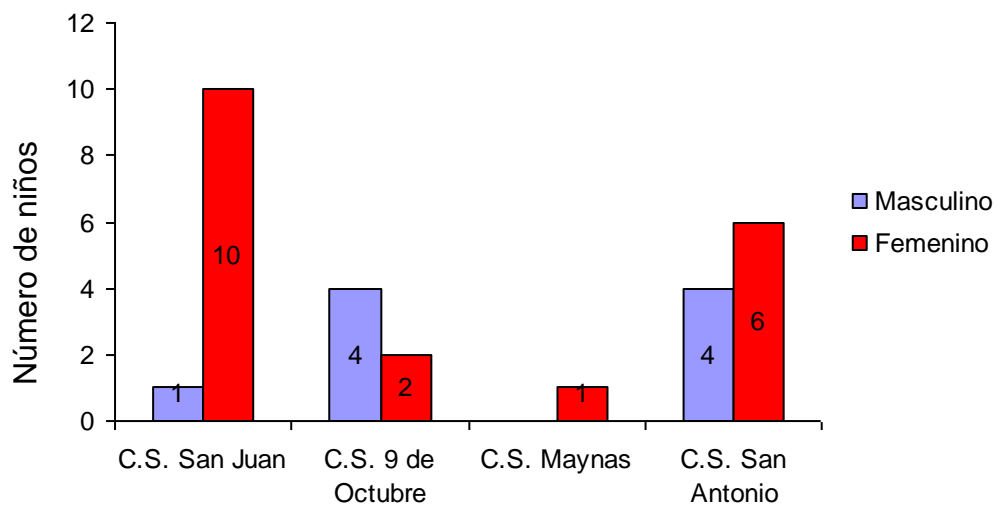
### Interpretación

En el presente cuadro se puede observar las 28 muestras portadoras de ECET, identificada molecularmente, distribuidas según el sexo y lugar de procedencia de los niños estudiados. Al respecto, se determinó que el mayor número de niños portadores de ECET correspondió al sexo femenino (19), los que mayormente procedían del C.S San Juan (10), mientras que el menor número procedió del C.S. de Maynas (1).

Por otro lado, la población masculina portadora de ECET estuvo conformada por 9 niños, los que mayormente procedían de los C.S 9 de Octubre y San Antonio (4 cada uno de ellos).

### GRÁFICO N° 7

**Presencia de *Escherichia coli* enterotoxigénica en niños menores de cinco años con diarrea, según sexo y lugar de procedencia, Iquitos – 2011**



Fuente: Datos recopilados por los tesisistas

## **CUADRO N° 8**

### ***Escherichia coli* enterotoxigénica en niños menores de cinco años con diarrea, según edad y lugar de procedencia, Iquitos – 2011**

<b>Grupo etáreo (años)</b>	<b>Lugar de procedencia</b>				<b>Total</b>
	<b>San Juan</b>	<b>9 de Octubre</b>	<b>Maynas</b>	<b>San Antonio</b>	
< 1	1	1	0	1	3
1 a 2	8	3	0	6	17
2 a 3	0	0	1	1	2
3 a 4	2	0	0	1	3
4 a 5	0	2	0	1	3
<b>Total</b>	<b>11</b>	<b>6</b>	<b>1</b>	<b>10</b>	<b>28</b>

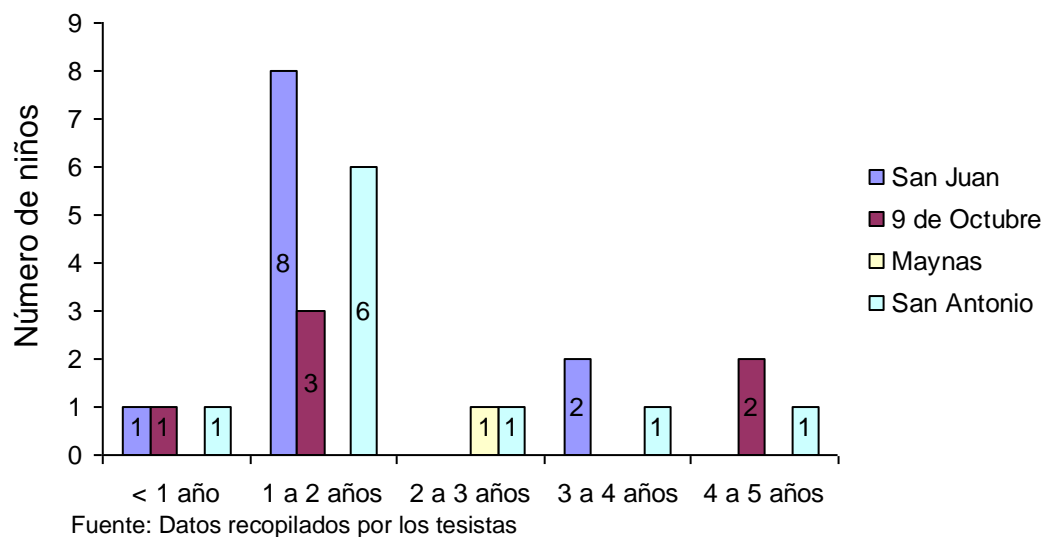
Fuente: Datos recopilados por los tesisistas

### **Interpretación**

En el presente cuadro se puede observar las 28 muestras portadoras de ECET, identificada molecularmente, distribuidas según el grupo etáreo y lugar de procedencia de los niños estudiados. Al respecto, se determinó que el mayor número de niños portadores de ECET correspondió al grupo etáreo de 1 a 2 años (17), los que mayormente procedían del C.S San Juan (8). Por otro lado, el menor número de portadores de ECET correspondió al grupo etáreo de 2 a 3 años (2), procedentes de los C.S. de Maynas y San Antonio.

## GRÁFICO N° 8

***Escherichia coli* enterotoxigénica en niños menores de cinco años con diarrea, según edad y lugar de procedencia, Iquitos – 2011**



### **CUADRO N° 9**

**Presencia de los genes *LT* y *ST* en las cepas de *Escherichia coli* enterotoxigénica, aisladas de niños menores de cinco años con diarrea, Iquitos – 2011**

<b><i>Escherichia coli</i> enterotoxigénica</b>	<b>n</b>	<b>%</b>
Gen LT	19	67.86
Gen ST	9	32.14
Total	28	100

Fuente: Datos recopilados por los tesisistas

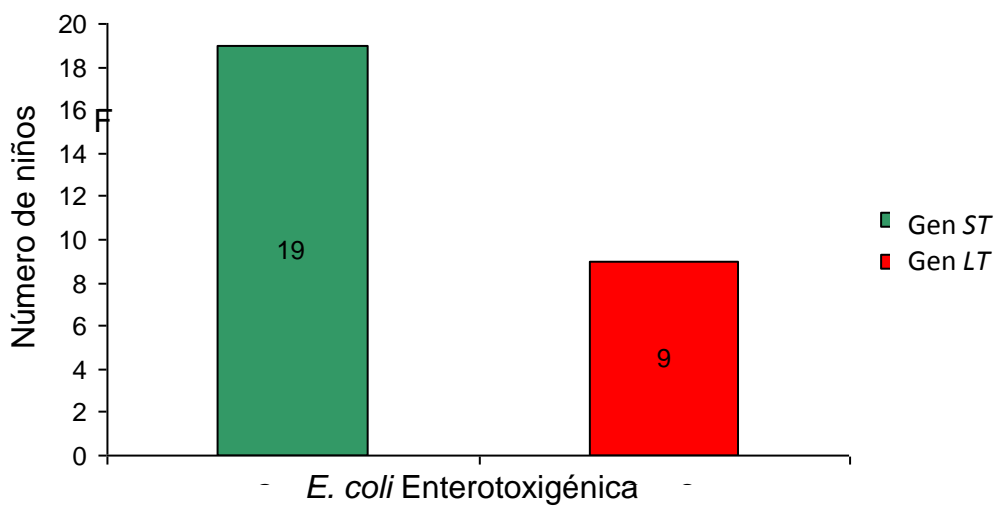
#### **Interpretación**

En el presente cuadro se observa que de las 28 cepas de ECET aisladas de niños menores de cinco años con diarrea, 19 presentaban el gen *LT*, mientras que las 9 restantes presentaban el gen *ST*. Cabe hacer mención que ninguna de las cepas mostró poseer los dos genes a la vez.



### GRÁFICO N° 9

Presencia de los genes *LT* y *ST* en las cepas de *Escherichia coli* enterotoxigénica, aisladas de niños menores de cinco años con diarrea, Iquitos – 2011



Fuente: Datos recopilados por los tesisistas

### CUADRO N° 10

Presencia de los genes *LT* y *ST* en cepas de *Escherichia coli* enterotoxigénica aisladas de niños menores de cinco años con diarrea, según sexo y grupo etáreo, Iquitos – 2011

Grupo etáreo (años)	<i>E. coli</i> enterotoxigénica				Total
	Gen <i>LT</i>		Gen <i>ST</i>		
	Masculino	Femenino	Masculino	Femenino	
< 1	1	1	1	0	3
1 a 2	2	9	1	5	17
2 a 3	1	1	0	0	2
3 a 4	1	1	0	1	3
4 a 5	1	1	1	0	3
Total	6	13	3	6	28

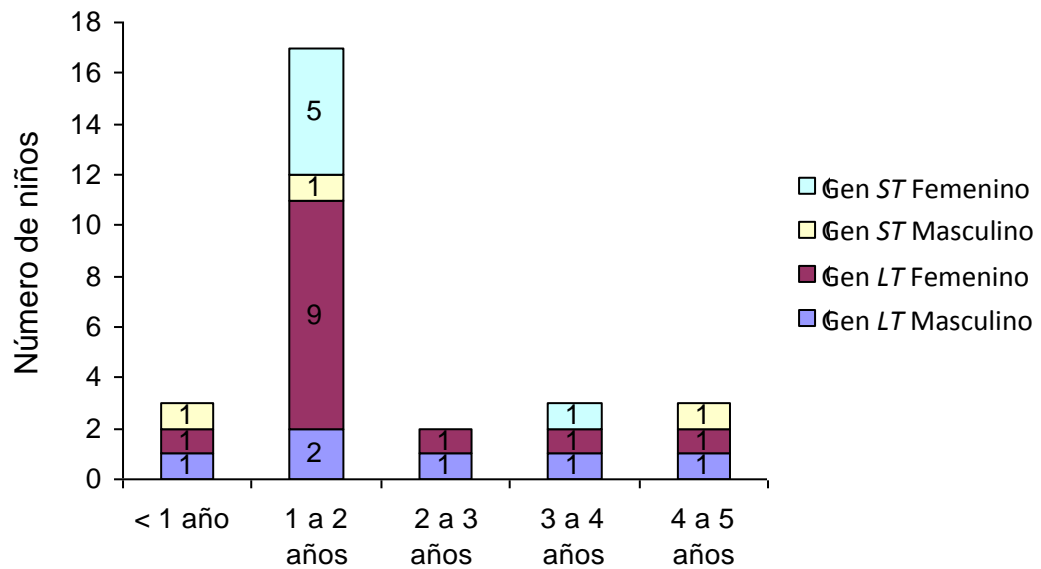
Fuente: Datos recopilados por los tesisistas

#### Interpretación

En el presente cuadro se puede observar la presencia de los genes *LT* y *ST* en las 28 cepas de ECET aisladas de los niños estudiados, en base a su sexo y grupo etáreo. Con respecto a las 19 cepas portadoras del gen *LT*, estas mayormente fueron aisladas del sexo femenino (13), mayormente del grupo etáreo de 1 a 2 años (9), mientras que las 9 cepas portadoras del gen *ST*, mayormente fueron aisladas del sexo femenino (6), mayormente del grupo etáreo de 1 a 2 años (5).

### GRÁFICO N° 10

**Presencia de los genes *LT* y *ST* en cepas de *Escherichia coli* enterotoxigénica aisladas de niños menores de cinco años con diarrea, según sexo y grupo etáreo, Iquitos – 2011**



Fuente: Datos recopilados por los tesisistas

### CUADRO N° 11

**Presencia de los genes *LT* y *ST* en cepas de *Escherichia coli* enterotoxigénica aisladas de niños menores de cinco años con diarrea, según sexo y lugar de procedencia, Iquitos – 2011**

Lugar de procedencia	<i>E. coli</i> enterotoxigénica				Total
	Gen <i>LT</i>		Gen <i>ST</i>		
	Masculino	Femenino	Masculino	Femenino	
C.S. San Juan	2	5	0	4	11
C.S.9 de Octubre	2	2	2	0	6
C.S.Maynas	0	1	0	0	1
C.S.San Antonio	2	5	1	2	10
Total	6	13	3	6	28

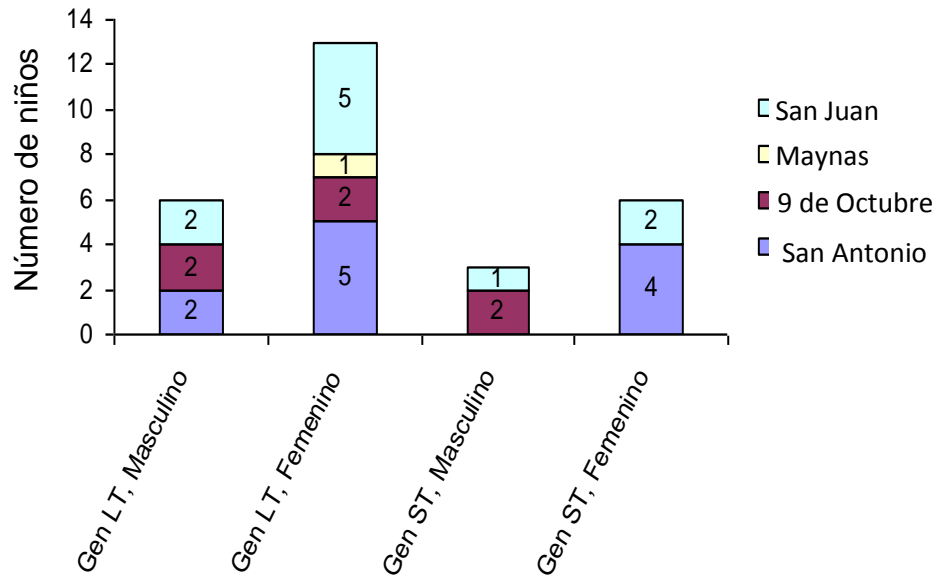
Fuente: Datos recopilados por los tesisistas

#### Interpretación

En el presente cuadro se puede observar la presencia de los genes *LT* y *ST* en las 28 cepas de ECET aisladas de los niños estudiados, en base a su sexo y lugar de procedencia. Con respecto a las 19 cepas portadoras del gen *LT*, estas mayormente fueron aisladas del sexo femenino (13), mayormente de niños procedentes de los C.S. de San Juan y San Antonio (5 cada uno de ellos), mientras que las 9 cepas portadoras del gen *ST*, mayormente fueron aisladas del sexo femenino (6), mayormente procedentes del C.S. de San Juan (4).

### GRÁFICO N° 11

**Presencia de los genes *LT* y *ST* en cepas de *Escherichia coli* enterotoxigénica aisladas de niños menores de cinco años con diarrea, según sexo y lugar de procedencia, Iquitos – 2011**



Fuente: Datos recopilados por los tesisistas

## CUADRO N° 12

Presencia de los genes *LT* y *ST* en cepas de *Escherichia coli* enterotoxigénica aisladas de niños menores de cinco años con diarrea, según el grupo etáreo y lugar de procedencia, Iquitos – 2011

Edad	<i>E.coli</i> enterotoxigénica								Total
	Gen <i>LT</i>				Gen <i>ST</i>				
	San Juan	9 de Octubre	Maynas	San Antonio	San Juan	9 de Octubre	Maynas	San Antonio	
<1	1	0	0	1	0	1	0	0	3
1 a 2	4	2	0	5	4	0	0	2	17
2 a 3	0	1	0	0	0	1	0	0	2
3 a 4	1	0	1	1	0	0	0	0	3
4 a 5	1	1	0	0	0	0	0	1	3
Total	7	4	1	7	4	2	0	3	28

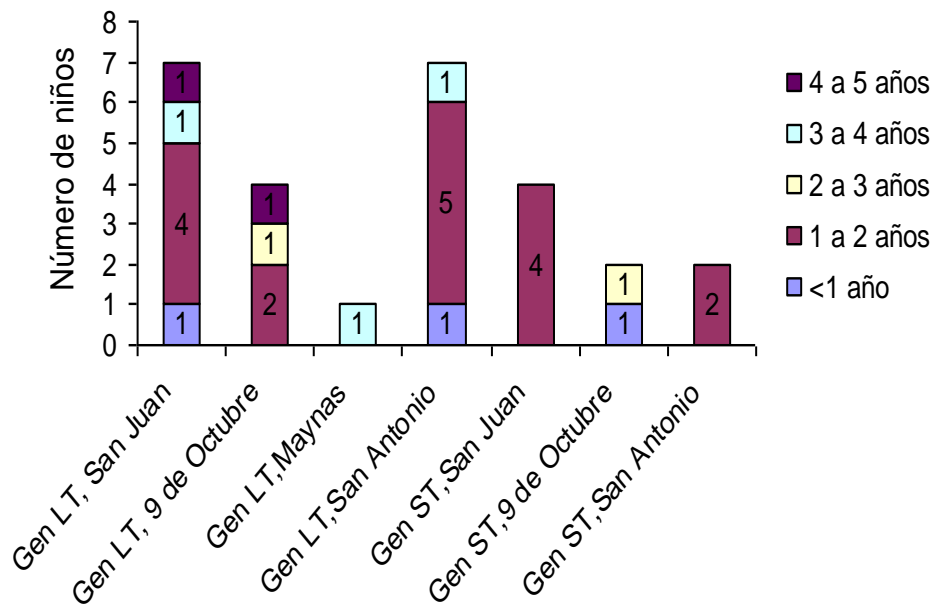
Fuente: Datos recopilados por los tesisistas

### Interpretación

En el presente cuadro se puede observar la presencia de los genes *LT* y *ST* en las 28 cepas de ECET aisladas de los niños estudiados, en base a su grupo etáreo y lugar de procedencia. Con respecto a las 19 cepas portadoras del gen *LT*, estas mayormente fueron aisladas de niños del grupo etáreo de 1 a 2 años (11), mayormente procedentes del C.S. San Antonio (5), mientras que las 9 cepas portadoras del gen *ST*, mayormente fueron aisladas de niños del grupo etáreo de 1 a 2 años (6), mayormente procedentes del C. S. de San Juan (4).

## GRÁFICO N° 12

**Presencia de los genes *LT* y *ST* en cepas de *Escherichia coli* enterotoxigénica aisladas de niños menores de cinco años con diarrea, según el grupo etáreo y lugar de procedencia, Iquitos – 2011**



Fuente: Datos recopilados por los tesisistas

## VI. DISCUSION

La prevalencia de las IDAs, se ha constituido en un problema de salud pública, especialmente a nivel de la población infantil menor de 5 años de edad. En los países en vías de desarrollo, donde se producen anualmente entre 4,6 a 6 millones de muertes al año, se le considera como la segunda causa de mortalidad infantil. (Prats, G. 2008). La ciudad de Iquitos no es ajena a esta problemática, tal es así que, en el año 2 010 se reportaron un total de 2 364 casos de diarrea en infantes menores de cinco años (DIRESA, 2010).

Aparentemente, esta problemática se mantiene en el año 2011, periodo en el cual se desarrolló el presente estudio, ya que los episodios de diarrea infantil a menudo vienen mostrándose especialmente en la población que vive en la periferia de la ciudad y que concurren a los diferentes Centros de Salud. Tal es así que, durante los meses de Abril a Julio del 2011, se recolectaron un total de 188 muestras de diarreas de niños menores de cinco años, de ocho Centros de Salud de la ciudad de Iquitos, 73 fueron de sexo masculino y 115 de sexo femenino, siendo del Centro de Salud de San Antonio, de donde correspondiendo la mayor cantidad de casos con un total de 59 niños con diarrea (23 del sexo masculino y 36 del sexo femenino) (Cuadro N°1) y (Cuadro N°2). En tanto, en un estudio realizado en Argentina, de un total de 112 muestras con diarrea aguda, 53 correspondieron al sexo femenino y 59 del sexo masculino (Gabriel, M. *et al.* 2010), En dicho trabajo, al igual que en mucho sectores de la ciudad de Iquitos, se resalta la carencia de servicios de saneamiento básico e higiene alimentaria, razón por la cual, tanto familias de las zonas urbanas y más aún las rurales, se ven expuestas fácilmente a ser infectadas por un gran número de microorganismos patógenos intestinales, principalmente las denominadas bacterias enteropatógenas. Además a esto también se le suman los factores socioeconómicos y nutricionales de la población, lo cual la hace más propensa a adquirir dichas infecciones (SUNASS, 2007; Vila, J. *et al.* 2009).



La diarrea infantil tiene diferentes causas, tales como: de etiología microbiana (virus, parásitos y bacterias), la sensibilidad a ciertos alimentos, antibióticos y el consumo excesivo de frutas o jugos de frutas. En cuanto a los cuadros diarreicos de etiología bacteriana, donde, alrededor de 200 especies se constituyen como el agente causal, son los más frecuentes (el 85% son causadas por enterobacteriáceas, entre las que destaca la *E. coli*) (Eslava, C. *et al* 2006; Coria, J. *et al.* 2008). En países en vías de desarrollo, los enteropatógenos como la *E. coli* se identifican mayormente en base a la determinación de sus características fenotípicas, esto se realiza mediante la realización de pruebas tintoriales, fisiológicas, bioquímicas, etc, que suelen realizarse como actividades de rutina en muchos laboratorios (Coloración Gram, prueba de la oxidasa, siembra en agar TSI, determinación de la producción de Indol, utilización del Citrato, etc.), lo cual ha permitido identificar el agente causal de diarrea en las 188 muestras analizadas en el presente estudio, de las cuales solo en el 82.98% se identificó a *E. coli*. (Cuadro N°4), Similar situación se registró en un trabajo realizado en Costa Rica, país similar al nuestro, donde la identificación suele hacerse fenotípicamente, en dicho trabajo, realizado por SALAS, R. (2005), reportaron que de 902 muestras, en 205 el agente causal de diarrea fue *Escherichia coli* y en las 697 muestras restantes, otros fueron los agentes causales. Sin embargo, este autor destaca aspectos que también podrían ser influyentes en la obtención de sus resultados, entre los que menciona, la existencia de políticas complejas asociadas a una población muy heterogénea, donde existe un flujo de inmigrantes de países aledaños, propiciando un incremento de diarreas en la población infantil causadas por factores extrínsecos (clima, geografía, alimentación y adaptación del patógeno) e intrínsecos (hábito alimenticios, de higiene, etc.). Sin embargo, en nuestra población, existe un menor número de habitantes y el flujo de inmigrantes es menor, pero los factores extrínsecos e intrínsecos, son similares a la población costarricense, lo cual podría propiciar el desarrollo de EDA (OMS, 2007),

Son seis los patotipos de *E. coli* que podrían ocasionar IDA, entre los que destaca la ECET, dicho patotipo puede ser identificado empleando la prueba del asa intestinal de conejo o utilizando líneas celulares; sin embargo, hoy en día, la creciente incorporación de nuevas tecnologías moleculares como la hibridación y la PCR, han permitido establecer la relación causal entre los microorganismos y las IDA, mediante la identificación y caracterización de genes de patogenicidad (Chávez, B. 2007). Sin embargo, la técnica de la PCR, en comparación con la hibridación suele ser más económica y rápida, que copia segmentos específicos del ADN, a diferencia de la hibridación, que es una técnica que tiene un costo superior la complejidad de la interpretación de los resultados, las dificultades en la estandarización y la necesidad de personal especializado y complicadas etapas de procesamiento de muestra (Soto, M. *et al.* 2011; Gil, E. *et al.* 2011).

Además, la PCR ha contribuido al desarrollo de la identificación filogenética y aplicación clínica de microorganismos enteropatógenos que causan diarreas como la ECET (Orberá, T. 2004). La técnica, es sobre todo útil en ausencia de métodos de diagnóstico alternativos o cuando éstos son muy complejos, para mejorar la eficacia diagnóstica, complementando métodos convencionales o si se requiere un diagnóstico rápido y precoz del agente etiológico para poder iniciar el tratamiento específico (Costa, J. 2011).

Por lo que en este estudio se empleó la técnica de la PCR para la detección de las cepas de ECET, donde se encontró que de 156 muestras identificadas fenotípicamente como *E. coli*, el 17.95% fueron ECET (Cuadro N°5). En un estudio realizado en Argentina, se detectó ECET en el 8,2 % de muestras diarreicas analizadas (Gabriel, M. *et al.* 2010), en tanto que en Tanzania, el 15% tuvieron como agente etiológico de diarrea a ECET, mientras que en Brasil solo 5 % de los aislamientos correspondieron a este patotipo enteropatógeno (Regua, A. *et al.* 2006). Esta diferencia de resultados se atribuye a las condiciones del clima, geografía y estrategias políticas relacionadas a la vigilancia epidemiológicas de estos países, a la

que suma condiciones sanitarias precarias y hábitos e higiene alimentaría (Vila, J. *et al.* 2009).

Además, la técnica de PCR permite la detección de genes *LT* y *ST* de la ECET (Gabriel, M. *et al.* 2010). En el presente estudio, se identificaron 28 muestras con ECET, de las cuales 19 (67.86%) presentaron el gen *LT* y 9 (32.14%), presentaron el gen *ST*, en ninguna muestra se detectaron simultáneamente ambos genes (Cuadro N°9); lo que concuerda con el estudio realizado por Gabriel, *et al.* (2010), en Argentina, en el cual determinaron que de 10 muestras de ECET detectadas, 7 eran portadoras del gen *LT* y 3 poseían el gen *ST*, mientras que en ningún aislamiento se detectaron simultáneamente ambos genes. De forma similar, en Tanzania y en Perú se encontró que el gen *LT* fue mucho más frecuente en los aislamientos que el gen *ST*, mientras que ambos genes aparecieron en muy pocas cepas de ECET (Regua, A. *et al.* 2006; Chávez, B. *et al.* 2007). Este elevado porcentaje de la presencia del gen *LT* podría deberse a que este gen sería más estable que el gen *ST*, el cual podría perderse rápidamente de las cepas que lo poseen.

Además, el estudio y sus resultados permite actualizar los avances observados en la patogénesis molecular de la infección por ECET, las metodologías para el diagnóstico microbiológico y la epidemiología en Iquitos y otros países en vías de desarrollo.

Por consiguiente, en estudios como este, es de suma importancia determinar el agente etiológico del brote, debido a que las medidas, estrategias, vigilancia y control, son diferentes en el caso de infecciones por parásitos, bacterias o virus.

## VII. CONCLUSIONES

- El patotipo ECET está presente en nuestro medio y se puede aislar de algunas muestras diarreicas de niños menores de cinco años, ya que su prevalencia es baja.
- El empleo de la técnica de la PCR posibilita la identificación del patotipo ECET.
- La técnica de PCR permite detectar la presencia de los genes *LT* y *ST* como parte del genoma de una bacteria.
- El gen *LT* es más prevalente que el gen *ST*, en las cepas de ECET.
- Las cepas de ECET, raramente contienen los genes *LT* y *ST* en forma simultánea.

## VIII. RECOMENDACIONES

- Que las autoridades municipales y regionales, elaboren políticas, programas y estrategias que garanticen una adecuada condición de vida para la población iquiteña, mejorando las condiciones básicas de salubridad: alcantarillado y educación sanitaria, de esta manera se estaría disminuyendo los casos diarreicos en la región, de esta manera se evitaría desnutrición y mortalidad en la población infantil menores de 5 años.
- Que las autoridades de la Dirección Regional de Salud, monitoreen de cerca los casos diarreicos en niños menores de 5 años, debido a que muchas veces no se sabe las causas originales de la infección: parasitaria, viral o bacteriana, pudiendo ser la *Escherichia coli* enterotoxigénica la causante de estos brotes diarreicos en la región.
- Proponer estas técnicas de diagnóstico rápido como el PCR, en el análisis rutinario en los centros de salud y hospitales de la Región, esto permitirá agilizar el tratamiento del paciente y evitar la mortalidad en la población menor de 5 años.

## IX. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Arias I, Cáceres H, Figueroa V, Huguet T, Máximo C. 2004.** *Escherichia coli* Enteroagregativa en niños con diarrea de un hospital de Lima. Rev. Peru. Med Exp Salud Pública 21: 176-177.
- Arias I, Huguet T. 2005.** Detección molecular de toxinas termoestable y termolábil de *Escherichia coli* mediante hibridación. Rev. Perú Med Exp Salud Pública 19: 193-194.
- Bergey, D. H. 2005.** Manual de determinación bacteriológica. 15va edición. Editorial Board and Trustees; EEUU. 1268 págs.
- Blanco J, Mora A, Alonso M, González E.&Bernárdez M. 2007.** Enterobacterias: características generales. Género *Escherichia*. Editorial McGraw-Hill Interamericana, Madrid, España. 325 págs.
- Coria J, Villalpando S, Gómez D, Treviño A. 2008;** Aspectos Microbiológicos y Epidemiológicos para el uso Racional de Antibióticos en niños con Gastroenteritis Bacteriana Aguda. Rev. Mexicana de Pediatría. Vol. 68, Núm. 5 pp 200-215.
- Costa J. 2011;** Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) a Tiempo Real. Rev. Enferm Infecc Microbiol. España. 22(5):299-305
- Chávez B, Martínez G, Cedillo R, Gil J, Avelino F, Castañeda R. 2007;** Identificación de cepas de *Escherichia coli* enterotoxigénicas en diferentes ambientes. Enf Inf Microbiol. 27: 70-74.
- DIRESA - LORETO, 2009;** Datos estadísticos de epidemiología, Hospital Regional de Loreto.

- Estrada T, Cerna J, Paheco G. 2005.** Drug-resistant diarrheogenic *Escherichia coli*. México. Emerg Infect Dis. 11:1306-1308.
- Eslava C, Mateo J, Cravioto A. 2006.** Diagnóstico de laboratorio de infecciones gastrointestinales: Cepas de *Escherichia coli* relacionadas con la diarrea. Secretaría de Salud. México. 251 págs.
- Fernández F. 2006.** Aplicaciones de las técnicas de PCR a la epidemiología molecular de las enfermedades infecciosas. Microbiol Clín Enf Infec 22:355–360.
- Gabriel M, Esquivel P, Lifschitz V, Medina L, Silvina L, Merino L. 2010.** Detección de *Escherichia coli* diarreogénicos en niños de barrios humildes de Corrientes, Argentina. *Rev Cubana Med Trop* . vol.62, n.1, pp. 56-65.
- Gil E, Ramírez M, Pérez A, Lisbona A. 2011.** Nuevas Tendencias en imagenología híbrida: PET/RNM. *Rev. Alasbimn Journal*. España. Vol. 13, pag. 53
- González C, Cunil R. 2004.** Diagnóstico y tratamiento de la diarrea persistente en un servicio de enfermedades diarreicas agudas. *Medic. San* 6:42-49.
- González T, Rojas H. 2005.** Enfermedades transmitidas por alimentos y PCR: prevención y diagnóstico. *Salud Pública de Mex*. 47: 388–389.
- Leotta G, Chinen I, Epszteyn S, Miliwebsky E, Melamed I, Motter M, Ferrer M, Marey E, Rivas M. 2005.** Validación de una técnica de PCR múltiple para la detección de *Escherichia coli* productor de toxina Shiga. *Revista Argentina de Microbiología* 37: 1-10.

- Malorny B, Hoorfar J, Bunge C, Helmuth R. 2005.** Multicenter validation of the analytical accuracy of Salmonella PCR: Towards an international standard. *Appl Environ Microbiol* 69:290–296.
- Maves R, Vásquez R. 2007.** Epidemiology of acute diarrheal disease in Peruvian military members in Iquitos, Peru. NMRCD.2003.0007; Naval Medical Research Center.
- Nohemí C, Jesús A. R, Gerardo V. 2006.** Tipificación metabólica y genético molecular de *Escherichia coli* diarreogénica. Edit. CIE. Universidad Michoacana San Nicolas de Hidalgo. México. Pág. 4027
- Orberá T. 2004.** Métodos moleculares de identificación de levaduras de interés biotecnológico. *Rev. Iberoam Micol. Cuba.* Vol. 21: 15-19.
- Organización Mundial de la salud (OMS). 2007.** Control de Alimentos. Primera edición. Ginebra – Suiza. 79 págs.
- Padilla C, Gladys Ventura E. 2005.** Diseño y estandarización de una prueba de PCR para el diagnóstico de la Bartonelosis causada por *Bartonella bacilliformi*. *Rev PeruMed Exp Salud Rep* 20 n.1 Lima – Peru.
- Prats, G. 2008.** Guía para la prevención y el control de la infección por *Escherichia coli* O157:H7 y *Escherichia coli* verotoxigenes”; Barcelona: Dirección General de Salud Pública.
- Prado V, Solari V, Álvarez I, Arellano C, Vidal R, Carreño M, Mamani N, Fuentes D, O’ Ryan M y Muñoz V. 2005.** Situación epidemiológica de las enfermedades transmitidas por alimentos en Santiago de Chile. *Rev. Med Chile.* 130: 495-501.



- Regua A, Gomes T, Vieira M, Andrade J, Irino K, Teixeira L. 2006.** Frequency and characteristics of diarrhoeagenic *Escherichia coli* strains isolated from children with and without diarrhea in Rio de Janeiro, Brazil. *Journal Infec.* 48(2):161-7.
- Rodríguez A. 2004.** Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*"; *Salud Pública de México* 44: 465-467.
- Rosende V, Zebemal de Gorogner O. 2006.** Estandarización de la Técnica de extracción de ADN de bacterias periodontales en placas ateromatosas de aorta. Instituto de Medicina Regional. 30 págs.
- Salas R, Sancho J. 2005.** Resistencia bacteriana a los antibióticos en infecciones del tracto urinario bajo, en pacientes de consulta externa en el área de salud Palmares. *Fármacos* 17: 10-16.
- Soto M, Álvarez F, Rojas A, Urdaneta K, Cásales J, González R. 2011.** Detección del complejo *BCR-ABL* mediante hibridación in situ fluorescente en pacientes leucémicos venezolanos. *Venezuela. Rev. Ciencias* 19 (1) 5 – 16.
- SUNASS, 2007.** Control de Calidad de Agua. Recopilación de los dos primeros cursos de capacitación", organizados por SUNASS; Primera edición. Edit. por GRI. Lima – Perú.
- Urrutia T, Reyes E, Melo C, Henríquez M, Pineda J, Sakurada A. 2007.** Estandarización de una Técnica para la Detección de *Salmonella* spp. útil para Manipuladores de Alimentos Mediante Técnica de Amplificación Molecular"; *Rev. Ciencia & Trabajo, Chile.* 50 págs.
- Vidal J, Canizález R, Gutiérrez J, Navarro G. 2007.** Patogénesis Molecular, Epidemiología y Diagnóstico de *Escherichia coli* enteropatógena. *Rev. Salud Publica de México* 49:376-386.

**Vila J, Alvarez M, Buesa J, Castillo J. 2009.** Diagnóstico Microbiológico de las Infecciones Gastrointestinales. Rev. Enfermedades infecciosas y microbiología clínica. España. 27(7): 406–411.

## **ANEXOS**

**Anexo N° 01**

**a) Muestra diarreica**



**b) Lugar de muestreo**

**Centro de San Juan**



**Centro de Salud 9 de Octubre**



**Anexo N° 02**

**Análisis microbiológico de niños menores de cinco años con diarrea de los  
Centros de Salud**

**Tesis: Carlos y Marx**

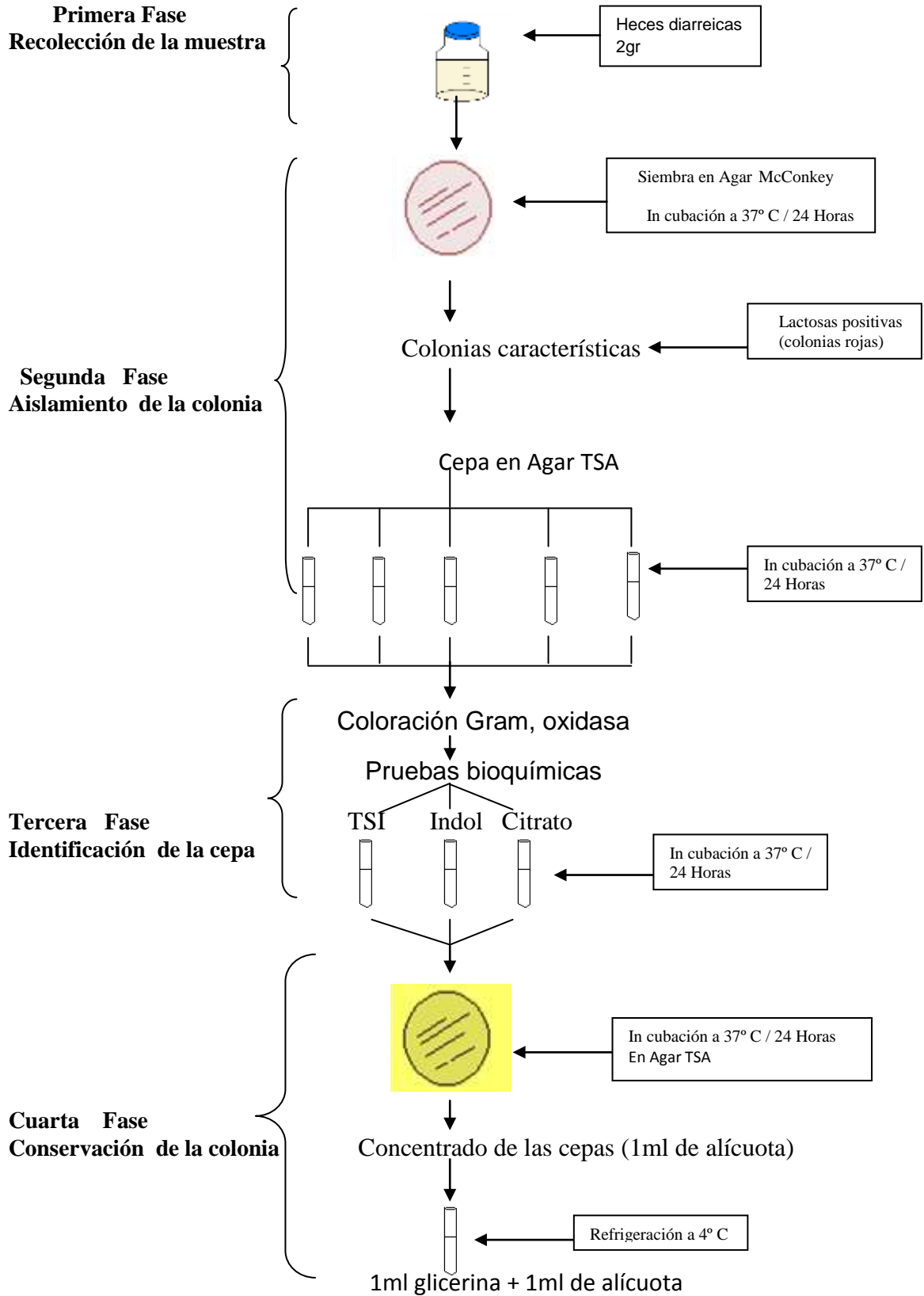
**MES / SEMANA: .....**

<b>Nº</b>	<b>Centro de salud</b>	<b>Código</b>	<b>Sexo</b>	<b>Edad</b>	<b>otros</b>	<b>MUESTREO POR SEMANA</b>

**Nota:** Los datos registrados en la presente ficha pertenecen a niños con diarrea menores de cinco años y serán de suma confidencialidad

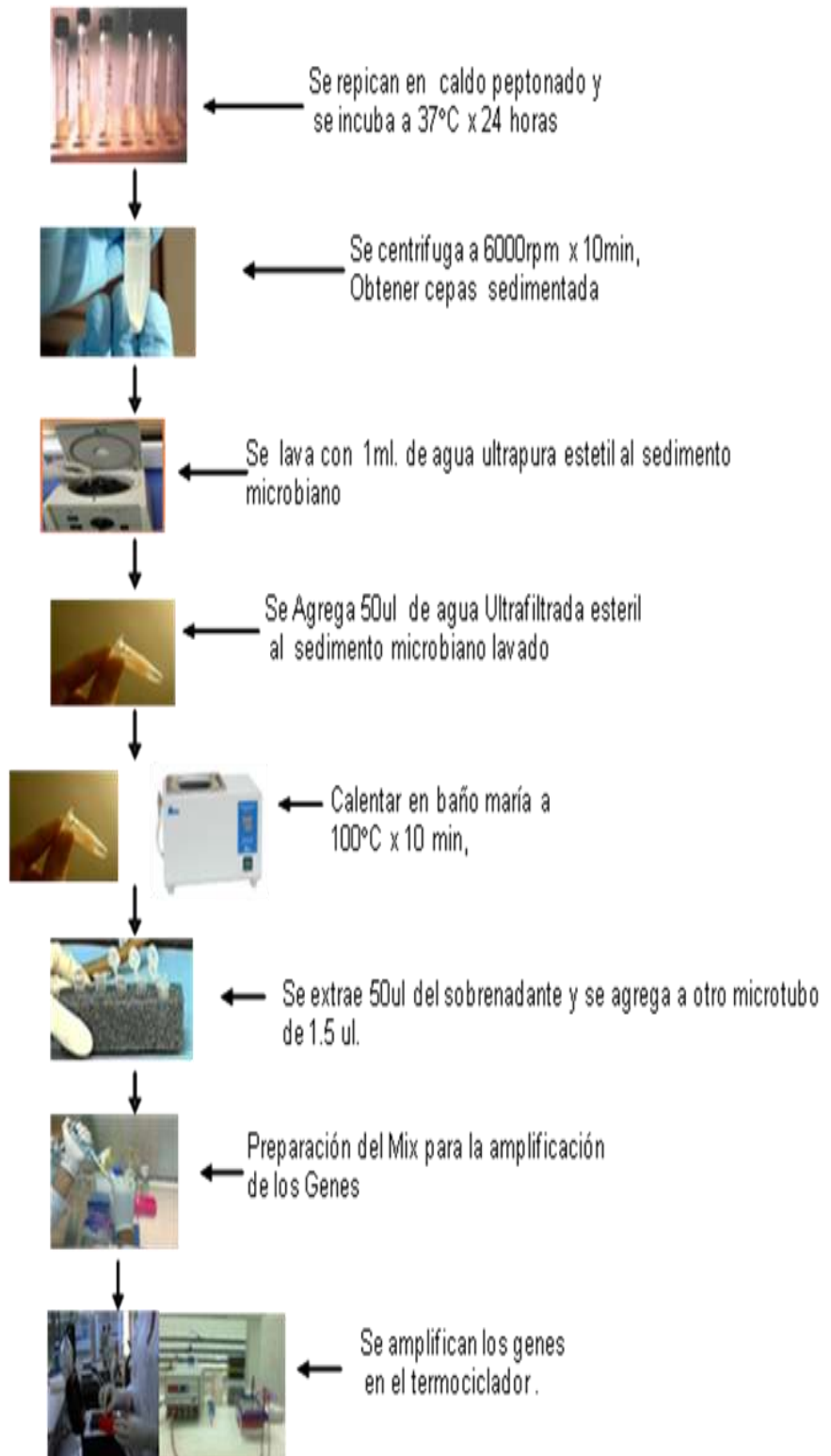
**Anexo N° 03 - A**

**FLUJOGRAMA DEL PROCESAMIENTO DE LA MUESTRA  
(MICROBIOLOGICO)**



### Anexo N° 03 -B

#### **FLUJOGRAMA DEL PROCESAMIENTO DE LA MUESTRA** (En la extracción de ADN y Análisis Molecular)



### Anexo N° 03 – C

#### Registro del análisis microbiológico para E. coli

N°	Centro de salud	N° colonia	Prueba bioquímica					Microorganismo		Cepas positivo	Cepas negativo	N° Muestra EC (Positivo)
			TSI			Indol	citrato	EC	OTRO			
			S/F	gas	H <sub>2</sub> S							
01		C1										
		C2										
		C3										
		C4										
		C5										
02		C1										
		C2										
		C3										
		C4										
		C5										
03		C1										
		C2										
		C3										
		C4										
		C5										
04		C1										
		C2										
		C3										
		C4										
		C5										
<b>Total</b>												

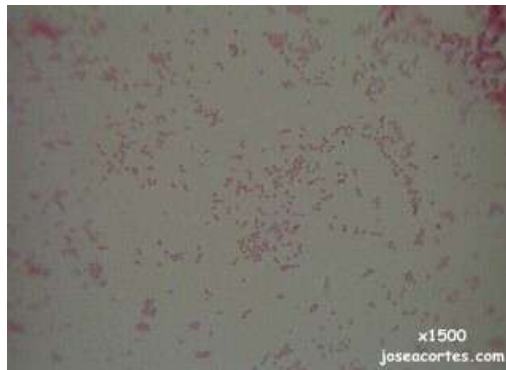
**Nota:** Los datos registrados en la presente ficha pertenecen a pacientes con diarrea menores de cinco años y serán de suma confidencialidad.



**Anexo N° 03 – D**

**ILUSTRACIONES DE LOS RESULTADOS MICROBIOLÓGICOS**

**a) Coloración Gram**



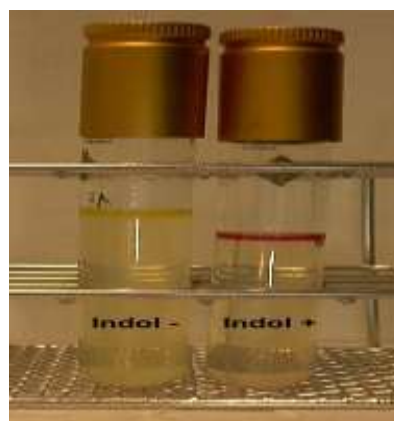
**b) Pruebas bioquímicas**



Prueba de la fermentación de la glucosa (TSI)



Degradación de Citrato de sodio



Producción de indol

## Anexo N° 04

### Extracción y corrido de las muestras de ADN bacteriano

**Cultivo Bacteriano E. coli**



**Lavado del Cultivo bacteriano**



**Centrifuga para extracción de ADN**



**Extracción de ADN bacteriano**



**Preparación de la mezcla para PCR**



**Corrido de los productos de PCR**



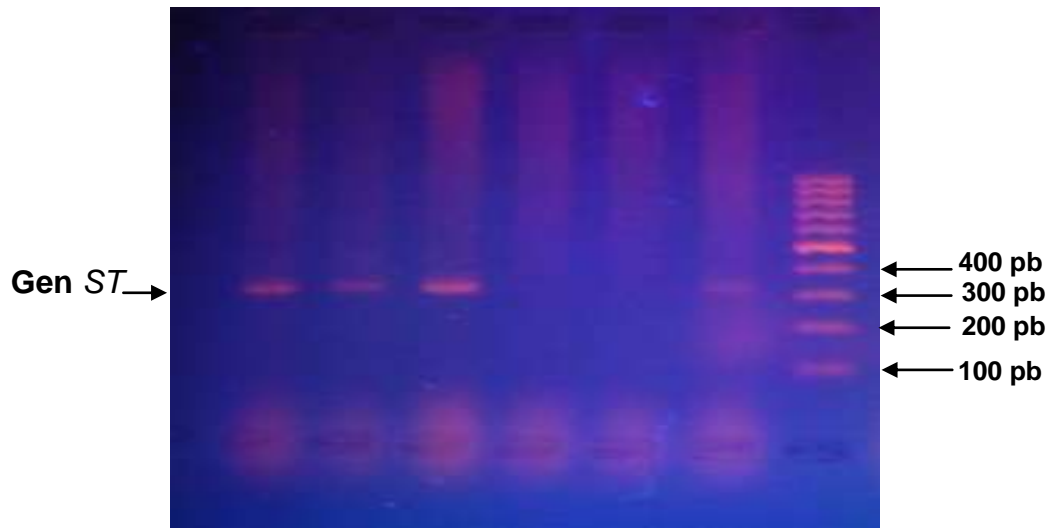
**Anexo N° 05**

**Secuencia de oligonucleotidos empleado en el diagnostico de *Escherichia coli* enterotoxigénica**

<b>GEN</b>	<b>Orientación</b>	<b>Oligonucleotidos (pb)</b>	<b>Tamaño de Amplificación (PM)</b>
<i>ST</i>	F	TTTCCCCTCTTTTAGTCAGTCAA	159
<i>ST</i>	R	GCAGGATTACAACACAATTCACAGCAG	159
<i>LT</i>	F	TCTCTATGTGCATACGGAGC	322
<i>LT</i>	R	CCATACTGATTGCCGCAAT	322

Anexo N° 06

Agarosa, Amplificación del gen *LT* : 322 pb



Agarosa, Amplificación del gen *LT* : 159 pb

