

# UACM

Universidad Autónoma  
de la Ciudad de México

*Nada humano me es ajeno*

COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES  
LICENCIATURA EN PROMOCIÓN DE LA SALUD

**Desarrollo de un nuevo método de diagnóstico molecular para  
enteropatógenos: una herramienta de la vigilancia epidemiológica  
para la Promoción de la Salud**

TRABAJO RECEPCIONAL  
PARA OBTENER EL TÍTULO DE LICENCIADO EN  
PROMOCIÓN DE LA SALUD

PRESENTAN  
**JAHAZIEL ISAI ORTEGA BAUTISTA**

Director de trabajo recepcional

**Mtro. Eduardo Flores Soto**

Codirectora

**Dra. Claudia Cervantes Rebolledo**

**Ciudad de México, diciembre 2016**

## SISTEMA BIBLIOTECARIO DE INFORMACIÓN Y DOCUMENTACIÓN



## UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE LA CIUDAD DE MÉXICO COORDINACIÓN ACADÉMICA

### RESTRICCIONES DE USO PARA LAS TESIS DIGITALES

### DERECHOS RESERVADOS<sup>©</sup>

La presente obra y cada uno de sus elementos está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor; por la Ley de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México, así como lo dispuesto por el Estatuto General Orgánico de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México; del mismo modo por lo establecido en el Acuerdo por el cual se aprueba la Norma mediante la que se Modifican, Adicionan y Derogan Diversas Disposiciones del Estatuto Orgánico de la Universidad de la Ciudad de México, aprobado por el Consejo de Gobierno el 29 de enero de 2002, con el objeto de definir las atribuciones de las diferentes unidades que forman la estructura de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México como organismo público autónomo y lo establecido en el Reglamento de Titulación de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México.

Por lo que el uso de su contenido, así como cada una de las partes que lo integran y que están bajo la tutela de la Ley Federal de Derecho de Autor, obliga a quien haga uso de la presente obra a considerar que solo lo realizará si es para fines educativos, académicos, de investigación o informativos y se compromete a citar esta fuente, así como a su autor ó autores. Por lo tanto, queda prohibida su reproducción total o parcial y cualquier uso diferente a los ya mencionados, los cuales serán reclamados por el titular de los derechos y sancionados conforme a la legislación aplicable.

## ÍNDICE

<b>ÍNDICE DE TABLAS</b>	<b>4</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>	<b>5</b>
<b>ÍNDICE DE DIAGRAMAS</b>	<b>5</b>
<b>ABREVIATURAS</b>	<b>6</b>
<b>AGRADECIMIENTOS</b>	<b>8</b>
<b>RESUMEN</b>	<b>9</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>11</b>
<b>1 La Salud Pública y las Enfermedades Infecciosas</b>	<b>11</b>
1.1 Determinantes de riesgo de las enfermedades diarreicas.	13
1.1.1 Determinantes causantes de diarrea	14
1.2 La Promoción de la Salud	17
1.3 La Promoción de la Salud y las Enfermedades Diarreicas: Vinculación y cooperación de instituciones- sector salud- comunidad, estudio de un caso	25
1.4 Trabajo gubernamental en el problema de las EDA`s.	26
1.5 La Promoción de la Salud y la Prevención de la Enfermedad son Instrumentos de intervención en la Salud Pública de las Enfermedades Diarreicas	27
<b>2. Epidemiología y Vigilancia Epidemiológica de las Enfermedades Diarreicas causadas por Enteropatógenos.</b>	<b>32</b>
2.1 Epidemiología de las Enfermedades Diarreicas	32
2.2 Vigilancia Epidemiológica en la Salud Pública y la Promoción de la Salud	37
2.3 Vigilancia Epidemiológica de las Enfermedades Diarreicas	39
2.4 Sistemas de Vigilancia Epidemiológica.	42
<b>3. Enterobacterias</b>	<b>46</b>
3.1 Enterobacterias	46
3.2 <i>Escherichia coli</i> (ETEC, EHEC, EIEC, EPEC, EAEC, DAEC)	47
3.3 <i>Salmonella</i> ( <i>S. typhi</i> , <i>S. typhimurium</i> )	52
3.4 <i>Shiguella</i> ( <i>S. sonnei</i> , <i>S. flexneri</i> )	55
3.5 <i>Vibrio</i> ( <i>V. cholerae</i> O1 Inaba, <i>V. cholerae</i> no O1 O139, <i>V.</i> <i>cholerae</i> no O1 negativo a O139, <i>V. parahaemolyticus</i> )	56
3.6 Mecanismos de patogenicidad en las Enterobacterias	57
<b>4. El diagnóstico de Enteropatógenos.</b>	<b>59</b>
4.1 Pruebas bioquímicas	59
4.2 Diagnóstico molecular	60
4.3 Reacción en Cadena de la Polimerasa PCR	62
4.4 PCR Múltiple	66
<b>JUSTIFICACIÓN</b>	<b>67</b>
<b>OBJETIVOS</b>	<b>68</b>
<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b>	<b>69</b>
1. Cepas utilizadas	69
2. Medios de Cultivo	70
3. Tinción de Gram	70

<b>4. Conservación de las cepas tipo de Enterobacterias.</b>	<b>72</b>
4.1 Conservación a largo plazo	72
4.2 Conservación a mediano plazo	72
4.3 Conservación a corto plazo	72
<b>5. Obtención de DNA total de las cepas tipo</b>	<b>73</b>
<b>6. Diseño de iniciadores</b>	<b>75</b>
<b>7. Amplificación de genes por la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)</b>	<b>77</b>
<b>8. Secuenciación de los productos amplificados.</b>	<b>77</b>
<b>9. PCR Múltiple</b>	<b>78</b>
<b>RESULTADOS</b>	<b>79</b>
<b>1. Identificación y aislamiento de las cepas de Enterobacterias usadas en el estudio</b>	<b>79</b>
<b>2. Alineamiento de secuencias de los genes de virulencia para el diseño de oligonucleótidos utilizados para la identificación de diferentes bacterias enteropatógenas.</b>	<b>81</b>
<b>3. Estandarización del método por PCR punto final de cada gen para la identificación de Enterobacterias (<i>E. coli</i>, <i>Shigella</i>, <i>Salmonella</i> y <i>Vibrio</i>)</b>	<b>88</b>
<b>4. Secuenciación de los fragmentos amplificados de los genes de interés, para la identificación de los diferentes subtipos de <i>E. coli</i>, y especies patógenas de los géneros <i>Salmonella</i>, <i>Shigella</i> y <i>Vibrio</i>.</b>	<b>94</b>
<b>5. PCR Múltiple punto final para el diagnóstico de Enterobacterias.</b>	<b>109</b>
<b>6. Aplicación del método estandarizado de PCR Múltiple para la amplificación de genes de virulencia de enteropatógenos en muestras clínicas de infantes para utilizarse en el diagnóstico de EDAs.</b>	<b>114</b>
<b>DISCUSIÓN</b>	<b>123</b>
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>135</b>
<b>REFLEXIÓN FINAL</b>	<b>137</b>
<b>ANEXO</b>	<b>138</b>
<b>FUENTES DE INFORMACIÓN (bibliograficas, artículos y electrónicas )</b>	<b>142</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Funciones y campos de acción de la Salud Pública	<b>12</b>
<b>Tabla 2.</b> Principales microorganismos relacionados con cuadros diarreicos	<b>15</b>
<b>Tabla 3.</b> Niveles de aplicación de medidas preventivas en la historia natural de la enfermedad	<b>17</b>
<b>Tabla 4.</b> Diferencias esquemáticas entre Promoción de la Salud y Prevención de las Enfermedades	<b>30</b>
<b>Tabla 5.</b> Evolución de los casos nuevos notificados de las EDA´s entre 1980 y 2010	<b>34</b>
<b>Tabla 6.</b> Casos nuevos de Enfermedad Diarreica Aguda según Entidad Federativa, México 2000-2010	<b>35</b>
<b>Tabla 7.</b> Estrategias de la Vigilancia Epidemiológica en Salud Pública	<b>38</b>
<b>Tabla 8.</b> Funciones de la Vigilancia Epidemiológica	<b>40</b>
<b>Tabla 9.</b> Subtipos de <i>E. coli</i> y determinantes de virulencia correspondientes	<b>52</b>
<b>Tabla 10.</b> Cepas utilizadas durante este trabajo	<b>69</b>
<b>Tabla 11.</b> Reactivos y preparación de caldo Todd-Hewitt para conservación a largo plazo	<b>72</b>
<b>Tabla 12.</b> Reactivos y preparación del medio Luria Bertani (LB)	<b>73</b>
<b>Tabla 13.</b> Genes que codifican para los distintos determinantes de patogenicidad seleccionados y utilizados en la identificación de los diferentes subtipos de <i>E. coli</i> y de los géneros de <i>Salmonella</i> , <i>Vibrio</i> y <i>Shigella</i> .	<b>76</b>
<b>Tabla 14.</b> Reactivos para preparar TAE 50 X.	<b>77</b>
<b>Tabla 15.</b> Identificación de las cepas por pruebas bioquímicas en los medios EMB, McK y SS	<b>80</b>
<b>Tabla 16.</b> Condiciones utilizadas para la amplificación de los genes mediante la reacción de PCR.	<b>88</b>
<b>Tabla 17.</b> Condiciones de amplificación de la PCR.	<b>88</b>
<b>Tabla 18.</b> Historia Natural de la Enfermedad	<b>132</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Tasa de incidencia por EDA en las Entidades Federativas 2000 y 2010	<b>36</b>
<b>Figura 2.</b> Mortalidad por EDA's según grupo de edad y sexo, México 2010.	<b>37</b>
<b>Figura 3.</b> Corrimiento de una Electroforesis en Campos Pulsados.	<b>62</b>
<b>Figura 4.</b> Esquema que presenta un protocolo completo de PCR.	<b>65</b>
<b>Figura 5.</b> Diseño de iniciadores para la identificación de las diferentes cepas de bacterias enteropatógenas.	<b>82</b>
<b>Figura 6.</b> Análisis de la especificidad de los oligonucleótidos utilizados para la amplificación de los fragmentos de los genes seleccionados como blancos moleculares para la identificación de subtipos de Enteropatogenos.	<b>91</b>
<b>Figura 7.</b> Electroferogramas de las secuencias correspondientes a algunos de los genes utilizados en este estudio.	<b>95</b>
<b>Figura 8.</b> Análisis bioinformático (BLAST) de los genes secuenciados.	<b>103</b>
<b>Figura 9.</b> Gel de agarosa al 2% en donde se corrieron los productos de la PCR múltiple.	<b>110</b>
<b>Figura 10.</b> Gel de agarosa al 2% en donde se corrieron los productos de la PCR múltiple.	<b>112</b>
<b>Figura 11</b> Geles de agarosa al 1.5% en donde se cargaron y corrieron electroforéticamente los diferentes ADN, obtenidas mediante la extracción con el kit correspondientes a aislados clínicos de pacientes.	<b>115</b>
<b>Figura 12</b> Geles de agarosa al 1.5% en donde se cargaron y corrieron electroforéticamente los diferentes ADN, obtenidas mediante la extracción con fenol correspondientes a aislados clínicos de pacientes.	<b>115</b>
<b>Figura 13</b> Gel de agarosa al 2% en donde se visualizan los productos de la PCR múltiple utilizando el ADN de aislados clínicos.	<b>117</b>
<b>Figura 14</b> Gel de agarosa al 2% en donde se observan los amplificados obtenidos con el primer Múltiple realizado con el ADN de aislados clínicos.	<b>120</b>

## ÍNDICE DE DIAGRAMAS

<b>Diagrama 1.</b> Dos campos estratégicos para el abordaje de las EDA's	<b>124</b>
--	------------

### ABREVIATURAS

<b>ADN</b>	Ácido Desoxirribonucleico
<b>CEVECE</b>	Centro Estatal de Vigilancia Epidemiológica y Control de Enfermedades
<b>DAEC</b>	<i>Escherichia coli</i> de adherencia difusa
<b>EAEC</b>	<i>Escherichia coli</i> enteroagregativa
<b>EDA´s</b>	Enfermedades Diarreicas Agudas
<b>EHEC</b>	<i>Escherichia coli</i> Enterohemorrágica
<b>EIEC</b>	<i>Escherichia coli</i> Enteroinvasiva
<b>EMB</b>	Medio Eosina y Azul de Metileno
<b>EPEC</b>	<i>Escherichia coli</i> Enteropatógena
<b>ETEC</b>	<i>Escherichia coli</i> Enterotóxica
<b>InDRE</b>	Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos
<b>LB</b>	Medio Luria Bertani
<b>Mck</b>	Medio Macconkey
<b>MH</b>	Medio Mullen Hinton
<b>NCDI</b>	Centro Nacional para Enfermedades Infecciosas
<b>P.S</b>	Promoción de la Salud
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa
<b>RIVE</b>	Red Iberoamericana de Vigilancia Epidemiológica
<b>SINAVE</b>	Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica
<b>S.P</b>	Salud Pública
<b>SS</b>	Medio <i>Salmonella Shigella</i>
<b>SUIVE</b>	Sistema Único de Información para la Vigilancia Epidemiológica
<b>V.E</b>	Vigilancia epidemiológica

**"cuidar de la salud (...) es más que construir un objeto e intervenir sobre el mismo para cuidar se debe considerar y construir proyectos" (Ayres, 2002)**

### **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco primeramente a DIOS que me permitió llegar a este punto de mi vida académica, a mi madre que me ha apoyado incondicionalmente en todos los aspectos y en cada decisión que he tomado, a mis buenos profesores que lograron que me apasionara en esta profesión y que me enseñaron, que por más difícil que se vea la vida siempre puede ser mejor, también a los malos profesores que me enseñaron como no debo ser en ninguno de los aspectos de la vida.

Agradezco infinitamente a esas dos sillas vacías cuyos ocupantes están en el cielo, una que al final de sus días me animó a seguir estudiando y luego a empezar esta licenciatura y la otra que me ayudó a no desanimarme nunca y me retó a que todo lo que haga lo hiciera lo mejor posible.

A Maricela, nos cruzamos un día y luego te convertiste en parte importante de mi vida, de mi futuro y porque siempre estás cuando más te necesite.

A la M.C. Patricia de la Torre del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM por su gran ayuda técnica en la secuenciación de los genes utilizados para el desarrollo del diagnóstico molecular de las enterobacterias por PCR multiplex

Al Dr. Máximo Berto Martínez Benítez que en su momento fungió como responsable del laboratorio y del proyecto general del cual se desprende esta tesis y en donde me capacité en las técnicas usadas en un laboratorio de diagnóstico como lo fue el CDE-DF.

A los profesores Eduardo Flores y Claudia Cervantes por fungir como director y codirectora respectivamente y apoyarme y guiarme en la realización de este trabajo, a los profesores Israel López, Érica Merino, Fanny Escobar y Berenice Parra por su trabajo como lectores y sus conocimientos para mejorar este trabajo de tesis.

A mis compañeros de aulas y colegas promotores que después de 4 años y medio se convirtieron en unos de mis amigos y amigas, de los cuales aprendí mucho no solo del que hacer del promotor sino de la vida en general.

### RESUMEN

La Enfermedad Diarreica Aguda (EDA), sigue siendo uno de los principales problemas de Salud Pública en México con altos índices de mortalidad en niños menores de cinco años, pudiendo llegar a afectar también a la población en general. Su prevalencia puede deberse a diferentes determinantes inherentes al individuo como son su susceptibilidad genética y estado nutricional y su condición socioeconómica, el lugar geográfico en el que vive, las condiciones sanitarias, así como a la falta de eficacia de muchas políticas públicas en materia de salud.

Bajo esta óptica en la presente tesis hemos abordado este problema a partir del desarrollo de una estrategia diagnóstica en el laboratorio de biología molecular para la detección de enteropatógenos que definen buena parte de la etiología de las EDA's. Consecuentemente, hemos puesto a discusión ante esta estrategia básica (estrategia diagnóstica) de la Vigilancia Epidemiológica (VE), las diferentes formas de intervención de la Promoción de la Salud, buscando una conexión inicialmente teórica, gracias a sus estrategias para generar métodos de intervención comunitaria cuyos objetivos se centran en la salud y no solo en la enfermedad.

La VE que se realice, apoyada de esta nueva estrategia diagnóstica, nos deberá de ayudar a realizar un diagnóstico comunitario que no solo se enfoque en aspectos inherentes a la persona como: edad, sexo, estado nutricional, prácticas de salud y síntomas primarios de la enfermedad; debe de tomar aspectos externos y relacionados a su contexto social, los servicios con los que cuenta y la calidad de estos servicios, condiciones socio económicas, ambientales y de saneamiento del medio y las prácticas de higiene de su comunidad.

Aparte del diagnóstico comunitario y de los datos que nos arroje la VE, gracias a esta nueva estrategia diagnóstica de laboratorio y a las diferentes acciones propuestas desde la visión de Promoción de la Salud (que se muestran en el apartado de la discusión), se puede decir que el promotor de la salud cuenta con todas las herramientas teórico – metodológicas para proponer una intervención

## Licenciatura en Promoción de la Salud

---

efectiva en las poblaciones afectadas por las EDA's, las cuales estarán ligadas a determinantes de la salud, medidas tradicionales de prevención de la enfermedad y de nuevas metodologías. Con el fin de que éstas acciones logren incidir tanto en la ideología actual que predomina en el personal de salud que labora en las instituciones esperando se le dé un mejor abordaje al tema de las diarreas, haciendo que las comunidades y las personas basados en sus estilos de vida se hagan partícipes en su proceso salud – enfermedad y no queden solo como entes pasivos.

Se implementó un nuevo método diagnóstico de biología molecular para la detección de enterobacterias (*Escherichia. coli*, *Salmonella*, *Shiguella* y *Vibrio*), usando la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) múltiple por sus siglas en inglés Polimerase Chain Reaction. Partiendo del hecho de que las bacterias presentan diferentes determinantes de virulencia codificados por diversos genes.

Así mismo, la estandarización de la técnica de PCR multiple, usando cepas control, ha permitido aplicar el método en aislados clínicos, directamente lo que da lugar a su aplicación sobre muestras fecales.

Con base en los resultados experimentales de esta tesis y su potencial aplicación en la VE, hemos explorado teóricamente la visión del Promotor de la Salud, proponiendo una visión binaria para la VE de las EDA's con una mejor VE de las EDA's. Por un lado, el uso de ésta nueva estrategia diagnóstica de biología molecular en los laboratorios de monitoreo epidemiológico y por otro lado, intervenir en las comunidades, tanto las endémicas como las que no lo son. Dicha intervención tendrá que ver con una serie de acciones desde la Promoción de la Salud (PS), Educación para la Salud (ES) y Prevención de Enfermedades (PE) que tengan como fin alimentar las bases de datos de la VE, que la comunidad y las personas sean capaces de incidir en su salud y logren prevenir estas enfermedades mediante el propio monitoreo, así como educarse para tener un mayor control sobre su salud mediante la promoción y prevención de estos padecimientos.

## INTRODUCCIÓN

### 1. La Salud Pública y las Enfermedades Infecciosas.

El concepto de Salud Pública (SP) ha estado presente a lo largo de la historia de la humanidad y ha evolucionado, pasando por el animismo, la magia, la religión y la ciencia, pero siempre determinada en última instancia por la base económica (Córdova y col, 2008).

De acuerdo al concepto del Doctor Gustavo Molina Guzmán, la Salud Pública: es la ciencia y el arte de organizar y dirigir los esfuerzos colectivos para proteger, fomentar y recuperar la salud de los habitantes de una comunidad (Seymour, 1990).

Derivado de este concepto, se pueden exponer las funciones fundamentales dentro de la SP las cuales abarcan: promoción y fomento de la salud, prevención de las enfermedades, curación, rehabilitación e investigación (Cardona, 1987), las cuales en suma hacen que la finalidad de la SP sea contribuir a la mejora de la salud de la población mediante disciplinas del área de salud, junto a otras como la antropología, la economía, la geografía, la ecología, por ejemplo.

La SP tiene dos grandes dimensiones, por un lado, el fenómeno salud/enfermedad por otro la atención a la salud, (García, 2009). La labor de la SP frente a un problema como lo son las enfermedades infecciosas, particularmente las enfermedades diarreicas, es trabajar desde las dos dimensiones, aprovechando los campos de la epidemiología, la higiene, el saneamiento ambiental, la educación para la salud, la sociología y la economía de la salud, para que en suma esto permita a la SP abordar esta problemática tratando de buscar posibles soluciones en pro de la salud colectiva.

## Licenciatura en Promoción de la Salud

---

Otros autores que han desarrollado los campos de acción de la SP son Winslow (1920) y Hanlon (1974), bajo los cuales es posible ubicar la importancia de las enfermedades infecciosas. Los campos de acción que nos presentan ambos autores son complementarios e importantes para tratar y prevenir las enfermedades infecciosas [Tabla 1] (Chapela, 2007).

**Tabla 1 Funciones y campos de acción de la Salud Pública tomado de García, 2009.**

<b>Winslow (1920)</b>	<b>Hanlon (1974)</b>
Saneamiento del medio	Saneamiento ambiental
Control de los padecimientos transmisibles	Prevención de las enfermedades
Educación de los individuos en higiene personal	Cuidados integrados de salud
Organización de los servicios de salud para el diagnóstico temprano y el tratamiento preventivo de las enfermedades	Colección y análisis de estadísticas vitales
Desarrollo social para elevar el nivel de salud	Educación para la salud individual y colectiva
	Planeación y evaluación de los servicios
	Investigación científica, técnica y administrativa

En esta Tesis hemos abordado uno de los grandes retos de la SP en cuanto a enfermedades infecto-contagiosas se refiere: la Enfermedad Diarreica Aguda (EDA`s), causada por enteropatógenos bacterianos, representa un verdadero problema de SP contemporáneo, tanto en países desarrollados, como en aquellos en vías de desarrollo, con una transición epidemiológica (Castro, 2007); y por cuya dimensión social queda expuesto el valor que cobra la Promoción de la Salud, pues no solo es un problema que se deba abordar desde el ámbito biológico o desde un ámbito social, como tradicionalmente lo haría la Salud Pública, sino

desde una visión integradora de diferentes ciencias y metodologías, con áreas de acción que la misma Promoción de la Salud se planteó desde sus inicios, que van desde el desarrollo de aptitudes personales y políticas públicas saludables, creación de entornos saludables, fortalecimiento de la participación de la comunidad y una reorientación de los servicios de salud (OMS/conferencias/productos,1986).

### **1.1 Determinantes de riesgo de las enfermedades diarreicas.**

La diarrea es una alteración en el movimiento característico del intestino con un incremento en el contenido de agua, volumen o frecuencia de las evacuaciones. Se trata de una disminución en la consistencia de las heces, un incremento de la frecuencia de los movimientos intestinales con mayor o igual a tres evacuaciones en un día (Secretaria de Salud, 2008).

La diarrea suele ser un síntoma de una infección del tracto digestivo, que puede ser ocasionada por diversos organismos, bacterianos, víricos o parásitos. La infección se transmite por el consumo de alimentos o agua contaminados, o bien de una persona a otra como resultado de una higiene deficiente (Cortez, 2011). La deposición frecuente de heces firmes (de consistencia sólida) no es diarrea, ni tampoco la deposición de heces de consistencia suelta y “pastosa” por bebés amamantados (Sánchez, 1997).

En el mundo las EDA`s son la tercera causa de muerte en niños menores de cinco años y ocasionan la muerte de 1.5 millones de niños cada año principalmente en países en vías de desarrollo, se encuentran por debajo de las infecciones del tracto respiratorio en primer lugar y el VIH-SIDA que son el segundo lugar (OMS, 2010).

Hay tres tipos clínicos de enfermedades diarreicas (OMS, 2010):

- a) La diarrea acuosa aguda, que dura varias horas o días, característico del cólera.

- b) La diarrea aguda con sangre, también llamada diarrea disintérica o disentería.
- c) La diarrea persistente, que dura 14 días o más.

### **1.1.1 Determinantes causantes de diarrea**

Entre los diferentes determinantes que pueden desencadenar un cuadro clínico de diarrea, se encuentran los asociados al patógeno, al ambiente y al hospedero:

Existen diversos patógenos, tanto bacterianos, víricos y parásitos, los cuales se transmiten por agua contaminada con materia fecal [Tabla 2]. El tipo y grado de diarrea depende de la patogenicidad del agente etiológico (Informe de la OMS sobre Determinantes Sociales de la Salud, 2008).

Determinantes ambientales. Debemos considerar las fuentes de agua, ya que la infección es más común cuando hay escasez de agua potable, empleada para beber, cocinar y lavar, ya que si éstas proceden de aguas residuales, fosas sépticas o letrinas, son particularmente peligrosas debido a que están contaminadas con heces humanas o de animales, lo que las hace ser vehículos de enteropatógenos, causantes de algún cuadro diarreico. Las heces de animales callejeros que pueden estar depositadas en las banquetas de las grandes urbes también contienen microorganismos capaces de ocasionar enfermedades diarreicas (Gómez, 1971).

En muchas áreas geográficas los episodios de diarrea ocurren por temporadas de acuerdo a las estaciones del clima. En las áreas tropicales, las diarreas ocasionadas por rotavirus suceden durante todo el año, aumentando su frecuencia durante la estación seca y los meses más fríos; mientras que las diarreas por bacterias tienden a suceder con mayor frecuencia en los meses más calientes de la estación lluviosa (Sáenz, 2005).

**Tabla 2. Principales microorganismos relacionados con cuadros diarreicos  
tomado de Hernández, 2011**

Síndrome	Características	Agentes etiológicos
Diarrea líquida aguda	Mecanismo no inflamatorio, mediado por enterotoxinas.	<p>Rotavirus *</p> <p><i>Escherichia coli</i> enterotoxigénica (ETEC) *</p> <p><i>Escherichia coli</i> enteropatógena (EPEC) *</p> <p><i>Escherichia coli</i> enteroadherente (EAEC)</p> <p><i>Salmonella</i> spp. *</p> <p><i>Cryptosporidium</i></p> <p><i>Vibrio cholerae</i></p> <p><i>Clostridium perfringens</i></p> <p><i>Bacillus cereus</i></p> <p><i>Staphylococcus aureus</i></p> <p><i>Vibrio parahaemolyticus</i></p> <p><i>Giardia lamblia</i></p> <p>Virus Norwalk</p> <p>Adenovirus 40,41</p> <p><i>Campylobacter jejuni</i> *</p> <p><i>Campylobacter coli</i></p> <p><i>Aeromonas</i> spp</p>
Diarrea con sangre	Mecanismo inflamatorio por invasión del epitelio intestinal, denominado usualmente disentería. También hay presencia de moco y leucocitos en las heces.	<p><i>Shigella</i> spp *</p> <p><i>Entamoeba histolytica</i></p> <p><i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica (EHEC)</p> <p><i>Escherichia coli</i> enteroinvasiva (EIEC)</p> <p><i>Campylobacter jejuni</i></p> <p><i>Salmonella enterica</i> (Serovar <i>Enteritidis</i>, <i>Choleraesuis</i>, <i>Paratyphi</i>) *</p> <p><i>Vibrio parahaemolyticus</i></p> <p><i>Yersinia enterocolitica</i></p> <p><i>Trichinella spiralis</i></p> <p><i>Schistosoma japonicum</i></p> <p><i>Balantidium coli</i></p> <p><i>Clostridium difficile</i></p> <p><i>Aeromonas</i> spp</p>
Diarrea crónica	Interferencia del agente infeccioso con la actividad normal del tracto gastrointestinal.	<p><i>Giardia lamblia</i></p> <p><i>Áscaris lumbricoides</i></p> <p><i>Necator americanus</i></p> <p><i>Strongyloides stercoralis</i></p> <p><i>Trichuris trichura</i></p> <p><i>Cryptosporidium</i></p> <p><i>Isospora bella</i></p> <p><i>Enterocytozoon bieneusi</i></p>
Fiebre entérica	Mecanismo invasivo con penetración a través de la mucosa intestinal y diseminación hematogena a todo el organismo.	<p><i>Yersinia enterocolitica</i></p> <p><i>Campylobacter fetus</i> subsp. <i>fetus</i></p> <p><i>Salmonella enterica</i> serovar <i>Paratyphi A y B</i> *</p> <p><i>Salmonella choleraesuis</i> *</p> <p><i>Yersinia pseudotuberculosis</i></p>
Gastritis o atrofia gástrica	Colonización del epitelio gástrico con ulceración.	<i>Helicobacter pylori</i>

\*Patógenos más frecuentemente aislados en niños hospitalizados en México 2012

## Licenciatura en Promoción de la Salud

---

Determinantes intrínsecos relacionados al ser humano: Las enfermedades diarreicas también son el resultado de la contribución de la propia salud humana, como lo son la malnutrición y la edad. Estos son determinantes que afectan a los niños ya que en muchos de los casos cuando sucede el destete a temprana edad, -esto estrechamente relacionado a una inequidad y exclusión social que impacta en los estilos de vida de diferentes poblaciones-(UNICEF, 2009), se presenta una disminución de los anticuerpos maternos adquiridos, entonces la carencia de inmunidad pasiva en el niño y la ingesta de comida contaminada puede desencadenar un episodio diarreico. Aunado a esto si la nutrición es deficiente el organismo del niño será menos capaz de aceptar mecanismos para combatir un episodio diarreico, por ejemplo su sistema inmune podría estar abatido, lo que los hace más vulnerables y propensos a morir si no se les da la atención debida y puntual. A su vez, cada episodio de diarrea empeora su estado nutricional y esto es un círculo vicioso donde, a más episodios de diarrea, más desnutrición y en el peor de los casos puede desencadenar en el fallecimiento del menor (Sáenz, 2005).

Determinantes extrínsecos relacionados al contexto del ser humano: Los determinantes culturales y sociales están ligados a los estilos de vida de los individuos y las condiciones socioculturales. Estos aspectos tienen que ver con el contagio de persona a persona, en particular en relación a las condiciones de higiene personal deficiente, o bien en la forma en que los alimentos son elaborados o almacenados en condiciones antihigiénicas. Así mismo, las condiciones de pobreza definen el uso de agua no potable como la de riego para sus necesidades básicas, incrementando el riesgo de adquirir una infección diarreica (Sáenz, 2005).

Como se ha descrito anteriormente, las EDAs se generan gracias a un conjunto de determinantes extrínsecos e intrínsecos que están interconectados y las acciones que se deben tomar para combatir este importante problema de Salud Pública deberían de partir desde diferentes ciencias y disciplinas bajo diferentes estrategias; ya que las soluciones más efectivas en los países en vías de

# Licenciatura en Promoción de la Salud

---

desarrollo, incluso en los países desarrollados, para evitar en mayor grado un contagio por enteropatógenos, como epidemias o combate de este problema en zonas endémicas, deben responder a medidas integrales gestadas desde la Promoción de la Salud para lograr la participación de las personas en la conservación de su salud, por sus estilos de vida, hasta el desarrollo tecnológico para vigilar la movilidad de los patógenos territorialmente, en potenciales brotes epidémicos (Weng Alemán, 2000).

## 1.2 La Promoción de la Salud

A lo largo de la historia y en las diferentes conferencias que han tenido lugar, la PS tiene un papel importante en la atención a la salud, en algunos aparece como un mecanismo primario de atención a la salud desde la atención primaria a la salud, como la representaron Leavell y Clark (1965) al desarrollar su modelo de historia natural de la enfermedad (L, Heyman, 2007). En éste se distinguen tres niveles de prevención y en cada uno hay componentes distintos de medidas preventivas, las cuales se implementarán dependiendo el grado de conocimiento de la historia natural de la enfermedad [Tabla 3].

**Tabla 3. Niveles de aplicación de medidas preventivas en la historia natural de la enfermedad**

Prevención primaria		Prevención secundaria		Prevención terciaria
Promoción de la Salud	Protección específica	Diagnóstico y tratamiento precoz	Limitación de la invalidez	Rehabilitación

El concepto moderno de Promoción de la Salud (PS) tomó fuerza en los últimos 20 años en países desarrollados de todo el mundo, pero son tres conferencias Ottawa (1986), Adelaide (1988) y Sundsval (1991) las que establecieron las bases conceptuales y el punto de partida de esta nueva disciplina (Vega, 2000).

En otras conferencias alrededor del mundo la PS se propuso como una herramienta metodológica y como una teoría que no deja de ser novedosa y a la

## Licenciatura en Promoción de la Salud

---

vez difícil de entender, ya que no siempre se tienen bien planteados sus alcances y limitaciones y, como lo veremos más adelante, no existe una sola promoción de la salud vista desde cualquiera de las tres formas antes mencionadas (Kumate, 1989).

Pero aunque existen diferentes visiones y formas de hacer PS, el fin es el mismo, darle un concepto positivo a la salud y tratar los problemas de salud de manera diferente como lo hacen otras disciplinas actualmente, que es una ausencia de enfermedad (solo ámbito biológico) y no como un equilibrio en todos los aspectos de la persona o comunidad donde la Salud es un medio o el fin.

La PS se a definido como un proceso que permite a las personas adquirir mayor control sobre su propia Salud y al mismo tiempo mejorar dicha salud. Lo anterior se establece con base en el contexto de salud definido como la capacidad con la que un individuo o grupo pueden realizar sus aspiraciones y satisfacer sus necesidades, además de cambiar su entorno o afrontarlo. Los principios fundamentales de la PS podrían enmarcarse en las siguientes características: interviene en la población en su conjunto en el contexto de su vida diaria, pretende influir en los determinantes de la salud, combina métodos o enfoques distintos pero complementarios, se orienta a conseguir la participación concreta y específica de la población y los profesionales de salud quienes habrán de desempeñar un papel de facilitador de la PS (Kickbush, 1996).

Es decir, la salud ya no solo debe ser vista como ausencia de enfermedad y sobre todo, el encargado de salvaguardar este bien social (la salud) ya no es, solo el médico, la enfermera, o el especialista en el ámbito biológico; sino que la salud se ve más como un proceso que como fin, donde intervienen determinantes sociales, culturales, ambientales, políticos, religiosos y éticos; que en suma, si el individuo está en armonía con éstos lo reflejará en su vida y en su comunidad (López, 2005).

Otro concepto que aterriza el campo de trabajo de la PS así como su naturaleza interdisciplinaria es el expuesto por Bunton y Macdonald (Restrepo, 2001). En el

## Licenciatura en Promoción de la Salud

---

que se afirma que se trata de una “Disciplina académica o mejor aún, un conjunto de varias disciplinas académicas”.

Entre estas disciplinas se identifican las siguientes: la Política social, la Educación, la Sociología, la Psicología, la Epidemiología, la Comunicación, el Mercado Social, la Filosofía y la Economía, solo por mencionar algunas.

Lo interesante es que con este intercambio disciplinar se crea un nuevo concepto que tiene identidad propia y aplica técnicas y metodologías que requieren un alto grado de manejo, creando así una fuerza multidisciplinaria con el fin de contribuir a la PS.

La PS señala la necesidad de cambiar el paradigma que nos dice que existe una sola salud y ésta sólo atañe al ámbito biológico; de modo que el enfoque es que hay varias dimensiones de la salud y elevar los niveles de Salud de las poblaciones requiere la apropiación de capacidades que lleven a los individuos y a las comunidades a lograr una cierta autonomía referente al proceso salud-enfermedad; y con esto, que ellos mismos se planteen el nivel de Salud al que quieran llegar. Una de las tareas iniciales de la PS es que de manera conjunta, los integrantes de las comunidades y los promotores de salud identifiquen primero el contexto en el que están inmersos, las capacidades con las que cuentan y las que pueden fortalecer así como las amenazas que los detienen para poder lograr un mejoramiento en su nivel de salud tanto individual como colectiva.

Desde el nacimiento de la Promoción de la Salud se ha tratado de profundizar más en el tema y se han llevado a cabo a lo largo de la historia 8 conferencias de PS, cada una tratando de contextualizar su importancia y la relevancia que debe tener está en las agendas políticas de todas las naciones, de igual manera han surgido de estas conferencias documentos que engloban tanto el trabajo, responsabilidades y retos de la propia PS, a continuación se mencionaran aspectos importantes de las conferencias y de las declaraciones de PS.

### **Declaraciones y Conferencias mundiales en torno a la Promoción de la Salud.**

El **Informe Lalonde, denominado (1974)** "Una Nueva Perspectiva de la Salud de los Canadienses". Representa un cambio de actitud frente a los problemas de salud, poniendo énfasis en las estrategias gubernamentales orientadas al cambio de comportamientos, así como al desarrollo de políticas públicas, que fortalecieran la acción comunitaria con la finalidad de actuar sobre distintos escenarios en los que las personas viven cotidianamente (Lalonde M, 1974).

La **Declaración de Alma-Ata (1978)**, (ex-URSS). Este documento tiene como filosofía: "*Salud para Todos en el año 2000*" y se resume en los diez puntos siguientes: 1) una definición universal de salud como un estado de bienestar, 2) igualdad en el estado de salud de la población, 3) desarrollo social y económico en un nuevo orden internacional, 4) el derecho de la población a participar en la aplicación, atención y planificación de su salud, 5) justicia Social, 6) atención primaria de salud y asistencia sanitaria esencial, basada en métodos y tecnologías, científicamente fundados y socialmente aceptables, 7) hacer hincapié en la atención primaria de salud, 8) todos los gobiernos deben formular políticas, estrategias y planes de acción hacia la atención primaria de salud, 9) cooperación entre los países para garantizar la atención primaria de salud de toda la población, 10) manejo más racional de los recursos del mundo para alcanzar la salud para todos en el año 2000(OMS/UNICEF,1978).

**En 1984, la Organización Mundial de la Salud** define los principios de la Promoción de la Salud. Aquí se mencionan algunos básicos:

- 1) Busca influir en los determinantes de la salud y asegurar ambientes saludables,
- 2) Se dirige a la población en general y su condición de vida particular, sin centrarse en personas especialmente vulnerables o en riesgo,
- 3) combina procedimientos diversos y complementarios como la comunicación, la educación, la legislación, las medidas fiscales, el cambio organizativo y el desarrollo comunitario,
- 4) debe aspirarse a la participación efectiva de la población,

## Licenciatura en Promoción de la Salud

---

propiciando la autogestión y estimulando la conciencia de las personas a encontrar estrategias para promover la salud de sus comunidades, 5) partir de la perspectiva social de la salud, los profesionales de la salud, especialmente los de atención primaria deben apoyar y facilitar la PS.

### **Primera Conferencia Internacional sobre Promoción de la Salud en Ottawa, Canadá (1986)**

Se elabora *La Carta de Ottawa para la Promoción de la Salud* en la que se destacan condiciones previas para la salud: la paz; ecosistemas estables; justicia social y equidad; recursos como educación, alimentos e ingresos. Además enmarca la necesidad del empoderamiento de la gente y de la “abogacía”, la participación y acción política. Las principales acciones se centran en: 1) la formulación de políticas públicas saludables, 2) la creación de entornos propicios saludables, 3) el fortalecimiento de acciones comunitarias, 4) el desarrollo de aptitudes personales; 5) la reorientación de los servicios de salud (OMS, 1986).

### **Segunda Conferencia Internacional de Promoción de la Salud, Adelaide, Australia (1988)**

En esta conferencia se definió la Política Pública Saludable como *"la que se dirige a crear un ambiente favorable para que la gente pueda disfrutar de una vida saludable"*. Así, desde esta perspectiva, se valoró su incidencia en los determinantes de la salud (Medio Ambiente, Estilos de vida, Sistemas Sanitarios, Biología Humana) y cómo estas políticas enmarcan las acciones que buscan reducir las inequidades sociales y económicas. Adicionalmente, se indicó la necesidad de pedir cuentas a los sectores público y privado; y que el gobierno formule políticas de salud y la valoración de su impacto (Raventós, 1988).

### **Tercera Conferencia Internacional de Promoción de la Salud, Sundsvall Suecia (1991)**

Esta conferencia enmarcó la interdependencia entre el medio ambiente y la salud en sus diferentes dimensiones: sociales (normas, costumbres y procesos), físicas (interdependencia de todos los seres humanos), culturales (reconocimiento de las mujeres), económicas (redistribución de los recursos y desarrollo sostenible) y políticas (participación democrática, descentralización de las responsabilidades y recursos). Se identificaron cuatro estrategias de Salud Pública para la creación de entornos de apoyo comunitario: fortalecer la abogacía, hacer que las personas y las comunidades asuman el control de la salud y el ambiente mediante el empoderamiento de las personas, creación de alianzas para la salud, mediación entre los intereses sociales en conflicto (OMS, 1991).

### **Cuarta Conferencia Internacional de Promoción de la Salud, Yakarta Indonesia (1997)**

En esta conferencia se incluye al sector privado en apoyo a la PS. Entre sus prioridades resaltan el promover la responsabilidad social y el incremento de la inversión para el desarrollo de la salud, esto con el objeto de asegurar la infraestructura necesaria para la PS; abordar los problemas de salud aprovechando los distintos escenarios, la participación de las comunidades en la toma de decisiones, acceso a la educación e información, participación efectiva y movilización de la gente, empoderar al individuo (OMS, 1997).

### **Quinta Conferencia Internacional de Promoción de la Salud, México (2000)**

En ésta se hizo hincapié en los acuerdos tomados en Yakarta, teniendo como meta, hacer un examen del aporte realizado por las estrategias de promoción para mejorar la salud y la calidad de vida de las personas que viven en circunstancias adversas, así como una mayor equidad entre los países. Se redactó la “Declaración ministerial de México para la promoción de la salud: de las ideas a la acción” en la que se compromete a los países a incluir a la salud en su agenda política y de desarrollo (Secretaría de Salud, 2000).

### **Sexta Conferencia Internacional de Promoción de la Salud, Bangkok Tailandia (2005)**

Aquí se realizó un análisis de los desafíos y oportunidades que enfrenta la PS en un mundo globalizado. Se ratificaron los principios y áreas de acción establecidos en la carta de Ottawa y las otras conferencias de PS. En esta conferencia se propusieron cuatro compromisos para la PS: 1) la PS debe ser primordial en la agenda mundial, 2) es responsabilidad de todo gobierno, 3) es un objetivo fundamental de comunidades y la sociedad civil y 4) es un requisito para las buenas prácticas empresariales. Así mismo se destaca la importancia de asociaciones, alianzas, redes y demás mecanismos de colaboración en torno a objetivos comunes para mejorar la salud de las comunidades (OMS, 2005).

### **Séptima Conferencia Internacional de Promoción de la Salud, Nairobi Kenya (2009)**

En esta conferencia se planteó una llamada a la acción de identificar estrategias y compromisos claves para cerrar la brecha en la salud y desarrollo mediante la PS, reduciendo la inequidad en salud a través de la implementación de la PS para crear sociedades más justas que permitan a las personas llevar una mejor calidad de vida y aumentar el control de su salud y los recursos necesarios para su bienestar.

Las estrategias planteadas en esta conferencia son: 1) construir capacidades para la P.S, 2) fortalecer los sistemas de Salud, 3) alianzas y acciones intersectoriales, 4) empoderamiento comunitario, 5) alfabetización y comportamiento en Salud (OMS, 2009).

### **Octava Conferencia Internacional de Promoción de la Salud, Helsinki Finlandia (2013)**

Identifica las acciones intersectoriales y las políticas públicas saludables como elementos centrales para la PS. El logro de la equidad en salud y el entendimiento de la salud como un derecho humano, esta conferencia le da más peso a la falta de políticas saludables y el deterioro de la salud de la población frente a procesos del mercado. Busca mejorar la rendición de cuentas de los políticos sobre el impacto en salud, enfatizar las consecuencias de las políticas públicas en los sistemas de salud, los determinantes de la salud y el bienestar.

Se exhortó a los gobiernos a :1) colocar como prioridad la política en salud y la equidad en salud mediante la adopción de los principios de *Salud en Todas las Políticas*, 2) asegurar estructuras, procesos y recursos eficaces que faciliten la implementación del enfoque de *Salud en Todas las Políticas* en todos los niveles de gobierno, 3) fortalecer la capacidad de los Ministerios de Salud para comprometer a otros sectores del gobierno a través del liderazgo, la colaboración, la promoción y la mediación para lograr mejores resultados de salud, 4) construir capacitación institucional y habilidades que permitan la implementación de *Salud en Todas las Políticas* y que proporcionen evidencias en los determinantes de la salud y la inequidad; y en respuestas efectivas, 5) adoptar mecanismos transparentes de auditoría y rendición de cuentas para los impactos en salud y equidad, que construyan confianza en todos los gobiernos y entre los gobiernos y sus poblaciones, 6) establecer medidas frente a los conflictos de intereses que incluyan garantías efectivas para proteger las políticas de la distorsión creada por la influencia de los intereses comerciales y otros intereses; e 7) incluir a las comunidades, los movimientos sociales y la sociedad civil en el desarrollo, implementación y monitorización de la *Salud en Todas las Políticas*, capacitando a la población en alfabetización en salud (OMS, 2013).

Así entonces, en la perspectiva de este trabajo de tesis la dimensión preventiva y las acciones de PS se complementan con el desarrollo tecnológico para el control

de enfermedades infecto contagiosas la necesidad de esta vinculación la encontramos a partir de que la Organización Mundial de la Salud (OMS) reconoce a la PS como una herramienta con la que deben contar los gobiernos para alcanzar “salud para todos” y cuya agenda incluye: 1) educación dirigida a los problemas de salud prevalentes y métodos de diagnóstico para su control, 2) prevención y control de enfermedades endémicas; e 3) inmunización contra las principales enfermedades infecciosas (OMS, 1978).

Es así que, el problema de las EDA's debe ser observado de manera integral de por lo que en este trabajo podemos conjuntar los alcances de la PS y sus estrategias en este problema de SP, así como la importancia a nivel preventivo que tiene el desarrollo de un nuevo método de diagnóstico molecular para enteropatógenos dentro de las estrategias de la Vigilancia Epidemiológica.

Así la PS incide y maximiza capacidades, detona procesos de cambio e identifica posibles problemas de salud y entre las comunidades. A su vez, busca una reorientación de las políticas de salud a partir de la concientización de sus prácticas.

### **1.3 La Promoción de la Salud y las Enfermedades Diarreicas: Vinculación y cooperación de instituciones- sector salud- comunidad, estudio de un caso.**

Un nivel de acción de la PS en regiones específicas del país a sido documentado en lo que se le llamado la salud comunitaria basada en evidencias. La intervención en comunidades con objetivos basados en el desarrollo de estrategias de salud y su impacto sobre la propia comunidad representa un campo claro para acciones concretas en problemas de Salud Pública regional. En este sentido se han desarrollado estrategias de planificación por regiones basadas en evidencias (Arrizón y col, 2011).

Estas estrategias han sido desarrolladas por el Centro de Investigación de Enfermedades Tropicales de la Universidad Autónoma de Guerrero. En sus primeras investigaciones estuvieron involucrados muchos de los municipios más pobres del Estado de Guerrero. Su método se basa en investigación de campo

local, con repeticiones a intervalos para obtener evidencias que apoyen la toma de decisiones. En un estudio realizado entre 1992 y 1995 en las 5 comunidades más pobres del estado, donde la tasa de mortalidad infantil fue de 100 por cada 1000 nacidos vivos, más de la mitad de las mujeres adultas son analfabetas y solo 27 de 700 comunidades tienen un centro de salud, se desplegaron estrategias para promover la participación comunitaria donde la prevalencia de las diarreas es alta. Por ejemplo se propició la formación de nuevos comités de salud para controlar la calidad del agua, se empleó una canción para promover la rehidratación, con la participación de la radio local y realizando “spots” con “estrellas” locales y del medio artístico fomentando buenos hábitos de salud, así como la participación directa de promotores de la salud; y el trabajo casa por casa para llevar a cabo la cloración del agua.

El resultado después de varios años fue que las tasas de diarrea descendieron en los 5 municipios. Aunado a esto, un efecto positivo altamente favorable fueron los cambios en: “conocimiento”, “prácticas domésticas” y “captación de servicios de las comunidades” podría representar claramente el impacto que la Promoción tiene sobre la comunidad para participar directamente de su salud a nivel comunitario.

### **1.4 Trabajo gubernamental en el problema de las EDA`s.**

Organismos internacionales como la OMS, trabajan con sus países miembros y con otros asociados, para lograr fomentar políticas para atender el problema de las enfermedades diarreicas en países en desarrollo, así mismo se realizan investigaciones para desarrollar y probar nuevas estrategias sanitarias en este ámbito, o bien, nuevas intervenciones sanitarias como la vacunación y la formación de profesionales sanitarios, a nivel comunitario para combatir estas enfermedades (Alberto, 2004).

Las dos causas más frecuentes de las EDAs en países en desarrollo son una mala nutrición y un inadecuado tratamiento de los menores infectados ya sea por rotavirus o *Escherichia coli*. En el caso de México, se han establecido estrategias

para lograr disminuir el número de casos y de defunciones. Dichas estrategias relacionadas a estas enfermedades están coordinadas por el Sector Salud, entre ellas se encuentran la promoción y la educación de la población, así como también la capacitación del personal médico, principalmente en el primer nivel de atención (WHO, 2013).

### **1.5 La Promoción de la Salud y la Prevención de la Enfermedad son Instrumentos de intervención en la Salud Pública de las Enfermedades Diarreicas.**

En las Conferencias de Promoción de la Salud, el centro de atención han sido acciones dictadas y adoptadas por los gobiernos, ya que éstos apuestan a que la PS y la PE a través de sus estrategias específicas, logren un mejor nivel de salud de su población.

En el caso de México para la prevención primaria y la Promoción de la Salud se han planteado varias estrategias coordinadas desde la Secretaria de Salud (Secretaria de Salud. 2008), las cuales tratan de incidir en el problema de las EDAs, algunas de estas acciones incluyen:

- a) Intervenciones de la Secretaria de Salud en el suministro y calidad del agua potable, sanidad e higiene que reducen la morbilidad por enfermedades diarreicas (Fewtrell, 2004).
- b) Campañas de educación y enseñanza del lavado de manos con jabón, ya que esto puede reducir el riesgo de enfermedad diarreica en un 42% a 47%, ya que es bien sabido que el correcto lavado de manos puede evitar el contagio de algunas enfermedades como es el caso de las EDA's (Curtis, 2003).
- c) Concientización por parte de la Secretaria de Salud para que se alimente a los niños en los primeros meses de vida exclusivamente por seno materno ya que experimentan menor morbilidad de infecciones gastrointestinales comparado con aquellos que son alimentados en forma mixta por 3-4 meses (Kramer, 2001).

## Licenciatura en Promoción de la Salud

---

Estas acciones asociadas, tanto a las conductas, como a las políticas públicas, representan un mejor trabajo desde la PS, ya que su trabajo fundamentalmente es modificar los determinantes de la salud, entendida ésta, como el bienestar y una mejor calidad de vida.

No existe un concepto único para responder unívocamente qué es la PS; y aún los alcances y limitaciones de esta disciplina, esto representa una controversia en cuanto a si las intervenciones deben realizarse de manera colectiva o individual; no obstante la flexibilidad de esta disciplina permite que algunos promotores generen mecanismos de intervención en el campo colectivo, mientras que otros de ellos puedan generar intervenciones personales, dirigidas a lograr cambios conductuales o “estilos de vida” (Silva, 2011).

Las diferencias en la operacionalización entre la PS y la PE permiten establecer una mayor precisión y claridad para el diseño de programas y proyectos en salud. La diferencia fundamental entre la PS y la PE radica en su objeto de intervención; para la PS este objeto es lo “saludable” en tanto que para la PE es la enfermedad y sus riesgos. Por otro lado la PS está encaminada a la población, a influir entre grupos y ambientes, en tanto que la PE se dirige más al individuo. En cuanto a los objetivos la PE se divide en tres (primaria, secundaria y terciaria), los cuales reducen determinantes de riesgos y enfermedades; mientras que en la PS se actúa sobre los determinantes de salud y se crean opciones saludables para que las poblaciones accedan a ellas.

En la PE **las acciones** se dirigen a grupos de riesgo y en la PS está dirigida a la población en general, a los procesos sociales, culturales y políticos; para que éstos a su vez influyan sobre la calidad de vida y la salud de los grupos. En la **implementación** la PE usa la medicina preventiva, las prácticas clínicas preventivas y de evidencia clínica y rehabilitación. En la PS los modelos de intervención son socio políticos, ecológicos y socio culturales que van dirigidos a la interacción entre los individuos y las comunidades con su ambiente físico, social, cultural, económico y político.

## Licenciatura en Promoción de la Salud

---

El **papel del interventor** tiene similitudes tanto en la PS como en la PE primaria, por ejemplo en el diseño de programas amplios e integrales se requiere de nuevos interventores sociales, políticos y comunitarios. En la PE secundaria se utilizan pruebas de tamizaje mientras que en la terciaria son procedimientos y manejos clínicos, en tanto que en la PS los nuevos interventores sociales se dirigen a generar condiciones para que los individuos y las comunidades desarrollen capacidad de actuar y tomen decisiones positivas para la salud y su bienestar colectivo.

Las **estrategias** que usa la PE secundaria se basan en la discriminación de los grupos que tienen una enfermedad de los que no. La terciaria utiliza el manejo clínico con el tratamiento de las enfermedades, la readaptación y la rehabilitación. Por su parte la PS utiliza estrategias e instrumentos como la información, la educación y la comunicación para la salud, el mercadeo social (social marketing), el fortalecimiento de la participación comunitaria, el empoderamiento; y la acción política para la formulación e implantación de políticas públicas saludables (Restrepo, 2001).

Lo importante es que ambos niveles de intervención estén conectados, porque no se pueden concebir herramientas metodológicas dirigidas al individuo para que cambie su comportamiento sin generar cambios en el colectivo; y que éstas a la larga, no incidan en el marco de las políticas públicas saludables y de los procesos participativos de elevar el nivel de salud del colectivo.

Existe un error y una confusión en decir que la prevención es lo mismo que la promoción, aunque en sus bases teóricas es más fácil diferenciarlas que en la práctica. Stachtchenko y Jenicek (1990) desarrollaron un esquema en donde se encuentran los puntos más importantes que diferencian a estas dos prácticas [Tabla 4].

## Licenciatura en Promoción de la Salud

---

**Tabla 4. Diferencias esquemáticas entre Promoción de la Salud y Prevención de las Enfermedades, tomado de Frenk, 2003.**

<b>CATEGORÍA</b>	<b>PROMOCIÓN DE LA SALUD</b>	<b>PREVENCIÓN DE ENFERMEDADES</b>
Concepto de salud	Positivo y multidimensional	Ausencia de enfermedad
Modelo de intervención	Participativo, Saludable	Médico, Determinantes de riesgo
Objetivo	Toda la población en su ambiente total	Principalmente los grupos de alto riesgo
Incumbencia	Red de asuntos de salud	Patología específica
Estrategias	Abordar el tema de salud desde diferentes disciplinas	Recuperar la salud
Abordajes	Facilitación y capacitación	Direccionador y persuasivos
Direccionamiento de las medidas	Ofrecidas a la población	Impuestas a un grupo objetivo
Objetivos de los programas	Cambios de la situación de los individuos y de su ambiente	Se enfocan principalmente en individuos y grupos de personas
Ejecutores de los programas	Promotores de la Salud, ONG`s, movimientos sociales, municipales, regionales y nacionales	Profesionales de la salud

## Licenciatura en Promoción de la Salud

---

Tanto los abordajes de la promoción y de la prevención son complementarios y no deben considerarse excluyentes dentro de la planificación de programas de salud, ya que la población se beneficiará de las medidas adecuadas y equilibradamente propuestas en ambos casos. Ambas pueden resultar efectivas pero debemos discriminar de acuerdo a las necesidades de la población con la que estemos trabajando. ¿Cuándo es que se requiera de la prevención y cuándo se requiera de la Promoción de la Salud para alcanzar un mayor grado de eficacia de los objetivos particulares?, considerando no abordar desde la Prevención como si se estuviera haciendo Promoción de la Salud (Frenk, 2003).

### **2. Epidemiología y Vigilancia Epidemiológica de las Enfermedades Diarreicas causadas por Enteropatógenos.**

#### **2. 1 Epidemiología de las Enfermedades Diarreicas.**

Durante millones de años el ser humano y los microorganismos han coevolucionado. La historia demuestra una confluencia de diferentes enfermedades infecciosas en las principales civilizaciones, tal vez, es por eso que actualmente, se acepta que los cambios globales influyen en el rango y la incidencia de las enfermedades infecciosas; y se destaca el papel de las condiciones políticas, económicas y sociales sobre el patrón de éstas (Torres, 2001).

Los avances científicos de finales del siglo XIX y principios del siglo XX dieron como resultado la prevención y el control de muchas enfermedades infecciosas, principalmente en los países desarrollados; sin embargo, a pesar de las mejoras en la salud, continúan apareciendo brotes de enfermedades infecciosas y emergen nuevas infecciones. El panorama sanitario en los países en vías de desarrollo ha estado dominado por la prevalencia de las enfermedades transmisibles, las cuales representan una carga pesada de morbi-mortalidad para muchos países (Weissenbacher, 1998).

Estas brechas sanitarias, que se han venido agrandando desde hace algunas décadas, pueden obedecer a comportamientos de alto riesgo como fallas en los sistemas de Vigilancia Epidemiológica, paralización de los sistemas de abastecimiento de agua y saneamiento, acercamiento de la fauna silvestre a los asentamientos humanos por la deforestación, entre otros.

La diarrea es frecuente en países en vías de desarrollo y hablando en cuestión de mortalidad para la OMS es la tercera causa de muerte, está solo por debajo de las infecciones agudas del tracto respiratorio inferior, que es la primera causa y del VIH-SIDA que está en segundo lugar.

## Licenciatura en Promoción de la Salud

---

En cuanto al periodo estacional se puede mencionar que la mayor incidencia de gastroenteritis vírica se da durante el otoño-invierno con una clara incidencia de los rotavirus; mientras que las bacterias afectan preferentemente en la temporada de primavera-verano (Cortez, 2011).

En 2004, en todo el mundo las enfermedades diarreicas fueron la tercer causa de muerte en países de ingresos bajos, donde ocasionaron el 6.9% de los fallecimientos; de los 1.5 millones de niños que fallecieron, el 80% tenían menos de dos años (OMS, 2012).

En Latinoamérica la mortalidad en el primer año de vida es de hasta 50 por cada 1000 nacidos vivos. En México, es de 363 por cada 100,000 nacidos vivos y en el grupo de 1 a 4 años es de 49 por cada 100,000, siendo en este último segmento de edad la principal causa de defunción al año (Secretaria de Salud, 2013).

De acuerdo con la Secretaria de Salud los estados de la República Mexicana que presentan mayores casos de incidencia en enfermedades gastrointestinales son: Chiapas, Guanajuato, Veracruz, Puebla y el Distrito Federal, los datos de los principales institutos de salud refieren que estas enfermedades siguen siendo un grave problema de Salud Pública al que se le debe de dar la atención debida (Secretaria de Salud, 2013).

Puntualmente en nuestro país podemos encontrar que en las enfermedades diarreicas agudas se observa un incremento de la tasa de incidencia que se ha presentado entre 1990 y 2010, (Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica, 2011) debido a la mejora en la identificación de los casos [Tabla 5].

**Tabla 5. Evolución de los casos nuevos en México notificados de las EDA's entre 1980 y 2010 tomada de Secretaria de Salud 2011**

Año	Casos	Tasa <sup>1/</sup>
1980	1 152 702	1 716.46
1981	1 697 805	2 465.95
1982	2 010 635	2 850.20
1983	2 243 821	3 106.23
1984	2 412 309	3 263.13
1985	2 715 244	3 590.79
1986	2 401 468	3 106.77
1987	2 590 247	3 280.75
1988	2 473 056	3 070.21
1989	3 708 950	4 512.96
1990	4 256 042	5 068.47
1991	4 700 348	5 492.13
1992	4 666 074	5 351.93
1993	4 948 172	5 575.28
1994	4 311 669	4 776.64
1995	5 866 261	6 395.52
1996	6 275 369	6 738.28
1997	7 040 048	7 451.52
1998	7 611 170	7 945.67
1999	7 258 268	7 473.90
2000	6 891 063	7 000.37
2001	6 908 456	6 928.16
2002	6 831 630	6 770.06
2003	6 259 077	6 136.38
2004	5 951 869	5 778.41
2005	5 912 952	5 688.44
2006	5 765 081	5 497.14
2007	5 533 670	5 230.77
2008	5 564 956	5 216.37
2009	5 564 841	5 174.16
2010	5 706 232	5 264.24

1/ Tasas de incidencia por 100 000 habitantes.

Ahora bien, existen diferentes determinantes que predisponen a las poblaciones menos protegidas a padecer enfermedades diarreicas, como lo son: el bajo nivel socioeconómico, bajo peso de los menores de cinco años al nacer, educación deficiente, inmunodeficiencia, desnutrición, falta de alimentación al seno materno, hacinamiento, deficiente sanidad, no disponibilidad al agua potable y manejo inadecuado de los alimentos (Mota, 2000). Estos determinantes podrían ser estudiados por la Promoción de la Salud gracias a su enfoque multidisciplinario ya que esta disciplina no solo se encarga de estudiar un problema específico sino que permite identificar las múltiples dimensiones del problema para darle una mejor solución a partir de la realización de un diagnóstico comunitario.

En cuanto a México los datos que se tienen de nuevos casos de EDA's, en las diferentes entidades federativas en el periodo de 2000 a 2010 se observa una

## Licenciatura en Promoción de la Salud

variabilidad de los casos y una tasa de incidencia a nivel nacional y por entidad federativa.

Las entidades que presentaron una reducción de EDA's por arriba del 40% fueron: Baja California, Baja California Sur, Morelos y especialmente Yucatán con el 50%. Caso contrario al de Aguascalientes y Oaxaca donde los casos aumentaron (Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica, 2011) [Tabla 6] [Figura 1]

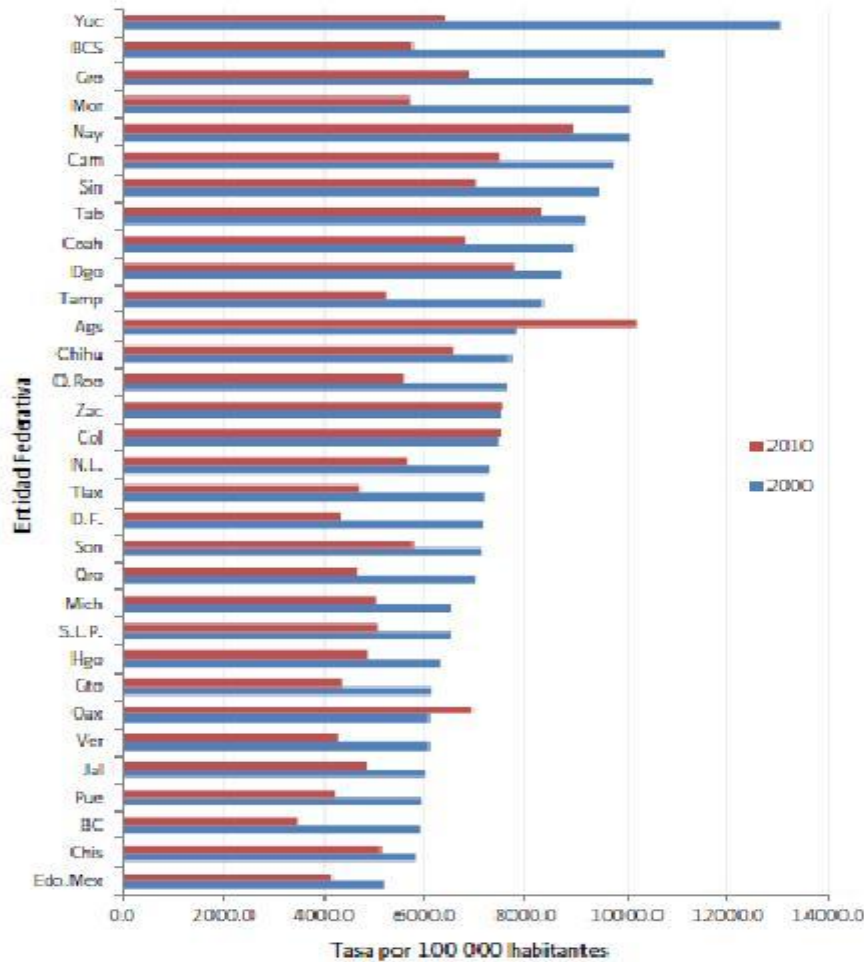
**Tabla 6. Casos nuevos de Enfermedad Diarreica Aguda según Entidad Federativa, México 2000-2010 tomado de Secretaria de Salud 2011**

Año Entidad	2000		2005		2010	
	Casos	Tasa <sup>1/</sup>	Casos	Tasa <sup>1/</sup>	Casos	Tasa <sup>1/</sup>
E.U.M	6 891 063	7000.4	5 912 952	5688.4	5 706 232	5264.2
Aguascalientes	75 317	7783.1	82 158	7682.5	118 248	10199.9
Baja California	141 304	5912.8	117 097	4148.7	113 094	3476.9
Baja California Sur	46 913	10727.2	33 538	6582.2	33 315	5752.0
Campeche	69 001	9749.9	55 875	7361.8	60 228	7480.0
Coahuila	210 174	8969.0	151 897	6038.6	180 761	6807.8
Colima	39 326	7456.0	33 895	5949.3	45 696	7509.2
Chiapas	232 866	5795.5	251 291	5827.6	234 245	5144.4
Chihuahua	234 905	7701.1	185 994	5711.4	224 400	6557.5
Distrito Federal	620 416	7133.6	455 571	5167.9	383 301	4332.7
Durango	127 892	8682.1	128 007	8399.0	120 443	7742.1
Guanajuato	291 692	6130.5	249 746	5055.0	220 933	4360.0
Guerrero	329 882	10548.0	222 345	7047.4	215 984	6890.7
Hidalgo	143 819	6302.1	122 111	5153.9	117 631	4833.7
Jalisco	387 093	6028.8	373 176	5501.9	340 184	4811.3
México	667 763	5186.9	665 577	4748.4	623 600	4148.6
Michoacán	263 055	6508.2	189 790	4724.7	199 081	5040.8
Morelos	154 946	10052.1	101 362	6253.6	96 486	5718.0
Nayarit	93 964	10028.4	92 881	9689.4	87 121	8963.9
Nuevo León	283 808	7284.7	248 109	5876.6	254 313	5648.8
Oaxaca	214 309	6097.6	237 887	6694.9	246 549	6947.7
Puebla	300 585	5926.4	249 239	4598.4	239 315	4194.4
Querétaro	100 404	6986.7	93 314	5839.1	81 934	4679.4
Quintana Roo	69 347	7663.3	69 199	6120.3	75 639	5554.3
San Luis Potosí	152 284	6491.3	129 728	5326.5	126 600	5073.1
Sinaloa	243 898	9438.3	246 662	9370.7	186 101	7006.9
Sonora	160 514	7092.6	130 371	5402.7	146 045	5766.5
Tabasco	177 077	9169.3	184 230	9182.7	171 743	8334.5
Tamaulipas	234 847	8359.4	185 664	6115.6	168 906	5228.8
Tlaxcala	70 699	7163.8	65 892	6137.9	54 389	4730.9
Veracruz	428 465	6097.5	332 418	4616.2	311 392	4268.6
Yucatán	221 113	13043.7	139 288	7624.9	124 590	6402.9
Zacatecas	103 385	7509.5	88 640	6404.6	103 965	7546.2

1/ Tasas de incidencia por 100 000 habitantes.

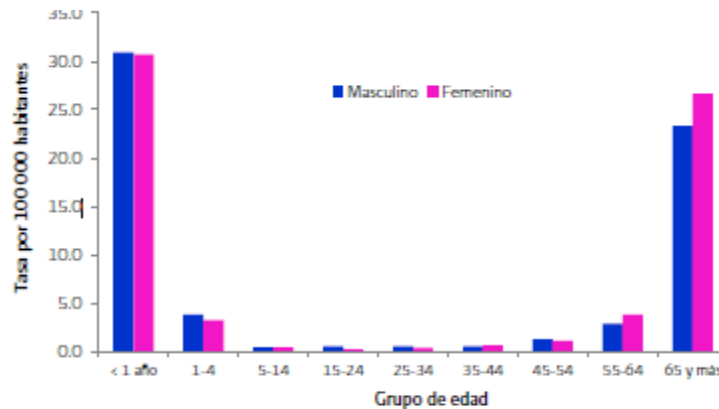
Habría que evaluar en los Estados donde los casos han disminuido, si las acciones planteadas por el Estado, se están llevando a cabo de buena manera y si es qué existe contribuciones realizadas por la PS. Sin embargo, las EDAs siguen siendo un grave problema si consideramos que su erradicación es prácticamente imposible debido a los determinantes múltiples que la conforman y a la reemergencia de patógenos.

**Figura 1. Tasa de incidencia por EDA en las Entidades Federativas 2000 y 2010 tomado de Secretaria de Salud 2011**



Las defunciones por EDA para el 2010, fueron un total de 3 165 muertes, con una tasa de mortalidad de 2.9 fallecidos por estas enfermedades por cada 100 000 habitantes. Los grupos de edad mayormente afectados son los que se encuentran en los extremos de la vida, principalmente, los menores de 1 año de edad con 585 defunciones y una tasa de mortalidad por EDA de 30.8 por 100 000 habitantes, mientras que los mayores de 65 años fue de 1612 defunciones y una tasa de mortalidad de 25.14 [Figura 2].

**Figura 2. Mortalidad por EDA's según grupo de edad y sexo, México 2010 tomado de Secretaria de Salud 2011**



1/ Por 100 000 habitantes.

Es indudable que la población mundial continuará su crecimiento, los microorganismos experimentando mutaciones y la tecnología y el conocimiento evolucionando. Las perspectivas para el siglo XXI dependerán de la capacidad existente de generar, integrar, diseminar y aplicar ese conocimiento. Es de señalar que la capacidad mundial de monitorear estos problemas ha sido bastante deficiente y cada vez se dispone menos de una adecuada coordinación para detectar y contener los problemas que acechan en la mayoría de los países en desarrollo y aún en los países industrializados (Weissenbacher, 1998).

### **2.2 Vigilancia Epidemiológica en la Salud Pública y la Promoción de la Salud.**

La vigilancia en la SP es la recopilación continua y sistemática de información, su análisis e interpretación son después divulgados a aquellas personas o instancias a cargo de prevenir enfermedades y otras condiciones de salud. La información permite a los responsables de la toma de decisiones poder responder rápidamente a las necesidades de la población en cuanto a su salud (Nsubuga, 2008).

A pesar de que existen herramientas para evitar las epidemias, el compromiso político y el apoyo económico son también necesarios para asegurarnos de que

## Licenciatura en Promoción de la Salud

---

todos los países tengan sistemas en funcionamiento para detectar, analizar y responder a un brote epidémico. Existen diferentes estrategias de la vigilancia en SP y las características se resumen a continuación [Tabla 7].

**Tabla 7. Estrategias de la Vigilancia Epidemiológica en Salud Pública tomada de OMS, 2008.**

<b>Sistemas de vigilancia centinela</b>	<p>Establecimiento de laboratorios en áreas seleccionadas, que reportan todos los casos que existen sobre una cierta condición por tanto ofreciendo tendencias que pueden afectar al total de la población.</p> <p>Reportar muestras es una buena forma de utilizar recursos limitados para vigilar posibles problemas de salud.</p>
<b>Encuestas de hogares</b>	<p>Se pueden utilizar para vigilar enfermedades si las encuestas son consistentes y se repiten periódicamente. Las encuestas están basadas en la población, es decir, incluyen encuestas demográficas y de salud.</p>
<b>Vigilancia con base en los laboratorios</b>	<p>Se utiliza para detectar y vigilar las enfermedades infecciosas, el uso de un laboratorio central para identificar por ejemplo, el tipo específico de una bacteria permite detectar los brotes de enfermedades más rápidamente.</p>
<b>Vigilancia y respuesta a Enfermedades</b>	<p>Reúnen datos de establecimientos de salud y laboratorios en sistemas diseñados para vigilar las enfermedades transmisibles.</p>

### **2.3 Vigilancia Epidemiológica de las Enfermedades Diarreicas.**

La Vigilancia Epidemiológica es un método observacional basado en un registro continuo para el seguimiento del estatus sanitario o de determinantes de riesgo en una población definida y particularmente sirve para detectar la aparición de procesos patológicos y estudiar su evolución en el tiempo y en el espacio (con vistas a adoptar medidas de control apropiadas) (Andersson, 2011).

El primer paso para controlar las enfermedades transmisibles y reconocer la aparición de nuevas enfermedades infecciosas corresponde a la detección e identificación inmediata. Para ello es esencial contar con un sistema organizado de vigilancia de las enfermedades prevalentes, conocidas y diagnosticadas, de las nuevas y las desconocidas (idem). Desde este punto, la vigilancia es la observación, reconocimiento e información, en cuanto una enfermedad, que afecte a humanos, sino también en animales y plantas esto puede abarcar enfermedades causadas por bacterias, hongos, virus, protistas y helmintos.

Dentro de los objetivos principales de la vigilancia podemos destacar los siguientes (Weissenbacher, 1998).

- a) Detectar precozmente la aparición de una enfermedad exótica o una enfermedad nueva en una región, prevalente, persistentes y endémicas.
- b) Capacitar para jerarquizar la importancia (económica o sanitaria) de las diferentes enfermedades presentes en una población.
- c) Determinar la verdadera importancia-extensión de una enfermedad (incidencia, prevalencia, pérdidas económicas) y seguir su curso.
- d) Evaluar los resultados de programas de control.
- e) Sugerir líneas de investigación.

La Vigilancia Epidemiológica tiene diversas funciones tanto centrales como de apoyo [Tabla 8] que en conjunto deberían lograr evitar que estos patógenos (emergentes, reemergentes, endémicos) causen grandes estragos en el nivel de salud de las poblaciones (OMS. 2007).

**Tabla 8. Funciones de la Vigilancia Epidemiológica.**

<b>Funciones centrales</b>	<b>Funciones de apoyo</b>
Detección de casos	Establecer instrumentos estandarizados de notificación
Reporte	Entrenar y supervisar los recursos humanos
Investigación y confirmación	Crear redes de laboratorio para el diagnóstico oportuno
Análisis e interpretación	Organizar las vías de comunicación para facilitar el flujo de información
Control- Respuesta oportuna	Manejo de recursos
Políticas	Garantizar una adecuada coordinación e integración del Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica (que evite afectar: el funcionamiento del sistema, costo del sistema y sustentabilidad del sistema)
Retroalimentación	

\* Tomada de OMS, 2007

En México, a través de la Secretaría de Salud, la Vigilancia Epidemiológica es utilizada en el campo de las enfermedades infecciosas, permite identificar de manera oportuna los potenciales riesgos a la salud y emite alertas para el establecimiento de medidas de prevención y control. Así, para el caso de la Enfermedad Diarreica Aguda (EDA), que está considerada dentro del Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica (SINAVE), se establece como estrategia complementaria el Núcleo Trazador de Vigilancia Epidemiológica (NuTraVE), para fortalecer la notificación oportuna de los casos con información de alta calidad, donde se asegura la toma de muestras y un diagnóstico etiológico de la enfermedad, lo que permite el establecimiento de medidas de mitigación de forma oportuna.

## Licenciatura en Promoción de la Salud

---

La manera de operar del NuTraVE está coordinada por la Dirección General de Epidemiología a nivel federal y por el área de Epidemiología de la Secretaría de Salud en el nivel Estatal, con el apoyo del Comité Estatal de Vigilancia Epidemiológica (CEVE); y la Epidemiología Jurisdiccional opera a través de unidades de atención médica y laboratorios locales.

Para operar la Vigilancia Epidemiológica de la EDA se toman en cuenta los siguientes casos:

**Caso de EDA:** Paciente de cualquier edad que presente cinco o más evacuaciones diarreas en menos de 24 horas durante no más de cinco días con o sin datos de deshidratación.

**Caso de EDA Moderada:** Paciente de cualquier edad que presente cuadro diarreico con cinco o más evacuaciones en menos de 24 horas, cuya evolución sea menor a cinco días y que presente datos de deshidratación moderada.

**Caso de EDA Grave:** Paciente de cualquier edad que presente cuadro diarreico con cinco o más evacuaciones en menos de 24 horas, cuya evolución sea menor a cinco días y que tenga **dos** o más de los siguientes síntomas: vómito (más de cinco en 24 horas), cuadro disentérico, temperatura mayor a 38°C, datos de deshidratación moderada a grave.

El muestreo para los casos de EDA en situaciones de no brote (monitoreo permanente) se realiza en las unidades hospitalarias, las cuales toman muestras a la totalidad de las diarreas moderadas y graves. En situaciones de brote además del muestreo de las formas moderadas y graves en las unidades hospitalarias, se toma muestra al 30 % de los casos de EDA en unidades del primer nivel de atención que conformen el NuTraVE, concluido el brote se acabará el muestreo de los casos en las unidades de primer nivel.

Los laboratorios locales (ubicados en centros de salud, hospitales y/o cabeceras jurisdiccionales) procesan las muestras siempre y cuando tengan capacidad instalada para realizarlo; de no ser así, remitirán las muestras o cepas que no puedan identificar al Laboratorio Estatal de Salud Pública (LESP). Si el nivel local

no cuenta con capacidad instalada, entonces debe remitir las muestras al laboratorio del nivel inmediato superior, según corresponda (SINAVE, 2011).

Existen diferentes instituciones, sistemas y redes encargadas de monitorear patógenos emergentes, endémicos y reemergentes que se presenten y que estos puedan afectar al ser humano, entre ellos se encuentran el **Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica** (SINAVE), **Sistema Único de Información para la Vigilancia Epidemiológica** (SUIVE), Centro Nacional de Vigilancia Epidemiológica y Control de Enfermedades (CENAVECE-UIES), **Centro Estatal de Vigilancia Epidemiológica y Control de Enfermedades** (CEVECE), **Centro Nacional para Enfermedades Infecciosas** (NCDI por sus siglas en inglés); y la **Red Iberoamericana de Vigilancia Epidemiológica** (RIVE).

### 2.4 Sistemas de Vigilancia Epidemiológica.

**Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica (SINAVE).**  
**([www.secretariadesalud/SINAVE.gob.mx](http://www.secretariadesalud/SINAVE.gob.mx))**

El SINAVE es el conjunto de estrategias y acciones epidemiológicas en México que permiten la producción de información epidemiológica útil para la SP, este sistema se alimenta de información proveniente de todo el país y de todas las instituciones del Sistema Nacional de Salud (SNA).

La información generada por el SINAVE fluye desde diferentes unidades de atención de la salud en todo el país, hacia la Dirección General de Epidemiología (DGE), órgano normativo federal del SINAVE. Los responsables de la Vigilancia Epidemiológica a nivel jurisdicción, estatal y federal verifican la información siguiendo lineamientos generales que son acordados por todas las instituciones del sector en órganos colegiados coordinadores y normativos de estos tres niveles administrativos.

### **Sistema Único de Información para la Vigilancia Epidemiológica (SUIVE). ([www.SUIVE.gob.mx](http://www.SUIVE.gob.mx))**

La información de la Vigilancia Epidemiológica en México se integra en el Sistema Único de Información para la Vigilancia Epidemiológica (SUIVE). Actualmente el SUIVE se enfoca a 114 enfermedades consideradas como las más relevantes del estado de salud de la población nacional. La información contenida en el SUIVE incluye la notificación de daños a la salud y los resultados de pruebas de tamizaje y diagnóstico por laboratorio.

Su criterio de operación, formas de colección de información y procedimientos de vigilancia son homogéneos en las distintas instituciones del sector y en todo el país. Esta homogeneidad facilita la comparación de la información obtenida y aumenta su utilidad para la planeación y evaluación de intervenciones de Salud.

### **CENAVECE- UIES. ([www.CENAVECE.gob.mx](http://www.CENAVECE.gob.mx))**

Es el Centro Nacional de Vigilancia Epidemiológica y Control de Enfermedades, el cual es un órgano descentralizado de la Secretaría de Salud, de éste centro se desprende la Unidad de Inteligencia para Emergencias en Salud (UIES), la cual sirve de monitoreo para cualquier evento o contingencia relacionada con la salud de los mexicanos, esta unidad revisa tanto la información nacional como la internacional para tener una pronta respuesta ante una emergencia epidemiológica.

Desde su creación en Febrero del 2007 se le consideró un centro de atención temprano capaz de dirigir acciones de atención primaria, preventivas y de control según sea la naturaleza del evento. Estas acciones atienden claramente las recomendaciones para la PS en la conferencia de Alma-Ata.

Cuenta con una área de monitoreo por medio de televisión, radio e internet, estaciones de trabajo, centro de atención telefónica en Salud, aulas de enseñanza, sala de prensa, seguimiento de acciones en Salud y sala de situación.

### **Centro Estatal de Vigilancia Epidemiológica y Control de Enfermedades (CEVECE).([www.secretariadesaluddelestadodemexico/CEVECE.gob.mx](http://www.secretariadesaluddelestadodemexico/CEVECE.gob.mx))**

De acuerdo a información de la página de la Secretaría de Salud del Estado de México, el 12 de octubre de 2009 se crea el Centro Estatal de Vigilancia Epidemiológica y Control de Enfermedades como órgano desconcentrado de la Secretaría de Salud estatal, con autonomía técnica para el ejercicio de sus atribuciones, cuyo objetivo es analizar e interpretar información sobre las enfermedades y el perfil epidemiológico en la entidad, así como de proponer proyectos, estrategias y lineamientos para la formulación, ejecución y evaluación de las acciones y programas de Salud Pública.

### **Centro Nacional para Enfermedades Infecciosas (NCDI). ([www.cdc.gov/](http://www.cdc.gov/))**

Los centros para el control y prevención de enfermedades en los Estados Unidos, CDC por sus siglas en inglés a través del Centro Nacional para Enfermedades Infecciosas (NCDI por sus siglas en inglés) en sus oficinas centrales en Atlanta desarrollan varios programas de vigilancia de muy diversas enfermedades.

### **Red Iberoamericana de Vigilancia Epidemiológica (RIVE) (Manual de la RIVE. 2014)**

En Agosto del 2009, el Gobierno del Distrito Federal a través del extinto Instituto de Ciencia y Tecnología, creó la *Red Iberoamericana de Vigilancia Epidemiológica para el Control de Enfermedades Infecciosas Emergentes y Re emergentes*

Su propósito era **identificar** los nuevos subtipos patogénicos, **detectar** las fuentes de infección e interrumpir el flujo de transmisión de los mismos, lo que permitiría **diagnosticar**, **prevenir** o erradicar cualquier brote infeccioso de origen comunitario o proveniente de centros hospitalarios y asistenciales; **crear nuevos** y más eficientes métodos de diagnóstico de patógenos.

Uno de los proyectos pertenecientes a esta RED se desarrolló en el CDE-DF, el cual estuvo integrado por cinco laboratorios de bioseguridad BSL-2, en los cuales se podría realizar diagnósticos oportuno del virus de la influenza humana A H1N1,

## Licenciatura en Promoción de la Salud

---

investigaciones para el desarrollo de vacunas, así como la experimentación con métodos de diagnóstico molecular para la detección de nuevas variantes o mutaciones de diferentes patógenos.

### **3. Enterobacterias.**

Las enterobacterias tienen una gran importancia en el campo de estudio de la Salud Pública, esto se debe a la relación que tienen con las epidemias humanas que se han presentado a lo largo de la historia de la humanidad (Mata, 1978).

Las enterobacterias son una familia que han estado en la tierra y convivido con el ser humano, pero el problema clínico con ellas se presenta cuando éstas producen diarreas que van desde cuadros clínicos o autolimitados hasta complicaciones graves como la muerte si el paciente no recibe una atención adecuada. Esta atención inicia desde el propio diagnóstico que identifique por cuál tipo de enterobacterias es que se está infectado, hasta el tratamiento que se le deba dar a la persona. Estas acciones no están alejadas del trabajo de la SP y por ende del quehacer del PS ya que todo esto está finalmente enfocado a tratar de recobrar un óptimo nivel de Salud de la persona (Duguid, 1978).

Ahora bien, para el promotor de salud no solo es importante conocer el problema de las diarreas en un contexto general e identificar su causa desde un contexto social, sino que es importante conocer al agente causal para que pueda tener un mejor abordaje de la enfermedad y pueda entonces proponer acciones realmente incluyentes al mencionado problema, por lo que a continuación se describen algunos conceptos generales de las enterobacterias y sus representantes patógenos más relevantes en cuanto a causantes de diarrea se refiere.

#### **3.1 Enterobacterias.**

Las enterobacterias forman una amplia familia de bacterias Gram negativas son móviles por flagelos, no esporuladas, anaeróbios facultativos, producen ácido a partir de glucosa, reducen el nitrato y dan negativo a la prueba de oxidasa.

La estructura antigénica de la superficie bacteriana está formada por tres clases de antígenos: somáticos o antígenos O, flagelares o antígenos H y capsulares o antígenos K.

La familia *Enterobacteriaceae* comprende numerosos géneros, destacan los géneros *Escherichia*, *Shigella*, *Salmonella*, *Yersinia* debido a que colonizan las diferentes mucosas del ser humano, en especial las del aparato gastrointestinal y urinario.

### **3.2 *Escherichia coli* (ETEC, EHEC, EIEC, EPEC, EAEC, DAEC).**

Un género que destaca entre estas enterobacterias es *Escherichia*, está constituido por cuatro especies: *Escherichia coli*, *Escherichia blattae*, *Escherichia fergusonii* y *Escherichia vulneris* las cuales son reductoras de nitratos, catalasa positiva y oxidasa negativa y en su mayoría fermentadoras de la lactosa (Sáenz, 2005).

*E. coli* coloniza el intestino del ser humano pocas horas después del nacimiento y se le considera biota normal. La mayoría de las cepas de *E. coli* son inofensivas, pero existen cepas que pueden causar daño produciendo cuadros clínicos variados entre los que destacan las enfermedades gastrointestinales. Entre éstas se encuentran la diarrea del viajero y la diarrea hemorrágica, que a veces puede causar insuficiencia renal o incluso la muerte. La enfermedad se puede adquirir al consumir alimentos contaminados por *E. coli* y al beber agua contaminada con desechos fecales humanos. Para evitar la intoxicación por alimentos y prevenir infecciones, se recomienda manipular la comida con seguridad ya que cocinar bien las carnes y lavar las frutas y verduras antes de comerlas se reduce considerablemente una posible infección, además, se debe evitar consumir la leche y los jugos sin pasteurizar (Ramos, 1987).

De acuerdo a diversas investigaciones se sabe que la presencia de *E. coli* es mayor durante los meses húmedos y calurosos y que afecta principalmente a niños menores de cinco años. Cuando se encuentra presente como patógeno en un cuadro por diarrea se le debe de dar la importancia debida y no solo considerarla como una bacteria de biota normal.

Debido a que la mayoría de cepas encontradas en heces no son patógenas, la identificación definitiva de *E. coli* diarreogénica depende no solamente del

primoaislamiento, sino también de la diferenciación adicional de los distintos grupos ya que en la actualidad no existen pruebas bioquímicas capaces de diferenciar estos grupos (Rodríguez, 2002).

Se han descrito seis subtipos de *E. coli* que pueden causar diarreas y cuya patogenicidad se ha caracterizado por los determinantes de virulencia que la bacteria emplea en su relación hospedero-parásito. Los seis subtipos comprenden: *E.coli* Enterotoxigénica (ETEC), *E.coli* Enterohemorrágica (EHEC), *E.coli* Enteroinvasiva (EIEC), *E.coli* Enteropatógena (EPEC), *E.coli* Enteroagregativa (EAEC) y *E.coli* de Adherencia Difusa (DAEC).

Para determinar el grupo patógeno al que pertenece, Kauffman desarrolló un esquema de serotipificación, el cual tiene 176 antígenos somáticos (O), 112 flagelares (H) y 60 capsulares (K). El antígeno "O" es el responsable del serogrupo; en tanto que la determinación del antígeno somático y flagelar (H: O) indican el serotipo (Rodríguez, 2002).

En la serotipificación se realizan ensayos *in vitro* como el de adherencia en células Hep-2; ensayos de toxigenicidad; ligada a la prueba de Sereny; ensayos inmunológicos y pruebas de biología molecular para identificar los determinantes de virulencia del grupo de *E.coli*.

### **E. coli Enterotoxigénica (ETEC).**

Estas bacterias colonizan el intestino delgado por medio de fimbrias las cuales son apéndices en forma de vellosidades las cuales le permiten adherirse a la superficie de otras células, tienen formas denominadas factor antigénico de colonización (o CFA por sus siglas en inglés: Colonization Factor Antigen). El principal mecanismo de patogenicidad es la síntesis de dos enterotoxinas llamadas: toxina termolábil (LT) y toxina termoestable (ST) que aumentan el nivel intracelular de AMPcíclico (cAMP) y de cGMP de las membranas de las células intestinales, provocando la pérdida de agua e iones del organismo (Arteaga, 2009).

La frecuencia de encontrar este grupo patógeno en niños menores de seis meses y con diarrea va de 10 a 30%, mientras que en niños en edad escolar y en adultos el patógeno puede tener características asintomáticas.

La enfermedad puede tener un periodo de incubación de 14 a 50 horas y el cuadro clínico se caracteriza por diarrea aguda generalmente sin sangre, sin moco, sin pus y en pocos casos se presenta fiebre y vómito (Flores, 2008).

Su principal fuente de infección es la contaminación fecal del agua y los alimentos, su dosis infectiva es de  $10^8$  UFC (unidades formadoras de colonias).

### **E. coli Enterohemorrágica (EHEC).**

La citotoxina STX (toxina shiga) es uno de los principales determinantes de virulencia, ya que actúa a nivel de síntesis de proteínas uniéndose a la subunidad 60S de los ribosomas de las células intestinales o renales del hospedero. Se han encontrado variantes de STX, STX1 y STX2, ambas son inmunológicamente diferentes y existen bacterias que pueden sintetizar una de las toxinas o ambas.

Otros determinantes de virulencia son el fenómeno de adherencia y esfacelación (A/E) el cual se debe a la alteración del citoesqueleto en el sitio de la unión de la bacteria debido al aumento de los niveles de calcio intracelular y de proteína C. Presentan el gen cromosomal *eae* que codifica para la proteína de membrana externa (OMP), llamada intimina y un plásmido p0157 implicado en la expresión de una fimbria de adherencia, éste plásmido porta además el operón que codifica una toxina RTX, designada enterohemolisina de EHEC (E-hly) que codifica para la enterohemolisina, responsable de la unión íntima de la bacteria al enterocito y la desorganización de las microvellosidades con producción de la lesión AE.

La diarrea causada por este subtipo se caracteriza por un dolor abdominal, diarrea acuosa con sangre y poco o nada de fiebre, daño renal agudo, anemia hemolítica, después de 1 o 2 días la diarrea se torna sanguinolenta y se intensifica el dolor abdominal con duración de 4 a 10 días.

Este grupo patógeno coloniza tanto a niños como a adultos y se puede adquirir principalmente por comer carne cruda o mal cocida (Heymann, 2007).

### **E. coli enteroinvasiva (EIEC).**

La EIEC invade el epitelio del colon; el primer paso es la adherencia de la bacteria a las vellosidades de la mucosa, requiere de mucinasa y adhesinas para después entrar por endocitosis a la célula. Los genes necesarios para la invasión se encuentran en un plásmido de 140 Kb llamado plnv el cual codifica para proteínas como la Ipa que permite la fijación e invasión de las vellosidades de la mucosa ya que estas proteínas hacen que se onduelen las membranas de las células lo que permite que las bacterias sean engullidas y lisen las vacuolas para replicarse en el citoplasma de la célula anfitriona.

Los síntomas son diarrea acuosa con sangre y moco. La transmisión puede ser de persona a persona, por ingestión de alimentos y agua contaminados convirtiéndose en un patógeno importante en niños mayores de seis meses.

### **E. coli enteropatógena (EPEC).**

La adherencia es el principal factor de virulencia de este subtipo. Implica un mecanismo mediante el cual hay una interacción entre la bacteria y la membrana de las células del epitelio intestinal, seguida de la destrucción de las microvellosidades otros determinante de la patogenicidad de EPEC es el esfacelamiento o A/E.

La adherencia está medida por fimbrias rizadas llamadas BFP (bundle-forming pilus, bfp) cuya información genética esta codificada en un plásmido llamado EAF (factor de adherencia de EPEC) de 50 a 70 Kpb. En la adherencia se necesita la síntesis de una proteína llamada intimina la cual es codificada por el gen cromosomal *eae* y que sirve como señal en A/E (Rodríguez, 2002).

Las EPEC afectan principalmente a niños menores de seis meses y a los dos años de edad, aunque también se le puede encontrar en adultos enfermos, siendo la diabetes un factor predisponente para localizarla. La forma de transmisión es

fecal-oral por manos contaminadas por los manipuladores de alimentos autoinfección.

### **E. coli enteroagregativa (EAEC).**

Los determinantes de patogenicidad en *E. coli* son variados, se ha demostrado que la adherencia a las células Hep-2 y la hemaglutinación de eritrocitos humanos se debe a la presencia de una fimbria o adhesina flexible llamada fimbria I de adherencia agregativa (AAF/I), codificada por el gen *aggA* que se encuentra en un plásmido de 60 Kpb. También se ha descrito la fimbria AAF/II inmunológicamente diferente a AAF/I y que está codificada por el gene *aafA*; sin embargo, no todas las EAEC presentan estas fimbrias.

El sitio blanco de daño de EAEC puede ser la mucosa del intestino grueso y delgado con un periodo de incubación de menos de 8 horas y puede durar hasta 18 o 20 días, en niños se manifiesta con diarrea líquida persistente y líquida de color verde con moco sin sangre.

El diagnóstico se hace mediante la observación de la adherencia agregativa en células Hep-2 de cultivos bacterianos, aunque existen otras pruebas bioquímicas que pueden detectar ciertos grupos de bacterias, los cuales son abordados más a detalle en el Anexo.

### **E.coli de adherencia difusa (DAEC).**

Se ha caracterizado una fimbria de superficie conocida como F1845 involucrada en el fenómeno de adherencia difusa, las cepas DAEC tienen la capacidad de inducir la formación de estructuras protuberantes en el cuerpo colonizado, las cuales le dan protección a la bacteria.

DAEC se puede aislar tanto en personas sanas como con diarrea, afecta principalmente a niños de 4 a 5 años; los principales síntomas son diarrea acuosa sin sangre y sin leucocitos.

La caracterización y clasificación de cepas patógenas de *E. coli* se puede hacer por: método tradicional, métodos *in vivo* e *in vitro*, también mediante métodos de biología molecular como la hibridación con sondas derivadas de un fragmento del gen *daaC*, que codifica para la fimbria F-1845, estos últimos representan una de las herramientas de diagnóstico más recientes (Rodríguez, 2002).

A continuación se presenta una tabla donde se concentran los 6 subtipos de *E. coli* con sus respectivos determinantes de virulencia [Tabla 9].

**Tabla 9. Subtipos de *E. coli* y determinantes de virulencia correspondientes.**

NOMBRE	ABREVIATURA	PRINCIPALES DETERMINANTES DE VIRULENCIA
ENTEROPATÓGENA	EPEC	A/E BFP PLÁSMIDO EAF DE 50-70 MDa
ENTEROTOXIGÉNICA	ETEC	ST y LT
ENTEROINVASIVA	EIEC	INVASIVIDAD PLÁSMIDO DE 140 MDa
ENTEROHEMORRÁGICA	EHEC	STX A/E INTIMINA p0157
ENTEROAGREGATIVA	EAEC	FIMBRIA AAF1 Y II EASTI OMP PLÁSMIDO de 60 MDa
ADHERENTE DIFUSA	DAEC	FIMBRIA F1845

\*Tomada de Arteaga, 2009

### 3.3 *Salmonella* (*S. typhi* y *S. typhimurium*).

Las enterobacterias pertenecientes al género *Salmonella*, utilizan citrato como única fuente de carbono y poseen metabolismo de tipo oxidativo, reducen el nitrato y fermentan la glucosa pero no la lactosa.

*Salmonella enterica* subespecie entérica representa 99% de los serotipos aislados, siendo estos últimos determinados por los antígenos somáticos (O), flagelares (H) y capsulares o de superficie (Vi). Es así como se describen más de 2500 serotipos o serovares de este género (Méndez, 2011).

Una característica esencial de la patogenicidad de *Salmonella* es su habilidad de engañar a la célula hospedera en una interacción bioquímica denominada de dos vías o conversación cruzada, lo cual conduce a la respuesta tanto de la bacteria como de la célula hospedera.

*Salmonella* responde a la presencia de la célula hospedera por activación de un sistema especializado de secreción de proteínas llamado Tipo III o dependiente de contacto. Este sistema permite a ciertos bacilos Gram negativos secretar e inyectar proteínas de patogenicidad en el citosol de la célula hospedera eucariótica. Las proteínas inyectadas frecuentemente reensamblan determinantes eucarióticos con funcionamiento de transducción de señales y son capaces de interferir con vías de señalización de la célula hospedera (Ramos, 2000).

En el caso de *Salmonella*, la redirección de señales celulares de transducción resulta en la reorganización del citoesqueleto de la célula hospedera, estableciendo nichos subcelulares para la colonización bacteriana y facilitando una estrategia patogénica altamente adaptada de líneas de comunicación con la defensa del hospedero (Sánchez, 1997).

*Salmonella* establece un estrecho contacto con el borde en cepillo del epitelio intestinal, antes del contacto inicial, el borde permanece intacto. Sin embargo, cuando las bacterias se acercan a la superficie epitelial, las microvellosidades circundantes empiezan a degenerarse con elongación, edema y crecimiento en un proceso llamado “ruffling” (rizado).

Aquí, los efectores interactúan con las proteínas de la célula hospedera para rearreglar el citoesqueleto de actina e inducir cambios morfológicos que al final

provocan que estas células, normalmente no fagocíticas internalicen las bacterias en un proceso llamado invasión.

Esta bacteria es hábil en capaz de explotar las funciones celulares preexistentes del hospedero y usarlas en su beneficio. Esto se ha visto durante la invasión, cuando *Salmonella* utiliza las señales de transducción del hospedero, lo cual afecta el reareglo del citoesqueleto y las proteínas de membrana produciendo “ruffling” de membrana y la invasión bacteriana.

La salmonelosis se considera un problema de Salud Pública mundial. *Salmonella enterica* causa infección intestinal aguda en personas de todas las edades y puede ocasionar infecciones invasivas graves como bacteremia y meningitis en lactantes, ancianos y pacientes inmunosuprimidos (Mussaret, 2006).

### ***S. typhi.***

Es una bacteria anaeróbica facultativa, que puede en ocasiones sobrevivir en bajas condiciones de oxígeno. Pertenece al serotipo 9,12, con base a los epítopes de la tivelosa, el azúcar repetida en su antígeno O (Mussaret, 2006) lo que significa que expresan un flagelo muy diferente en secuencia de aminoácidos al encontrado en las cepas de otras regiones del mundo. Además de los antígenos O y H tiene en su exterior una cápsula de polisacáridos denominada Vi (por antígeno de "virulencia").

Los mecanismos de patogenicidad por los que induce diarrea no han sido descritos detalladamente, pero parece ser un fenómeno que involucra diversos determinantes de virulencia como las enterotoxinas similares a las de *Vibrio cholerae* (CT) y a la toxina termolábil (LT) de *E. coli* (Méndez, 2011).

### ***S. typhimurium.***

*Salmonella typhimurium* está asociada a infecciones en el intestino y la causa más común del envenenamiento de comida por especies de *Salmonella* es la *S. typhimurium*, esta bacteria causa enfermedades parecidas a la fiebre tifoidea. La

enfermedad por *S. typhimurium* se caracteriza por diarreas, dolores abdominales, vómitos, náuseas, y suele durar unos siete días.

Desafortunadamente, en personas cuyo sistema inmune esté comprometido, como es el caso de adultos en plenitud y personas con el sistema inmune deprimido, la infección por *Salmonella* termina siendo fatal si no se trata a tiempo con antibióticos.

### **3.4 *Shigella* (*S. sonnei*, *S. flexneri*).**

Son inmóviles y se dividen en cuatro especies específicas: *S. dysenteriae*, *S. flexneri*, *S. boydii* y *S. sonnei*. Estas especies se dividen a su vez, sobre bases serológicas, en varios tipos y subtipos, existiendo alrededor de 30 serotipos del género. Sin embargo, las especies predominantes en la mayoría de las áreas geográficas son *S. flexneri* y *S. sonnei* debido a que pueden ser responsables de epidemias de gran magnitud y son las que se estudiaron en este trabajo (Gangarosa, 1969).

Las infecciones clínicas por *Shigella* ocurren en los humanos y en primates superiores; siendo el humano su principal reservorio. En los países con malas condiciones de saneamiento ambiental y prácticas higiénicas deficientes, *Shigella* es endémica siendo una causa importante de morbilidad y mortalidad. También las especies de *Shigella* son endémicas en instituciones de salud caracterizadas por el hacinamiento y las malas prácticas higiénicas siendo esta situación epidemiológica más común en países en vías de desarrollo (Mata, 1970) por lo tanto, estas infecciones se transmiten fácilmente por contacto directo, por la vía fecal-oral, a través del agua y de los alimentos contaminados (Duguid, 1978).

*Shigella* invade células epiteliales de la mucosa del intestino delgado terminal y del colon, donde proliferan provocando la muerte de las células. La secuencia de una infección típica por *Shigella* consiste en: Colonización temporal del intestino delgado, que puede resultar en cólicos abdominales leves, fiebres y diarrea líquida, seguida por colonización extensa del intestino grueso e invasión del epitelio colónico, en donde se lleva a cabo una multiplicación bacteriana

intracelular en el epitelio e invasión de las células de la submucosa o *lamina propia*, en donde se presenta una destrucción local de la región invadida de la mucosa, que provocan una respuesta inflamatoria aguda con ulceración subsecuente de la mucosa (G.T, 1982).

Como resultado de las lesiones colónicas se produce dolor abdominal agudo, tenesmo y disentería. Sin embargo, la destrucción de la mucosa se limita a las capas superficiales del colon, siendo muy rara la invasión bacteriana en el torrente sanguíneo. En un ser humano infectado que tenga una buena alimentación la recuperación se da en pocos días después de la aparición de los síntomas, pero en poblaciones con alta prevalencia en desnutrición y malas condiciones higiénicas, la infección puede prolongarse por varias semanas y asociarse a que los pacientes entren a cuadros diarreicos agudos (Mata, 1970).

Las propiedades virulentas de estas bacterias que producen disentería son sus capacidades para penetrar y multiplicarse en las células epiteliales del colon y destruirlas. Adicionalmente producen una potente citotoxina que tiene efectos enterotóxicos. (Gangarosa, 1969).

### **3.5 *Vibrio* (*V. cholerae* O1 Inaba, *V. cholerae* no O1 O139, *V. cholerae* no O1 negativo a O139, *V. parahaemolyticus*).**

A diferencia de las bacterias anteriormente mencionadas, *Vibrio* no pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*, este género comprende varias especies de importancia médica muchas de ellas relacionadas muchas de ellas con enfermedad gastrointestinal y en particular con enfermedades transmitidas por alimentos de origen marino. De todas ellas merece especial atención *Vibrio cholerae*, responsable del cólera epidémico, la cual es una enfermedad infecciosa con un cuadro clínico caracterizado por vómitos y diarrea intensa, que puede llevar a la deshidratación grave (Guzmán, 1999).

Dicha bacteria ingresa al organismo con el agua o los alimentos contaminados por excretas de personas infectadas o productos marinos y la enfermedad que produce es endémica en por lo menos 80 países con epidemias que ocurren en

varias regiones, incluyendo África, Sudamérica y el sur y sudeste de Asia (Paredes, 2004).

*Vibrio cholerae* es un bacilo Gram negativo anaerobio facultativo, como ya se dijo perteneciente al género *Vibrio*; y es de la familia *Vibrionaceae*. Presenta forma de “coma”, es extremadamente móvil debido a su único flagelo polar (Torres y col, 2001).

El cuadro clínico puede oscilar desde una leve diarrea no complicada hasta producir una enfermedad grave con diarrea fulminante, coma y muerte en pocas horas. *Vibrio cholerae* serogrupo 01 es el agente etiológico del cólera epidémico, tiene dos biotipos: el Clásico y El Tor. El primero se aisló históricamente en las epidemias de la India, pero en la séptima pandemia que comenzó en 1961 predominó el Tor, (idem).

La gravedad de la enfermedad es variable: el biotipo Tor ocasiona en su mayoría infecciones asintomáticas (75%), 23% enfermedad leve o moderada y 2% grave.

El período de incubación es de varias horas hasta 5 días, dependiendo del tamaño del inóculo. Si la bacteria consigue atravesar la acidez del estómago (primera gran barrera), coloniza el intestino delgado y comienza a producir la toxina colérica. Los síntomas de la enfermedad se deben a la acción de la toxina que actúa a nivel del intestino produciendo secreción de líquido y electrolitos, lo cual lleva a severa deshidratación. Estas pérdidas pueden ser de tal severidad que el paciente puede presentar deposiciones descritas como “agua de arroz”. En etapa temprana se ven vómitos, escasos dolores abdominales, pero por el trastorno electrolítico se dan calambres musculares. El tratamiento debe ir dirigido a prevenir el “shock” hipovolémico, hipoglicemia y acidosis metabólica. Es de gran importancia la rápida y adecuada reposición líquida de las pérdidas intestinales.

### **3.6 Mecanismos de patogenicidad en las Enterobacterias y *Vibrio cholerae*.**

Dentro de los componentes macromoleculares de los microorganismos que pueden contribuir a la patogénesis y actuar como determinantes de virulencia

podemos mencionar las capsulas extracelulares, la capa mucosa, la pared celular, las fimbrias y los pilis. Pero además de estos componentes, existen numerosos determinantes microbianos intracelulares y extracelulares cuya única función es la de actuar como determinantes de virulencia (Heymann, 2007).

Aunque dichos determinantes son especializados; éstos son producidos por una gran variedad de patógenos, muchos de ellos tienen características moleculares y mecanismos de acción similares y pueden clasificarse de acuerdo al grado de invasión en un hospedero susceptible; y lo que podemos encontrar son los siguientes mecanismos:

1. Bacterias que causan diarrea por adherencia a la mucosa y producción de enterotoxinas (ETEC y *Vibrio cholerae*).
2. Bacterias que causan diarrea por disolución del borde en cepillo de la mucosa intestinal (EPEC).
3. Bacterias que causan diarrea por invasión de la mucosa y proliferación bacteriana dentro de la célula epitelial (EIEC y *Shigella*).
4. Bacterias que causan diarrea por translocación de la mucosa seguida por proliferación bacteriana en la lámina propia y en los ganglios linfáticos mesentéricos (*Salmonellas*).
5. Bacterias que causan fiebre entérica por translocación de la mucosa seguida por infección generalizada (*Salmonella typhi*).

### **4. El diagnóstico de Enteropatógenos.**

El diagnóstico de enterobacterias es importante para poder conocer con qué tipo de organismo está infectado un individuo, estos mecanismos deben de tener una gran especificidad y ser capaces de diferenciar entre patógenos y especies (Sánchez, 1997).

Los métodos diagnósticos usados para la identificación de los patógenos infecciosos incluyen ensayos microbiológicos dependientes del cultivo, inmunoensayos y diagnóstico molecular (Cruz, 2000).

En el caso de las enterobacterias el método tradicional consiste en aislar las bacterias obtenidas de la materia fecal o a través de la toma de una muestra utilizando un isopo rectal. Una vez aislada la bacteria la identificación se hace mediante pruebas bioquímicas en tubos con componentes, sustancias y nutrientes para la bacteria; tales como TSI (tres azúcares- hierro), LIA (Agar-Hierro-Lisina), MIO (Movilidad, Indol y Ornitina), citrato, sorbitol, mucato, urea, rojo de metilo, Voges Proskauer, fermentación de azúcares y caldo manitol. Por otra parte en los laboratorios y hospitales que cuenten con los antisueros correspondientes se realizan pruebas de aglutinación (Gonzales, 1996).

Los métodos moleculares incluyen el uso de sondas para la hibridación en fase sólida como el “colony blot”, la reacción en cadena de la polimerasa o PCR en donde la hibridación se realiza entre el ADN blanco presente en la muestra y una secuencia conocida de un fragmento específico de un gen involucrado en la patogenicidad de las cepas a estudiar (Innis, 1990).

#### **4.1 Pruebas bioquímicas.**

Las pruebas bioquímicas permiten determinar las características fisiológicas de las bacterias, algunas de estas pruebas son técnicas rápidas, su lectura varía entre unos segundos hasta días y evalúan la presencia de una enzima preformada.

Otras pruebas requieren para su lectura el crecimiento del microorganismo con una incubación previa, a este grupo pertenecen la mayoría de las pruebas que

detectan componentes metabólicos o aquellas que determinan la sensibilidad de un microorganismo a una sustancia dada, después del cultivo en medios de identificación que contienen el sustrato a metabolizar. No obstante, algunas de estas pruebas pueden realizarse de forma rápida tras incubación; en general, se trata de reacciones enzimáticas (Roskoski, 1998).

### **4.2 Diagnóstico molecular.**

La biología molecular ha venido a revolucionar los estudios diagnósticos de enfermedades infecciosas. Las técnicas moleculares aplicadas al diagnóstico ofrecen mayor sensibilidad, especificidad y rapidez con requerimientos mínimos de muestra en comparación con las pruebas convencionales. Esto permite el inicio temprano de un mejor y oportuno esquema terapéutico, disminuyendo de esta manera la probabilidad de complicaciones (Hernández, 2009).

Las técnicas moleculares aplicadas al diagnóstico de enfermedades infecciosas en ocasiones superan las limitaciones que imponen los organismos para su aislamiento. Los ácidos nucleicos microbianos extraídos de una muestra clínica pueden ser analizados para buscar la presencia de secuencias de ADN específicas de los organismos sin importar los requerimientos fisiológicos para la viabilidad de los organismos. Actualmente, las técnicas de biología molecular permiten la identificación, cuantificación y el análisis de la secuencia del genoma bacteriano en los individuos infectados (Álvarez y col, 2008).

Dentro de estas pruebas de diagnóstico molecular de enteropatógenos, podríamos mencionar al menos dos: la PCR y la electroforesis en campos pulsados (PFGE por sus siglas en inglés Pulsed- Field Gel Electrophoresis). En la primera, las muestras utilizadas pueden ser de una cepa aislada de una muestra clínica, de materia fecal o de alimentos implicados. Los reactivos necesarios para la PCR de cada muestra son desoxirribonucleotidos trifosfatados (dNTP`s) adenina (dATP), timina (dTTP), guanina (dGTP), citocina (dCTP), Cloruro de Magnesio (MgCl), iniciadores y enzimas polimerasa, regulador de la enzima, agua y ADN molde.

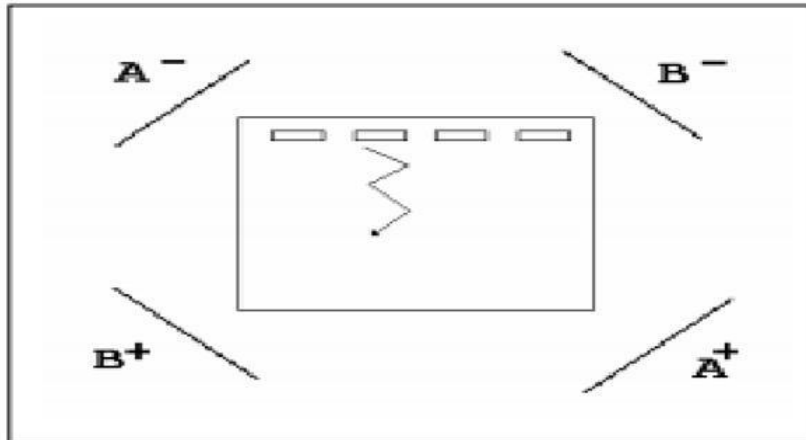
El segundo método utilizado es la electroforesis de campos pulsados este se utiliza para el análisis de fragmentos grandes de ADN. Para realizar un *PFGE*, se deben usar enzimas para cortar el ADN en pocos fragmentos de alta talla molecular y que en conjunto representan todo el genoma de la célula.

El procedimiento para esta técnica es relativamente similar a la realización de una electroforesis en un gel estándar, excepto que en lugar de una corriente eléctrica constante, la corriente se distribuye periódicamente entre tres direcciones; una que corre a través del eje central del gel y dos que se ejecutan en un ángulo de 60 grados a cada lado. (Rodríguez, 2004).

En general, la electroforesis en gel horizontal permite separar fragmentos de ADN con base en un campo eléctrico unidireccional aprovechando que el ADN tiene una carga neta negativa y que éste migra hacia el polo positivo. En la electroforesis en gel de campos pulsados el ADN queda sometido a la aplicación de campos eléctricos que forman ángulos de acuerdo a una geometría particular.

Al cambiar las direcciones se separan los fragmentos de ADN en dos planos y se separa el ADN de manera más clara. El campo eléctrico es generalmente aplicado en un patrón hexagonal, de manera que el campo se alterna en seis direcciones diferentes [Figura 3] (Nelson, 2006).

**Figura 3. Corrimiento de una Electroforesis en Campos Pulsados.**



**Fig. 3** Se observa la migración de las moléculas de acuerdo a ambas cargas eléctricas (+, -), cada campo eléctrico (A+, A- y B+, B-) se activa durante un cierto tiempo, la flecha indica el trayecto de acuerdo al campo eléctrico que está activo.

#### **4.3 Reacción en Cadena de la Polimerasa PCR.**

La PCR ha hecho posible el análisis y estudio de genes gracias a que nos permite obtener un enorme número de copias de una secuencia de ADN específica, emplea ciclos repetidos de síntesis de ADN, los cuales son dirigidos por un iniciador, que al unirse con su secuencia complementaria en la otra cadena permite que se acople la enzima polimerasa y se inicie la catálisis o polimerización del ADN a amplificar. Las secuencias de los iniciadores se determinan.

Para la estandarización de la PCR se deben tomar en cuenta varios aspectos importantes, como podrían ser (Yabar, 2003):

1. La secuencia de interés.

Se le denomina a ciertos fragmentos de “interés” dentro del ADN que queremos amplificar para poder trabajar en el laboratorio y es gracias a los iniciadores que esto se puede hacer, ya que los iniciadores, como ya dijimos se diseñan para identificar la zona que nos interesa amplificar (Barrera, 1993).

### 2. Iniciadores.

Se utilizan iniciadores de 16 a 30 nucleótidos de longitud, lo que permite que la temperatura de alineamiento sea razonablemente elevada. Los iniciadores no deben tener tramos de secuencias con una polibase (p. ej., poli-dG) ni ser repetidos, ya que podrían hibridarse de forma inadecuada con el ADN molde. Deben evitarse las secuencias repetidas invertidas, a fin de prevenir la formación de estructuras secundarias del iniciador, que impedirían su hibridación con el ADN molde. También deben evitarse las secuencias complementarias de otros iniciadores utilizados en la PCR, para prevenir la hibridación con las mismas (Torres, 1995).

En la PCR punto final conviene que el extremo 3' del iniciador tenga gran proporción de bases G y C para aumentar la fuerza en la hibridación del extremo que se quiere extender. La distancia entre los iniciadores debe ser inferior a 10 kb en longitud, ya que se observa una importante reducción del rendimiento cuando los cebadores se encuentran a más de unos 3 kb de distancia entre sí.

### 3. Región específica del gen.

La especificidad de los primers es en parte dependiente de su longitud. Los primers deben ser elegidos de modo que tengan una secuencia única dentro del ADN que será amplificado. Un primer diseñado con una secuencia altamente repetida dará lugar a productos no deseados o inespecíficos. Sin embargo, el mismo primer puede dar una sola banda si se amplifica una sola clona de una genoteca (Innis, 1990).

### 4. Región más conservada.

Secuencias del ADN que codifiquen y que se han mantenido a lo largo de la evolución.

### 5. Región diferencial con genes homólogos.

## Licenciatura en Promoción de la Salud

---

Los primers necesitan ser diseñados con menos de 3 pares de bases de homología entre ellos. Si un primer tiene tal región de homología se formarán estructuras parciales de doble cadena que interferirán con el alineamiento. Si la homología ocurre en el extremo 3', ocurrirá la formación de dímeros de primers que, a menudo, evitará la formación del producto deseado por competencia.

Cada ciclo de la PCR consiste básicamente en tres etapas (Sampieri, 2009).

### 1) Desnaturalización

El ADN molde es incubado a una temperatura de 92-98°C de 30 a 90 segundos para separar las cadenas complementarias y de esta manera hacerlas accesibles al apareamiento con los iniciadores específicos.

### 2) Alineamiento

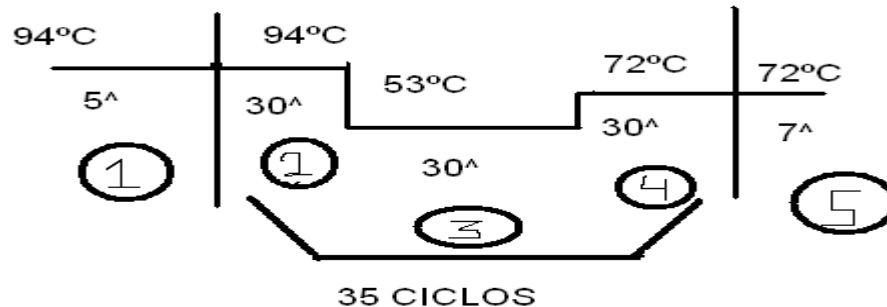
La etapa de alineamiento, permite que los iniciadores hibriden a las secuencias complementarias del ADN molde; la temperatura de alineamiento a la que se lleva a cabo dicha hibridación está determinada por la secuencia del primer, de acuerdo a su contenido de AT y GC.

### 3) Extensión

La etapa de extensión, generalmente se lleva a cabo a una temperatura, en la cual la ADN polimerasa copia el ADN entre las secuencias flanqueadas por los iniciadores colocados en ambas cadenas del ADN a la distancia previamente establecida en su diseño.

Estas tres etapas que constituyen un ciclo térmico más don adicionales, una PCR típica lleva entre 30 a 50 ciclos, cuando cada ciclo termina, los fragmentos nuevos de ADN sintetizado sirven de ADN blanco lo que genera una producción exponencial del número de copias del mismo fragmento y en unos ciclos más el producto predominante será una única clase de fragmento de ADN cuya longitud corresponderá a la distancia entre los iniciadores. Así la repetición del ciclo origina una acumulación geométrica y exponencial de las secuencias amplificadas.

**Figura. 4. Esquema que presenta un protocolo completo de PCR.**



**Fig. 4.** Esquema que presenta un protocolo completo de PCR (1: desnaturalización inicial; 2: desnaturalización; 3: alineamiento (variable de acuerdo al par de iniciadores empleados; 4 extensión; 5: extensión final).

Las partes 2, 3 y 4 que corresponderán a la desnaturalización, alineamiento y extensión son las que se repiten de acuerdo al número de ciclos que se necesiten para obtener el amplificado esperado.

Entre los componentes de la reacción de PCR destacan:

- **ADN polimerasa:** Es una enzima termoestable que en un inicio fue purificada a partir de la bacteria *Thermus aquaticus*. Esta enzima tiene un peso molecular cercano a 93.910 KDa y su temperatura óptima de funcionamiento es de entre 72 °C y 80°C.
- **El ADN molde:** La concentración del ADN molde dependerá de la fuente utilizada, idealmente se requieren 100 nanogramos de ADN genómico.
- **Los iniciadores:** Se seleccionan oligonucleótidos normalmente un sentido y otro antisentido, que hibriden con regiones de ADN molde y su secuencia debe presentar la mayor similitud posible con la secuencia del ADN blanco. Idealmente en cada 5 µl de reacción la concentración aceptable de cada oligonucleótido es de 0.05 a 1.0 µ M.

- **Los desoxirribonucleotidos trifosfato (dNTPs):** Las concentraciones mínimas de dNTPs disminuyen el índice de incorporación errónea de los nucleótidos, mientras que las concentraciones muy altas disminuyen la especificidad de la reacción, por lo que casi siempre la concentración debe optimizarse entre 20 y 200  $\mu\text{M}$ , debiéndose igualar las concentraciones de cada uno de los cuatro dNTPs en concentraciones equimolares.

El producto obtenido de la PCR puede ser analizado en un gel de agarosa o poliacrilamida mediante un corrimiento electroforético. Al terminar este puede ser teñido con bromuro de etidio y observarse el ADN obtenido con luz ultravioleta.

#### **4.4 PCR Múltiple.**

Es un tipo de PCR que emplea dos o más pares de iniciadores, en un único tubo de reacción, con el fin de amplificar simultáneamente múltiples segmentos de ADN. Consiste en combinar en una única reacción todos los pares de iniciadores de los sistemas que queremos amplificar simultáneamente, junto con el resto de los reactivos de la reacción en cantidades suficientes. La ventaja de esta PCR es que se obtiene la información de varios genes, los cuales se refieren al lugar que un gen ocupa en el cromosoma y este corresponde al segmento de un gen en el ADN o ARN. Por esto en la PCR múltiple se obtienen en una sola reacción diferentes segmentos de genes, utilizando menor cantidad de molde para el análisis y menor cantidad de reactivos (Paredes, 2004).

### JUSTIFICACIÓN

A pesar de las políticas de salud en torno a las EDA's, en la actualidad los datos epidemiológicos en México muestran alta prevalencia, que afecta principalmente a poblaciones marginadas. El fenómeno puede ser el resultado de diversos determinantes de la salud de las poblaciones, lo que podría llegar a constituir un tipo de enfermedad tanto emergente como reemergente.

La conferencia sobre Salud Pública de La Haya del año 2000, de la que se desprenden las "Funciones Esenciales de la Salud Pública (FESP)", puntualizando la necesidad de generar profesionales con capacidades y destrezas epidemiológicas, así como la creación de nuevos laboratorios encargados del desarrollo tecnológico, que puedan implementar una respuesta efectiva y dirigida al control de daños y afectaciones a la Salud Pública por diferentes patógenos.

En esta tesis se hace hincapié en la importancia de la Vigilancia Epidemiológica y en la necesidad de establecer redes de monitoreo epidemiológico, de enteropatógenos emergentes, que cuenten con las metodologías que permitan la detección rápida y específica del agente etiológico.

Como ya se dijo, la identificación de las diferentes cepas de enterobacterias se realiza tradicionalmente con base a sus características bioquímicas o serológicas. Sin embargo, estos ensayos demandan la realización de técnicas especiales que requiere de personal experimentado, además de necesitar mucho tiempo para dar un resultado final. Por tal motivo, recientemente se han tratado de desarrollar métodos moleculares de diagnóstico rápido, sensible y confiable, que en este trabajo se empleará. De entre todas las estrategias utilizadas, la PCR múltiple la cual permite la amplificación *in vitro* de zonas genómicas previamente seleccionadas de acuerdo con el tipo de microorganismo patógeno a identificar. Esto permite reducir el tiempo de identificación del patógeno, lo cual facilita responder con mayor eficacia ante un brote epidémico.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo General**

Desarrollar un nuevo método molecular para el diagnóstico de Enterobacterias de importancia en la Salud Pública que permita prevenir la aparición de un brote epidemiológico proporcionando así, elementos que permitan cumplir algunas de las FESP

### **Objetivos particulares**

1.- Establecer por búsqueda bibliográfica qué determinantes promueven la aparición de EDA'S buscar e identificar marcadores moleculares que permitan diferenciar específicamente los tipos y subtipos de los enteropatógenos más comunes mediante PCR punto final y multiple.

2.-Diseñar un sistema específico de identificación de Enteropatógenos a nivel de tipo y subtipo mediante PCR de punto final y multiplex.

3.- Probar el método estandarizado en muestras de ADN obtenidos a partir de aislados clínicos.

4.-Discutir la importancia de la metodología desarrollada como instrumento de la Vigilancia Epidemiológica y la conexión con la Promoción de la Salud.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### 1. Cepas utilizadas.

Las cepas tipo empleadas en este trabajo de tesis fueron donadas por diversas instituciones tales como son: el laboratorio de bacteriología medica de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, del Instituto Politécnico Nacional (ENCB-IPN); el posgrado de Ciencias Genómicas, de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México (UACM); el Laboratorio de la Clínica Universitaria de la Salud Integral de la Facultad de Estudios Superiores FES Iztacala, de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM); y el Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológica (InDRE) [Tabla10].

**Tabla 10. Cepas utilizadas durante este trabajo.**

<b>Bacterias Enteropatógenas</b>	<b>Cepa</b>
<i>Escherichia coli</i> (no patógena)	<i>E. coli</i> s/n
<i>E. coli</i> enterohemorrágica (EHEC)	EHEC EDL933
<i>E. coli</i> enteroadherente (EAEC)	EAEC 042; EAEC 1
<i>E. coli</i> enteropatógena (EPEC)	EPEC ATCC 43887; EPEC 2348/69
<i>E. coli</i> enterotoxigénica (ETEC)	ETEC B7A; ETEC ATCC 35401
<i>E. coli</i> enteroinvasiva (EIEC)	EIEC 1; EIEC ATCC 43893
<i>Salmonella</i> spp	<i>S. typhi</i> y <i>S. typhimurium</i>
<i>Vibrio</i> spp.	<i>V. cholerae</i> O1 Inaba; <i>V. cholerae</i> no O1, <i>V. cholerae</i> O139, <i>V. parahaemolyticus</i>
<i>Shigella</i> spp	<i>S. sonnei</i> y <i>S. flexneri</i>

### **2. Medios de Cultivo.**

Para verificar que las cepas correspondieran a las especies y géneros identificados por los grupos que amablemente nos las proporcionaron, se realizó la caracterización de las cepas a través de pruebas bioquímicas, morfología microscópica y tinción de Gram.

Con la ayuda de algunos medios se logró verificar la pureza de cada una de las cepas utilizadas en este estudio. En el anexo se muestra los procedimientos para la preparación de los medios utilizados en la caracterización de las cepas que permitieron verificar la pureza.

### **3. Tinción de Gram.**

Es una de las tinciones diferenciales más utilizadas en bacteriología, clasifica a los cultivos bacterianos en Gram positivas y Gram negativas.

[[www.ecologia.unam.mx/laboratorios/evolucionmolecular/documentos/ClaseProcariontes/Alejandra/Pr%C3%A1ctica%203%20Tinci%C3%B3n%20de%20Gram.pdf](http://www.ecologia.unam.mx/laboratorios/evolucionmolecular/documentos/ClaseProcariontes/Alejandra/Pr%C3%A1ctica%203%20Tinci%C3%B3n%20de%20Gram.pdf)].

De la tinción de Gram podemos mencionar que es una tinción diferencial ya que utiliza dos colorantes para distinguir bacterias Gram positivas de las Gram negativas, esta primera diferenciación nos permite identificar los posibles microorganismos causantes de una infección. El principio de esta tinción está basado en las características de la pared celular de las bacterias, la cual le confiere propiedades determinadas a cada microorganismo.

La pared celular de las Gram negativas está constituida por una capa fina de peptidoglicano y una membrana celular externa, mientras que las bacterias Gram positivas poseen una pared celular gruesa constituida por peptidoglicano, pero no cuentan con membrana celular externa; así pues la composición química y el contenido de peptidoglicano en la pared de ambas explican y determinan las características tintoriales.

Si se parte de un cultivo sólido, se etiqueta un portaobjetos limpio y desengrasado con el nombre de la cepa; luego se coloca sobre el portaobjetos una gota de agua destilada y se coloca un poco de la colonia aislada hasta formar un círculo de

## Licenciatura en Promoción de la Salud

---

aproximadamente 1cm<sup>2</sup>. Posteriormente se fijan las bacterias con calor, pasando el portaobjetos 3 veces sobre la flama del mechero.

Se añade un colorante primario que es cristal violeta, el cual tiene afinidad con el peptidoglicano de la pared celular, posteriormente, se coloca lugol el cual sirve como mordiente formando un complejo cristal violeta- yodo que satura los espacios del peptidoglicano de la pared bacteriana.

En seguida se coloca una mezcla de alcohol- acetona, Las bacterias Gram positivas, al contener una gran cantidad de peptidoglicano, retiene con mayor frecuencia este complejo, mientras que las Gram negativas no lo pueden retener por tener menos cantidad de peptidoglicano.

Por último se añade el colorante secundario safranina la cual funciona como un colorante secundario o de contratinción y sirve para teñir las bacterias que no pudieron retener el primer el complejo cristal violeta-yodo.

Se deja secar al aire y se observa al microscopio con el objeto de 100X; recordando que las bacterias Gram positivas se observan de color morado, mientras que las Gram negativas se observan de color rosa a rojo.

### 4. Conservación de las cepas tipo de Enterobacterias.

Las cepas se conservaron a corto, mediano y largo plazo, con la finalidad de garantizar la viabilidad y estabilidad genética de las cepas para experimentos posteriores.

#### 4.1 Conservación a largo plazo.

Una vez que se fenotipicaron las cepas Gram negativas (Anexo) con las que se trabajó en esta tesis y que se confirmó la pureza de las cepas se sembraron masivamente dos placas de Muller Hinton y se incubaron a 37°C por 12 horas. Después se cosechó toda la biomasa bacteriana y se colocó en un criotubo de 1.5 mL que contenía 1 mL de medio Todd Hewitt [Tabla 11] y se mezcló vigorosamente en vórtex para posteriormente ser guardado en criotubo a -70°C.

**Tabla 11. Reactivos y preparación de caldo Todd-Hewitt para conservación a largo plazo.**

Reactivo	Cantidad
Caldo Todd-Hewitt	1.092 g
Glicerol	12 ml
Agua	18 ml
Homogenizar y distribuir en tubos o frascos. Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 min. Enfriar a temperatura ambiente.	

#### 4.2 Conservación a mediano plazo.

La conservación se realizó en tubos de cultivo que contenían agar LB inclinado [Tabla 12], los cuales se sembraron por estría abierta e incubaron durante 18 horas a 37°C. El tubo con el crecimiento de colonias bacterianas se selló con papel parafilm en la tapa y se almacenó a 4°C.

#### 4.3 Conservación a corto plazo.

Se sembraron en agar LB por estría cruzada e incubaron a 37°C por 18 horas y cuando se requería la cepa se tomaba de colonias aisladas.

**Tabla 12. Reactivos y preparación del medio Luria Bertani (LB).**

<b>Reactivo</b>	<b>Cantidad (g)</b>
Agua desionizada	cbp1000 mL
Tryptona	10
Extracto de levadura	5
NaCl	5
Homogenizar y distribuir 8 mL del medio en tubos de ensaye de 16*150 estériles o placas petri. Esterilizar por autoclave durante 15 minutos a 121°C (15 libras de presión).	

### **5. Obtención de DNA total de las cepas tipo.**

La extracción del ADN genómico de las cepas se realizó por dos metodologías, la primera fue a través de un **kit de extracción de DNA genómico de QIAGEN**, siguiendo el protocolo que se describe a continuación.

La extracción se inició con la cosecha de las células bacterianas en un tubo de 1.5 mL por centrifugación durante 5 min a 16,128 Xg, decantando el sobrenadante después de cada centrifugación, este procedimiento se repitió hasta que se concentraron los 5 mL del cultivo bacteriano. El botón de células se lavó con 1mL de agua destilada estéril, centrifugando durante 5 min. a 16,128Xg, el sobrenadante se decantó el sobrenadante y el botón se utilizó para la extracción como lo indica el manual del proveedor del kit o estuche.

A la pastilla bacteriana se le adicionaron 180 µL de amortiguador ATL y se resuspendió el botón cuidadosamente, posteriormente se adicionaron 20µL de proteinasa K, se mezcló gentilmente con el vórtex, se incubó con agitación constante a 56°C durante 30 min hasta que las bacterias se lisaran por completo.

Transcurrido el tiempo de incubación se añadieron 200 µL de Buffer AL, se mezcló con ayuda del vórtex por 15 seg y se incubó a 70°C durante 10 min. Al concluir el tiempo el tubo se centrifugó durante 30 seg. Posteriormente se le adicionaron 200 µL de etanol al 100%, se agitó en vórtex por 15 seg y se centrifugó por 30 seg. Se colocaron 600 µl del sobrenadante en una columna de extracción QIAampse y se centrifugó a 8,000 rpm durante 1 min y se eliminó el líquido colectado en un tubo

## Licenciatura en Promoción de la Salud

---

colector, este paso se repitió hasta coleccionar todo el sobrenadante. Se agregó 500 µL del amortiguador de lavado AW1 dentro de la columna y se centrifugó a 8,000 rpm por 1 min.

La columna se colocó en un nuevo tubo colector y dentro de la columna se agregaron 500 µL del segundo amortiguador del lavado AW2, se centrifugó nuevamente a 14,000 rpm por 3 min. Al concluir se cambió la columna a un tubo eppendor de 1.5 mL estéril.

Para la elución del ADN, se agregaron 100 µl de agua ultra pura y se centrifugó a 8,000 rpm por 1 min, este paso se repitió una vez más. El ADN recolectado fue almacenado a -70°C hasta su uso.

La segunda técnica de extracción empleada fue la de lisis mediante **fenol-cloroformo- alcohol isoamílico**, a continuación se menciona la descripción de los pasos realizados para esta técnica:

Las bacterias se crecieron en 10 mL de Caldo LB a 37°C en agitación constante durante 24 h. Posteriormente se cosecharon 5 ml del cultivo celular por centrifugación a 12,000 rpm durante 5 min. Una vez cosechadas las células se lavaron con 500 µL de agua destilada estéril, se agitaron con ayuda de un vórtex y se centrifugaron a 12,000 rpm durante 5 min, se decantó el sobrenadante y las células se resuspendieron en el volumen de agua sobrante.

Posteriormente, se agregó 200 µL de solución de lisis y 200 µL de fenol: cloroformo: isoamílico (proporción 25:24:1), la mezcla se agitó vigorosamente e incubó a 65°C por 1 h, una vez transcurrido el tiempo se agregó 200 µL de regulador TE. La muestra se centrifugó por 5 min a 12,000 rpm, hasta obtener la fase acuosa la cual que se traspasó a otro tubo limpio de 1.5 mL y se adicionó 1 ml de etanol absoluto, se mezcló por inversión e incubó durante 20 min. a -20°C. Posteriormente, se centrifugó durante 5 min a 12,000 rpm, el sobrenadante se decantó y se dejó secar la pastilla.

La pastilla seca se resuspendió en 400 µL de regulador TE y se añadieron 10 µL de acetato de amonio 4M más 1 mL de etanol 70%, se mezcló por inversión y se incubó durante 20 min a -20°C.

Finalmente, el tubo se centrifugó durante 5 min y el botón se resuspendió en 100 µL de agua destilada estéril, se hicieron alícuotas y se almacenaron a -70 °C hasta su utilización.

### **6. Diseño de iniciadores.**

Se realizó la búsqueda en la página del NCBI de los principales genes que codifican para determinantes de patogenicidad en el genoma bacteriano. Tratando de que estos sirvieran para la identificación de los diferentes subtipos de *Escherichia coli* (EHEC, EPEC, ETEC EAEC, EIEC y una cepa no patógena), así como para la identificación de las especies de *Salmonella* (*S. typhi* y *S. typhimurium*), *Shigella* (*S. sonnei* y *S. flexneri*), y *Vibrio* (*Vibrio cholerae* O1 Inaba, *Vibrio cholerae* no O1 O139, *Vibrio cholerae* no O1 negativo a O139, *Vibrio parahaemolyticus*) [Tabla 13]. La búsqueda e identificación se efectuó en la base de datos del NCBI en la página <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.

**Tabla 13. Genes que codifican para los distintos determinantes de patogenicidad seleccionados y utilizados en la identificación de los diferentes subtipos de *E. coli* y de los géneros de *Salmonella*, *Vibrio* y *Shigella*.**

<b>GEN</b>	<b>PROTEÍNA PARA LA QUE CODIFICA</b>	<b>ENTEROBACTERIA QUE IDENTIFICA</b>
<b>EaeA</b>	Intimina	EPEC y EHEC
<b>Vt</b>	Verotoxina	EHEC
<b>bfpA</b>	Paquete para formar pili	EPEC
<b>aggR</b>	Fimbrias de adherencia agregativa	EAEC
<b>St</b>	Enterotoxina termoestable	ETEC
<b>Lt</b>	Enterotoxina termolábil	
<b>virB</b>	Activador transcripcional B de genes de virulencia	EIEC y <i>Shigella</i> spp.
<b>virF</b>	Activador transcripcional F de genes de virulencia	<i>Shigella</i> spp.
<b>ITS</b>	Esparcidoras intergénicas	<i>Salmonella</i> spp.
<b>rtx-A</b>	Toxina de autoprosesamiento de la familia RTX	<i>Vibrio</i> spp.
<b>ctx-B (Toxina B)</b>	Toxina de autoprosesamiento de la familia V. Cólera	<i>Vibrio</i> spp.

### 7. Amplificación de genes por la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

La identificación de cada uno de los fragmentos de genes seleccionados para cada tipo y subtipo de bacterias, se realizó mediante la técnica de PCR. Se tuvo cuidado de las condiciones de amplificación fueran las mismas para todos los genes. Los productos de PCR se visualizaron en geles de agarosa al 2%. El corrimiento electroforético se realizó a un voltaje de 60 V; el regulador que se utilizó, tanto para preparar el gel de agarosa como para el corrimiento electroforético, fue el buffer TAE 1X [Tabla14].(>20kb) [[http://www.genomica.uaslp.mx/Protocolos/Gral\\_Buffer\\_TAE\\_TBE.pdf](http://www.genomica.uaslp.mx/Protocolos/Gral_Buffer_TAE_TBE.pdf)].

En cada uno de los pozos del gel de agarosa se colocaron 10 µL del producto de la reacción de PCR, empleando 0.5 µL de regulador de carga "loading buffer". Como referencia de tamaño molecular se empleó un marcador de 100 pares de bases. El producto de PCR de los genes amplificados se visualizó mediante tinción con bromuro de etidio. Para esto el gel se sumergió en un recipiente que contenía el bromuro de etidio al 2% durante 5 minutos, posteriormente se enjuagó con agua corriente a través de un transiluminador de la luz UV.

**Tabla 14. Reactivos para preparar TAE 50 X.**

Reactivo	Cantidad
Tris base	(40 mM) 48.4 g
Acético glacial	11.42 ml
EDTA pH 8	(2 mM) 7. 44 g
Ajustar a pH 8.0	

### 8. Secuenciación de los productos amplificados.

Para asegurar que los fragmentos observados correspondían a los genes esperados, todos los productos de PCR se secuenciaron a través de la técnica de interrupción de cadena con *ABI Big Dye terminator sequencing chemistry*. Los productos de la reacción fueron separados y detectados usando el equipo *ABI 3750 capillary DNA sequencer*. Los electroferogramas y las secuencias de las

bases fueron visualizadas utilizando el programa *Bioedit*. Con las secuencias obtenidas se realizó un análisis bioinformático en la base de datos del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) utilizando la herramienta *BLAST* (*blast.ncbi.nlm.nih.gov*), por sus siglas en inglés (*Basic Local Alignment Search Tool*).

Es un programa informático de alineamiento de secuencias de tipo local, ya sea de ADN, ARN o de proteínas. El programa es capaz de comparar una secuencia problema o secuencia *query*, contra una gran cantidad de secuencias que se encuentren en una base de datos ya establecida y el algoritmo encuentra las secuencias de la base de datos que tienen mayor parecido a la secuencia problema, es usado para encontrar probables genes homólogos. Por lo general, cuando una nueva secuencia es obtenida, se usa el *BLAST* para compararla con otras secuencias que han sido previamente caracterizadas, para así poder inferir su función y concordancia genética entre estas, además de ser la herramienta más usada para la anotación y predicción funcional de genes o secuencias proteicas, determinando que todos los productos secuenciados corresponden a lo que se esperaba, es decir se tratara de los genes de interés para este estudio.

### **9. PCR Múltiple.**

Esta reacción se llevó a cabo con las mismas condiciones de amplificación utilizadas en la estandarización de cada gen, la variante consistió en que se colocó una mezcla de los iniciadores y los ADN's en un mismo tubo de reacción manteniendo el volumen de reacción de 25 µl. La ventaja de esta PCR es que podemos obtener la identificación de varios genes en una misma reacción, utilizando menor cantidad de reactivos y poca cantidad de muestra, además de que el análisis es más rápido.

### RESULTADOS

#### **1. Identificación y aislamiento de las cepas de Enterobacterias usadas en el estudio.**

Las cepas utilizadas en este estudio se cultivaron en los medios: Eosina y Azul de Metileno (EMB), Macconkey (McK) y *Salmonella Shiguella* (SS) para verificar la identidad de las cepas y pureza, además de tener la certeza de que se estaría trabajando con las cepas que correspondieran al grupo de las Gram negativas. Los resultados de esta caracterización [Tabla 15] nos dieron la seguridad para poder proseguir con los trabajos de este estudio.

## Licenciatura en Promoción de la Salud

**Tabla 15. Identificación de las cepas por pruebas bioquímicas en los medios.  
EMB, McK y SS**

Cepas tipo	EMB	McK	SS		
<i>E. coli</i>	Positivo	Positivo	Negativo		
EHEC EDL933					
EAEC 042	Negativo				
EAEC 1	Positivo				
EAEC 2					
EPEC ATCC 43887					
EPEC 2348/69					
ETEC B7A					
ETEC ATCC 35401	Positivo			Positivo	Negativo
EIEC 1					
EIEC ATCC 43893					
<i>S. typhi</i>	Negativo	Negativo			
<i>S. typhimurium</i>					
<i>V. cholerae</i> O1 Inaba	Negativo	Negativo	Negativo		
<i>V. cholerae</i> no O1 O139					
<i>V. cholerae</i> no O1 negativo a O139	No creció *				
<i>V. parahaemolyticus</i>	No creció*				
<i>S. sonnei</i>	Negativo**	Negativo**	Positivo		
<i>S. flexneri</i>					

\*No creció: Se refiere a que la cepa no presentó crecimiento en estos medios, posiblemente por el estado de las cepas originales.

\*\* Negativo: Se refiere a que el resultado de esta cepa fue el esperado, debido a que *Salmonella* no tiene que crecer en el medio EMB ni McK.

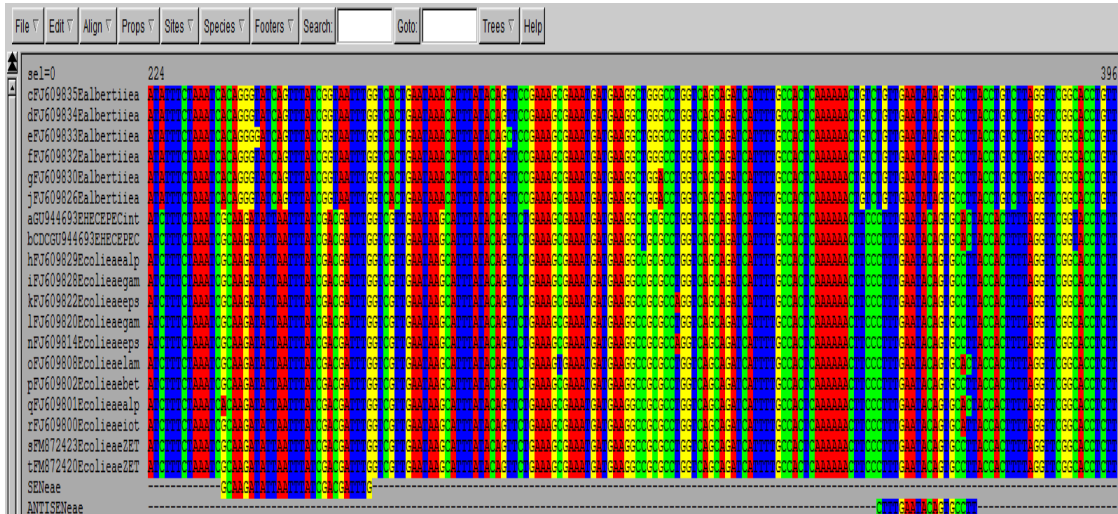
### **2. Alineamiento de secuencias de los genes de virulencia para el diseño de oligonucleótidos utilizados para la identificación de diferentes bacterias enteropatógenas.**

Una vez seleccionados dichos iniciadores, se realizó un análisis bioinformático para detectar diferentes secuencias de cada uno de ellos, dichas secuencias están almacenadas en las bases de datos de la página <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/> del Genbank, y con ellas se realizó un alineamiento múltiple para identificar sitios conservados y específicos de cada factor de virulencia para los diferentes subtipos de *E. coli*, y especies de *Salmonella*, *Shigella* y *Vibrio*. Respectivamente, se efectuó el diseño de oligonucleótidos en sentido y antisentido para cada una de estas cepas, utilizando el programa *Clustal X* versión 1.81 (Thompson y col., 1997) y el programa *Seaview*. El análisis de estos datos se muestra en las figuras 5 (A – K) mientras que en la Figura 5(A´ - K´) se muestran las secuencias de los oligonucleótidos en sentido y antisentido así como el tamaño del fragmento por amplificar para cada uno de estos pares seleccionados.

A partir de estos alineamientos y con base en los sitios conservados se efectuó el diseño de los primers para la amplificación específica de los fragmentos de los genes que en este estudio se contemplaron.

**Figura 5. Diseño de iniciadores para la identificación de las diferentes cepas de bacterias enteropatógenas.**

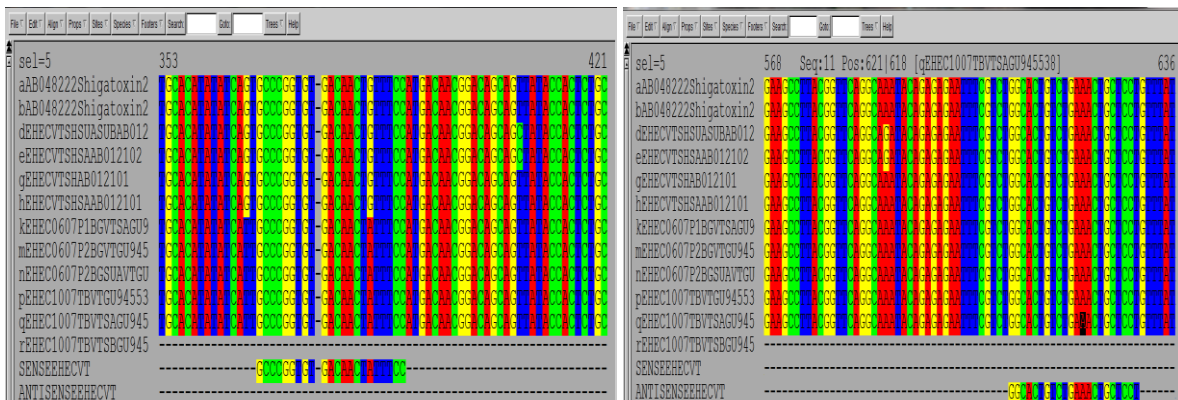
**A) *aeA* identifica a los subtipos EHEC y EPEC (139 pb)**



**A'**

GEN	Sentido (Tamaño del oligo)	Antisentido (Tamaño del oligo)	Amplificado (pb)
Intimina ( <i>aeA</i> )	237-264 (28) GCAATTAATTTATCGACGATTG	354-376 (24) GTGGTTAAGCACTGATTCAAAG	139

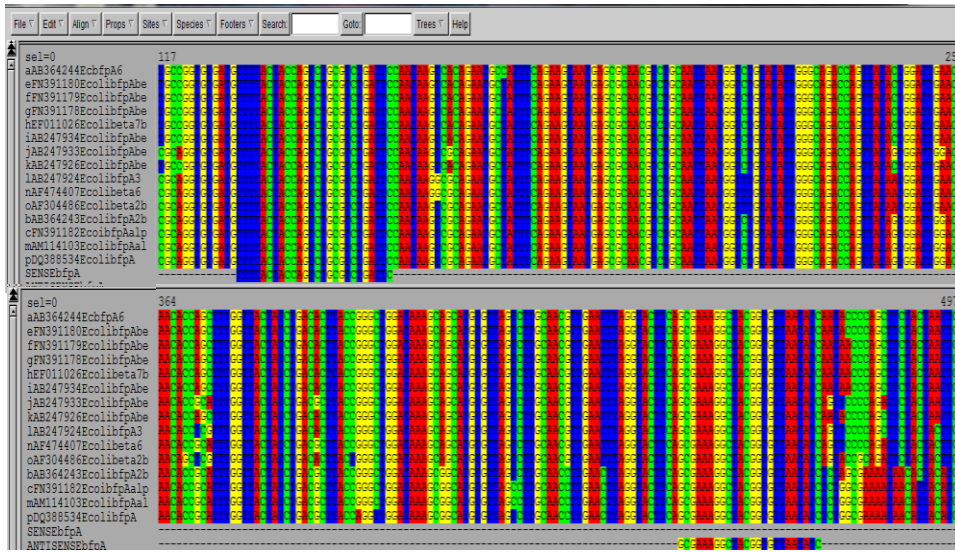
**B) VT identifica al subtipo EHEC (262 pb)**



**B'**

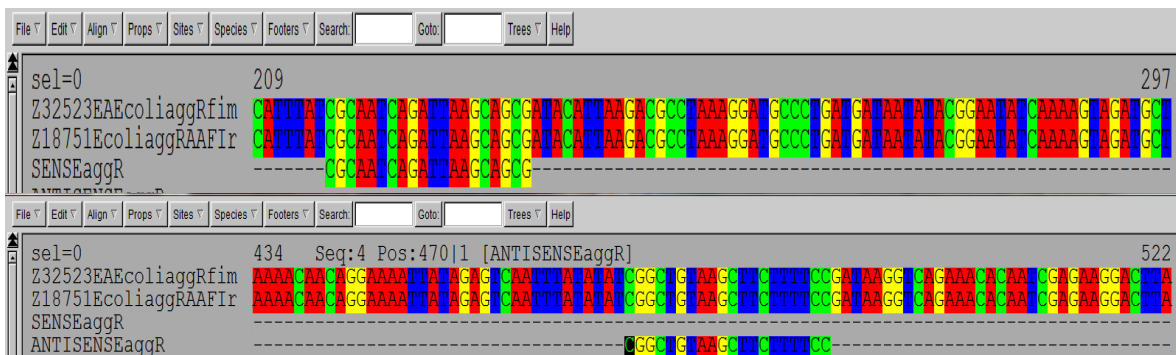
GEN	Sentido (Tamaño del oligo)	Antisentido (Tamaño del oligo)	Amplificado (pb)
Verotoxina (VT)	366-387 (22) GCCCGGTGTGACAACTATTTC	606-628 (22) AGGAGCAGTTTCAGACAGTGCC	262

**C) *bfpA* identifica al subtipo EPEC (344 pb)**



C <sup>+</sup> N	Sentido (Tamaño del oligo)	Antisentido (Tamaño del oligo)	Amplificado (pb)
Bundle forming pili ( <i>bfpA</i> )	103-128 (26) TTTTACTACCAGTCTGCGTCTGATTC	424-447 (24) GATATTAACACCGTAGCCTTTCGC	344

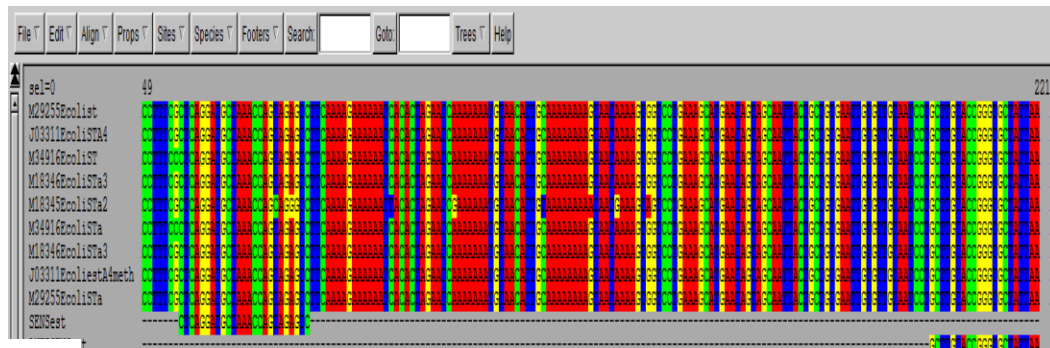
**D) *aggR* identifica al subtipo EAEC (273 pb)**



**D'**

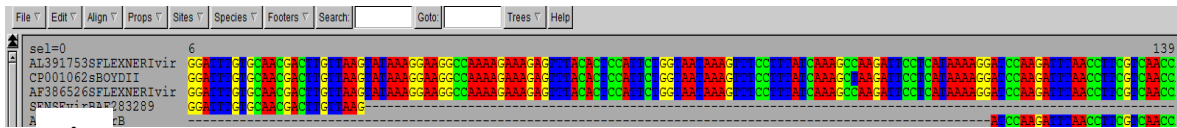
GEN	Sentido (Tamaño del oligo)	Antisentido (Tamaño del oligo)	Amplificado (pb)
Adhesina fimbrial ( <i>aggR</i> )	216-235 (20) CGCAATCAGATTAAGCAGCG	470-489 (20) GGAAAAGAAGCTTACAGCCG	273

**E) st identifica al subtipo ETEC (163 pb)**



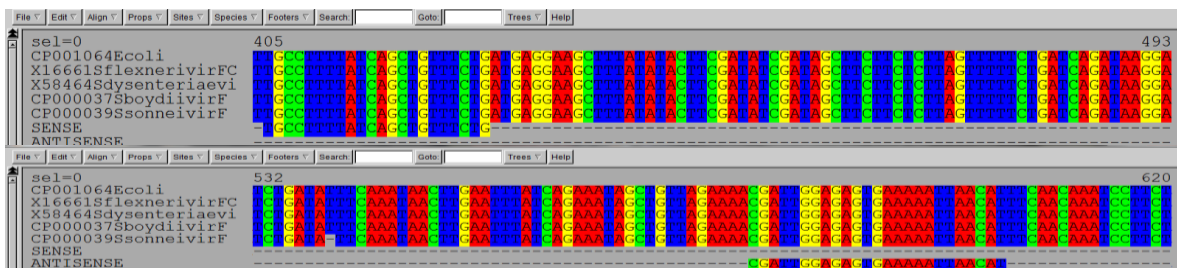
GEN	Sentido (Tamaño del oligo)	Antisentido (Tamaño del oligo)	Amplificado (pb)
Toxina termoestable (st)	56-80 (25) CTCAGGATGCTAAACCAGTAGAGTC	199-219 (21) TTAATAGCACCCGGTACAAGC	163

**F) virB identifica al subtipo EIEC y las cepas patógenas de Shigella spp (144 pb)**



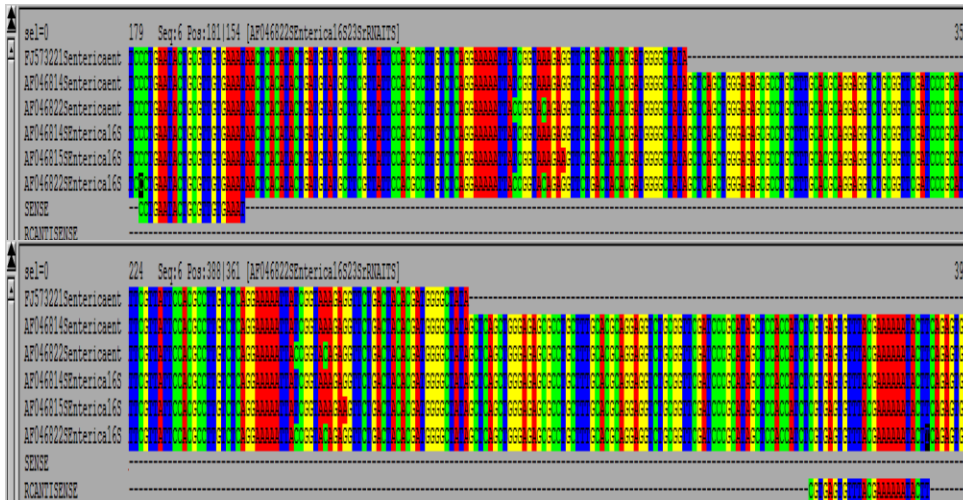
GEN	Sentido (Tamaño del oligo)	Antisentido (Tamaño del oligo)	Amplificado (pb)
Gen de virulencia (virB)	virB 6-29 (24) GGATTTGTGCAACGACTTGTTAAG	VirB 115-139 (24) GGTTGACGAAGGTTAAATCTTGAT	144

**G) virF identifica al subtipo EIEC (197 pb)**



GEN	Sentido (Tamaño del oligo)	Antisentido (Tamaño del oligo)	Amplificado (pb)
Activador transcripcional de la virulencia (virF)	404-425 (22) TGCCTTTTATCAGCTGTTTCTG	577 -601 (25) ATGTTAATTTTCACTCTCCAATCG	197

## H) ITS identifica a las cepas de *Salmonella* spp.



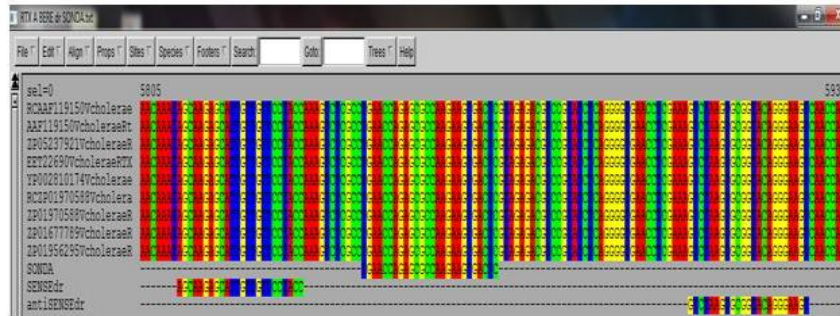
H'	Sentido (Tamaño del oligo)	Antisentido (Tamaño del oligo)	Amplificado (pb)
Espaciador intergénico (ITS)	154-175 (22) CCTGAATACTGCGTGTGAAAT	337-361 (25) AAGTATTTTTTCGTAACACTCAG	207

## I) Lt identifica al subtipo ETEC



GEN	Sentido (Tamaño del oligo)	Antisentido (Tamaño del oligo)	Amplificado (pb)
Enterotoxina estable al calor Lt	570-591 (22) AGCTTGGAGAGAAGAACCCTGG	833-854 (22) CGGAGCTCCCCAGTCTATTACA TGTAATAGACTGGGGAGCTCCG	283

**J) rtx-A identifica a las cepas de *Vibrio spp.***



J'

GEN	Sentido (Tamaño del oligo)	Antisentido (Tamaño del oligo)	Amplificado (pb)
Repeticiones en la toxina del colera  RTX-A	5812-5835 (25) <b>AGCAAGAGCATTGTTGTTCTACC</b>	5909-5931 (23) <b>GTCTAAGTGCGGTACAGGGAAGT</b>	119

**K) ctx-B identifica a las cepas de *Vibrio spp.***



K'

GEN	Sentido (Tamaño del oligo)	Antisentido (Tamaño del oligo)	Amplificado (pb)
ToxinaB  ctxB	198-222 (25) <b>TGCAACTTTTCAAGTAGAAGTACCA</b>	275-297 (23) <b>CCCTGAGGATTGCATATCTTACT</b>	126

**Figura 5.** Diseño de iniciadores para la identificación de las diferentes cepas de bacterias enteropatógenas; A) gen *eaeA* (EHEC); B) VT (EHEC); C) *bfpA* (EPEC); D) *aggR* (EAEC); E) *st* (ETEC); F) *virB* (*Shigella* spp., EIEC); G) *virF* (EIEC); H) ITS (*Salmonella* spp.); I) Lt (ETEC); J) *rtx-A* (*Vibrio* spp.); K) *ctx-B* (*Vibrio* spp.): En los distintos incisos de las figuras se observan los alineamientos múltiples de las secuencias que codifican para cada uno de los determinantes de virulencia en las diferentes cepas.

**3. Estandarización del método por PCR punto final de cada gen para la identificación de Enterobacterias (*E. coli*, *Shigella*, *Salmonella* y *Vibrio*).**

Para la estandarización y amplificación de cada fragmento de gen se utilizó el ADN genómico de cada una de las bacterias enteropatógenas de interés. La reacción de PCR punto final se efectuó utilizando los oligonucleótidos respectivos [Fig. 5 (A'-K')] y las condiciones de amplificación que a continuación se detallan [Tabla 16, Tabla 17].

**Tabla 16. Condiciones utilizadas para la amplificación de los genes mediante la reacción de PCR.**

REACTIVO	Concentración final en la reacción	CANTIDAD (µL)
Buffer 10x	1X	2.5 µL
MgCl <sub>2</sub> [25 mM]	1.5 mM	1.5 µL
DNTP's [10 m]	0.2 mM	0.5 µL
Oligo Sentido [0.5µM]	0.5 µM	0.5 µL
Oligo Antisentido [0.5µM]	0.5 µM	
DNA		3 µL
Taq polimerasa [1.0-2.5 unidades]	1.5 unidades	0.1 µL
H2O		16.3 µL
volumen final		25 µL

**Tabla 17. Condiciones de amplificación de la PCR.**

PROGRAMA	TEMPERATURA	TIEMPO	CICLOS
Desnaturalización inicial	94°C	5 min.	1
Desnaturalización	94°C	30 seg.	35
Alineamiento	57°C	30 seg.	
Extensión	72°C	30 seg.	
Extensión final	72°C	10 min.	1

Los fragmentos amplificados se analizaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 2%. Para cada gel se utilizaron marcadores de talla molecular para verificar el tamaño del fragmento amplificado; en cada una de las imágenes de los geles se puede observar la amplificación de los fragmentos esperados de los genes considerados en este trabajo.

Con el fin de analizar la especificidad de los oligonucleótidos para cada gen, se realizaron controles positivos y negativos de la amplificación. Como control positivo se utilizó una mezcla de todos los ADN's de enterobacterias (Subtipos patógenos de *E. coli*; y especies patógenas de *Salmonella spp.*; *Shigella spp.*; *Klebsiella spp.*; *Enterobacter spp.*; *Vibrio spp.*; etc.), con los que se contaba en el laboratorio donde se efectuó este estudio. El control negativo correspondió a la misma mezcla mencionada pero sin el ADN de la cepa que corresponde a la amplificación específica del gen en cada reacción [Figura 6(A- K)].

Como se muestra en la Figura 6 A, se obtuvo un amplificado de 139 pb; correspondiente al gen *eaeA*, de acuerdo a los marcadores de talla molecular (carril 1). Este amplificado de 139 pb se obtuvo con los ADN's de las cepas EHECed1933 y EPEC2348/69 (carril 2 y 3) no obstante para la cepa EPEC ATCC 43887 no se obtuvo amplificación (carril 4). Sin embargo, si hubo fragmentos de 139 pb en el control positivo (carriles 5 y 6) lo que demuestra la especificidad del fragmento de gen utilizado, con las mezclas de ADN's y no así en el control negativo (carril 7) sin ADN. Por último para la reacción sin ADN (carril 8) no se observó ninguna banda de amplificación y la finalidad de éste fue verificar que no estuvieran contaminados los reactivos.

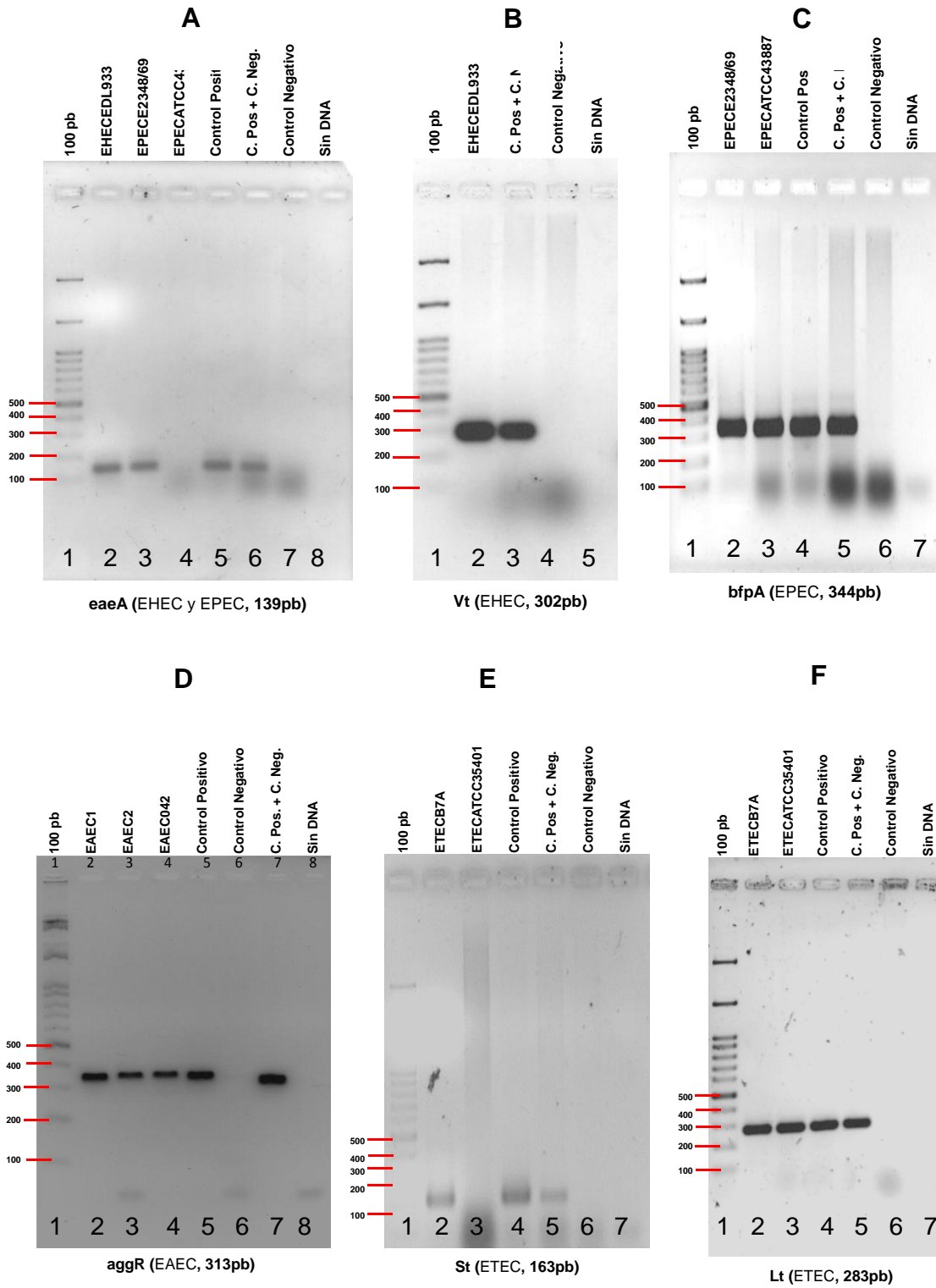
De manera similar podemos verificar la amplificación de los diferentes fragmentos específicos de 302 pb (VT) para EHEC [B- carril 2]; de 344 pb (*bfpA*) para EPEC [C- carriles 2 y 3]; de 313 pb (*aggR*) para EAEC [D- carriles 2,3 y 4]; de 163 pb (*St*) para ETEC [E- carriles 2 y 3]; de 283 pb (*Lt*) para ETEC [F- carriles 2 y 3]; de 133 pb (*VirB*) para EIEC [G- carril 3] y *Shigella* [G- carril 2]; de 197 pb (*VirF*) para EIEC [H- carril 3] y *Shigella* [H- carril 2]; de 208 pb (ITS) para *Salmonella* [I- carriles

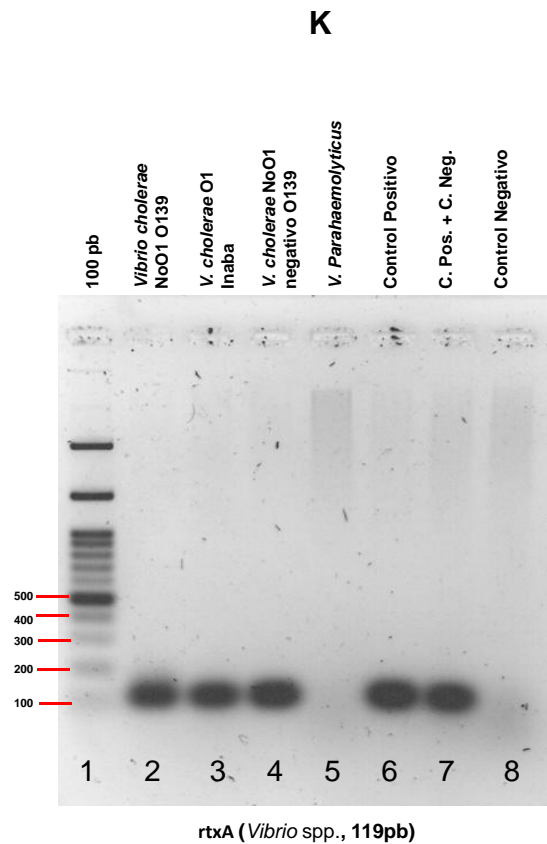
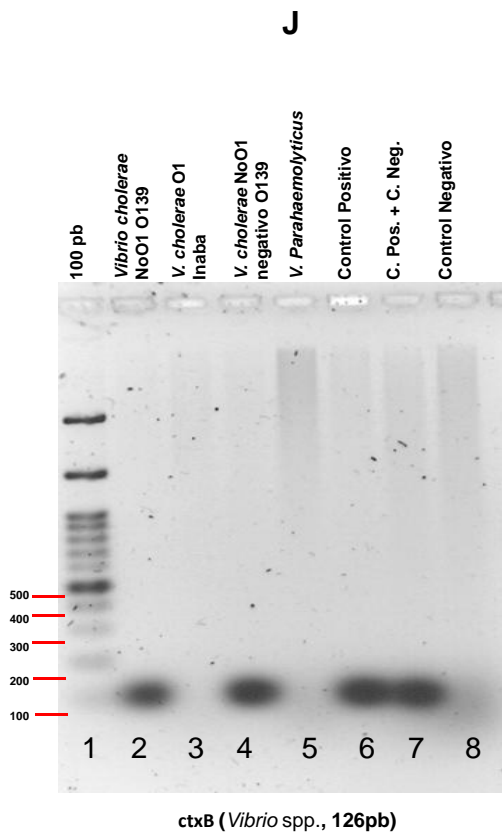
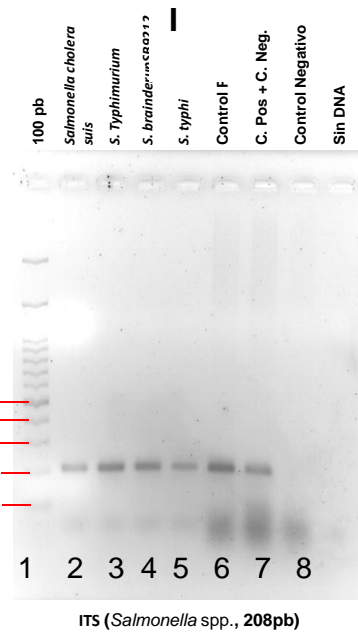
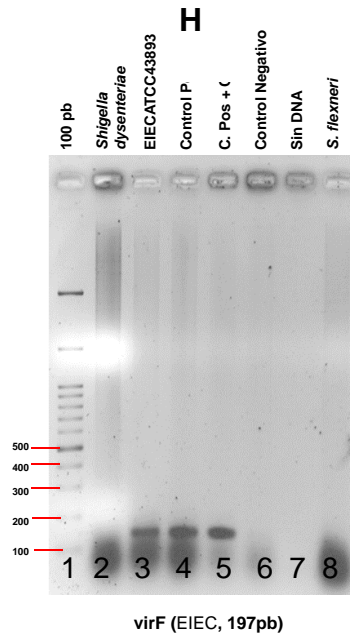
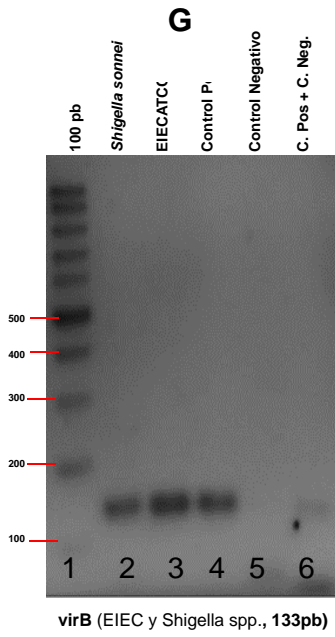
## Licenciatura en Promoción de la Salud

---

2,3,4 y 5]; de 126 pb (ctxB) para *Vibrio spp* [J- carriles 2 y 4]; de 119 pb (rtxA) para *Vibrio spp* [K- carriles 2,3 y 4].

Por lo que, con estos resultados podemos afirmar que logramos obtener amplificadores específicos de cada uno de los fragmentos de los genes de los diferentes grupos de *E. coli*, *Salmonella*, *Shigella* y *Vibrio*.





**Figura 6.** Análisis de la especificidad de los oligonucleótidos utilizados para la amplificación de los fragmentos de los genes seleccionados como blancos moleculares para la identificación de subtipos Enteropatógenos. En cada uno de los geles (A-K) se señala el fragmento de ADN amplificado mediante PCR en cada una de las cepas, incluyendo los controles positivos, negativos y el control de los reactivos. En el carril 1 de cada gel se colocaron los marcadores de talla molecular. Debajo de cada gel se anota el nombre del gen analizado, el subtipo de enterobacteria o *Vibrio sp.* que identifica y el tamaño del amplificado esperado.

#### **4. Secuenciación de los fragmentos amplificados de los genes de interés, para la identificación de los diferentes subtipos de *E. coli* y especies patógenas de los géneros *Salmonella*, *Shigella* y *Vibrio*.**

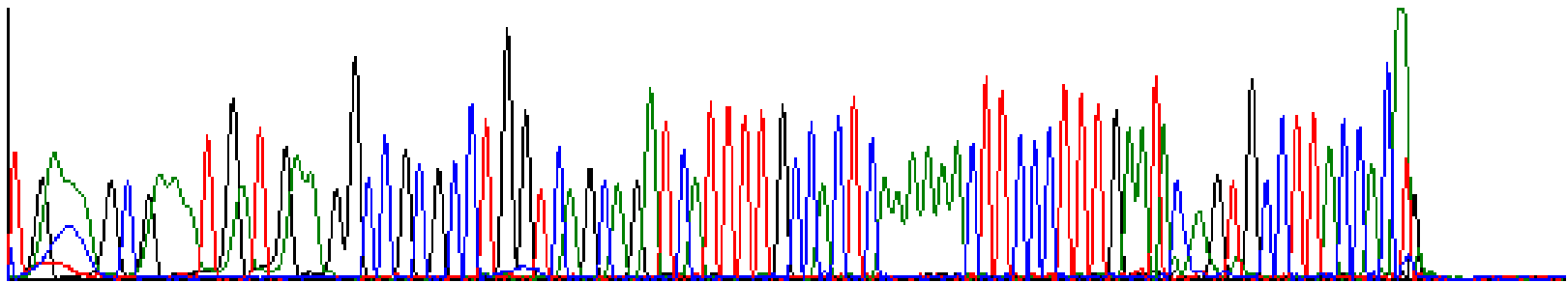
Para asegurar que los productos amplificados correspondieran a los genes de bacterias enteropatógenas utilizadas en este estudio, todos los productos de PCR de los genes se secuenciaron como se describió en la metodología. Los electroferogramas [Fig. 7 (A - H)] y las secuencias de las bases fueron visualizadas utilizando el programa *Chromas* 2.4.1. Con las secuencias obtenidas se realizó un análisis bioinformático en la página del *NCBI blast* ([blast.ncbi.nlm.nih.gov](http://blast.ncbi.nlm.nih.gov)), un ejemplo representativo de los resultados de este análisis bioinformático lo mostramos con los genes *aggR* y *VT* de *E. coli*, *ITS* de *Salmonella*; y *VirF* de *Shigella* [Fig. 8 (A-D)], así mismo todos los demás productos secuenciados correspondieron a lo esperado. Es decir las secuencias obtenidas son en un 100% igual a las secuencias que están reportadas en las bases de datos para cada gen aquí estudiado. A continuación se muestran los electroferogramas y los resultados de los análisis bioinformáticos.

**A) eaeA 139pb.**

>eaeAEHEC+Fw

GCGAATGATGAAGGCCGCGCCTGGTCAGCAGATCATTTTGCCACTCAAAAACCTTCCTTTGAATACAGTGCCTTACCACATG

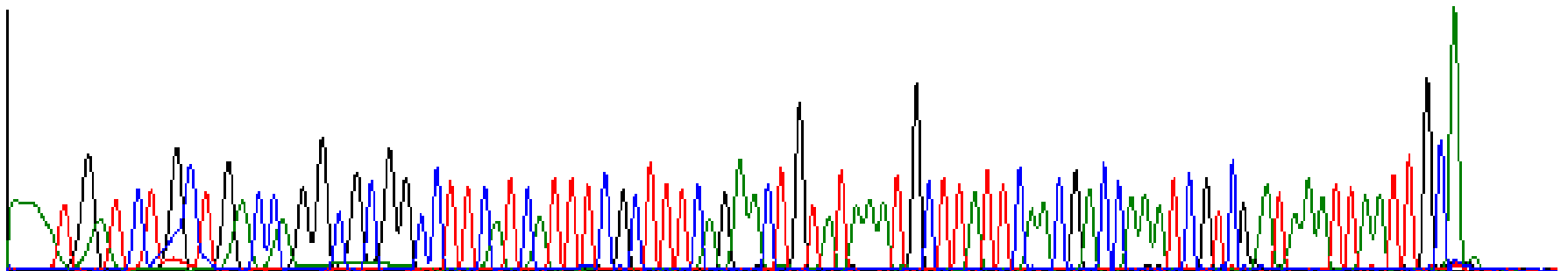
NNNN



>eaeAEHEC+Rev

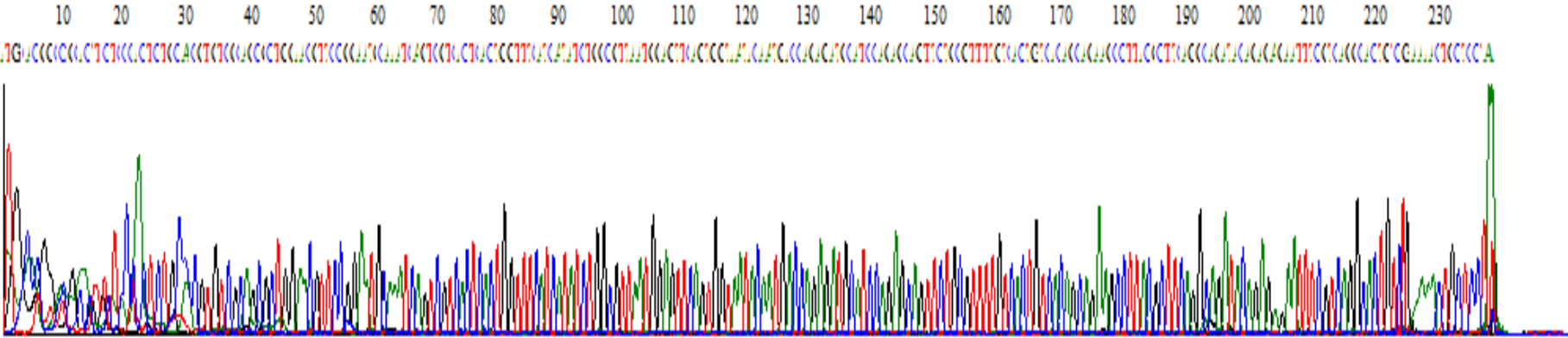
AAAATGATCTGCTGACCAGGCGCGCCTTCATCATTTCGCTTTCAGAACTGTATAAATGCTTATTCAACGACCAAATCGTCGATAAATTAATTGCA

NNNN

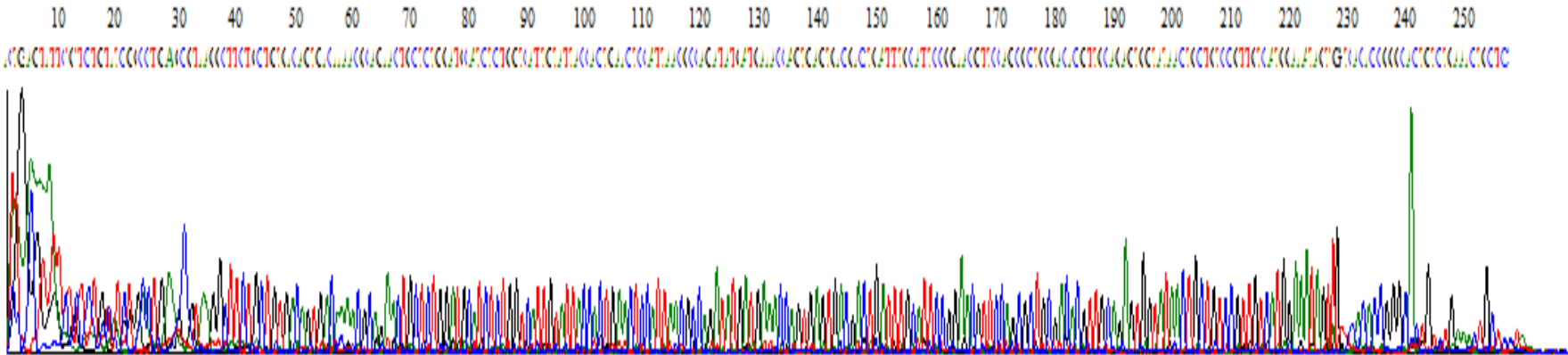


B) Vt 262 pb.

>VtEHEC+Fw



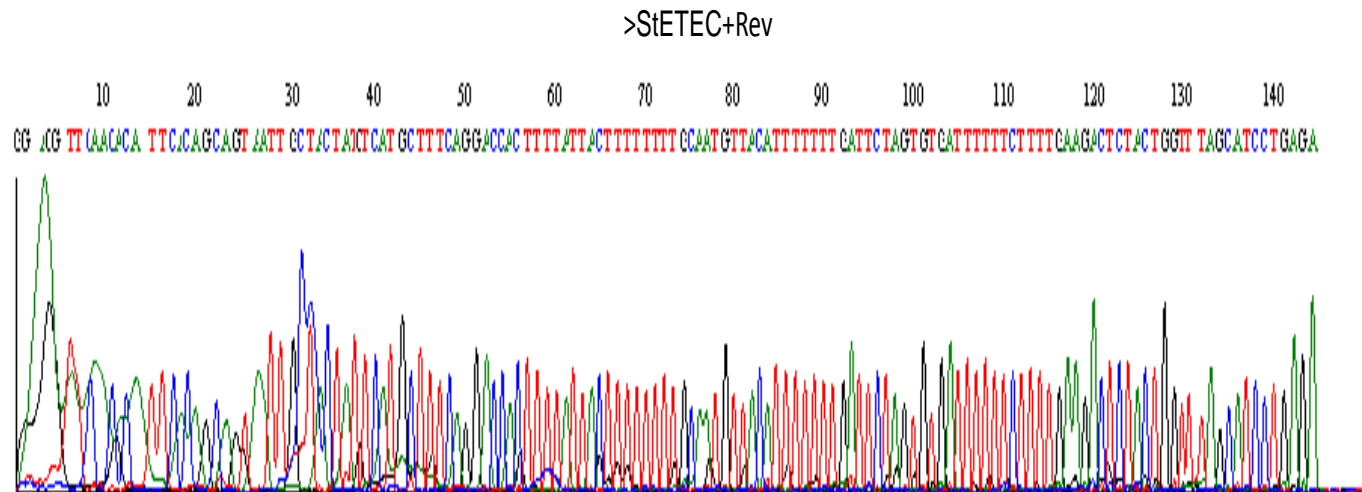
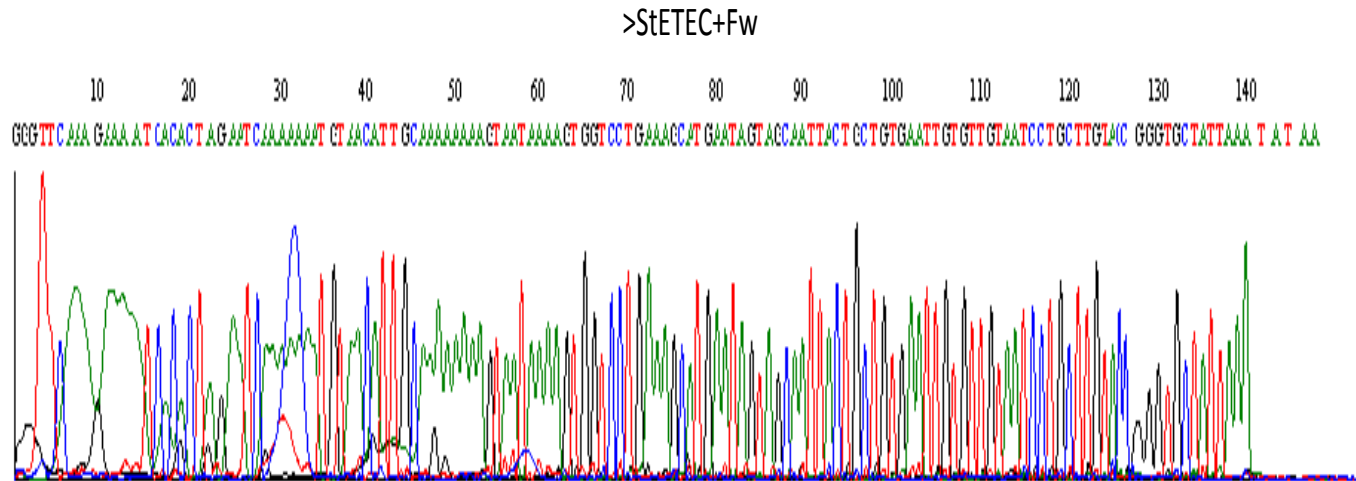
>VtEHEC+Rev





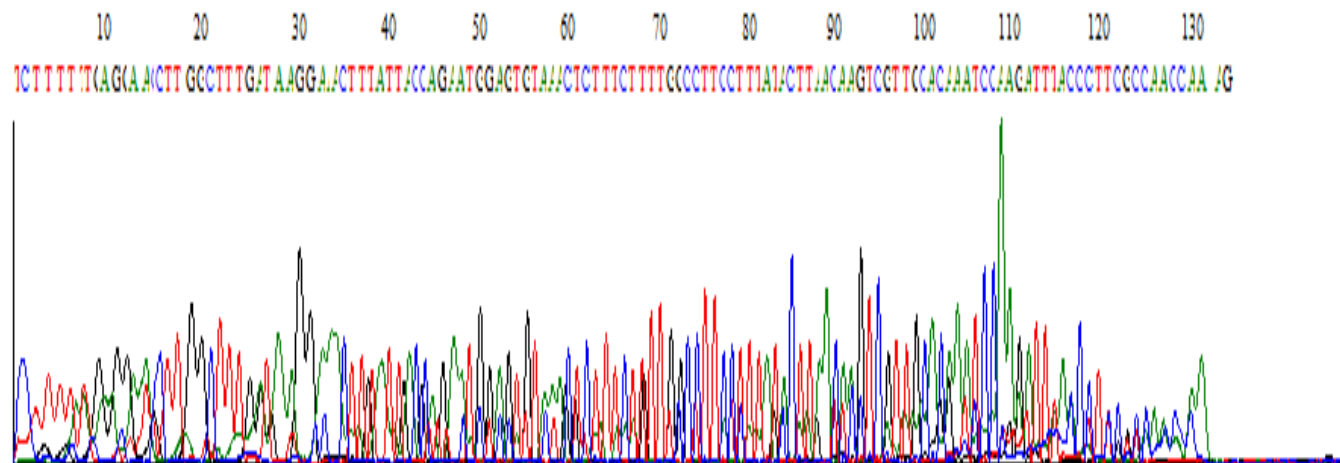


E) st 163 pb.



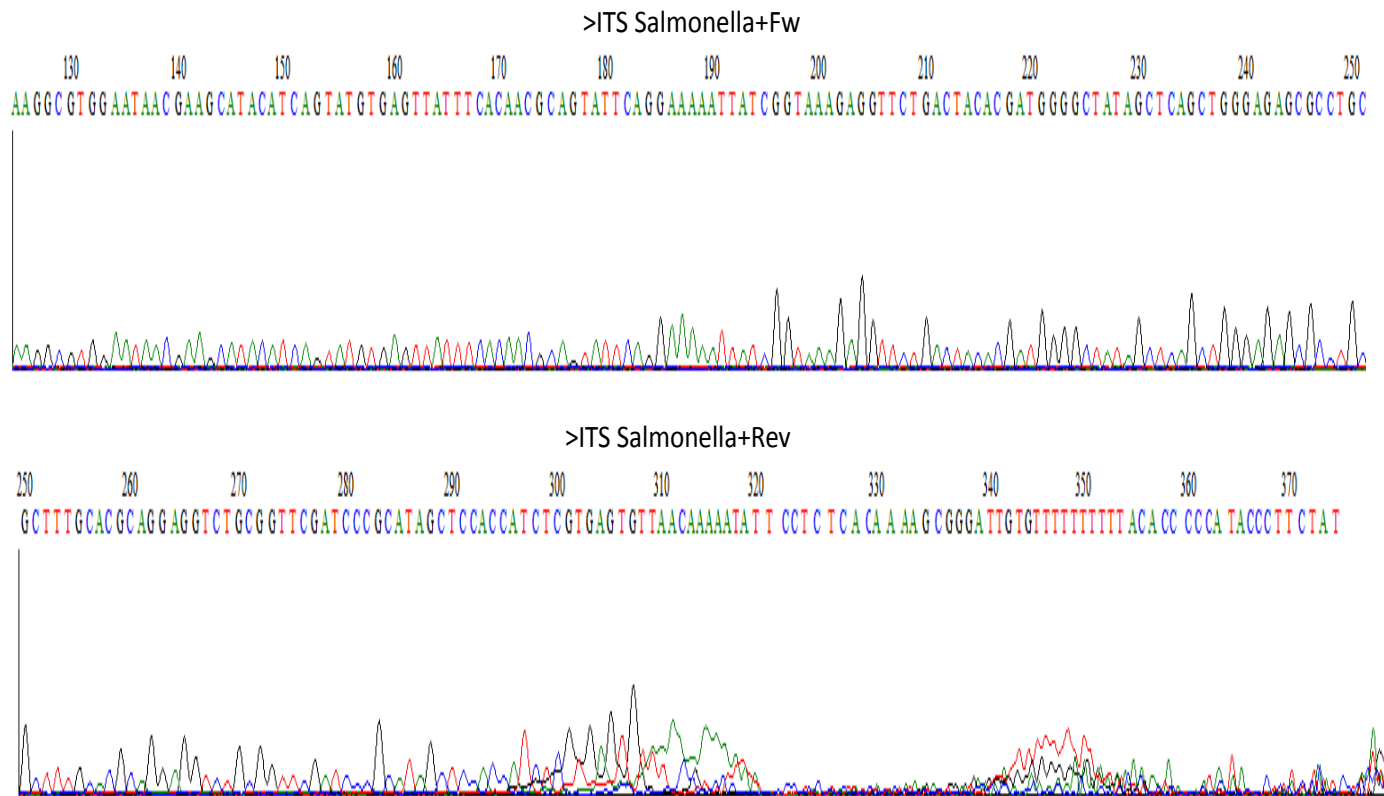
F) virB 144 pb.

>VirB S Sonnei+Rev





H) ITS 208 pb.



**Figura 7.** Electroferogramas (A-H) de las secuencias correspondientes a algunos de los genes utilizados en este estudio, Se pueden observar partes de la cadena en sentido y del antisentido, los picos de las bases nitrogenadas en distintos colores cada una (A- verde, C-azul, G-negro y T-rojo) así mismo se indica el tamaño en pares de bases de cada uno de los fragmentos de los genes.

## A) El par de oligonucleótidos diseñados para un fragmento del gen VT sirvió para identificar a cepas de *E. coli*.

NCBI Blast2 sequences (VTEHECFw) +

blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi

NCBI BLAST/blastn suite/ **Formatting Results - KRWG9XA0013**

[Edit and Resubmit](#) [Save Search Strategies](#) [Formatting options](#) [Download](#)

**2 sequences (VTEHECFw)**

Results for: 1:16280 VTEHECFw(238bp)

Query ID |16280 Database Name nr  
 Description VTEHECFw Description All GenBank+EMBL+DBJ+PDB sequences (but no EST, STS, GSS, environmental samples or phase 0, 1 or 2 HTGS sequences)  
 Molecule type nucleic acid Program BLASTN 2.2.26+ [Citation](#)  
 Query Length 238

Other reports: [Search Summary](#) [Taxonomy reports](#) [Distance tree of results](#)

**Sequences producing significant alignments:**

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
<a href="#">AB168111.1</a>	Escherichia coli O157:H7 q, stx2A, stx2B genes for antiterminator Q protein, Shiga toxin	390	390	91%	2e-105	99%	
<a href="#">JQ011318.1</a>	Escherichia phage TL-2011c, complete genome	385	385	91%	9e-104	99%	
<a href="#">JN194203.1</a>	Escherichia phage 1720a-02 Stx2d activatable A subunit (stx2dactA) gene, complete c	385	385	91%	9e-104	99%	
<a href="#">FR874041.1</a>	Escherichia coli ORF1, ORF2, ORF3, tRNA-Ile, tRNA-Arg, stx2A and stx2B genes, isolate	385	385	91%	9e-104	99%	
<a href="#">HQ585061.1</a>	Escherichia coli strain 3024-94 Stx2d A subunit variant 2d (stx2dA) gene, complete cds	385	385	91%	9e-104	99%	
<a href="#">HQ424691.1</a>	Enterobacteria phage VT2phi_272, complete sequence	385	385	91%	9e-104	99%	
<a href="#">FN252459.1</a>	Escherichia coli stx2A gene for Shiga toxin 2 A-subunit and stx2B gene for Shiga toxin 2	385	385	91%	9e-104	99%	
<a href="#">FN252458.1</a>	Escherichia coli stx2A gene for Shiga toxin 2 A-subunit and stx2B gene for Shiga toxin 2	385	385	91%	9e-104	99%	
<a href="#">GU983682.2</a>	Escherichia coli O157:H7 isolate 00F078 insertion sequence IS 1203v hypothetical prote	385	385	91%	9e-104	99%	
<a href="#">GU983683.2</a>	Escherichia coli O157:H7 isolate BRY24 insertion sequence IS 1203v hypothetical protei	385	385	91%	9e-104	99%	
<a href="#">AP010958.1</a>	Escherichia coli O103:H2 str. 12009 DNA, complete genome	385	385	91%	9e-104	99%	
<a href="#">FN182287.1</a>	Escherichia coli stx2Adact gene for shiga toxin 2d activatable subunit A and stx2dB gen	385	385	91%	9e-104	99%	
<a href="#">FM998861.1</a>	Escherichia coli stx2vA and stx2vB genes for shiga toxin 2v subunits A and B, strain TS	385	385	91%	9e-104	99%	
<a href="#">FM998860.1</a>	Escherichia coli stx2vA and stx2vB genes for shiga toxin 2v subunits A and B, strain TS	385	385	91%	9e-104	99%	

> [dbj|AB168111.1](#) Escherichia coli O157:H7 q, stx2A, stx2B genes for antiterminator Q protein, Shiga toxin 2 A subunit, Shiga toxin 2 B subunit, complete cds, strain: Thai-13  
 Length=2935

Score = 390 bits (211), Expect = 2e-105  
 Identities = 216/218 (99%), Gaps = 1/218 (0%)  
 Strand=Plus/Plus

```

Query 21   CCACTCTGC-ACGTGTGCGCAGCGCTGGAACGTTCCGGAATGCAAATCAGTCGTCCTCAC   79
Sbjct 2104  CCACTCTGCAACGTGTGCGCAGCGCTGGAACGTTCCGGAATGCAAATCAGTCGTCCTCAC   2163

Query 80   TGGTTTCATCATATCTGGCGTTAATGGAGTTCAGTGGTAATACAATGACCAGAGATGCAT   139
Sbjct 2164  TGGTTTCATCATATCTGGCGTTAATGGAGTTCAGTGGTAATACAATGACCAGAGATGCAT   2223

Query 140  CCAGAGCAGTTCTGCGTTTTGTCACTGTCCACAGCAGAAGCCTTACGCTTCAGGCAGATAC   199
Sbjct 2224  CCAGAGCAGTTCTGCGTTTTGTCACTGTCCACAGCAGAAGCCTTACGCTTCAGGCAGATAC   2283

Query 200  AGAGAGAATTTTCGTCAGGCAGTGTGAAAAGTCTCTCT   237
Sbjct 2284  AGAGAGAATTTTCGTCAGGCAGTGTGAAAAGTCTCTCT   2321
    
```

## B) El par de oligonucleótidos diseñados para un fragmento del gen *aggR* sirvió para identificar a cepas de *E. coli*.

NCBI BLAST2 sequences (aggREAC1Fw) +

blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi

NCBI BLAST/blastn suite/ Formatting Results - KNT96NGF01R

[Edit and Resubmit](#) [Save Search Strategies](#) [Formatting options](#) [Download](#)

2 sequences (aggREAC1Fw)

Results for: 1|cd13806 aggREAC1Fw(251bp)

Query ID |cd13806  
 Description aggREAC1Fw  
 Molecule type nucleic acid  
 Query Length 251

Database Name nr  
 Description All GenBank+EMBL+DDBJ+PDB sequences (but no EST, STS, GSS, environmental samples or phase 0, 1 or 2 HTGS sequences)  
 Program BLASTN 2.2.26+ [Citation](#)

Other reports: [Search Summary](#) [Taxonomy reports](#) [Distance tree of results](#)

Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
<a href="#">FM554767.1</a>	Escherichia coli O42 plasmid pAA complete sequence	424	424	97%	2e-115	98%	
<a href="#">HE603111.1</a>	Escherichia coli HUSEC41 plasmid pHUSEC41-2 complete sequence	403	403	97%	3e-109	96%	
<a href="#">CU928159.2</a>	Escherichia coli str. 55989 plasmid 55989p, complete genome	403	403	97%	3e-109	96%	
<a href="#">AF411067.1</a>	Escherichia coli strain 55989 plasmid pAA-like agg3 gene cluster, complete sequence	403	403	97%	3e-109	96%	<a href="#">G</a>
<a href="#">Z32523.1</a>	E.coli aggR gene for fimbrial adhesin	403	403	97%	3e-109	96%	
<a href="#">Z18751.1</a>	E.coli aggR gene for AAF/I regulator protein	403	403	97%	3e-109	96%	
<a href="#">AB255435.1</a>	Escherichia coli plasmid pO86A1 DNA, complete sequence	375	375	97%	6e-101	94%	

Alignments

Select All [Get selected sequences](#) [Distance tree of results](#)

[emb](#) FM554767.1 | [D](#) Escherichia coli O42 plasmid pAA complete sequence  
 Length=113346

Score = 424 bits (229), Expect = 2e-115  
 Identities = 241/246 (98%), Gaps = 3/246 (1%)  
 Strand=Plus/Minus

```

Query 5   AGAGCCTTACGGATGCCCTGATGATCATATACGGATATCRAAAGTAGATCTGTAGT 63
          |||
Sbjct 41634 AGAGCCTTAAAGGATGCCCTGATGATCATATACGGATATCRAAAGTAGATCTGTAGT 41575

Query 64   TGTCCGATTGCTCAAAAGGATTAATGTAGCTGATGCTGACGATTCGTATTAGATAC 123
          |||
Sbjct 41574 TGTCCGATTGCTCAAAAGGATTAATGTAGCTGATGCTGACGATTCGTATTAGATAC 41515

Query 124  TTCAAGAGTATCGATTAATGATGATTCAGGATTAAGTTCAGATTGATATATCTATA 183
          |||
Sbjct 41514 TTCAAGAGTATCGATTAATGATGATTCAGGATTAAGTTCAGATTGATATATCTATA 41455

Query 184  TCAAGATCGAAAACACAAAAAATTATAGAGTCRAITTTATATATCGGCTG-AGGCTT 242
          |||
Sbjct 41454 TCAAGATCGAAAACACAAAAAATTATAGAGTCRAITTTATATATCGGCTGTAGC-TT 41396

Query 243  CTTTC 248
          |||
Sbjct 41395 CTTTC 41390
    
```

## C) El par de oligonucleótidos diseñados para un fragmento del gen ITS sirvió para identificar a cepas de *Salmonella*.

BLAST® Basic Local Alignment Search Tool

Home Recent Results Saved Strategies Help My NCBI Sign In Register

NCBI BLAST blast suite: **Formatting Results - MXFZKE2K01N**

Edit and Resubmit Save Search Strategies Formatting options Download

2 sequences (ITSSTyphimFw)

Results for: 1bl44842 ITSSTyphimFw(36bp)

Query ID |l|44642 Database Name nr  
 Description ITSSTyphimFw Description All GenBank+EMBL+DBJ+PDB sequences (but no EST, STS, GSS, environmental samples or phase 0, 1 or 2 HTGS sequences)  
 Molecule type nucleic acid Program BLASTN 2.2.26+ Citation  
 Query Length 356

Other reports: Search Summary Taxonomy reports Distance tree of results

Legend for links to other resources: UniGene GEO Gene Structure Map Viewer PubChem BioAssay

Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
<a href="#">CP003278.1</a>	Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhi str. P-stx-12, complete genome	331	2606	83%	2e-87	99%	
<a href="#">CP003047.1</a>	Salmonella enterica subsp. enterica serovar Gallinarum/pullorum str. RKSS078, complete genome	331	1844	83%	2e-87	99%	
<a href="#">CP002614.1</a>	Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhimurium str. UK-1, complete genome	331	1942	83%	2e-87	99%	
<a href="#">CP002487.1</a>	Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhimurium str. ST4/74, complete genome	331	1942	83%	2e-87	99%	
<a href="#">AP011957.1</a>	Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhimurium str. T000240 DNA, complete genome	331	1726	83%	2e-87	99%	
<a href="#">FQ312003.1</a>	Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhimurium SL1344 genome	331	1942	83%	2e-87	99%	
<a href="#">CP001363.1</a>	Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhimurium str. 140285, complete genome	331	1942	83%	2e-87	99%	
<a href="#">FN424405.1</a>	Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhimurium str. D23580 complete genome	331	1942	83%	2e-87	99%	
<a href="#">AE006468.1</a>	Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhimurium str. LT2, complete genome	331	1942	83%	2e-87	99%	
<a href="#">AM933172.1</a>	Salmonella enterica subsp. enterica serovar Enteritidis str. P125109 complete genome	331	2055	83%	2e-87	99%	
<a href="#">CP001138.1</a>	Salmonella enterica subsp. enterica serovar Agona str. SL483, complete genome	331	1824	83%	2e-87	99%	
<a href="#">CP001127.1</a>	Salmonella enterica subsp. enterica serovar Schwarzengrund str. N1M10633 complete genome	331	1942	83%	2e-87	99%	

> [gb|CP003278.1](#) | [D](#) Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhi str. P-stx-12, complete genome  
 Length=4768352

Sort alignments for this subject sequence by:  
 E value Score Percent identity  
 Query start position Subject start position

Score = 331 bits (179), Expect = 2e-87  
 Identities = 181/182 (99%), Gaps = 0/182 (0%)  
 Strand=Plus/Minus

```

Query 2      CACCTACTGATGTAIGCTTCGTTAATCCACGCCTTGTCTCAGGAAAAATTATCGGTAAG 61
|||
Sbjct 2688974  CACATACTGATGTAIGCTTCGTTAATCCACGCCTTGTCTCAGGAAAAATTATCGGTAAG 2688915

Query 62      AGGTTCTGACTACAGATGGGGCTATAGCTCAGCTGGGAGAGCGCCTGCTTTGCACGCAG 121
|||
Sbjct 2688914  AGGTTCTGACTACAGATGGGGCTATAGCTCAGCTGGGAGAGCGCCTGCTTTGCACGCAG 2688855

Query 122     GAGGTTCTGCGGTTTCGATCCCGCATAGCTCCACCATCTCGTGTAGTGTACGAAAAAATAC 181
|||
Sbjct 2688854  GAGGTTCTGCGGTTTCGATCCCGCATAGCTCCACCATCTCGTGTAGTGTACGAAAAAATAC 2688795

Query 182     TT 183
||
Sbjct 2688794  TT 2688793
    
```

## D) El par de oligonucleótidos diseñados para un fragmento del gen VirF sirvió para identificar a cepas de *Shigella*.

2 sequences (VirFSSonnei+Fv)

Results for:

Query ID: kl0274  
 Description: VirFSSonnei+Fv  
 Molecule type: nucleic acid  
 Query Length: 174

Database Name: nr  
 Description: All GenBank+EMBL+DDBJ+PDB sequences (but no EST, STS, GSS, environmental samples or phase 0, 1 or 2 HTGS sequences)  
 Program: BLASTN 2.2.26+

Other reports: [Search Summary](#) [Taxonomy reports](#) [Distance tree of results](#)

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
<a href="#">HE616529.1</a>	<i>Shigella sonnei</i> 53G plasmid A, complete genome	285	285	95%	6e-74	98%	
<a href="#">CP001384.1</a>	<i>Shigella flexneri</i> 2002017 plasmid pSFxv_1, complete sequence	285	285	95%	6e-74	98%	
<a href="#">CP001064.1</a>	<i>Escherichia coli</i> 53638 plasmid p53638_226, complete sequence	285	285	95%	6e-74	98%	
<a href="#">AF386526.1</a>	<i>Shigella flexneri</i> 2a str. 301 virulence plasmid pCP301, complete	285	285	95%	6e-74	98%	
<a href="#">AY206433.1</a>	<i>Shigella flexneri</i> plasmid pINV_F6_M1382 VirF (virF) gene, compl	285	285	95%	6e-74	98%	
<a href="#">AL391753.1</a>	<i>Shigella flexneri</i> virulence plasmid pWR100: from 1 to 213494	285	285	95%	6e-74	98%	
<a href="#">AF348706.1</a>	<i>Shigella flexneri</i> 5a plasmid virulence plasmid pWR501, complete	285	285	95%	6e-74	98%	
<a href="#">X16661.1</a>	<i>S. flexneri</i> 2a 140-megadalton plasmid virF gene	285	285	95%	6e-74	98%	
<a href="#">X58464.1</a>	<i>S. dysenteriae</i> virF gene	285	285	95%	6e-74	98%	
<a href="#">CP000037.1</a>	<i>Shigella boydii</i> Sb227 plasmid pSB4_227, complete sequence	285	285	95%	6e-74	98%	
<a href="#">CP000039.1</a>	<i>Shigella sonnei</i> Ss046 plasmid pSS_046, complete sequence	285	285	95%	6e-74	98%	
<a href="#">AY879342.1</a>	<i>Shigella flexneri</i> plasmid pSF5, complete sequence	285	285	95%	6e-74	98%	
<a href="#">M29172.1</a>	<i>S. flexneri</i> 2a plasmid virF locus encoding two ORFs, complete cd	285	285	95%	6e-74	98%	
<a href="#">CP001062.1</a>	<i>Shigella boydii</i> CDC 3083-94 plasmid pBS512_211, complete seq	279	279	95%	3e-72	97%	

> [gb|CP001064.1](#) **E** *Escherichia coli* 53638 plasmid p53638\_226, complete sequence  
 Length=225683

Features in this part of subject sequence:  
[transcriptional activator of virulence loci](#)

Score = 285 bits (154), Expect = 6e-74  
 Identities = 163/167 (98%), Gaps = 1/167 (1%)  
 Strand=Plus/Plus

```

Query 8      TTT-TATGCTTCGATGTCGGTAGCTTCTTCTTCTTCTTCTGATCAGATAAGGAAAGAT 66
            ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 218846  TTTATATACTTCGATATCGATAGCTTCTTCTTCTTCTGATCAGATAAGGAAAGAT 218905

Query 67     TGTTGaaaaaaaaCATCGAAGAGAGATGGCGCTTTCTGATATTTCAAATAACTTGAAATT 126
            ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 218906  TGTTGAAAAAAAAACATCGAAGAGAGATGGCGCTTTCTGATATTTCAAATAACTTGAAATT 218965

Query 127    ATCAGAAATAGCTGTTAGAAAAACGATTGGAGAGTGAAAAAATTAACAT 173
            ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 218966  ATCAGAAATAGCTGTTAGAAAAACGATTGGAGAGTGAAAAAATTAACAT 219012
    
```

> [gb|AF386526.1](#) **E** *Shigella flexneri* 2a str. 301 virulence plasmid pCP301, complete sequence  
 Length=221618

Features in this part of subject sequence:  
[VirF, member of the AraC family of transcriptional activa...](#)

Score = 285 bits (154), Expect = 6e-74  
 Identities = 163/167 (98%), Gaps = 1/167 (1%)  
 Strand=Plus/Minus

```

Query 8      TTT-TATGCTTCGATGTCGGTAGCTTCTTCTTCTTCTTCTGATCAGATAAGGAAAGAT 66
            ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 36800  TTTATATACTTCGATATCGATAGCTTCTTCTTCTTCTGATCAGATAAGGAAAGAT 36741

Query 67     TGTTGaaaaaaaaCATCGAAGAGAGATGGCGCTTTCTGATATTTCAAATAACTTGAAATT 126
            ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 36740  TGTTGAAAAAAAAACATCGAAGAGAGATGGCGCTTTCTGATATTTCAAATAACTTGAAATT 36681
    
```

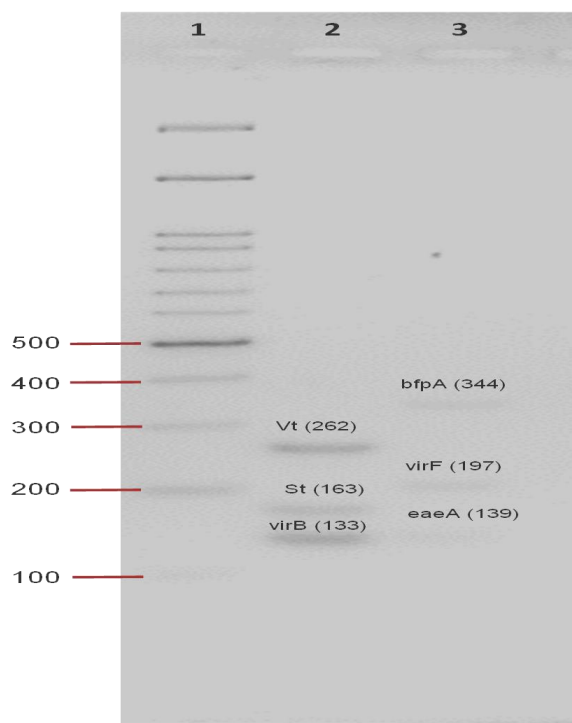
**Figura 8.** Análisis bioinformático (*BLAST*) de los genes secuenciados (A, B), *aggR* y *VT* de *E. coli*, (C), ITS de *Salmonella* y (D), *VirF* de *Shigella* en donde se muestra el porcentaje de identidad de cada uno de estos.

### 5. PCR Múltiple punto final para el diagnóstico de Enterobacterias.

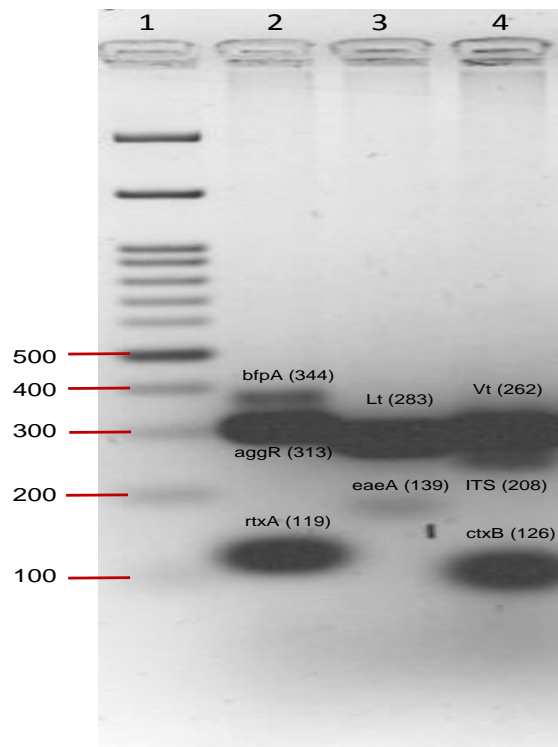
Una vez realizada la técnica de PCR para cada uno de los genes de los diferentes subtipos de *E. coli* y diferentes especies patogénicas de los géneros de *Salmonella*, *Shigella* y *Vibrio*, se estandarizó la PCR multiplex. Esto, como ya se dijo con la finalidad de que en una sola mezcla de reacción se logaran amplificar la mayoría de los genes.

Como podemos ver en las figuras 9 y 10 se obtuvieron los amplificadores de los genes VT, ST y VirB [Fig. 9] (carril 2) para EHEC, ETEC, EIEC y *Shigella* respectivamente. En tanto que otra combinación permitió visualizar los productos de la PCR para los genes bfpA, VirF y eaeA [Fig. 9] (carril 3) para EPEC, EIEC y EHEC respectivamente. De igual forma en otras mezclas se logró amplificar 3 genes bfpA, aggR y rtxA [Fig.10] (carril 2) para EPEC, EAEC y *Vibrio* respectivamente. Al igual que en otra reacción se logró amplificar eaeA y LT [Fig.10] (carril 3) para EHEC, EPEC y ETEC respectivamente. Por último, se amplificaron en otra mezcla de reacción los genes VT, ITS y ctxB [Fig.10] (carril 4) para EHEC, *Salmonella*, y *Vibrio*.

Estos resultados aportan claramente información que nos permite proponer el uso de este método para la identificación múltiple de subtipos de especies diferentes de enteropatógenos, lo que sería de gran utilidad en el establecimiento de protocolos de diagnóstico con ahorro de recursos y tiempo, el cual podría ser propuesto a las autoridades sanitarias para su validación e implementación.



**Figura 9.** Gel de agarosa al 2% en donde se corrieron los productos de la PCR múltiple que podría ser utilizada como un nuevo método o diagnóstico. En el carril 2 se observa que en la misma reacción de PCR se logró la identificación de los subtipos EHEC (gen *Vt*), ETEC (gen *St*), EIEC y el género *Shigella spp* (gen *virB*). En el carril 3 se observa que utilizando otra combinación de oligos se pueden identificar los subtipos EPEC (gen *bfpA*), EIEC (gen *virF*) y EHEC (gen *eaeA*).

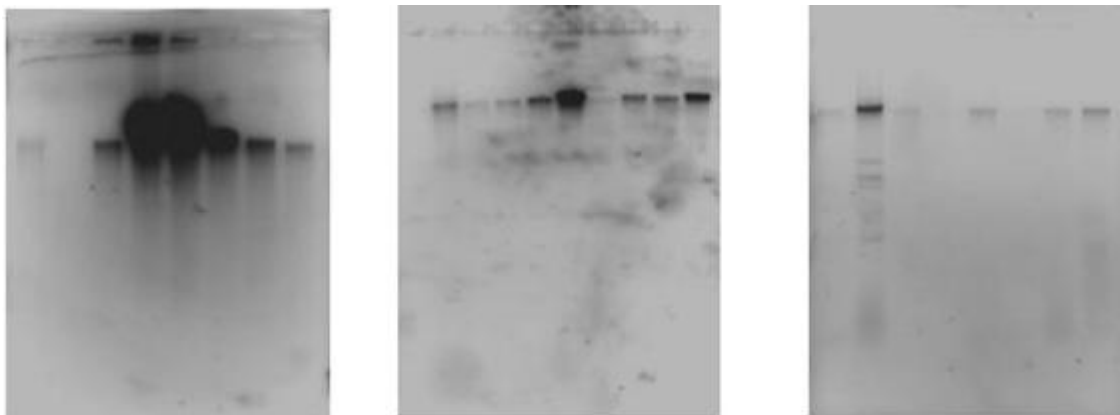


**Figura 10.** Gel de agarosa al 2% en donde se corrieron los productos de amplificación de la PCR múltiple. En el carril 2 se observa que en la misma mezcla de reacción se amplificaron los fragmentos genes *bfpA*, *aggR* y *rtxA*; en el carril 3 la mezcla de los genes *eaeA* y *LT* y en el carril 4 la combinación de oligos para la mezcla de los genes *VT*, *ITS* y *ctxB*.

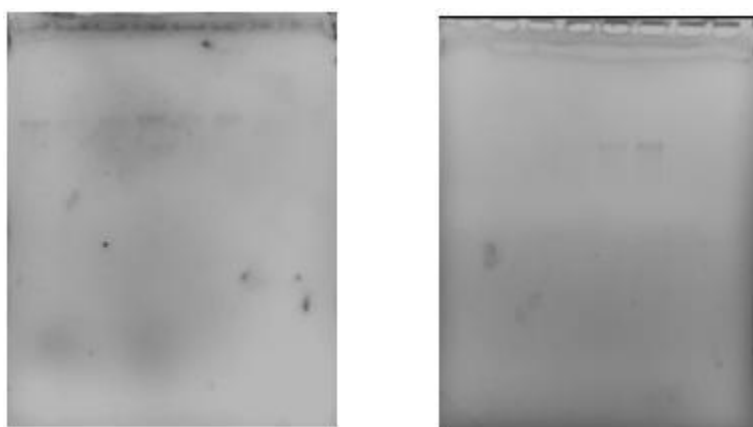
### **6. Aplicación del método estandarizado de PCR Multiple para la amplificación de genes de virulencia de enteropatógenos en muestras clínicas de infantes para utilizarse en el diagnóstico de EDA's.**

Después de estandarizar las diferentes PCR multiplex de los genes de virulencia, el siguiente paso fue poner a prueba el diagnóstico para verificar la especificidad utilizando muestras clínicas de infantes con diagnóstico positivo a enfermedades diarreicas; para con esto posteriormente proponer un nuevo método diagnóstico de biología molecular de bacterias enteropatógenas.

Primero se obtuvo el ADN de los aislados clínicos por los dos métodos descritos, en el apartado de material y métodos [Figuras 11 y 12], una vez obtenido el DNA se procedió a correr las muestras de los ácidos nucleicos para verificar la estabilidad y pureza.



**Fig.11** Geles de agarosa al 1 % de los diferentes ADN, obtenidas mediante la extracción con el kit de extracción de DNA genómico de QIAGEN correspondiente a aislados clínicos de pacientes.



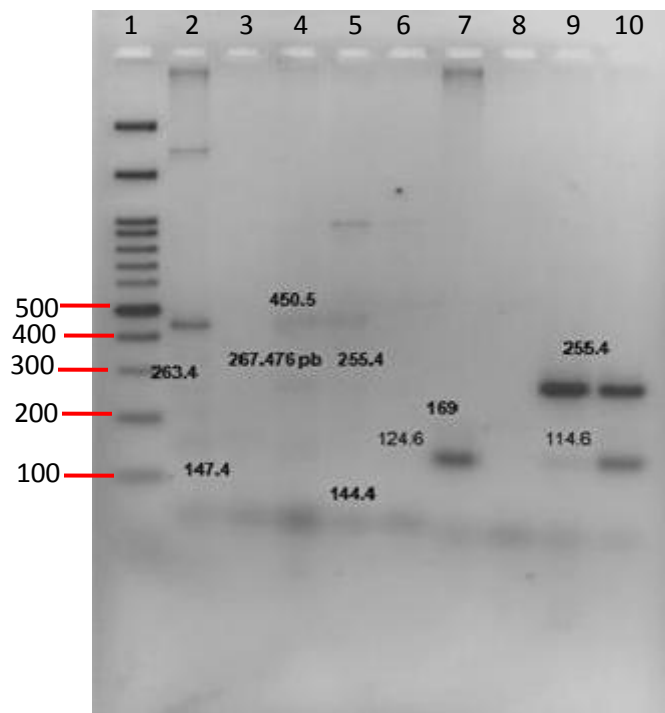
**Fig.12** Geles de agarosa al 1% de las diferentes ADN, obtenidos mediante la extracción con fenol correspondiente a aislados clínicos de pacientes.

Después de haber obtenido el ADN de cada una de las muestras clínicas se evaluó la viabilidad que tendría el método de diagnóstico por PCR múltiple en el uso clínico. Para lo cual, se efectuó el diseño de la PCR utilizando en está 28 muestras clínicas, previamente identificadas con base en el corrimiento electroforético y cuando se observó mayor cantidad de ADN y en mejores condiciones.

Como primer paso se realizaron mezclas de 5 ADN`s de los 28 seleccionados, esto se realizó por duplicado y a esta mezcla se le añadieron cada uno de los pares de primers, para un ensayo múltiple de los genes de virulencia VT, ITS, VirB, esthA; mientras que un segundo múltiple contenía los pares de primers de los genes bfpA, VirF, aggR, eaeA.

En los resultados de cada una de estas PCR múltiples se puede verificar la ausencia o presencia de los diferentes genes de virulencia que identifican a las cepas de *E.coli*, *Salmonella*, *Shigella*, *Vibrio cholerae*. Esto con la ayuda de un marcador de talla molecular con el cual se compararon cada uno de los fragmentos de los genes, los cuales se habían diseñado para un tamaño específico [Figura 13].

Lo que podemos observar es que en cada uno de los carriles hay presencia de amplificados cercanos al tamaño de los fragmentos de los genes utilizados en cada reacción del múltiple.



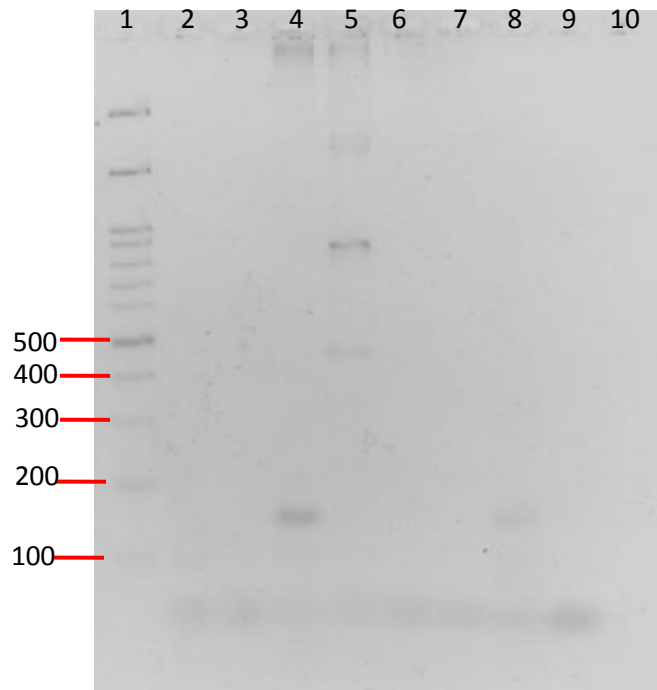
**Fig. 13** Gel de agarosa al 2% en donde se visualizan los productos de la PCR múltiple utilizando el ADN de aislados clínicos. En el carril 1 está el marcador de talla molecular, en cada carril del 2 al 10 está la mezcla de 5 diferentes ADN's. Del carril 2 al 6 mezcla del ADN mencionado con la mezcla de los pares de oligos que se utilizaron VT, ITS, VirB y esthA. En los carriles del carril 7 al carril 10 la mezcla del ADN mencionado con la mezcla de los pares de oligos de bfpA, VirF, aggR, eaeA. En los carriles 2-7 y 9,10 se presentan amplificados muy cercanos al tamaño esperado de los fragmentos de los genes. En los carriles 3 y 8 no se observan amplificados.

## Licenciatura en Promoción de la Salud

---

Por otra parte, se realizaron PCR múltiples utilizando un solo ADN de cada muestra clínica, con cada una de las dos mezclas de los pares de oligos que ya mencionamos. En el carril 1 se encuentra el marcador de talla molecular, del carril 2 al 10 se observan los amplificadores de los genes. En el carril 4 VirB (133pb) esthA (166pb), en el carril 5 ITS (208 pb) y en el carril 8 esthA (166 pb).

En los carriles restantes (3, 6, 7, 9 y 10) no se puede apreciar la amplificación de algún fragmento en el corrimiento electroforético [Figura 14].



**Fig.14** Gel de agarosa al 2% en donde se observan los amplificados obtenidos con el primer Múltiple realizado con el ADN de los aislados clínicos. En este gel podemos observar la presencia de 4 amplificados en diferentes carriles, cada uno corresponde al tamaño esperado de acuerdo al diseño de los oligos. En el carril 1 el marcador de talla molecular, carril 4 amplificado de dos bandas que corresponden a los tamaños de los fragmentos VirB y esthA, carril 5 amplificado de ITS y carril 8 amplificado que corresponde a esthA.

En los carriles restantes (2, 3, 6, 7, 9 y 10) no se puede apreciar la amplificación de algún fragmento en este primer corrimiento electroforético.

Por causas ajenas al propio proyecto y al lugar en donde se estaba realizando este trabajo, no se pudo continuar con los ensayos de estas PCR`s múltiples. Tampoco se pudieron hacer más experimentos para corroborar la especificidad de cada uno de los pares de oligos para identificar cepas y subtipos de *E.coli*, *Salmonella*, *Shigella*, *Vibrio cholerae*. No obstante, con los resultados expuestos hasta aquí se puede verificar en un principio la alta especificidad y reproducibilidad de la técnica, en las cepas tipo; y podría ser que en un futuro ésta pueda ser utilizada en más muestras clínicas, con el fin de realizar una Vigilancia Epidemiológica más adecuada e idónea. Estos resultados presentados aquí con algunas muestras clínicas son parciales, pero pueden ser abordados o complementados en futuras tesis.

### DISCUSIÓN

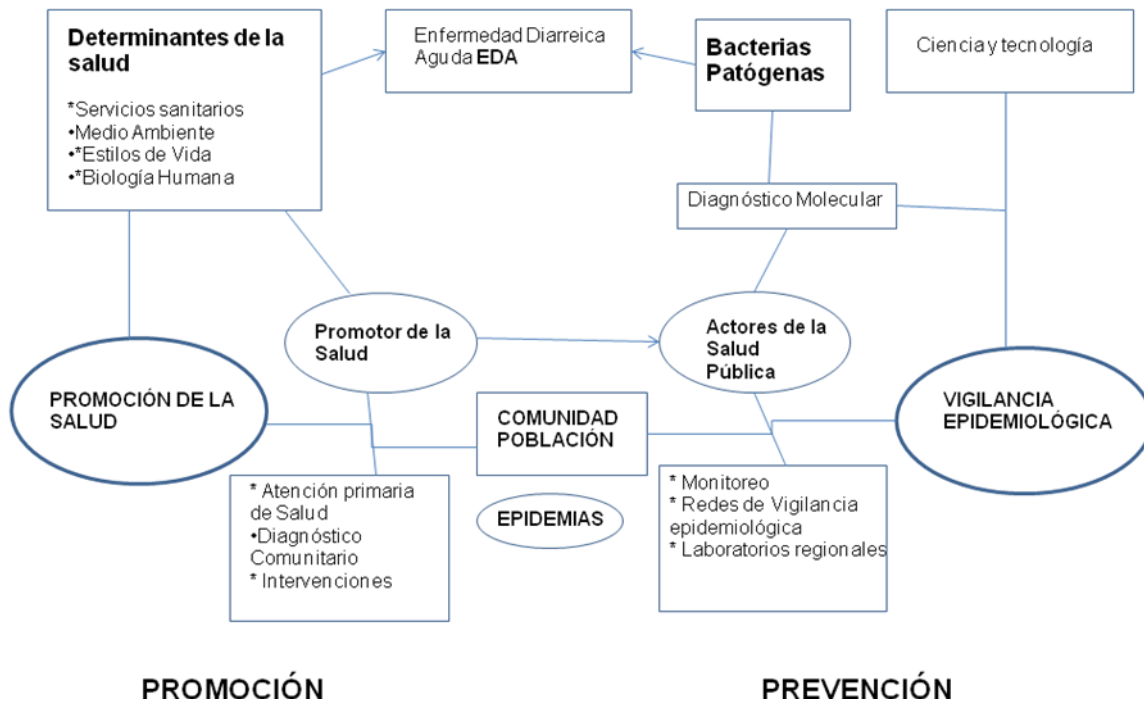
Tradicionalmente los problemas de salud pueden ser abordados con una lógica basada en el uso de tecnologías para la prevención, el diagnóstico y el tratamiento de las enfermedades. Aunque son eficaces, en el plano individual, -ya que son trascendentes en su identificación y atención-, están limitadas y desvinculadas con relación a las necesidades y contextos sociales de salud que intervienen en la aparición y persistencia de tales enfermedades; y es aquí, donde el campo de la Promoción de la Salud cobra importancia. Es a través de esta disciplina, que hoy podemos incorporar la idea de atender las necesidades sociales en salud de carácter colectivo, superando las posturas que establecen que el problema de salud es solo la cura de una enfermedad, o bien el daño o riesgo de un individuo solo en el terreno biológico. Esta visión establece como una necesidad el abrir el tema de Salud a su contexto social y a las problemáticas y necesidades actuales.

El reto en esta Tesis ha sido doble. Por un lado, su desarrollo experimental en el terreno biológico ha permitido conocer la perspectiva tecnológica para abordar un problema de Salud Pública como es la Enfermedad Diarreica Aguda, a través del desarrollo de un método molecular para la detección de enterobacterias. Por otro lado, teóricamente, la contextualización de las EDA's a través de la Promoción de la Salud, para identificar su campo de acción bajo su visión integradora. De este modo queremos discutir la importancia del método experimental que aquí reportamos, como una herramienta para la Vigilancia Epidemiológica y discriminar sus alcances respecto de las acciones que por su parte podría realizar el Promotor de la Salud. En el Diagrama 1 hemos integrado dos visiones para un mismo problema de Salud Pública. Hemos puesto a las EDA's como el tema central, en torno al cual se desarrollan las estrategias para su abordaje, buscando así discutir el papel multidisciplinario que puede alcanzar el Promotor de la Salud.

Primeramente, podemos plantearnos que los principales agentes infecciosos enteropatógenos que contribuyen en México a mantener las tasas de morbilidad y mortalidad de las EDA's, han sido definidos como agentes etiológicos re-emergentes debido a determinantes como la migración, resultado de la

globalización, las condiciones socioeconómicas y ambientales, así como la pobreza, inequidad y saneamiento deficiente (Promoción de la Salud: Una antología, 1999). Así que tenemos por un lado, un elemento biológico que determina el Proceso Salud-Enfermedad, para el individuo y por otro lado, el conjunto de Determinantes de la Salud que inciden en la aparición, emergencia, reemergencia y prevalencia del problema en su dimensión social.

**Diagrama 1. Dos campos estratégicos para el abordaje de las EDA's**



## El valor de un nuevo método de diagnóstico molecular en la Vigilancia epidemiológica

Consideramos que esta tesis tiene un valor en el terreno tecnológico, ya que logramos el desarrollo de un método de diagnóstico usando biología molecular para la detección de genes de enterobacterias causantes de EDA's. Su aplicación en la cadena de acciones para la Vigilancia Epidemiológica constituye parte de la Prevención en Salud. Hay que resaltar que su uso no adquiere importancia en el diagnóstico médico en sí mismo, sino en el diagnóstico con valor epidemiológico,

de modo que desde este punto de vista podemos considerar que su establecimiento puede representar una acción complementaria a los trabajos que podrían realizarse desde la Promoción de Salud, particularmente en los casos de un brote epidémico.

El método presenta ventajas sobre los métodos tradicionales, ya que en la actualidad el diagnóstico para Enterobacterias, incluyendo varias especies de *Vibrio spp*, *Salmonella ssp.* y *Shigella ssp.*, se realiza mediante protocolos establecidos con metodologías microbiológicas de aislamiento de las bacterias y un posterior análisis bioquímico y serológico. Solo bajo ciertos criterios, se recurre a los métodos moleculares. Cabe resaltar que en estos protocolos no están incluidos los diferentes grupos de *E. coli* enteropatógenos, salvo si hay sospecha de algún brote epidémico (Secretaria de Salud, 2016). Tales metodologías para el diagnóstico de enterobacterias, en comparación con este nuevo método molecular que hemos desarrollado, presentan varias desventajas, como son su costo y el tiempo de espera para obtener el resultado basado en cultivos bacterianos. Que no sobra decir que en los casos de brotes epidémicos resulta ineficaz. Esto demuestra la relevancia de los resultados de esta tesis, dado que aquí se ha desarrollado un método molecular que sirve para la identificación y subtipificación de los principales agentes etiológicos de las EDA's.

De modo que el método desarrollado en este trabajo nos permite identificar genes de virulencia de *E.coli* que diferencian entre los cinco subtipos (EPEC, ETEC, EHEC, EIEC, EAEC); especies del género de *Salmonella*: (*S. typhi* y *S. typhimurium*); especies de género *Shigella*: (*S. sonnei* y *S. flexneri*); especies del género *Vibrio* tales como: *V. cholerae* 01 Inaba, *V. cholerae* no 01 0139, *V. cholerae* no. 01 negativo a 0139, *V. parahaemolyticus*. Lo que significa que esta metodología podría representar un gran avance en la detección con un alto nivel de sensibilidad y especificidad de patógenos entéricos.

Para ello nos basamos en el uso de secuencias específicas de ADN de genes de virulencia. Empleando la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), fue posible identificar diferentes géneros y subtipos de enteropatógenos.

## Licenciatura en Promoción de la Salud

---

Los resultados presentan datos importantes, ya que a nivel de cepas de laboratorio, la prueba fue capaz de identificar las enterobacterias de referencia y de distinguir de entre éstas los subtipos a los cuales pertenecían.

Posteriormente, se probó el método experimentalmente con algunos aislados clínicos donados por instituciones de salud y que provenían de pacientes con un diagnóstico positivo a EDA's mediante diagnóstico tradicional. El método es capaz de identificar y distinguir las cepas que se encontraban en las muestras diarreicas de los pacientes. Cabe mencionar que al aplicar este método no se necesita una muestra grande de materia fecal para realizar el diagnóstico cuando se emplea. No obstante, es importante señalar que es necesario realizar más experimentos para probar la reproducibilidad de la técnica. Por otro lado, el método detecta con especificidad bacterias aisladas de muestras clínicas de diferente género en una misma reacción de PCR múltiple, lo que proyecta su alto potencial para el diagnóstico epidemiológico.

Los datos epidemiológicos de las EDA's que actualmente tenemos siguen evidenciando su prevalencia en México, esto se ve reflejado por el número de casos y las tasas de mortalidad que se continúa presentando, aunque se tendría que reconocer que los datos podrían registrarse con mayor prevalencia por un posible mal diagnóstico. Las cifras muestran que las EDA's siguen siendo una de las principales causas de mortalidad en menores de 5 años. (Subsecretaría de Prevención y Promoción de la Salud, 2008)

Estos resultados experimentales en su conjunto, determinan que el método que aquí proponemos representa, por lo tanto, una excelente herramienta que puede servir para la Vigilancia Epidemiológica en México.

Sabemos que la Vigilancia Epidemiológica tiene el propósito de recopilar datos estadísticos sobre la prevalencia, emergencia, o re-emergencia de enfermedades infecciosas, puede establecer varias estrategias, tales como las que se basan en aplicar cuestionarios a la población, implementar sistemas Centinela, a través de laboratorios y clínicas o la Vigilancia basada en los laboratorios Centrales de

Diagnóstico. Esta última estrategia puede ser a su vez parte de un sistema de redes de Vigilancia. Así entonces, la tecnología desarrollada a través de la optimización de un método molecular para subtipificar enteropatógenos, podría formar parte esencial de las estrategias seguidas en los laboratorios para hacer frente a un mejor monitoreo epidemiológico.

Esto mismo con la idea de mejorar la toma de decisiones por los actores centrales de las instituciones de salud ante una contingencia epidémica. Actualmente la Vigilancia Epidemiológica en México depende del SINAVE y a través del CEVECE genera un número de datos estadísticos sobre 114 enfermedades incluyendo las EDA's. Este sistema lo que arroja es información epidemiológica sobre la prevalencia de estas 114 enfermedades. En estos mismos se refleja el hecho de que siguen faltando políticas, planes y programas en salud, además de acciones desde la propia Promoción de la Salud que puedan ser eficientes para combatir y controlar estos patógenos causantes de enfermedades entéricas principalmente en niños.

### **La VE para el problema de las EDA's y su vínculo con la PS.**

La Vigilancia Epidemiológica nos permite realizar un registro continuo para el seguimiento del estatus sanitario o de determinantes de riesgo en una población, así para las EDA's sería importante la implementación de un instrumento de registro de los síntomas primarios, datos generales: edad, sexo, estado nutricional y otros relacionados a su calidad de vida, como los servicios y estado de la vivienda, condiciones ambientales, sociales y culturales de sus alrededores, lugar geográfico en el que vive y la fauna con la que se está en contacto. La recopilación de los datos podría llevarse a cabo en casas, escuelas, mercados o lugares de trabajo, considerados como puntos clave de referencia para el monitoreo epidemiológico de las EDA's y los determinantes que las puedan causar.

Parte de los objetivos de ésta tesis formaron parte de un proyecto para la creación de una Red de Vigilancia Epidemiológica donde se proponía la creación de una

red social de Vigilancia Epidemiológica digital. La idea se basa en la Participación Ciudadana para el llenado de datos, creando una red de vigilancia alterna a los instrumentos aplicados por un organismo de salud. A partir de esta base de datos, éstos se integrarían a una red de vigilancia mayor en donde se tendría el registro y control de nuevos casos cuyas muestras se analizarían para EDA's por medio del método de diagnóstico molecular desarrollado y reportado en esta tesis, buscando identificar el agente etiológico de posibles brotes epidémicos en zonas de riesgo y su expansión en la población.

Ahora bien, si la Vigilancia Epidemiológica cuenta con instrumentos que recaban la información sobre el estado de salud de una población y a su vez genera los insumos para que los actores sociales de la toma de decisiones creen políticas de Salud, resulta interesante vincular el papel que podría jugar la Promoción de la Salud en el problema de las EDA's en particular, e incluso en cualquier otro problema de Salud Pública. De modo que esta propuesta debe ser un **punte** que reorienta dichas políticas a partir de haber generado mejores diagnósticos comunitarios de salud, pues permitiría proponer acciones desde los actores sociales involucrados de Salud dado que los niveles de intervención de la PS profundizan en los Determinantes Sociales de la Salud y facilitaría el trabajo en conjunto tanto para la promoción como para la prevención, apuntando al objetivo común de alcanzar mejores niveles de salud en la población.

### **La PS para el problema de las EDA's.**

En esta tesis, además de mostrar nuestros resultados sobre la eficiencia del diagnóstico molecular que desarrollamos para la identificación de tipos y subtipos de enteropatógenos, se ha construido un marco teórico, en el que un problema de salud como lo son las EDA's puede ser observado de manera integral abordándolo desde las perspectivas propias de la Promoción de la Salud y no solo como una prevención de la enfermedad. Identificando las acciones donde intervenga activamente la comunidad en su Proceso Salud-Enfermedad, sus estilos de vida y sus comunidades.

## Licenciatura en Promoción de la Salud

---

Si existiera un control efectivo de las EDA's por los actores sociales actuales y las autoridades encargadas de la toma de decisiones en salud, las cifras epidemiológicas mostrarían una disminución en el número de casos. Este hecho nos lleva a las propuestas que desde la Promoción de la Salud, buscan identificar los potenciales para elevar los niveles de salud de las poblaciones abarcando desde aspectos biológicos de un determinado padecimiento hasta los Determinantes Sociales de la Salud.

De modo que la Promoción de la Salud buscaría empoderar a la población en el tema de las diarreas, identificando sus agentes etiológicos, promoviendo las medidas de prevención y educación para la salud, buscando que las personas se hagan partícipes en el Proceso Salud-Enfermedad. Así mismo, la Promoción de la Salud buscará incidir con las políticas de salud que se generen para este problema de salud, ya que en la actualidad las políticas existentes carecen de la visión integradora que tiene la Promoción de la Salud.

La visión de la Promoción de la Salud, nos hace recordar que hay diferentes aspectos que en suma nos debieran proporcionar un mejor abordaje en todos los temas de salud. Primero, el promotor siempre tendrá en la mente que la salud va más allá de su dimensión biológica ya que en el proceso de la salud intervienen Determinantes Sociales como son: equidad, calidad de la vivienda, políticas públicas saludables, medio ambiente sano, economía estable, educación, esparcimiento, trabajo, mejor transporte, seguridad, etc., que en suma, lograrán que los individuos y las comunidades en su conjunto logren aspirar a tener una mejor calidad de vida.

Sabemos que los enfoques de Promoción de la Salud, con base en sus intervenciones actúan desde tres niveles básicos en una población: individual, colectivo y social. Si tomamos a las EDA's como un problema de Salud Pública, en el primer nivel (individual), la Promoción de la Salud deberá buscar que el individuo tenga nuevos estilos de vida y un mayor autocuidado donde se alcance un control de su salud con mayor consciencia y la manera de elevar su nivel. Siendo éstos, Determinantes de la Salud los que más influyen y los más

## Licenciatura en Promoción de la Salud

---

modificables mediante actividades de la PS. Así, en el caso de las EDA's, la Promoción de la Salud trazaría estrategias de intervención mediante talleres, pláticas y seminarios en los que se informe a las personas sobre los riesgos que conllevan las infecciones por enteropatógenos, las vías de contaminación (principalmente el agua), el grado de saneamiento del medio ambiente, la higiene sobre la preparación de alimentos, así como reconocer los síntomas de las EDA's para la inmediata rehidratación oral. A nivel preventivo, la Promoción de la Salud señalaría a las personas, la importancia de los buenos hábitos, tratando de destacar lo bueno de sus prácticas cotidianas, pero aplicando la información aprendida para su Salud.

En el segundo nivel (colectivo) estaríamos planteando que la Promoción de la Salud pretende generar un apoyo mutuo en las comunidades, tanto dentro como fuera de éstas, donde lo que predomine sea la ayuda y el mejoramiento de los niveles de salud de manera colectiva, mediante la concientización de los ciudadanos para que todos aspiren a obtener un bien común y no solo por beneficios personales. Así, en el caso de las EDA's, la Promoción de la Salud tendrá un papel empoderante en el trabajo dentro de las comunidades, ya que buscará identificar a los líderes comunitarios con los que se pueda colaborar de manera eficiente buscando el mejoramiento de la salud de los integrantes de dicha comunidad mediante la creación de redes de ayuda para la identificación de los Determinantes de la Salud que estén incidiendo negativamente en su Proceso Salud-Enfermedad. Este nivel de intervención está ejemplificado con la formación, desde 1993 de la Red Mexicana de Municipios por la Salud, cuyos programas son financiados para llevar a cabo proyectos tales como: comunidades saludables, mejoramiento del medio ambiente, control de zoonosis, educación para la salud, saneamiento básico, uso y consumo adecuado del agua; en donde la comunidad tiene una participación importante (Salud en las Américas, 2007).

En el tercer nivel (social) las estrategias que predominan involucran tanto al Promotor de Salud, las instancias de representación política como a las comunidades, para incidir de una manera positiva en la creación de nuevas

## Licenciatura en Promoción de la Salud

---

políticas, planes o programas saludables y en la reorientación de los servicios de salud. Para lograr esto se parte de procesos como “*advocacy*” (abogacía) entendido esto como la defensa y promoción dirigida a movilizar a la ciudadanía en apoyo de una causa ó problema que demande atención y solución por parte de los líderes políticos, de acompañamiento y de exigibilidad de derechos (Silva, 2011).

Al respecto, la 8a Conferencia llevada a cabo en Indonesia de Promoción de la Salud cuyo lema fue “Salud en Todas las Políticas” a dimensionado claramente el papel de todos los sectores implicados en la Salud y su enfoque para las políticas públicas en la toma de decisiones, buscando evitar impactos perjudiciales para la salud con el fin de mejorar para la población la equidad en salud. Además de que busca mejorar la rendición de cuentas de los políticos. Con ello se pretende enfatizar sobre las consecuencias de las políticas públicas en los sistemas de salud, los Determinantes de la Salud y el bienestar (OMS, 2013).

Así entonces, para el caso de las EDA’s, desde la Promoción de la Salud, en una comunidad afectada por este padecimiento, lo que se espera es que una vez identificados los determinantes que estén incidiendo negativamente en su proceso Salud-Enfermedad, se pueda generar un estrategia de intervención para lograr que esto se convierta en una nueva política, planes o programas a realizar, mediante el acompañamiento del Promotor de la Salud, y que esto logre incidir de manera positiva en el mejoramiento de su calidad de vida de dicha comunidad.

## Licenciatura en Promoción de la Salud

### Propuestas de acciones e intervenciones de la PS para el problema de las EDA's.

De acuerdo a la historia natural de la enfermedad, se pueden identificar varios momentos de intervención con el objeto de disminuir la morbilidad y mortalidad de la EDAs.

**Tabla 18. Historia Natural de la Enfermedad.**

HISTORIA NATURAL DE LA ENFERMEDAD			
<b>Agente Biológico</b>  Enteropatógenos	<b>Hospedero</b>  Niños menores de 5 años	<b>Medio Ambiente</b>  Social: falta de drenaje, pobreza, inequidad  Natural: fauna nociva, aguas residuales, brotes epidémicos	<b>Síntomas en el curso de la enfermedad</b>  Diarrea  ↓  Muerte
<b>Primer Nivel de Prevención</b>			<b>Segundo y Tercer Nivel de Prevención</b>
<b>Promoción de la Salud</b>	<b>Vigilancia Epidemiológica</b>	<b>Educación para la Salud</b>	<b>Diagnóstico y Rehabilitación</b>
*Diagnóstico *Intervención comunitaria *Concientización social *Empoderamiento	*Redes de Vigilancia Epidemiológica *Monitoreo *Diagnóstico de Biología Molecular	*Talleres y cursos sobre higiene, alimentación y vacunación  *Manejo de residuos  *Estilos de vida	*Intervención médica especializada para el tratamiento y la rehabilitación

(Modificado de Fascinetto Constantini José Ricardo Martín en [www.inspvirtual.mx/centrodocumentacion/.../spt-downloadfile.php?](http://www.inspvirtual.mx/centrodocumentacion/.../spt-downloadfile.php?))

Aunque las acciones a seguir, de acuerdo con los niveles de prevención quedan bien establecidas, nosotros hacemos énfasis en las medidas preventivas asociadas al primer nivel de intervención. Ya que es aquí donde cobra valor la Promoción de la Salud.

Entre los determinantes plenamente identificados que se relacionan de manera directa con la ocurrencia de diarreas está el saneamiento básico deficiente, casi

siempre sinónimo de la pobreza y de falta de oportunidades para las personas, el poco o nulo control prenatal, el bajo impacto en la promoción de la lactancia materna exclusiva y la ablactación muy temprana (antes de los 4 meses) o tardía (después de los 8 meses).

El suministro de agua potable y la eliminación sanitaria de las excretas contribuyen a reducir el riesgo de infección intestinal. Sin embargo, esta condición no es suficiente para eliminar completamente la probabilidad de enfermar ya que se necesitan además, la concurrencia de otras características individuales, familiares y del entorno para lograr una mejor intervención y darle una solución factible a este problema de Salud (Romero Cabello, 2002).

Por otro lado, desde metodologías cuantitativas y cualitativas como (entrevistas, cuestionarios, encuestas, talleres, foros entre otros) se debe abordar el problema de las EDA's, esto nos permitiría obtener un diagnóstico comunitario con el que se definirían los Determinantes de la Salud que estuvieran involucrados en el Proceso Salud-Enfermedad de las EDA's y con esto poder generar una mejor solución para disminuir los índices de esta enfermedad.

Un aspecto a considerar para el abordaje de las EDA's con un enfoque de Promoción de la Salud, es ubicar las características y condiciones de la población con la que se trabaje y definir qué propuestas de intervención de Promoción de la Salud convienen más, de acuerdo con las características de la población.

Reconociendo que los alcances y las acciones de la Promoción de la Salud, son el resultado de diferentes abordajes teóricos y metodológicos y el Promotor de la Salud cuenta con enfoques y herramientas que le permiten comprender y abordar los procesos que intervienen en la Salud (biológicos, sociales, culturales, psicológicos o políticos) por lo que las propuestas de intervención se construyen desde un análisis e interpretación contextual de los problemas de salud enfermedad.

En general, el Promotor de la Salud maneja elementos biológicos y médicos o epidemiológicos; y complementa sus observaciones, interpretaciones y análisis

con enfoques y metodologías de las ciencias sociales que le permiten trabajar la Salud a nivel individual y colectiva, lo que le permite incidir en la dirección, las prácticas de salud, la planificación, la supervisión y el control sobre un problema de Salud Pública, como podría ser en el caso de las EDA's.

Finalmente en esta tesis, reportamos el desarrollo de un método experimental para la detección de patógenos entéricos, se ha contextualizado la etiología de las EDA's como un problema de Salud Pública, con lo que no solo justificamos el desarrollo de este método y sus alcances como un instrumento de las estrategias de la Vigilancia Epidemiológica, sino que se expone la discusión que genera este problema, desde un enfoque integral basado en la Promoción de la Salud, cuyos paradigmas oscilan entre la intervención comunitaria hasta la reorientación de las políticas de salud prevalecientes.

Este trabajo nos permitió obtener un método diagnóstico, que en un contexto epidemiológico puede representar para algunos actores los insumos para establecer una política de salud o reorientar las ya existentes. En otra fase, bajo nuestro enfoque, se plantea la idea de aportar nuevas estrategias epidemiológicas para la intervención de las comunidades que participen activamente en el monitoreo de las EDA's tomando en cuenta los Determinantes Sociales, tales como el medio ambiente, la pobreza y la migración, los cuales puedan ser insumos para definir un mapa en el que el diagnóstico molecular y social converjan.

### CONCLUSIONES

- En esta tesis hemos abordado un problema de Salud Pública en relación a los agentes patógenos que causan las Enfermedades Diarreicas Agudas. Con base en una investigación teórico-experimental hemos desarrollado un nuevo método molecular para la identificación de Enterobacterias.
- Utilizando las bases de datos existentes para los genomas de bacterias pudimos identificar secuencias de genes de virulencia específicos, con las cuales realizamos un análisis comparativo de los diferentes subtipos de enterobacterias con la idea de obtener marcadores moleculares capaces de hacer una diferenciación entre cepas.
- Mediante el uso de la PCR múltiple y con base en las secuencias de genes de virulencia específicos se logró amplificar una batería de fragmentos de ADN específicos, correspondientes a genes de virulencia para las diferentes cepas de *E. coli* y sus grupos, además de *Shigella spp.*, *Salmonella spp.* y *Vibrio spp.*
- De manera complementaria, basándonos en la técnica de PCR multiplex, logramos la amplificación de al menos tres genes diferentes en una misma reacción, gracias a la combinación de pares de oligonucleótidos, lo que apunta a ser un método de diagnóstico con amplias ventajas.
- Como un primer acercamiento al uso de este nuevo método molecular de diagnóstico para enteropatógenos en muestras clínicas, se verificó su especificidad y si posteriormente dicha estrategia diagnóstica se implementa, tal vez podría realizar una Vigilancia Epidemiológica dirigida por estrategias de promoción de la salud.

## Licenciatura en Promoción de la Salud

---

- El desarrollo de un nuevo método molecular para el diagnóstico de subtipos de Enterobacterias, rebasa a las técnicas bioquímicas y serológicas usadas actualmente; y constituye una herramienta básica para la Vigilancia Epidemiológica, al considerar su implementación como parte de las estrategias ante un brote epidémico de EDA´s.
- Se propuso una estrategia para el abordaje de las EDA´s desde la perspectiva de la Promoción de la Salud que incluye enlazar los instrumentos de la Vigilancia Epidemiológica ubicados ante el fenómeno de la salud colectiva y los mecanismos de la Promoción de la Salud que intervienen de manera más constante en la población; por cuanto las EDA´s son resultado de los Determinantes Sociales de la Salud.

REFLEXIÓN FINAL

**“No podemos seguir cayendo en el error de que solo una Promoción de la Salud es la idónea, más allá de discursos, más allá de los contenidos de la licenciatura, tenemos que entender que la Promoción de la Salud, por ser una disciplina muy flexible y multidisciplinaria en comparación con otras del área de salud, puede ser vista como una herramienta, una teoría y/o una práctica. Por lo tanto, no existiría lugar a decir cuál es la promoción más o menos adecuada. Porque podemos creer en una hegemonía, en una emancipación o en un empoderamiento o en algún otro tipo de Promoción pero lo que al final a mi parecer importa son dos cosas: una, aportar nuevas herramientas al paradigma de la Nueva Salud y la no subordinación a la enfermedad. Además de abrir el concepto de Salud, donde se incluya cada aspecto y cada situación con la que estén en contacto los individuos, colectivos y la sociedad. Como número dos es que no importa a qué corriente de la Promoción de la Salud pertenezcamos o en cual creamos, lo que a las personas realmente les interesa es que al intervenir en ellas o en sus comunidades les ayudemos a mejorar su salud sin importarles la carga ideológica desde la cual lo hagamos”**

**(Isai, 2014).**

## ANEXO

### 1. Medio Agar Eosina y Azul de Metileno (Eosin-Methylene Blue Agar-EMB).

El medio EMB solo permitió el crecimiento de bacilos gramnegativos, principalmente de la Familia Enterobacteriaceae, inhibiendo el crecimiento de las bacterias Gram positivas. Debido, a sus componentes nos permite saber por la coloración de las colonias si los microorganismos que crecen fermentan lactosa o sacarosa. Si las bacterias fermentan lactosa o sacarosa, acidifican el medio y la eosina vira dando lugar a la aparición de colonias oscuras, de color rosado a verde brillante. Las bacterias que no fermentan ni lactosa ni sacarosa originan colonias claras o transparentes [[ecaths1.s3.amazonaws.com/.../Clase%20%20-%20Seminarario.pdf](https://ecaths1.s3.amazonaws.com/.../Clase%20%20-%20Seminarario.pdf)]. Con este medio fue posible diferenciar a las bacterias pertenecientes a la especie *E. coli*, ya que la mayoría presentan un metabolismo de lactosa positivo.

### 2. Medio Agar Mac Conkey (Agar McK).

Este medio es útil para aislar los bacilos Gram negativos de fácil desarrollo, aerobios y anaerobios facultativos. Además, permite diferenciar a las bacterias que utilizan o no, lactosa como fuente de carbono. En este medio de cultivo, las peptonas, aportan los nutrientes necesarios para el desarrollo bacteriano, la lactosa es el hidrato de carbono fermentable; y la mezcla de sales biliares y el cristal violeta son los agentes selectivos que inhiben el desarrollo de gran parte de la flora Gram positiva. La lactosa incorporada permite diferenciar los fermentadores de los no fermentadores, por el cambio de color de las colonias que se tornan rosadas para las bacterias fermentadoras de lactosa e incolora para las bacterias lactosa negativas [[www.mastgrp.com/IFUS/IFU328\\_SPA](http://www.mastgrp.com/IFUS/IFU328_SPA)].

### **3. Medio Agar Salmonella-Shigella (Agar SS).**

Este medio es útil para el aislamiento de las especies pertenecientes a los géneros *Salmonella* y *Shigella*. La selectividad de este medio está dada por las sales biliares y el verde brillante, que inhiben el desarrollo de bacterias Gram positivas y es diferencial debido a la fermentación de la lactosa y a la formación de ácido sulfhídrico a partir de tiosulfato de sodio.

Los microorganismos fermentadores de lactosa acidifican el medio haciendo virar el indicador de pH a rojo, obteniendo así colonias rosadas o rojas sobre un fondo rojizo, como en el caso de *Salmonella*. Por otra parte, *Shigella* u otros microorganismos no fermentadores de lactosa crecen bien en el medio de cultivo produciendo colonias transparentes. El tiosulfato de Sodio es reducido por ciertos organismos entéricos a sulfito y gas sulfhídrico (H<sub>2</sub>S) y este proceso enzimático de reducción es atribuido a la tiosulfato reductasa. La producción del gas H<sub>2</sub>S es detectada como un precipitado negro insoluble de sulfito ferroso, formado a través de la reacción del gas H<sub>2</sub>S con los iones férricos o citrato férrico, indicado en el centro de la colonia [[www.himedialabs.com/TD/M108](http://www.himedialabs.com/TD/M108)].

### **4. Medio Agar Muller Hinton (MH).**

Una vez caracterizadas todas las cepas con los 3 medios diferenciales, descritos anteriormente. Las colonias puras se crecieron en medio Muller Hinton (MH) el cual no es un medio diferencial, porque promueve el crecimiento satisfactorio de la mayoría de los patógenos microbianos. Este medio fue utilizado para hacer crecer las colonias bacterianas para su uso cotidiano [[www.britanialab.com/productos/335\\_hoja\\_tecnica\\_es.pdf](http://www.britanialab.com/productos/335_hoja_tecnica_es.pdf)].

### **5. Medio Luria-Bertani (LB).**

Para la extracción del DNA genómico las células fueron crecidas en medio Luria-Bertani (LB) [Tabla 27]. El cual es un medio líquido para el mantenimiento y propagación de las bacterias.

Pruebas bioquímicas y bacterias que identifican

**1. Catalasa.** La catalasa es un enzima presente en la mayoría de los microorganismos que poseen citocromos. Las bacterias que sintetizan catalasa hidrolizan el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno gaseoso que se libera en forma de burbujas.

**2. Oxidasa.** Esta prueba sirve para determinar la presencia de enzimas oxidasas, la reacción de oxidasa se debe a la presencia de un sistema citocromooxidasa que activa la oxidación del citocromo el cual es reducido por el oxígeno molecular produciéndose agua o peróxido de hidrógeno según la especie bacteriana. El oxígeno actúa por tanto como aceptor final de electrones en la cadena transportadora de electrones. Por lo general, el sistema citocromooxidasa solo se encuentra en las bacterias aerobias, algunas anaerobias facultativas y, excepcionalmente, en alguna microaerofila (*Vibrio fetus*), pero las bacterias anaerobias estrictas carecen de actividad oxidasa.

**6. Ureasa.** Determina la capacidad de un organismo de desdoblar la urea formando dos moléculas de amoníaco por acción del enzima ureasa. Esta actividad enzimática es característica de todas las especies de *Proteus* y se usa sobre todo para diferenciar este género de otras enterobacterias que dan negativo o positivo retardado. La prueba también se utiliza para diferenciar *Physobacter phenylpyruvicus* de *Moraxella spp.* *Helicobacter pylori* y *Brucella spp.* Esta prueba puede ayudar en la identificación de *Cryptococcus spp.* que produce un resultado positivo después de una incubación prolongada.

**7. Indol.** Mediante esta prueba se detecta la liberación de indol en un cultivo bacteriano. Dicha liberación se debe a la degradación del aminoácido triptófano mediante el enzima triptofanasa

**8. Oxido-Fermentación.** Mediante esta prueba se va a determinar si la utilización de los hidratos de carbono por parte de un microorganismo, se realiza por vía oxidativa (proceso aeróbico, presencia de oxígeno) o por la fermentativa (proceso anaeróbico, ausencia de oxígeno).

**10. Rojo de metilo.** El rojo de metilo es un indicador de pH. Actúa entre pH 4,2 y 6,3 variando desde rojo (pH 4,2) a amarillo (pH 6,3). Mediante esta prueba se comprueba la capacidad de un microorganismo de producir y mantener estables los productos terminales ácidos de la fermentación de la glucosa por la vía de la fermentación ácido- mixta. Se utiliza como parte de la identificación a nivel de especie de los bacilos entéricos Gram negativos.

**11. Utilización de citrato.** Esta prueba sirve para determinar si un microorganismo es capaz de utilizar citrato como única fuente de carbono y compuestos amoniacales, como la única fuente de nitrógeno en su metabolismo, provocando una alcalinización del medio. Entre las enterobacterias, éstas características se dan en los siguientes géneros: *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Citrobacter* y algunas especies de *Salmonella*. Sin embargo, *Escherichia*, *Shigella*, *Yersinia*, *Salmonella typhi* y *Salmonella paratyphi* son incapaces de crecer utilizando citrato como única fuente de carbono.

**12. Utilización de malonato.** Pone de manifiesto la capacidad que poseen determinadas bacterias de utilizar el malonato de sodio como única fuente de carbono, con la consiguiente liberación del catión, que en presencia de iones y agua produce alcalinidad. Solamente los microorganismos que pueden usar simultáneamente malonato de sodio como fuente de carbono y sulfato de amonio como fuente de nitrógeno son capaces de ejercer una acción tampón produciendo hidróxido de sodio. El aumento de la alcalinidad resultante hace que el azul de bromotimol cambie de verde a azul. Los microorganismos malonato negativos que fermentan glucosa hacen que el indicador cambie de verde a amarillo. Se utiliza en la diferenciación de especies entre las *Enterobacteriaceae*. La mayoría de las especies de *Enterobacter* y *Klebsiella* utilizan malonato de sodio.

## FUENTES DE INFORMACIÓN

### BIBLIOGRÁFICAS

1. Alberto J Cesar. *Promoción de la salud y prevención de la enfermedad: Enfoque en salud familiar*. Bogotá, Colombia: Panamericana, 2004: 24,54.
2. Arteaga Eslava C. *Cepas de Escherichia coli relacionadas con la diarrea*. Diagnóstico de laboratorio de infecciones gastrointestinales. México: Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos 2009: 251-265.
3. Duguid, J.P *et al. Medical Microbiology*, Vol 1, Edimburg, Churchill Livingstone, 1978: 102-104.
4. Frenk Julio. *La salud de la población: Hacia una nueva salud pública*. México: Secretaría de Educación Pública Fondo de Cultura Económica: Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, 2003: 8-10-14, 56.
5. Gangarosa E.T. *et al. Epidemic Shiiga Bacillus in Central America II Epidemiological studies in 1969*: 80-90.
6. González-Morán Ma. Genoveva. *Técnicas en biología celular: Teoría y práctica*. México: AGT editor, 1996: 9-19.
7. G.T Keusch *et al. Shigella toxins. A review*. Pharmacol Ther. 1982: 403-408.
8. Innis, D. H Gelfand, J. J Sninsky, T.J White. *PCR Protocols*. Academic Press Inc. Estados Unidos, 1990: 11-12.
9. Kumate Jesús, Soberón Guillermo. *Salud para todos: ¿utopía o realidad?* México: El Colegio Nacional, 1989: 190-198.

10. L. Heymann. David *El control de las enfermedades transmisibles*. México: El Manual Moderno, 2007: 22, 27,30.
11. Mata *et al. Epidemic Shiga Bacillus in Central America I. Etiological investigations in Guatemala*, 1970:170-180.
12. Mata. *Infection and Colonization of the intestine. The children of SANTA Maria Cauque: a Prospective field study of Health and Growth*. The MIT Press, Cambridge, Massachusetts, and London, England, 1978:140-145.
13. Méndez I, Mossos N, Mogollon D, Mattar S, Poutou R. *Epidemiological relationship among strains of Salmonella enterica subsp. enteric isolated from humans, poultry and food*. U.S.A 2011: 5-13.
14. Mota Hernández Felipe. *Hidratación oral y diarreas*. México: McGraw-Hill, 2000: 55-65.
15. Nsubuga K, Leyma. *Vigilancia epidemiológica de enfermedades emergentes y reemergentes en el Caribe*. Cuba. 2008:43-49.
16. OPS. Salud en las Américas. Vol. I- REGIONAL. Publicación científica y técnica No. 622, 2007: 298.
17. Promoción de la Salud: Una antología. Publicación científica No. 157, OPS, 1999, Washington D.C *Promoción de la Salud. Una perspectiva Mundial*. Ilona Kickbush: 15-17.
18. Promoción de la Salud: Una antología. Publicación científica No. 157, OPS, 1999, WASHINGTON D.C *Estrategias para la Promoción de la Salud en la comunidad*. Ronald Labonde: 153-156.

19. Ramos Durango J. *Microbiología, patogénesis, epidemiología, clínica y diagnóstico de las infecciones producidas por Salmonella*. MVZ-Córdoba. 2002: 187-200.
20. Restrepo Helena, Hernán Málaga; col. *Promoción de la salud: cómo construir vida saludable*. Bogotá, Colombia: Médica Internacional, 2001: 34-40.
21. Roskoski Robert. *Bioquímica*. México: Mc-Graw Hill, 1998: 22-27.
22. Silva Paim Jairnilson. *Desafíos para la salud colectiva en el siglo XXI*. Buenos Aires: Lugar Editorial, 2011: 45, 54-60,67-72.
23. Torres ME, Pírez MC, Schelotto F, Varela G, Parodi V, Allende F, Falconi E, Dell'Acqua L, Gaione P, Méndez MV, Ferrari AM, Montano A, Zanetta E, Acuña AM, Chiparelli H, Ingold E. *Etiology of children's diarrhea in Montevideo, Uruguay: associated pathogens and unusual isolates*. J. Clin. Microbiol. 2001: 2134-2139.
24. Vega Franco Leopoldo. *La salud en el contexto de la nueva salud pública*. México: El Manual moderno: UNAM, Facultad de Medicina, 2000: 23, 33,47-60.

### ARTÍCULOS

1. Álvarez Martínez Miriam, Buesa Gómez Javier, Castillo García Javier, Vila Estape Jordi. *Diagnóstico Microbiológico de las Infecciones gastrointestinales*. EIMC. 2008:194-195.
2. Andersson N., Martínez E, Villegas A Rodríguez I. *Vigilancia epidemiológica y planificación descentralizada*. Salud Pública de México. 2011: 493-502.
3. Arrizón Villegas Asencio, Andersson Neil, and Ledogar Robert L. *Micro-regional planning: evidence-based community buy-in for health development in five of Mexico's poorest rural districts*. Bio Med Central Health services research. 2011. 3-10.
4. Barrera, H.A Ortiz, R. y Resendez, D. *Reacción en Cadena de la Polimerasa. Una nueva época dorada en la biología molecular*. Ciencia y Desarrollo. México. Vol. 18. 1993: 50-60.
5. Cardona J.M *Promoción de la salud. A diez años de Ottawa: ¿salud mercancía o derecho social?* Nueva Época. 1987 Volumen 2: 55-60.
6. Castro Roberto, Erviti Joaquina, Leyva René. *Globalización y enfermedades infecciosas en las poblaciones indígenas de México*. Cad. Saúde Pública, Rio de Janeiro, 23 Sup 1:S41-S50, Brazil. 2007: 58-66.
7. Córdova-Villalobos José Ángel, Barriguete-Meléndez Jorge Armando, Lara-Esqueda Agustín, Barquera Simón, Rosas-Peralta Martín, Hernández-Ávila Mauricio, de León-May María Eugenia, Aguilar-Salinas Carlos A. *Las enfermedades crónicas no transmisibles en México: sinopsis epidemiológica y prevención integral*. Salud Pública de México / vol. 50, no. 5, septiembre-octubre. México. 2008:1-38.

8. Cortez Hernández Cecilia, Arreola Aguilera Ma. Guadalupe, Escarpulli Castro Graciela. *Situación de las enfermedades gastrointestinales en México*. Enfermedades infecciosas y microbiología, Vol 31, núm. 4, octubre-diciembre 2011: 137-151.
9. Cruz E. *La Revolución Científico Técnica: su impacto en la esfera de la salud*. Lecturas de Filosofía, Salud y Sociedad. La Habana: ECIMED. 2000: 64-78.
10. Curtis Val, Caimcross Sandy. *Effect of washing hands with soap on diarrhoea risk in the community: A systematic review*. IN Lancet Infect Dis. 2003, May: 81, 275.
11. Chápela Mendoza Ma. del Consuelo. *¿Qué Promoción de la Salud ha Fracasado?*. México. 2007: 1-19.
12. Chápela Mendoza Ma. del Consuelo. *Promoción de la salud. Un instrumento del poder y una alternativa emancipatoria*. México. 2007: 24, 29.
13. Duguid Teja J. *Las enfermedades emergentes y reemergentes: un problema de salud en las Américas*. Revista Panamericana de Salud Pública 1978: 28- 35.
14. Fewtrell Lorna, John M. Cold ford Jr. *Water, sanitation and hygiene. Interventions and diarrhoea: A systematic review and meta-analysis*. USA: HNP, 2004: 88.

15. Flores Jose, L. DuPont Herbert, Jiang Zhi-Dong, Belkind-Gerson Jaime, A. Mohamed Jamal, G. Carlin Lily, S. Padda Ranjit, Paredes Mercedes, Martinez-Sandoval Jose Francisco, A. Villa Nicolas, C. Okhuysen Pablo. *Enterotoxigenic Escherichia coli Heat-Labile Toxin Seroconversion in US Travelers to Mexico*. Journal of Travel Medicine, Volumen 15, Issue 3, 2008, 156–161.
16. García Cárdenas David. *Introducción al enfoque emancipador de la Promoción de la Salud*. UACM. México. 2009: 1-10.
17. Gómez Abad Héctor *Concepto ecológico de enfermedad*. Boletín ACOM-SAP Vol 1, núm. México. 1971 2: 3-4.
18. Guzmán Tirado María Guadalupe, Kourí Flores Gustavo, Bravo González José Ramón. *La emergencia de la fiebre hemorrágica del dengue en las Américas. Reemergencia del dengue*. Rev. Cubana MedTrop Vol.51.Cuba. 1999: 34-40.
19. Heymann M. *Escherichia Coli: Mecanismos de Patogenicidad*. UNAM. México. 2007: 6-10.
20. Hernández Cortez Cecilia, Aguilera Arreola Ma. Guadalupe, Castro Escarpulli Graciela. *Situación de las enfermedades gastrointestinales en México*. Enfermedades Infecciosas y Microbiología, vol. 31, núm. 4, octubre-diciembre. México 2011:50- 60.
21. Hernández-Hernández Fidel de la Cruz, H Rodríguez Mario. *Avances biotecnológicos en el diagnóstico de enfermedades infecciosas*. Salud Pública de México / vol. 51, suplemento 3. México. 2009: 223-230.
22. Kramer, Michael S, Kakuma, Ritsuko. *The optimal duration of exclusive breastfeeding: A systematic review*. EUA: WHO, 2001: 18-20.

23. Lalonde M: "A New Perspective on the Health of Canadians". Ottawa: Office of the Canadian Minister of National Health and Welfare. April 1974: 18-20.
24. López Santos V. *El nuevo enfoque de atención a la salud*. Marco conceptual de la salud pública: 2005. UACM: 27-33.
25. Méndez Iván Alberto, Badillo Carlos Andrés, Ortiz Parra Gabriela, Faccini Álvaro Adolfo. *Caracterización microbiológica de Salmonella en alimentos de venta callejera en un sector universitario de Bogotá, Colombia. Julio a octubre de 2010*. Revista de los Estudiantes de Medicina de la Universidad Industrial de Santander. Colombia. Enero-Abril. 2011: 27-32.
26. Mussaret B. Zaidi, Constantino López Macías, Edmundo Calva. *Estudios mexicanos sobre Salmonella: epidemiología, vacunas y biología molecular*. Revista Latinoamericana de Microbiología. Vol. 48, No. 2 Abril - Junio. 2006: 331-350.
27. Nelson Fernández Ana. *Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología*. España. 2006: 30-35.
28. OMS/OPS. Declaración de Yakarta sobre la Promoción de la Salud en el siglo XXI. 1997. Washington D.C: 4-10.
29. OMS/UNICEF. Conferencia Internacional sobre Atención Primaria de Salud. Alma –Ata. URSS. 1978: 10-15.
30. OMS. Carta de Bangkok para la Promoción de la Salud en un mundo globalizado. Tailandia: 1-3.
31. OMS: "Carta de Ottawa para la Promoción de la Salud". Conferencia Internacional para la Promoción de la Salud. Ottawa 1986: 2-8.

- 32.OMS. Conferencia Mundial sobre Promoción de la Salud: La declaración de Helsinki sobre Salud en Todas las Políticas. Helsinki, Finlandia. 2013: 1-4.
- 33.OMS. Declaración de Sundsvall sobre los ambientes favorables a la Salud. Suecia. 1991: 34-39.
- 34.OMS. *Estrategias de Cooperación*. Revista en línea. Abril 2006:1-5.
- 35.OMS. *Informe sobre los Determinantes Sociales de la Salud*. OMS. Agosto 2008: 2-4.
- 36.OMS La llamada a la acción de Nairobi Para Cerrar la brecha de implementación en Promoción de la Salud. Kenya. 2009: 1-9.
- 37.OMS. *La vigilancia de la salud pública La mejor arma para evitar epidemias*. Disease Control Priorities Project. 2006: 1-5.
- 38.OMS. *Octava Conferencia Mundial de Promoción de la Salud*. Helsinki, 2013: 1-2.
- 39.Paredes Salido Fernando, Roca Fernández Juan José. *Infecciones gastrointestinales tipos, diagnóstico y tratamiento*. OFFARM. Vol 23 núm. 5 Mayo 2004: 479-506.
- 40.Ramos RP, Vega FL, Solís LA, Olrte J. *Síndromes diarreicos*. México. Ed científicas. 1987: 11-16.
- 41.Raventós Ana. Segunda Conferencia Internacional de Promoción de la Salud “Políticas a Favor de la Salud” Revista de la Consejería de la Salud de la Junta de Andalucía. 1990: 25-27.
- 42.Rodríguez-Ángeles Guadalupe. *Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de Escherichia coli*. Salud Pública de México / vol.44, no.5, septiembre-octubre. México.2002: 82-101.

43. Rodríguez Sánchez Irama, Barrera Saldaña Hugo A. *La reacción en cadena de la polimerasa a dos décadas de su invención*. Red de Revistas Científicas de América Latina y el Caribe. Vol VII número 003 Julio-Septiembre.2004: 1004-1013.
44. Ruiz-Palacios Guillermo M., Pérez-Schael Irene, Velázquez F. Raúl. *Safety and Efficacy of an Attenuated Vaccine against Severe Rotavirus Gastroenteritis*. The New England Journal of Medicine núm. 1. 2006: 11-22.
45. Sáenz Román A. *Patogénesis molecular, epidemiología y diagnóstico de Escherichia coli enteropatógena*. México. Salud pública. 2005, vol.49, n.5: 376-386.
46. Sampieri Ramírez Clara Luz. *Educación en salud pública: impacto de las nuevas tecnologías*. Salud Pública de México / vol. 51, no. 5, septiembre-octubre. México. 2009:121-127.
47. Sánchez Tarragó Nancy. *Enfermedades emergentes: Determinantes causales y situación epidemiológica por regiones*. Reporte Técnico de Vigilancia: Enfermedades emergentes. Vol. 2, No. 4 Marzo 27. Cuba.1997: 1-15.
48. Secretaria De Salud. *Prevención, Diagnóstico y Tratamiento de la Diarrea Aguda en Niños de Dos Meses a Cinco Años. en el Primero y Segundo Nivel de Atención*. Guía de Práctica Clínica gpc. México. 2008:197-215.
49. Secretaria de Salud. *Perfil Epidemiológico de las Enfermedades Infecciosas Intestinales*. Dirección General de Epidemiología. México. 2012: 231-241.
50. Secretaria de Salud. *Quinta Conferencia Mundial de Promoción de la Salud Promoción de la salud: hacia una mayor equidad*. Ciudad de México. 2000: 3-6.

51. Seymour H. Ashoton J. *La nueva salud pública*. Masson. Barcelona. 1990: 34-35.
52. Subsecretaría de Prevención y Promoción de la Salud. *Programa de Acción Específico 2007-2012, Prevención de la Mortalidad Infantil*. México. 2008:15,25,93-100.
53. Torres Tejeda Alfredo G., Eugenia Baca Beatriz. *Reacción en cadena de la Polimerasa*. Elementos, No. 23, Vol.3. México. 1995: 21-30.
54. Vidal Graniel Jorge. *E.coli enteropatógena: Una causa frecuente de diarrea infantil*. Red de Revistas Científicas de América Latina y el Caribe. Vol.9, No.1 Abril. México. 2003: 50-65.
55. Weissenbacher Mercedes, Salvatella Roberto, Hortal María. *El desafío de las enfermedades emergentes y reemergentes*. Revista Médica del Uruguay. Vol.14. Uruguay.1998: 247-262.
56. Weng Alemán Zulia, Suárez Pita Maritza Tomasa. *Enfermedades Emergentes y Reemergentes: Determinantes Causales e Impacto Social*. Instituto Nacional de Higiene, Epidemiología y Microbiología. Cuba. 2010: 37-31, 35-38,45.
57. Yábar Varas, Carlos. *Manual de procedimientos de electroforesis para proteínas y ADN*. Ministerio de Salud, Instituto Nacional de Salud. Lima.2003: 40-45.65.

### ELECTRÓNICAS

1. "Centers for Disease Control and Prevention" (n.d). Extraída el 18/VIII/2013 desde <http://www.cdc.gov/>.
2. "Diagnóstico bacteriológico" (n.d). Extraída el 25/VII/2013 desde <http://www.ecaths1.s3.amazonaws.com/.../Clase%20%20%20Seminarario>.
3. "Mac Conkey Agar" (n.d). Extraída el 25/VII/2013 desde [http://www.mastgrp.com/IFUS/IFU328\\_SPA](http://www.mastgrp.com/IFUS/IFU328_SPA).
4. "Muller Hinton Agar" (n.d). Extraída el 25/VII/2013 desde [http://www.britanialab.com/productos/335\\_hoja\\_tecnica\\_es.pdf](http://www.britanialab.com/productos/335_hoja_tecnica_es.pdf).
5. "Página de la Secretaria de Salud"(n.d). Extraída el 02/XII/2012 desde <http://www.secretariadesalud.gob.mx>.
6. "Pagina de la OMS" (n.d) Extraída el 20/XII/2012 desde <http://www.who.int/es/>.
7. "Proyecto de intervención para disminuir la incidencia de enfermedad diarreica aguda en menores de cinco años en el municipio de San Antonio Tecomitl, Milpa Alta D. F". Fascinetto Constantini José Ricardo Martín. Instituto de Salud Pública. Extraída el 22/01/2016 desde <http://www.inspvirtual.mx/centrodocumentacion>.
8. "S.S Agar" (n.d). Extraída el 25/VII/2013 desde <http://www.himedialabs.com/TD/M108>.
9. "Secretaria de Salud del Estado de México" (n.d). Extraída el 29/V/2014 desde <http://www.secretariadesaluddelestadodemexico/CEVECE.gob.mx>.

10. "Secretaria de Salud" Lineamientos para la Implementación del Núcleo Trazador de Vigilancia Epidemiológica (NuTraVE), Diciembre 2011. Extraída el 22/01/2016 desde <http://www.SINAVE.gob.mx>
11. "Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica" (n.d). Extraída el 25/V/2014 desde <http://www.secretariadesalud/SINAVE.gob.mx>.
12. "Sistema único de Vigilancia Epidemiológica" (n.d). Extraída el 17/IV/2014 desde <http://www.SUIVE.gob.mx>.
13. "Tinción de Gram" (n.d). Extraída el 25/VII/2013 desde <http://www.ecologia.unam.mx/laboratorios/evolucionmolecular/documentos/ClaseProcariontes/Alejandra/Pr%C3%A1ctica%20Tinci%C3%B3n%20de%20Gram>.
14. "UIES Unidad de Inteligencia para Enfermedades en Salud" (n.d) Extraída el 31/11/2012 desde <http://www.CENAVECE.gob.mx>.