



UNIVERSIDAD DE ORIENTE
NÚCLEO DE SUCRE
ESCUELA DE CIENCIAS
POSTGRADO BIOLOGÍA APLICADA

**IDENTIFICACIÓN POR PCR Y SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA
DE CEPAS DE *Escherichia coli* DIARREOGÉNICAS, AISLADAS DE
NIÑOS CON DIARREA AGUDA EN CUMANÁ, VENEZUELA**

ERIKA JOSEFINA HANNAOUI RODRÍGUEZ

TRABAJO DE GRADO PRESENTADO COMO REQUISITO PARCIAL PARA
OPTAR AL TÍTULO DE MAGISTER SCIENTIARUM EN BIOLOGÍA APLICADA
MENCIÓN MICROBIOLOGÍA APLICADA

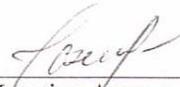
CUMANÁ, 2009

**IDENTIFICACIÓN POR PCR Y SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA
DE CEPAS DE *Escherichia coli* DIARREOGÉNICAS, AISLADAS DE
NIÑOS CON DIARREA AGUDA EN CUMANÁ, VENEZUELA**

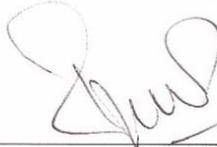
APROBADO POR:



M.Sc. Luz Bettina Villalobos de B.
Asesora



Dra. Yasmína Araque
Jurado Principal



Dra. Raquel Pedroza
Jurado Principal

ÍNDICE

DEDICATORIA	i
AGRADECIMIENTO	ii
LISTA DE TABLAS	iii
LISTA DE FIGURAS	iv
RESUMEN	v
INTRODUCCIÓN	1
METODOLOGÍA	16
Población	16
Muestra	16
Métodos	17
Aislamiento e identificación por métodos de cultivo y pruebas bioquímicas convencionales	17
Identificación por la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de los distintos grupos de <i>E. coli</i> aisladas.	26
Evaluación de la susceptibilidad antimicrobiana de las <i>E. coli</i> aisladas de niños con diarrea y niños control	32
Obtención de datos clínicos, epidemiológicos y evaluación de las características socioeconómicas de los individuos estudiados	33
Análisis estadístico	34
RESULTADOS	35
DISCUSIÓN	47
CONCLUSIONES	59
BIBLIOGRAFÍA	61
APÉNDICE	73
HOJA DE METADATOS	95

DEDICATORIA

A

Dios y a la Virgen, por acompañarme e iluminar siempre mi camino.

Mis padres y hermanos.

AGRADECIMIENTO

A

Todas aquellas personas que con sus conocimientos, experiencia, y amistad, colaboraron en la realización de esta investigación. Agradezco especialmente a mi asesora, Profesora. Luz Bettina Villalobos de B., por guiarme en la realización de esta investigación y por todas sus enseñanzas de índole académico y humano, y a la Profesora. Rosa E. Martínez N., por todos sus consejos, apoyo, y amistad.

El Proyecto Multicéntrico Nacional N° G-2005000371, financiado por el FONACIT, a través del cual se adquirieron los equipos, materiales y reactivos que hicieron posible esta investigación.

El Dr. Peter Feng (FDA, USA), por su asesoramiento en el manejo de las técnicas moleculares.

Todos mis queridos amigos, pero en especial a las Licda. Milagros Figueroa, por su gran apoyo.

Los representantes de los niños que formaron parte de esta investigación y el personal médico que colaboró en la toma de muestras.

A Todos... MIL GRACIAS!.

LISTA DE TABLAS

Tabla 1.- Relación entre la edad y la distribución porcentual de <i>E coli</i> diarreogénicas, aisladas de niños con diarrea aguda.	35
Tabla 2.- Relación entre el sexo y la distribución porcentual de <i>E coli</i> diarreogénicas, aisladas de niños con diarrea aguda.	36
Tabla 3.- Asociación de cada tipo de <i>E coli</i> diarreogénica con otros géneros bacterianos.	37
Tabla 4.- Origen de la cepa de <i>E. coli</i> diarreogénica y porcentaje de sensibilidad o resistencia a los antibióticos evaluados.	42
Tabla 5.- Meses del año y porcentajes de aislamiento de cepas de <i>E. coli</i> diarreogénicas de los niños con diarrea aguda.	43
Tabla 6.- Características de las heces de niños diarreicos con <i>E. coli</i> diarreogénica.	44
Tabla 7.- Características clínicas presentes en niños con enfermedad diarreica aguda causada por cada tipo de <i>E. coli</i> diarreogénica.	45
Tabla 8.- Relación de los porcentajes de aislamientos de <i>E. coli</i> diarreogénicas, con el tipo de alimentación recibida por los niños con diarrea aguda.	46
Tabla 9.- Relación de los porcentajes de aislamientos de <i>E. coli</i> diarreogénicas con la condición socioeconómica del núcleo familiar de los niños con diarrea aguda.	46

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Frecuencia de los géneros bacterianos aislados de los coprocultivos realizados a 200 niños con enfermedad diarreica aguda.	36
Figura 2. Amplificación por PCR para el gen eae (ECEP).....	38
Figura 3. Amplificación por PCR para el gen bfp (ECEP).....	38
Figura 4. Amplificación por PCR para el gen st (ECET)	39
Figura 5. Amplificación por PCR para de los genes ipaH y virF (ECEI).....	40

RESUMEN

Con la finalidad de establecer la prevalencia de cepas de *E. coli* patógenas asociadas a casos de diarrea aguda infantil en Cumaná, se tomaron muestras de heces de 200 niños con enfermedad diarreica aguda (EDA), de ambos sexos, menores de 5 años, que acudieron al Hospital de Cumaná, y 30 muestras de heces de niños de ambos sexos y en el mismo grupo de edad, que no presentaron cuadro diarreico, para ser usados como control. El aislamiento e identificación de las cepas bacterianas se realizó por métodos bioquímicos convencionales. Para la identificación de los genes de patogenicidad se empleó la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés), determinando la presencia de los genes *eae* y *bfp* para *E. coli* enteropatógena (ECEP), *st* y *lt* para *E. coli* enterotoxigénica (ECET), *ipaH* y *virF* para *E. coli* enteroinvasiva (ECEI), *Sxt1* y *Sxt2* para *E. coli* shigatoxigénica (ECST), *aafII* para *E. coli* enteroagregativa (ECEA), y *daaE* para *E. coli* de adherencia difusa (ECAD). La susceptibilidad a los antibióticos se efectuó por la técnica de difusión en placa. Además se aplicó encuesta para la obtención de datos clínicos y epidemiológicos de interés. Los datos obtenidos fueron procesados por estadística descriptiva porcentual y la prueba Chi-cuadrado a un 95% de confiabilidad. De los 200 niños con EDA, se aisló *E. coli* de 169, 54,44% fueron de sexo masculino y 45,56% de sexo femenino. De los 30 niños controles, se aisló *E. coli* de 25 de ellos, correspondiendo el 56% al sexo masculino y el 44% al sexo femenino. Por PCR se determinó que de las cepas de *E. coli* aisladas de niños con EDA, el 10,65% fueron positivas para ECEP, 5,91% para ECET, 1,78% fueron ECEA y 0,59% se correspondieron a ECEI, no se hallaron cepas ECST ni ECAD. En las cepas de *E. coli* aisladas de niños control no hubo amplificación por PCR de ninguno de los genes de patogenicidad evaluados. Al realizar la distribución porcentual de acuerdo a la edad, y el porcentaje de aislamientos de cada tipo de *E. coli* diarreogénica (ECD), se hallaron diferencias estadísticas no significativas ($p > 0,05$), sin embargo, en la distribución porcentual de acuerdo al sexo y el porcentaje de aislamientos de cada ECD, se encontraron diferencias estadísticas significativas ($p < 0,05$), observándose que los "patotipos" ECEP, ECEA y ECEI tuvieron mayor porcentaje de aislamientos en niños del sexo masculino, mientras que ECET fue mayormente aislada del sexo femenino. De los niños con enfermedad diarreica aguda, además de ECD se aislaron otros géneros bacterianos patógenos entéricos: *Salmonella sp* (5,92%) y *Campylobacter sp* (2,96%). Otros géneros bacterianos no patógenos o de dudosa patogenicidad encontrados asociados a *E. coli* en los niños con EDA fueron: *Citrobacter sp*, *Klebsiella sp*, *Enterobacter sp*, *Serratia sp*, y *Proteus sp*, en un 57% de los casos. Se evaluó la susceptibilidad de las cepas a los antimicrobianos: ciprofloxacina (Cf), gentamicina (CN), aztreonam (ATM), tetraciclina (TE), sulfametoxazol/trimetoprim (SXT), imipenem (IPM), cefixima (CFM), ampicilina/sulbactam (SAM). Las ECD mostraron mayor resistencia a los antibióticos SAM, TE y SXT. Las *E. coli* provenientes de niños controles mostraron altos porcentajes de resistencia a los antibióticos: SAM, CFM y TE. Las características clínicas presentes en los niños con EDA fueron en su mayoría fiebre, vómitos y dolor abdominal, no permitiendo discriminar entre los diferentes tipos de ECD, ni entre estas con algún otro agente etiológico bacteriano que pudiera ser causante de diarrea. El tipo de alimentación de estos niños no se asoció con la aparición de un tipo en particular de ECD, pero los mayores porcentajes de aislamiento de estas cepas se hallaron en niños alimentados con leche no materna más otros alimentos. La mayoría de los niños con ECD se encontraron en las clases obrera y marginal. En vista a que *E. coli* diarreogénica tiene una alta asociación con EDA en niños de Cumaná (18,93%), debe dársele mayor importancia a su identificación en los coprocultivos, a fin de lograr un mejor manejo y control de esta afección tanto en niños como en adultos.

Palabras Clave: *Escherichia coli* diarreogénica, diarrea aguda, enfermedad diarreica infecciosa, reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

INTRODUCCIÓN

La diarrea aguda es una alteración en el contenido de agua, volumen, o frecuencia de las deposiciones (mayor o igual a 3 deposiciones por día), con menos de 14 días de evolución; la misma es una causa importante de morbilidad y mortalidad en pacientes pediátricos (Guerrant y Van Gildert, 2001).

Las enfermedades diarreicas constituyen un problema de salud pública en el mundo, especialmente en los países en desarrollo, donde representan una relevante causa de morbilidad y mortalidad en niños menores de 5 años (Guerrant *et al.*, 1992). Se ha estimado que en Venezuela ocurren 1,32 millones de episodios anuales de diarrea, con una mediana de 2,2 episodios por niño y año, cifra muy similar a la registrada en todo el mundo: 2,5 episodios por niño y año (Bern *et al.*, 1992). En los últimos años, las diarreas han representado en Venezuela la novena causa de muerte en la población en general y la segunda causa de mortalidad en menores de 4 años (MSAS 1998). De acuerdo al anuario de mortalidad 2006 del MPPS, se ubican a las diarreas y gastroenteritis de origen infeccioso en el estado Sucre, en la quinta posición entre las diez principales causas de mortalidad infantil.

En esta afección se ha involucrado como mecanismo de transmisión la ingestión de alimentos o agua contaminada, y la transmisión persona a persona, su presentación clínica presenta variaciones debidas tanto al tipo de hospedero (niño, anciano o inmunocomprometido), como a la variedad de agentes causales de origen parasitario: *Giardia lamblia*, *Entamoeba histolytica*, *Cryptosporidium parvum*; viral: rotavirus, adenovirus, calicivirus, astrovirus; o bacteriano: *Salmonella*, *Shigella*,

Campylobacter, *Vibrio cholerae*, *Yersinia enterocolitica* y *Escherichia coli* enteropatógenas (Guerrant y Van Gildert, 2001).

E. coli fue descubierta en 1885 por Theodor Escherich, quien la denominó inicialmente *Bacterium coli*. Posteriormente la taxonomía le adjudicó el nombre de *Escherichia coli*, en honor a su descubridor. Ésta y otras bacterias son necesarias para el funcionamiento correcto del proceso digestivo. Es un bacilo que forma parte de la familia Enterobacteriaceae, reacciona negativamente a la tinción de Gram, es aerobio o anaerobio facultativo, móvil por flagelos peritricos o inmóvil, no esporulado, capaz de fermentar la glucosa y la lactosa, son fermentadores y oxidativos en medios con glucosa u otros carbohidratos, catalasa positiva, oxidasa negativa, reductores de nitratos a nitritos, y poseedores de una proporción G+C de 39 a 59% en su DNA. Suelen producir ácido y gas a partir de la glucosa, la arabinosa, y habitualmente de la lactosa y otros azúcares. Generalmente son positivas a la reacción del rojo de metilo, y negativa a Vogues-Proskauer. No suelen crecer en medio con citrato como única fuente de carbono y energía. Frecuentemente son H₂S, ureasa y fenilalanina negativos, y en general son indol positivos y descarboxilan la lisina (Neidhardt, 1999; Nowrouzian *et al.*, 2003).

Kauffmann en 1947, propone una forma de diferenciar las cepas de *E. coli* con base en la determinación de los antígenos superficiales O (somáticos), K (capsulares) y H (flagelares). Esta forma de clasificación serológica resultó muy útil en los estudios epidemiológicos y de patogénesis de *E. coli*, facilitando la diferenciación entre cepas virulentas e inócuas. El antígeno O es un polisacárido termoestable (estable tras calentarlo a 121°C/2 h) que forma parte del lipopolisacárido (LPS) presente en la membrana externa de la pared celular. Los antígenos flagelares H, son de naturaleza proteica y termolábiles (se inactivan al calentarlos a 100°C por 30 min). *E. coli* se clasifica en más de 170 serogrupos O, según las características antigénicas de su LPS, y

en serotipos por la combinación de antígenos O y H (Drasar and Hill, 1974; Neidhardt, 1999).

E. coli es en general, considerada flora normal del intestino humano, pero se han descrito seis grupos bien definidos, implicados en procesos diarreicos, los cuales son: *E. coli* enteropatógenas (ECEP), *E. coli* enterotoxigénica (ECET), *E. coli* enteroinvasiva (ECEI), *E. coli* shigatoxigénica (ECST), *E. coli* enteroagregativa (ECEA) y *E. coli* adherencia difusa (ECAD) (Levine, 1987; González *et al.*, 1997; Rodríguez-Ángeles, 2002).

Las cepas ECEP representan un grupo patógeno importante a escala global, y en los países subdesarrollados constituyen la principal causa de diarrea en niños. La edad representa el factor predisponente más notable en la gran incidencia de este microorganismo; los padecimientos debidos a ECEP afectan de manera primaria a los infantes menores de 2 años, siendo aún mayor su relevancia en los menores de 6 meses. A partir de los 2 años, su aislamiento puede ser común, a partir de individuos sanos y enfermos (Torregrosa *et al.*, 1996; Nataro and Kaper, 1998).

El periodo de incubación de ECEP es de 6 - 48 horas, con un inoculo infectivo de $10^8 - 10^{10}$ bacterias. Se caracteriza por causar una diarrea acuosa autolimitada, la cual puede estar asociada con fiebre, cólicos abdominales y vómito. El cuadro enteral puede ser persistente y durar 14 días o más, sobre todo en niños de países en vías de desarrollo. La diarrea se caracteriza por presentar evacuaciones líquidas sin sangre ni moco (Donnenberg and Kaper, 1992; Nataro and Kaper, 1998).

El poder patogénico de las cepas ECEP está asociado con su capacidad de adherirse a las células intestinales del hospedero, en un patrón conocido como adherencia y esfacelación (A/E), mediante el cual se forman microcolonias

tridimensionales sobre la superficie de la célula blanco, sin llegar a cubrirla completamente (Donnenberg y Kaper, 1992). El mecanismo de patogénesis mediante el cual se producirá el cuadro diarreico viene dado por una adhesina BFP (*bundle forming pilus*) codificada en el plásmido EAF (*ECEP adherence factor*), dicha adhesina es responsable de la adhesión a distancia de la bacteria al enterocito. Presentan también la isla de patogenicidad LEE (*locus of enterocyte effacement*) con los genes: *eae*, *tir*, *esp* y *sep* (Giammnanco *et al.*, 1996). El gen *eae* codifica para una proteína de la membrana externa denominada intimina que es responsable de la adhesión íntima de la bacteria al enterocito. El gen *tir* (*translocated intimin receptor*) codifica para el receptor celular al que se une la intimina. La bacteria después de unirse a distancia al enterocito mediante las fimbria BFP, excreta el receptor Tir que se fija al enterocito y a continuación la bacteria se une íntimamente al enterocito al fijarse la intimina al receptor Tir. Los genes *esp* codifican para proteínas necesarias para la producción de la lesión de adhesión y borrado (*attaching and effacing*) de las microvellosidades intestinales y la condensación de la actina del citoesqueleto celular, que provoca la aparición de un pedestal en forma de copa sobre el que descansa la bacteria; y los genes *sep* codifican para las proteínas que constituyen un sistema de secreción de proteínas tipo III (Baldini *et al.*, 1983; Donnenberg and Kaper, 1992).

La adhesina bfp es una estructura de la superficie bacteriana asociada a la virulencia, presente en las cepas ECEP clasificadas como "típicas", dicha adhesina es un pili de adherencia tipo IV, responsable de la adhesión a distancia de la bacteria al enterocito. Existen cepas ECEP con la isla de patogenicidad LEE, pero sin el plásmido que codifica para bfp, y son clasificadas como ECEP "atípicas", éstas se han asociado a brotes y casos de diarrea en seres humanos, y tienen un rol controversial en la enfermedad diarreica aguda (Alikhani *et al.*, 2006).

Otro tipo de *E. coli*, asociado a cuadros diarreicos es ECET, la cual elabora diversos factores de virulencia, entre los que destacan sus enterotoxinas (termolábil y termoestable) y adhesinas, codificadas todas ellas por uno o más plásmidos no conjugativos. Las toxinas termolábiles (LT) presenta los serogrupos LT-I y LT-II, de los cuales sólo el primero predomina en los humanos y se encuentra constituido por una subunidad A y cinco subunidades idénticas B, pentámero que puede enlazarse firmemente al gangliósido G (su receptor primario) y a otras glicoproteínas intestinales. Además, tal como ocurre en otras exotoxinas A-B, la subunidad A es la responsable de la actividad enzimática (Banwell, 1990; Nataro and Kaper, 1998).

Una vez que la subunidad B de la LT se une a su receptor primario, la subunidad A penetra en la célula hospedera y es escindida proteolíticamente en los péptidos A₁ y A₂, el primero de los cuales provoca la activación permanente de la adenilato ciclasa, localizada en la membrana basolateral de las células intestinales, bajo tales condiciones, ocurren la fosforilación supranormal de los canales de cloruro ubicados en las membranas apicales de las células epiteliales y, posteriormente, la hipersecreción del ion Cl⁻ e inhibición en la absorción de Na⁺, fenómenos que generan la pérdida de agua por parte de las células intestinales (Banwell, 1990; Nataro and Kaper, 1998).

Las toxinas termoestables (ST) son de origen plasmídico y eventualmente transposónico, pequeñas, no inmunogénicas y monoméricas; a la fecha sólo se han detectado dos clases de ellas: STa o STI y STb o STII, que difieren en cuanto a estructura y mecanismo de acción (Qadri *et al.*, 2000).

El receptor natural de la STa es la enzima guanilato ciclasa, localizada en la membrana apical de las células epiteliales del intestino, y la unión de ambas da lugar a severas diarreas, al dispararse la elevación de los niveles intracelulares de GMPc, la

hipersecreción de Cl^- y/o la inhibición de la absorción de $\text{Na}^+ \text{Cl}^-$ (Torregrosa *et al.*, 1996). Cabe destacar que, los cuadros entéricos debidos a ECET incluyen mayoritariamente cepas productoras de ST; la STa actúa mucho más rápido que la LT, ya que ésta requiere de hasta 60 minutos para translocarse y activar a la adenilato ciclasa (Banwell, 1990). En relación a la STb, ésta se asocia principalmente a cepas de ECET provenientes de porcinos y, a diferencia de la STa, provoca la pérdida de células epiteliales vellosas y estimula la liberación de HCO_3^- en las células intestinales (Guerrant *et al.*, 1990).

El síndrome clínico más frecuente de la infección por ECET incluye diarrea acuosa, calambres abdominales, náuseas y malestar gastrointestinal. Estudios realizados en voluntarios indican que una dosis relativamente alta (10^7 bacterias) es probablemente necesaria para establecer la colonización en el intestino delgado donde estos microorganismos proliferan y producen las toxinas, sin embargo, los niños pueden requerir menos organismos para que se establezca la infección (Nataro and Kaper, 1998).

ECEI, fue descrita por primera vez a principios de los 70, como una cepa que causaba un cuadro diarreico disenteriforme invasor. Es genéticamente, bioquímicamente y clínicamente cercana en identidad a *Shigella* (Kotloff, 1999). ECEI se presenta de manera endémica en países en desarrollo, causando en promedio del 1% al 5% de episodios de diarrea entre la población. En países industrializados se ha asociado a brotes, sobre todo debido a ingesta de alimentos contaminados, no obstante el porcentaje de éstos es limitado o raro. El inóculo requerido para causar infección es (10^6 - 10^{11} bacterias) (Dupont *et al.*, 1971).

ECEI produce disentería, aunque los cuadros de diarrea acuosa son más comunes. Posee un gran plásmido de virulencia que lleva los genes necesarios para favorecer la

capacidad de invadir el epitelio colónico, replicarse intracelularmente y diseminarse de un enterocito a otro. El resultado es necrosis, ulceración e inflamación dentro de la pared intestinal (Bukholm and Figenschau, 1988). El periodo de incubación de ECEI es de 1 - 4 días. El cuadro clínico se caracteriza por diarrea acuosa, que puede ser disenteriforme, la presencia de diarrea sanguinolenta es en menos del 10%, hay cólicos o calambres abdominales, la fiebre usualmente está presente, una minoría de pacientes presentan náusea y vómito. Los síntomas característicos en personas infectadas por ECEI son diarrea acuosa, con moco y sangre, pero algunos casos solo presentan diarrea, ésta en ocasiones es indiferenciable de la que produce ECET. Las cepas de ECEI se asocian más con brotes que con casos aislados, en los cuales la transmisión puede ser de persona a persona, por la ingesta de alimentos y agua contaminada, convirtiéndose en un patógeno importante en niños mayores de 6 meses (Eslava *et al.*, 1994).

La patogenicidad de las cepas de ECEI, ocurre por su capacidad de invasión al epitelio del colon, previa adherencia a las vellosidades de la mucosa que genera una diarrea de tipo disentérica. Los genes necesarios para la invasividad de las ECEI son llevados por un plásmido (*pInv*) de 140 MDa. Además también están implicados genes cromosómicos que regulan la transcripción de algunos de los genes plasmídicos (Levine, 1987). El modelo de patogénesis comprende los siguientes pasos: (1) penetración por endocitosis dentro de las células de la mucosa intestinal del colon, (2) lisis de la vacuola endocítica, (3) multiplicación intracelular, (4) movimiento intracelular y (5) diseminación lateral a las células adyacentes. Los genes plasmídicos *mxi* y *spa* codifican para un aparato de secreción de proteínas de tipo III similar al que poseen los ECEP y ECST. Este aparato se requiere para la secreción de múltiples proteínas de la membrana externa OMP (*out membrane protein*) que están implicadas en el proceso invasivo y que se denominan proteínas Ipas (*invasion plasmid antigens*) (IpasA a IpasD). IpasC promueve la entrada de la bacteria en la célula, mientras que

IpaB lisa la vacuola fagocítica e induce apoptosis en macrófagos. virG codificada por el gen *IcsA*, es una proteína de superficie esencial para que se produzca la condensación de actina que facilita el movimiento de la bacteria a través del citoplasma (Nataro *et al.*, 1995).

La regulación de la virulencia viene dada por una cascada regulatoria, compleja y característica. virR es una proteína codificada cromosómicamente y que actúa en unión con virF, un activador transcripcional que tiene efectos pleiotrópicos, y es codificado en el plásmido pInv. La secuencia de genes del antígeno H (*ipaH*), encontrado en el plásmido de invasión, es usado para el diagnóstico de los casos de disentería, *ipaH* es transportado por las especies de *Shigella*, y por ECEI. (Shanta *et al.*, 2001, Thiem *et al.*, 2004).

ECST o *E. coli* enterohemorrágica (ECEH) se caracteriza por la producción de una citotoxina denominada shiga toxina (Stx) de la cual se han encontrado las variantes Stx1 y Stx2, y son codificadas en profagos (Nataro and Kaper, 1998). El término ECEH, está dado a las cepas que además de sintetizar Stx, ocasionan colitis hemorrágica CH y síndrome urémico hemolítico SUH, causan lesiones A/E (adherencia y esfacelación) sobre las células epiteliales, y poseen un plásmido de 60MDa que codifica para una enterohemolisina (O'Brien *et al.*, 1977; Levine *et al.*, 1987). Por lo tanto, ECEH pertenece a un subgrupo de ECST, e incluye una connotación clínica importante, porque no todas las ECST son patógenas, mientras que todas las ECEH sí lo son (Kaper *et al.*, 2004).

ECEH posee el locus cromosómico LEE con genes: *eae*, *tir*, *esp* y *sep*, y junto a la producción del patrón A/E, y elaboración de Stx, poseen un plásmido de 60 MDa que codifica para una enterohemolisina (EntHly), mediando el desarrollo de una diarrea acuosa con sangre, denominada colitis hemorrágica. ECST posee el locus

cromosómico LEE y sintetizan Stx, provocando una diarrea acuosa con o sin sangre (Beutin *et al.*, 1994; Feng, 1995; Rodríguez-Ángeles, 2002).

ECST necesita una baja dosis infectiva (se estima entre 100 a 1000 bacterias), el periodo de incubación de la enteritis fluctúa entre 3 y 4 días, el síntoma inicial es diarrea no sanguinolenta que puede evolucionar hasta tornarse sanguinolenta, la cual puede ser precedida de dolores y calambres abdominales, fiebre de corta duración acompañada por vómitos. En cuanto al desarrollo de las alteraciones extraintestinales, los reportes incluyen trastornos cardíacos y neurológicos asociados al SUH y a púrpura trombocitopénica trombótica, cuyas consecuencias llegan a resultar fatales (Robinson *et al.*, 2006).

Esta bacteria se transmite por vía fecal-oral, y la forma de infección humana más frecuente, es la carne de bovino mal cocida. La transmisión de persona a persona también ha sido demostrada (Bravo y Villalobos, 2002). Ocurrida la infección, cuya dosis infectante es mínima, su mecanismo de patogenicidad viene dado en gran parte por la toxina Shiga, la cual está constituida por una subunidad A y cinco subunidades idénticas B, una vez que la toxina Stx (subunidad B) se ha fijado a su receptor Gb3 (globotriaosylceramide), es endocitada la subunidad A de la toxina, transportada al aparato de Golgi y posteriormente hasta el retículo endoplásmico rugoso, para inhibir la síntesis proteica y conducir a la muerte celular (Tesh and O'Brien, 1991).

Es probable que el daño de la mucosa intestinal por la Stx, el lipopolisacárido LPS, y otros mediadores de inflamación, promuevan la translocación de la toxina a la circulación. Y en la circulación sanguínea Stx va hacia la célula blanco que posee el receptor específico: en el intestino, el SNC y el riñón. Particularmente altos niveles de Gb3 en humanos se encuentran en el riñón, específicamente en la región cortical (Paton and Paton, 1998). La Stx citotóxica para las células endoteliales del riñón

humano, causa una típica histopatología renal que incluye edema en las células del endotelio glomerular y deposición de plaquetas dentro del glomérulo, estas lesiones endoteliales conducen al estrechamiento de la luz de los capilares y a la oclusión de los vasos glomerulares, a través de la acumulación de plaquetas y fibrina (Paton and Paton, 1998). Diversas investigaciones permiten establecer que Stx induce la expresión de citocinas proinflamatorias, tales como TNF α e IL-6, que pueden potenciar el efecto citotóxico de la Stx sobre las células endoteliales vasculares humanas (Tesh and O'Brien, 1991).

E. coli enteroagregativa o enteroadherente (ECEA), causa comúnmente diarrea en países en desarrollo. Se requiere un alto inóculo para el desarrollo de la enfermedad, sugiriendo que el agua y los alimentos son el modo de transmisión de estas cepas (Adachi *et al.*, 2002).

Los síntomas más frecuentes son diarrea acuosa con o sin moco y sangre, dolor abdominal, náuseas, vómitos y fiebre no tan alta. ECEA pueden causar tanto diarrea aguda como crónica (> 14 días de evolución). El período de incubación de las enfermedades diarreicas va de 8 a 18 horas. Las variaciones de los síntomas clínicos de la infección por ECEA se deben a factores como la respuesta inmune del huésped, la heterogeneidad de la virulencia entre las cepas, y la cantidad de bacterias que se encuentren infectando al individuo (Elías *et al.*, 2002).

Los cultivos con diferentes cepas ECEA, revelan bacterias que se disponen en una gruesa capa mucosa por encima de las superficies celulares (Hicks *et al.*, 1996). ECEA produce en el colon efectos citotóxicos como, por ejemplo, la vesiculación de las microvellosidades, y la ampliación de las aberturas de las criptas (Harrington *et al.*, 2005). Su patogénesis involucra tres etapas: (1) adhesión a la mucosa intestinal por la actuación de las fimbrias de agregación y factores de adhesión; (2) producción

de moco por las bacterias y formación de un biofilm en la superficie de los enterocitos, y (3) liberación de toxinas y estimulación de una respuesta inflamatoria por la mucosa intestinal (Huang *et al.*, 2004; Harrington *et al.*, 2005; Nataro, 2005).

La adhesión de ECEA a la mucosa intestinal requiere fimbrias de adherencia agregativa AAF (Moreira *et al.*, 2003). AAF tiene tres subunidades estructurales codificadas por los genes *aggA* (AAF/I), *aafA* (AAF/II) y *agr-3* (AAF/III) que se encuentran en un plásmido pAA (*plasmid aggregative adherence*) de 60-65 MDa. AAF/I, es responsable de la agregación y el fenotipo de hemaglutinación de eritrocitos humanos de algunas cepas ECEA (Nataro *et al.*, 1993). AAF/II, le permite adherirse a la mucosa intestinal (Czeczulin *et al.*, 1997), y AAF/III, funciona como una adhesina (Bernier *et al.*, 2002).

Los cuadros causados por ésta se caracterizan por diarrea acuosa, la cual puede tender a la cronicidad y favorecer desnutrición, pocos pacientes presentan fiebre y vómito y ocasionalmente se ha reportado sangre en heces, habitualmente se acompaña de moco. La duración media de la diarrea causada por ECEA_{agg} en un estudio en la India, fue de 17 ± 14.4 días. Los factores de riesgo para persistencia del cuadro enteral no han sido bien definidos. Hasta el momento no existe ningún tratamiento antimicrobiano efectivo (Tarr, 1995).

Las características patogénicas de *E. coli* de adherencia difusa (ECAD), son poco conocidas. Estas no forman microcolonias cuando se adhieren a células Hep-2, tal como lo hace ECEA (Eslava *et al.*, 1994). Su mecanismo de patogenicidad se ha asociado a una fimbria de superficie, conocida como F1845, involucrada en el fenómeno de adherencia difusa (Bilge *et al.*, 1989). Los genes *daa*, que codifican para esta fimbria se pueden encontrar en el cromosoma o en un plásmido. El fenómeno de adherencia difusa también se ha asociado con una proteína de

membrana externa de 100 kDa, en una cepa del serotipo 0126:H27, cuyos genes se han secuenciado pero solo se han encontrado en una minoría de las cepas aisladas. Al realizar ensayos in vitro en células CaCo y Hep-2, las cepas ECAD tienen la capacidad de inducir la formación de estructuras protuberantes, semejantes a dedos, las cuales le confieren protección a las bacterias, pero la presencia de dichas estructuras no se ha demostrado in vivo, por lo que los estudios epidemiológicos efectuados hasta ahora han generado grandes conflictos y polémicas acerca de su verdadero significado clínico (Benz and Schmidt, 1996; Nataro and Kaper, 1998). El grupo ECAD se puede aislar tanto de personas sanas como en personas con diarrea, siendo más importante en niños de 4 a 5 años. Los principales síntomas que se presentan son diarrea acuosa sin sangre y sin leucocitos (Nataro and Kaper, 1998).

La gastroenteritis infecciosa aguda a menudo tiende a ser autolimitada y no representa un riesgo para la vida del paciente, por lo que un adecuado manejo puede ser tan simple como la hidratación oral, que sigue constituyendo la base fundamental en el tratamiento de la gastroenteritis aguda para evitar la deshidratación. Sin embargo, el tratamiento antimicrobiano, está indicado en cualquier paciente que presente un síndrome disentérico, sobre todo si el cuadro enteral dura más de cinco días, o el cuadro febril se prolonga por más de tres días. De igual manera el tratamiento antimicrobiano debe ser reservado para infecciones graves y/o sus complicaciones, que pongan en peligro la vida del paciente, como por ejemplo las causadas por *Shigella*, *E. coli* enterotoxigénica, *E. coli* enteroinvasiva, cólera, etc. La elección del antibiótico siempre deberá ser con base en el patógeno que se sospeche y acorde a la experiencia de los médicos que tratan a la población infantil (Coria *et al.*, 2001).

El cuadro clínico no es suficientemente específico para permitir el diagnóstico fiable, de cualquiera de estas cepas diarreogénicas, los estudios habituales de

laboratorio (coprocultivo y pruebas bioquímicas) tienen un valor muy limitado, pues no permiten discriminar entre la *E. coli* comensal y la causante de patología gastrointestinal (Hechevarría *et al.*, 1993). Para la detección de *E. coli* diarreogénicas, existen reacciones bioquímicas, la serotipificación, los ensayos fenotípicos basados en características de virulencia y algunos métodos moleculares entre los que se incluyen la PCR (*polimerase chain reaction*), electroforesis en gel de campo pulsado, ribotipificación, hibridación de sondas de ADN, entre otras. que tiene alta sensibilidad y especificidad, además de ser valiosas donde las técnicas convencionales presentan restricciones, y para estudios de epidemiología molecular, al permitir diferenciar serotipos estrechamente relacionados y grupos de cepas no relacionadas clonalmente, debido a su gran poder discriminatorio (Calderón, 2002).

Tornieporth *et al.* (1995) diferenciaron cepas patogénicas de *E. coli* de niños de Brazil por PCR usando primers de oligonucleótidos específicos para detectar ECET, ECEP, ECEI, y esta técnica logró identificar de 96 niños con diarrea aguda, 16% de los casos con ECET, 8% con ECEP y 1% con ECEI y comparando con las técnicas de ensayos convencionales, el método de PCR demostró ser más simple, específico, rápido y económico. En un estudio realizado por Franzolin, *et al.* (2005) sobre prevalencia de *E. coli* enteropatógenas en niños con diarrea de Bahia, Brazil, usando técnicas de hibridación por colony blot con sondas de ADN marcadas para identificar factores de virulencia, hallaron ECEP en un 10% de los casos, seguidas por ETEC en 7,5% y EAEC en 4,2%.

Giammanco *et al.* (2002), caracterizaron cepas antibiótico resistentes de ECEH del serotipo O157:H7 aisladas en Italia, Francia y España por el análisis de genes de virulencia mediante la técnica de PCR y la electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE) de ADN digerido por la enzima XbaI, y encontraron que la PFGE produjo perfiles distintos de digestión de la

endonucleasa de restricción (REDPs). La variedad genética y fenotípica observada entre aislamientos antibiótico resistentes demostraron que las cepas no tenían un solo origen clónico. Por otra parte, Toma *et al.* (2003), desarrollaron un análisis de PCR múltiple para la identificación de las diversas *Escherichia coli* diarreagénicas humanas, cuyos blancos seleccionados para cada categoría eran *eae* para ECEP, *stx* para ECST, *elt* y *est* para ECET, *ipaH* para ECEI y *aggR* para ECEAg, concluyendo que esta metodología constituía una prueba práctica y rápida de diagnóstico para la identificación de las *E. coli* diarreagénicas en un solo tubo de reacción.

En Venezuela, la frecuencia de aislamiento de cepas patógenas de *E. coli* a menudo se encuentra asociada con diarrea aguda y crónica, principalmente en menores de 5 años, el 9% de las cepas patógenas recuperadas eran de ECEP de los serogrupos O clásicos, y otro 5% estaba confirmado por cepas ECET (Vizcaya *et al.*, 1999). Estos resultados se asemejan a los obtenidos por Urrestarazu, *et al.* (1999), que realizaron un estudio en 4 ciudades de Venezuela, para evaluar las características etiológicas, clínicas y sociodemográficas de la diarrea aguda en niños menores de 5 años y encontraron además de otros enteropatógenos, a ECEP en un 9% de los casos. En Cumaná, estado Sucre, Araque y Bastardo (1999) realizaron un estudio bacteriológico de la diarrea aguda infantil y reportaron que en niños menores de 1 año, ECEP tuvo el mayor porcentaje de aislamiento (17,78%), donde predominaron los serogrupos polivalentes I, seguidos por el polivalente III, y mostraron un alto grado de resistencia a los antibióticos trimetoprim/sulfametoxazol y tetraciclina.

También se ha demostrado que cepas de *E. coli* enteropatógenas se encuentran contaminando alimentos de diversos orígenes (Villalobos y Elguezabal, 2002; Villalobos, 2003; Martínez y Villalobos, 2005) lo que evidencia una manera de mantener circulantes las cepas infecciosas en la población, principalmente en la

infantil, que como bien se sabe es muy susceptible a estas infecciones. Ante todas estas evidencias nos propusimos investigar la presencia de *E. coli* diarreogénicas en niños con diarrea aguda en Cumaná – Venezuela, con el fin de conocer los "patotipos" circulantes y su implicación en el cuadro diarreico agudo, a su vez que se evaluaría la susceptibilidad antimicrobiana de las cepas aisladas.

METODOLOGÍA

Población

Se realizaron coprocultivos para aislamientos de bacterias enteropatógenas en 200 niños menores de 5 años, de ambos sexos, que presentaron diarrea aguda, y en 30 niños sin cuadro diarreico, para ser usados como control, que asistieron a la emergencia pediátrica del Servicio Autónomo Hospital "Antonio Patricio de Alcalá"(SAHUAPA) de Cumaná-Sucre, durante el periodo comprendido entre marzo 2006-julio 2007.

Muestra

Las muestras de heces fueron tomadas mediante el procedimiento de hisopado rectal (2 hisopos por paciente), atravesando el esfínter anal y llegando hasta la ampolla rectal. Los hisopos fueron introducidos en un tubo que contenía 8ml de medio de transporte Cary Blair. Estas muestras fueron debidamente identificadas y llevadas al laboratorio, para su procesamiento.

Los criterios de inclusión para los niños con diarrea fueron que presentaran cuadro diarreico agudo, de evolución no mayor de 72h, con heces blandas o líquidas, con sangre o no, con moco o no, sin tratamiento antibiótico en un lapso no menor de dos semanas previos a este episodio. Los niños controles no debían presentar episodio diarreico, y los mismos estuvieron apareados con los niños diarreicos según la edad y condición socioeconómica., estos niños procedieron de la consulta de triaje pediátrico del SAHUAPA de Cumaná, los cuales acudieron por causa de origen no

gastrointestinal, y no habían recibido terapia antibiótica, por lo menos en un periodo de dos semanas previo a la entrevista y toma de muestra.

A cada representante del niño en estudio se le pidió el consentimiento por escrito para la toma de muestra (Apéndice 1) siguiendo los criterios de Helsinki (PAHO, 2004) y luego del consentimiento del representante, a él mismo, se le realizó una encuesta para obtener datos epidemiológicos del niño con respecto a: estatus socioeconómico, tipo de trabajo, suministro de agua, procedencia, tipo de vivienda, disposición de excretas, etc., y poder realizar el Graffar correspondiente También se averiguó sobre el tipo de alimentación que recibían los niños (Apéndice 2). Para realizar el llenado de las encuestas, evaluación clínica de los niños y toma de las muestras (hisopado rectal), se contó con el apoyo profesional de un médico autorizado para tal fin

Métodos

Aislamiento e identificación por métodos de cultivo y pruebas bioquímicas convencionales.

Materiales para el transporte, cultivo, aislamiento e identificación bioquímica:

.- Medio de transporte Cary Blair a pH 8.4 (DIFCO, Laboratories, Detroit, Mich): permite la supervivencia de los microorganismos por un largo periodo de tiempo e impide la proliferación de los mismos. Constitución en 1000 mL de agua: Fosfato disódico: 1,10 g. Tioglicolato sódico: 1,50 g. Cloruro sódico: 5,0 g. Agar: 5,0 g.

.- Agar Nutritivo AN (DIFCO), pH: $7,0 \pm 0,2$. Medio base. Constitución en 1000 mL de agua: Peptona de carne: 5 g. Extracto de carne: 3 g. Agar: 12 g.

.- Agar Levine (DIFCO): pH: $6,8 \pm 0,2$. Medio diferencial selectivo que permite diferenciar a los fermentadores de lactosa (colonias moradas, con o sin brillo metálico) de los no fermentadores (colonias rosadas). Constitución en 1000 mL de agua: Peptona 10 g. Lactosa: 10 g. Hidrógeno fosfato dipotásico: 2 g. Eosina: 0,4 g. Azul de metileno: 0,065 g. Agar: 15 g.

.- Agar MacConkey (DIFCO): pH: $7,0 \pm 0,2$; medio diferencial selectivo (agar-rojo neutro sales biliares) es un medio diferencial para la selección y recuperación de Enterobacteriaceae y bacilos entéricos gran negativos relacionados, permite diferenciar a los fermentadores de lactosa (colonias rosadas) de los no fermentadores (colonias claras). Constitución en 1000 mL de agua: Peptona: 17 g. Polipeptona: 3,0 g. Lactosa: 10 g. Sales biliares: 1,5 g. Cloruro sódico: 5,0 g. Agar: 13,50 g. Rojo neutro: 0,03 g. Cristal violeta: 0,001 g.

.- Agar MacConkey sorbitol (DIFCO): pH: $7,1 \pm 0,2$. Es un medio diferencial para la selección y recuperación de bacterias sorbitol negativas (colonias transparentes) de las fermentadoras de sorbitol (colonias rosadas). Constitución en 1000 mL de agua: Peptona: 20 g. Sorbitol: 10 g. Sales biliares: 1,5 g. Cloruro de sodio: 5,0 g. Rojo neutro: 0,03 g. Cristal violeta: 0,001 g. Agar: 15 g.

.- Agar *Salmonella Shigella* (DIFCO): pH: $7,0 \pm 0,2$. Medio altamente selectivo formulado para inhibir el crecimiento de muchos microorganismos coliformes y permite el crecimiento de *Salmonella* y *Shigella* de muestras clínicas. Constitución en 1000 mL de agua: Peptona: 10 g. Lactosa: 10 g. Bilis bovina secada: 8,5 g. Citrato sódico: 8,50 g. Citrato de amonio y hierro (III): 1,0 g. Agar: 12 g. Rojo neutro: 0,025 g. Verde brillante: 0,0003 g.

.- Agar Xilosa-Lisina-Desoxicolato (XLD) DIFCO: pH: $7,4 \pm 0,2$. Diseñado para detectar *Shigella* en materia fecal, observándose las colonias rojas por las descarboxilación de la lisina, las *E. coli* y fermentadores de más de un hidrato de carbono producen colonia amarillas. Constitución en 1000 mL de agua: Xilosa: 3,50 g. Lactosa: 7,50 g. Lisina: 5,0 g. Sacarosa: 7,50 g. Cloruro de sodio: 5,0 g. Extracto de levadura: 3,0 g. Desoxicolato de sodio: 2,50 g. Tiosulfato de sodio: 6,8 g. Citrato de amonio y hierro (III): 0,80 g. Agar: 13,50 g. Rojo fenol: 0,08 g.

.- Caldo Selenito Cistina (DIFCO): pH: $7,0 \pm 0,2$. Medio de enriquecimiento, el cual reduce el crecimiento de los bacilos coliformes y mejora el crecimiento de *Salmonella* y *Shigella*. Constitución en 1000 mL de agua: L-Cistina: 0,01 g. Lactosa: 4,0 g. Tampón de fosfatos: 10,0 g. Hidrógeno – selenito sódico: 4,0 g.

.- Agar Tiosulfato Citrato sales Biliares Sucrosa (TCBS) DIFCO: pH: $8,6 \pm 0,2$. Se utiliza para el cultivo y aislamiento selectivo de Vibrios enteropatógenos. Constitución en 1000 mL de agua: Extracto de levadura: 5,0 g. Digerido pancreático de caseína: 5,0 g. Digerido pancreático de tejido animal: 5 g. Citrato sódico: 10,0 g. Tiosulfato de sodio: 10 g. Oxgall dihidratado: 5,0 g. Colato de sodio: 3,0 g. Sacarosa: 20 g. Cloruro sódico: 10,0 g. Citrato férrico: 1 g. Agar: 14 g. Azul timol: 0,04g. Azul de bromotimol: 0,04g.

.- Agua Peptonada Alcalina (APA): pH $8,6 \pm 0,2$. Medio de enriquecimiento para inhibir crecimiento de coliformes y estimular el de Vibrio. Constitución en 1000 mL de agua: Peptona: 10 g. Cloruro sódico: 5,0 g.

.- Caldo Infusión cerebro corazón (BHI) con novobiocina: (30 μ g de novobiocina por cada 50mL de BHI: caldo enriquecido y con antibiótico, que permitirá inhibir crecimiento de coliformes y aislar posibles *E. coli* enterohemorrágicas o

shigatoxigénicas. Constitución en 1000 mL de agua: Infusión de cerebro de oveja: 200 g. Infusión de ternero: 250 g. Proteasa peptona: 10 g. Dextrosa: 2,0 g. Cloruro sódico: 5,0 g. Fosfato disódico: 5,0 g.

.- Agar DNasa más ampicilina con verde de metilo, (DIFCO): pH: $7,3 \pm 0,2$. Utilizado para el aislamiento y cultivo de *Aeromonas*, observándose colonias rosadas de halo claro. Constitución en 1000 mL de agua: Triptona: 20 g. Ácido desoxirribonucleico: 2,0 g. Cloruro de sodio: 5,0 g. Agar: 12 g.

.- Medio *Campylobacter* Preston modificado: *Campylobacter* Blood-Free Selective agar base (OXOID), utilizando como sustancia selectiva Cefeperazona 32 mg/L. pH: $7,4 \pm 0,2$. Este medio se utiliza para el aislamiento de *Campylobacter sp.* Constitución en 1000 mL de agua: Caldo nutritivo: 225,0 g. Carbón bacteriológico: 4,0 g. Sulfato ferroso: 0,25 g. Hidrolizado de caseína: 3,0 g. Desoxicolato sódico: 1,0 g. Piruvato sódico: 0,25 g. Agar: 12,0 g.

.- Suplemento selectivo (OXOID): aditivo selectivo para *Campylobacter*, compuesto por cefoperazona: 4,0mg, teicoplanina: 2,0mg, y anfotericina B: 5,0mg.

.- Agar Conservación: para la conservación de las *E. coli* identificadas. Constitución en 1000 mL de agua: Triptona 10 g. Extracto de carne: 3,0 g. Agar: 13 g.

Medios de identificación bioquímica

Para la identificación bioquímica de las enterobacterias se partió del diagnóstico presuntivo consistente en las características morfológicas de las colonias en los medios selectivos diferenciales, bacilos Gram negativos y prueba de oxidasa negativa (Koneman *et al.*, 1997). Los medios para pruebas bioquímicas utilizados fueron los siguientes:

.- Agar Hierro Triple Azúcar (TSI) DIFCO. pH: $7,4 \pm 0,2$. Medio utilizado para determinar la capacidad de los microorganismos de metabolizar un hidrato de carbono específico incorporado al medio, con producción o no de gas, junto con la determinación de la posible producción de ácido sulfhídrico. Constitución en 1000 mL de agua: Extracto de levadura: 3,0 g. Peptona: 20 g. Cloruro de sodio: 5,0 g. Lactosa: 10 g. Sucrosa: 10,0 g. Glucosa: 1,0 g. Citrato férrico: 0,3 g. Tiosulfato de sodio: 0,3 g. Rojo fenol: 0,025 g. Agar: 12 g.

.- Agar Lisina Hierro (LIA) DIFCO. pH: $6,7 \pm 0,2$. Utilizado para determinar la capacidad enzimática o no del microorganismo de descarboxilar el aminoácido lisina para formar una amina con la resultante alcalinidad, con producción o no de gas y/o ácido sulfhídrico. Constitución en 1000 mL de agua: Extracto de levadura: 3,0 g. Glucosa: 1,0 g. L-Lisina: 10 g. Citrato de amonio férrico: 0,5 g. Tiosulfato de sodio: 0,04 g. Púrpura de bromocresol: 0,02 g. Agar: 14,5 g.

.- Agar Motilidad indol Ornitina (MIO) DIFCO. pH: $6,5 \pm 0,2$. Permite determinar la motilidad o no del microorganismo, su capacidad o no de producción de indol, utilizando el reactivo de Kovacs como revelador, y la descarboxilación de la ornitina. Constitución en 1000 mL de agua: Extracto de levadura: 3,0 g. Peptona: 10 g. Triptona: 10 g. L-Ornitina HCl: 5,0 g. Dextrosa: 1,0 g. Agar: 2,0 g. Púrpura de bromocresol: 0,02 g.

.- Agar Citrato de Simmons (BBL). pH: $6,6 \pm 0,2$. Usado para determinar si un microorganismo es capaz de utilizar el citrato como única fuente de carbono para el metabolismo y el crecimiento, con alcalinidad resultante. Constitución en 1000 mL de agua: Dihidrógeno fosfato amónico: 1,0 g. Hidrógeno fosfato dipotásico: 1,0 g. Cloruro sódico: 5,0 g. Citrato sódico: 2,0 g. Sulfato de magnesio: 0,20 g. Agar: 13 g. Azul de bromotimol: 0,08 g.

.- Agar base Urea (BBL). pH: $6,8 \pm 0,2$. Determina la capacidad de un microorganismo de hidrolizar la urea en dos moléculas de amoníaco, por producción de la enzima ureasa. Constitución en 1000 mL de agua: Digerido pancreático de gelatina: 1,0 g. Dextrosa: 1,0 g. Cloruro de sodio: 5,0 g. Fosfato potásico: 2,0 g. Urea: 20 g. Rojo fenol: 0,012 g.

.- Medio para la prueba Rojo de Metilo – Voges Proskauer (RM/VP) BBL. pH: $6,9 \pm 0,2$. Utilizado para evaluar el metabolismo del piruvato formado a partir de la fermentación de la glucosa (ácido mixto y butilenglicol). Se usa rojo de metilo en solución para revelar el RM y se emplea KOH al 10% y α -naftol en solución para revelar el VP. Constitución en 1000 mL de agua: Polipeptona: 7,0 g. Glucosa: 5,0 g. Fosfato dipotásico: 5,0 g.

.- Agar acetato (BBL). pH: $6,8 \pm 0,2$. Determina la capacidad de ciertos microorganismos de utilizar acetato como única fuente de carbono. Es especialmente útil para diferenciar *Escherichia coli* de *Shigella spp.* Constitución en 1000 mL de agua: Acetato de sodio: 2,0g. Sulfato de magnesio: 0,2 g. Cloruro de sodio: 5,0 g. Fosfato de amonio: 1,0 g. Fosfato dipotásico: 1,0 g. Azul de bromotimol: 0,08 g. Agar: 14,8 g.

.- Discos de O.N.P.G. (o-nitrofenil- β -D-galactósido) BBL. Utilizados para diferenciar los microorganismos fermentadores lentos de lactosa, de los no fermentadores.

.- Caldo EC con MUG (metilumbeliferil- β - D-glucorónido) (BBL). pH: 7,5. Determina la producción y utilización de la enzima 4-metilumbeliferone-B-D-glucoroine y por lo tanto muestran la fluorescencia típica ante la luz ultravioleta, permitiendo la identificación rápida del género *Escherichia*. Constitución en 1000 mL de agua: Extracto de levadura: 1,2 g. Caseína: 3,7 g. Thiopeptona: 3,7 g. Triptona: 7,5

g. Lactosa: 9,4 g. Fosfato de potasio dibásico: 1,0 g. Cloruro de sodio: 15,0 g. Sulfato de sodio: 0,5 g. Sulfito de sodio: 1,6 g. Fucsina básica: 0,8 g. Agar bacto: 19,0 g.

.- Galerías API 20E (bioMérieux). Es un sistema para la identificación rápida de bacterias de la familia *Enterobacteriaceae* y otros bacilos Gram-negativos. El sistema está estandarizado, y combina 8 pruebas convencionales y 12 de asimilación. El kit consta de una galería con 20 microtubos conteniendo medios y/o sustratos en forma deshidratada.

.- Colorantes y reactivos para coloración de Gram (Cristal violeta, Lugol, Safranina y Alcohol acetona. Para evaluar la morfología bacteriana y reacción frente a la tinción.

a) Cristal violeta. Para teñir las células bacterianas. Constitución: Cristal violeta: 20 g. Oxalato de amonio: 8,0 g. Etanol: 200 mL. Agua desionizada: 800,0 mL.

b) Lugol. Actuó como mordiente. Constitución: Yoduro: 3,30 g. Yoduro de potasio: 6,60 g. Etanol: 100,0 mL.

c) Safranina. Colorante de contraste. Constitución: Safranina: 2,50 g. Etanol: 100,0 mL.

d) Alcohol acetona (1:1). Se usó para decolorar. Constitución: Etanol: 500 mL. Acetona: 500 mL.

Reactivos reveladores

.- Reactivo de Kovacs, para la prueba de Indol. Este reactivo fue preparado según la siguiente fórmula: Alcohol isoamílico: 150,0 mL. Para-metil-amino-benzaldehído: 10 g. Ácido hidrociorhídrico concentrado: 50 mL.

.- Rojo de metilo en solución, para revelar la prueba rojo de metilo. La solución se preparó a partir de la siguiente fórmula: Rojo de metilo: 0,1 g. Alcohol etílico al 95%: 300 mL. H₂O destilada: 200 mL.

.- Hidróxido de potasio al 40% (p/v) con H₂O destilada. Para revelar el Voges Proskauer.

.- α -Naftol: Para revelar el Voges Proskauer. La solución se preparó a partir de la siguiente fórmula: α -naftol: 5 g. Alcohol isopropílico: 100 mL.

.- Peróxido de hidrógeno al 3% para realizar la prueba de catalasa, la cual se aplicó a las cepas recuperadas sospechosas de *Campylobacter*.

.- Solución acuosa al 1% de diclorhidrato de tetrametil parafenilendiamina para la reacción de oxidasa, la cual fue empleada para orientar el grupo bacteriano en función a su positividad o negatividad frente a esta prueba.

Método de coprocultivo

Se realizó la siembra de las 200 muestras de pacientes y las 30 muestras de niños controles a partir del hisopado, por extensión y agotamiento en placas de agares: Levine, MacConkey, *Salmonella-Shigella* (SS), xilosa lisina desoxicolato de sodio (XLD), deoxirribonucleasa (DNasa), y agar base selectivo para *Campylobacter* (Campy), y se colocaron a incubar a 37°C por 24 horas, excepto agar Campy que se colocó a 42°C por 48 horas en anaerobiosis, esto con la finalidad de realizar el coprocultivo completo y poder aislar cualquiera de los enteropatógenos bacterianos que pudiera estar causando la diarrea (Koneman, *et al.*, 1997).

Fue realizado enriquecimiento en caldo selenito cistina, el cual fue inoculado e incubado a 37°C por 18h y sembrado posteriormente en agar XLS y SS, los cuales se incubaron a 37°C por 24h, en busca de *Salmonella* y *Shigella*. También se enriqueció en APA, la cual fue incubada por 4h a 37°C y luego sembrada en agar TCBS incubado a 37°C por 24h, para la búsqueda de *Vibrio*. Y además se realizó enriquecimiento en caldo BHI con novobiocina (concentración final de 30 µg/mL), el cual se incubó a 37°C por 6h, para luego sembrarse en agar MacConkey sorbitol por extensión, e incubado a 37°C por 24h en búsqueda de *E. coli* sorbitol negativas (Koneman, *et al.*, 1997; Bravo and Villalobos, 2002).

Se tomaron 5 colonias con las características típicas o sospechosas de *Escherichia coli* por cada muestra de paciente y control, y se aislaron en agar nutritivo (AN) a fin de realizar la prueba oxidasa, para diferenciar las enterobacterias oxidasa negativa, de otros géneros, y posteriormente las otras pruebas bioquímicas para identificación conformadas por: triple azúcar hierro (TSI), siembra por punción y estría; hierro lisina (LIA), siembra por punción y estría; motilidad indol ornitina (MIO), siembra por punción; Citrato, siembra por estría, para verificar utilización de citrato como única fuente de carbono; Urea, siembra por punción; y la Reacción del Rojo de metilo y Voges/Proskauer, según la metodología descrita por (Edwards and Ewing, 1972; Koneman, *et al.* 1979; Ewing, 1986), las que originaron resultados confusos fueron confirmadas mediante el uso de galerías API 20E. Las cepas identificadas como *E. coli* fueron almacenadas en agar conservación para los análisis posteriores de confirmación (Koneman, *et al.*, 1997). Los otros microorganismos identificados diferentes a *E. coli* que se encontraron asociados a diarreas (*Salmonella*, *Campylobacter*, *Klebsiella*, etc.) fueron diagnosticados por las pruebas bioquímicas, para otorgarle información al médico y al paciente (Apéndice 3).

Identificación por la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de los distintos grupos de *E. coli* aisladas.

Materiales

.- Agar Nutritivo para el cultivo de las cepas de *E. coli* y posterior extracción del ADN.

.- Triton 100X.

.- Agua libre de endonucleasas. Promega.

.- Solución Buffer Tris Borato EDTA (TBE) pH 8,0 10X.

.- Primer para la amplificación de las secuencias específicas de ECEP (genes *eae* y *bfp*):

Primer *eae*-F: Secuencia (5'– 3'): GTG GCG AAT ACT GGC GAG ACT

Primer *eae*-R: Secuencia (5'– 3'): CCC CAT TCT TTT TCA CCG TCG

Primer *bfp*: Secuencia (5'– 3'): GGA AGT CAA ATT CAT GGG GGT AT

Primer *bfp*-1: Secuencia (5'– 3'): CCC CAT TCT TTT TCA CCG TCG

.- Primer para la amplificación de las secuencias específicas de ECET (genes *STI*, *STIa* y *LT*):

Gen *STI* y *STIa*

Primer SRM148^a: Secuencia (5'– 3'): TCT GTA TTA TCT TTC CCC TCT TTT AGT C

Primer SRM148B^a: Secuencia (5'– 3'): GTA TTG TCT TTT TCA CCT TTC GTC C

Primer SRM149: Secuencia (5'– 3'): GCA GGA TTA CAA CAC ART TCA CAG C

Gen *LT*

Primer SRM152: Secuencia (5'– 3'): CGA CAG ATT ATA CCG TGC TGA CTC

Primer SRM154: Secuencia (5'– 3'): GTA ATC GTT CAT CAA TCA CAC CAA

.- Primer para la amplificación de las secuencias específicas de ECEI (genes *ipaH* y *virF*):

Primer *ipaH*: Secuencia (5'– 3'): CTC GGC ACG TTT TAA TAG TCT GC

Primer *ipaH*-1: Secuencia (5'– 3'): GTG GAG AGC TGA AGT TTC TCT GC

Primer *virF*: Secuencia (5'– 3'): AGC TCA GGC AAT GAA ACT TTG AC

Primer *virF*-1: Secuencia (5'– 3'): TGG GCT TGA TAT TCC GAT AAG TC

.- Primer para la amplificación de las secuencias específicas de ECST (genes *Stx1* y *Stx2*):

Primer *Stx1*.1^a: Secuencia (5'– 3'): CTG GAT TTA ATG TCG CAT AGT GG

Primer *Stx2*.1^a: Secuencia (5'– 3'): CTG GCG TTA ATG GAG TTC AGT G

Primer SRM129: Secuencia (5'– 3'): TGA TGA TGA CAA TTC AGT ATA ACT GCC AC

^aMezcla de primers para la detección de *Stx1* y *Stx2*.

.- Primer para la amplificación de las secuencias específicas de ECEA (gen *aafII*):

Primer *aafII*: Secuencia (5'– 3'): CAC AGG CAA CTG AAA TAA GTC TGG

Primer *aafII*-1: Secuencia (5'– 3'): ATT CCC ATG ATG TCA AGC ACT TC

.- Primer para la amplificación de las secuencias específicas de ECAD (gen *daaE*):

Primer *daaE*: Secuencia (5'– 3'): GAA CGT TGG TTA ATG TGG GGT AA

Primer *daaE*-1: Secuencia (5'– 3'): TAT TCA CCG GTC GGT TAT CAG T

.- Master Mix 2X. Promega: 50U/mL de Taq ADN polimerasa; 400µM de cada: dATP, dGTP, dCTP, dTTP; 3mM MgCl₂.

.- Agarosa, Sigma.

.- Solución de bromuro de etidio 100µg/µL.

.- Colorante: blue/narange 6X. Promega.

.- Marcador de peso de ADN, Promega. Para determinar ADN de 100 a 1500 pb de longitud.

Como templado se utilizó el ADN total, el cual fue obtenido por procedimientos estándar de extracción por lisis, descrito por Rivas *et al.* (2007). El cual consistió en suspender 5 colonias de cada una de las cepas en 150 μ L de Triton 100X al 1% en buffet TE 1X, seguidamente se llevó a ebullición por 15 minutos, a fin de lisar por calor las membranas, finalmente se centrifugó a 10000 rpm durante 5 minutos, tomando el sobrenadante como templado de ADN. Posteriormente se realizó una electroforesis en gel de agarosa preparada al 1,5% (con buffer TBE 1X y bromuro de etidio al 1%), corrida a 80 voltios por 1 hora, utilizando como vehículo de transmisión de corriente buffer TBE 1X, a fin de constatar la presencia de ADN.

Todos los aislamientos de *E. coli* (tanto los obtenidos de niños con diarrea aguda, como los de niños control) fueron evaluados por PCR para la identificación de genes de virulencia de los distintos grupos, los protocolos de la reacción se presentan a continuación:

E. coli enteropatógena

Primer	Tamaño del amplificado pb	Condiciones de reacción
eae-F eae-R	890	95°C x 3min, 30 Ciclos (95°C x 20s; 58°C x 40s; 72°C x 30s) 72°C x 5min
Referencia:		Kim <i>et al.</i> 2005

Control positivo: *E. coli* CDC EDL 933

Control negativo: *E. coli* ATCC 25922

Volumen total de 25 μ L: 0,25 μ L de cada primer (20pmol/ μ L), 10 μ L de agua libre de endonucleasa, 12,5 μ L master mix y 2 μ L templado ADN.

Primer	Tamaño del amplificado pb	Condiciones de reacción
bfp bfp-1	300	94°C x 5min, 35 Ciclos (94°C x 1,5min; 60°C x 1,5min; 72°C x 1,5min) 72°C x 7min
Referencia:		Vidal <i>et al.</i> 2005

Control positivo: *E. coli* O55:H7
Control negativo: *E. coli* ATCC 25922

Volumen total de 25µL: 2,5µL de cada primer (2µM), 5µL de agua libre de endonucleasa, 12,5µL master mix y 2,5µL templado ADN.

E. coli enterotoxigénica

Primer	Tamaño del amplificado pb	Condiciones de reacción
SRM 148 ^a SRM148B ^a SRM149 SRM152 SRM154	169 466	95°C x 15min, 10 Ciclos (95°C x 30s; 65°C x 20s; 72°C x 30s) y 30 Ciclos (95°C x 30s; 60°C x 20s; 72°C x 30s) 72°C x 7min
Referencia:		Monday <i>et al.</i> 2006

Control positivo: *E. coli* O15:H11
Control negativo: *E. coli* ATCC 25922

Volumen total de 25µL: 2,5µL de cada primer (2µM), 2,5µL de agua libre de endonucleasa, 12,5µL master mix, 2,5µL templado ADN.

E. coli enteroinvasiva

Primer	Tamaño del amplificado pb	Condiciones de reacción
ipaH	933	94°C x 5min, 35 Ciclos (94°C x 1,5min; 60°C x 1,5min; 72°C x 1,5min) 72°C x 7min
ipaH-1		
virF	618	
virF-1		
Referencia:		Vidal <i>et al.</i> 2005

Control positivo: *E. coli* K1a O28:NM
Control negativo: *E. coli* ATCC 25922

Volumen total de 25µL: 2,5µL de cada primer (2µM), 5µL de agua libre de endonucleasa, 12,5µL master mix y 2,5µL templado ADN.

E. coli Shigatoxigénica

Primer	Tamaño del amplificado pb	Condiciones de reacción
Stx ₁ .1	313	95°C x 15min, 10 Ciclos (95°C x 30s; 65°C x 20s; 72°C x 30s) y 30 Ciclos (95°C x 30s; 60°C x 20s; 72°C x 30s) 72°C x 7min
Stx ₂ .1		
SRM129		
Referencia:		Monday <i>et al.</i> 2006

Control positivo: *E. coli* CDC EDL 933 O157:H7
Control negativo: *E. coli* ATCC 25922

Volumen total de 25µL: 2,5µL de cada primer (2µM), 2,5µL de agua libre de endonucleasa, 12,5µL master mix, 2,5µL templado ADN.

E. coli enteroadherente

Primer	Tamaño del amplificado pb	Condiciones de reacción
aafII aafII-1	378	94°C x 5min, 35 Ciclos (94°C x 1,5min; 60°C x 1,5min; 72°C x 1,5min) 72°C x 7min
Referencia:		Vidal <i>et al.</i> 2005

Control positivo: *E. coli* O42

Control negativo: *E. coli* ATCC 25922

Volumen total de 25µL: 2,5µL de cada primer (2µM), 5µL de agua libre de endonucleasa, 12,5µL master mix y 2,5µL templado ADN.

E. coli adherencia difusa

Primer	Tamaño del amplificado pb	Condiciones de reacción
daaE daaE-1	542	94°C x 5min, 35 Ciclos (94°C x 1,5min; 60°C x 1,5min; 72°C x 1,5min) 72°C x 7min
Referencia:		Vidal <i>et al.</i> 2005

Control positivo: *E. coli* F-1845

Control negativo: *E. coli* ATCC 25922

Volumen total de 25µL: 2,5µL de cada primer (2µM), 5µL de agua libre de endonucleasa, 12,5µL master mix y 2,5µL templado ADN.

Los ensayos de PCR se realizaron en un termociclador Gene Amp Perquim Elmer Applied Biosystems 9700 y los productos del PCR fueron visualizados por electroforesis en gel de agarosa preparada al 2% (con buffer TBE 1X y bromuro de etidio al 1%), los cuales fueron corridos a 85 voltios por 1h y 30min, utilizando como vehículo de transmisión de corriente buffer TBE 1X. Se utilizó un marcador de peso molecular de 100 - 1500 pb. Los productos fueron fotografiados en el fotodocumentador Gel doc (Biorad) (Eisenstein, 1990).

Evaluación de la susceptibilidad antimicrobiana de las *E. coli* aisladas de niños con diarrea y niños control.

Materiales

.- Agar Müeller - Hinton (DIFCO): pH: $7,3 \pm 0,1$. Usado como medio base para realizar pruebas de susceptibilidad a antimicrobianos. Constitución en 1000 mL de agua: Peptona ácida de caseína: 17,5 g. Infusión de carne: 300,0 g. Almidón: 1,50 g. Agar: 15,0 g.

.- Solución Salina Fisiológica 0,85% estéril.

.- Patrón de cloruro de bario equivalente a 0,5 estándar de MacFarland. Usado para la estandarización del número de bacterias requeridas en la prueba de susceptibilidad a antimicrobianos. Este patrón es equivalente aproximadamente a $1 \times 10^7 - 1 \times 10^8$ Unidades Formadoras de Colonias/mL. Constitución: Solución de cloruro de bario 0,048 M: 0,50 mL. Solución de ácido sulfúrico 0,18 M: 99,50 mL. Ajustado a una Densidad Optica (625 nm) de 0,08 – 0,1.

.- Discos de antibióticos comerciales marca DIFCO, utilizándose: ciprofloxacina (Cf: 5 μ g), gentamicina (CN: 10 μ g), aztreonam (ATM: 30 μ g), tetraciclina (TE: 30 μ g), sulfametoxazol/trimetoprim (SXT: 25 μ g), imipenem (IPM: 10 μ g), cefixima (CFM: 5 μ g), ampicilina/sulbactam (SAM: 20 μ g).

Método de difusión en placa, en agar Müeller-Hinton

Se practicó prueba de susceptibilidad a antimicrobianos a las *E. coli* aisladas de muestras diarreicas y también a las aisladas de muestras controles, siguiendo los procedimientos descritos por Bauer *et al.* (1966).

Las *E. coli* seleccionadas se repicaron en AN, incubándose a 37°C por 24h, al cabo de los cuales se seleccionaron 4-5 colonias bien aisladas que se suspendieron en

5ml de SSF estéril. Se incubó la suspensión a 37°C hasta la aparición de turbidez, comparándose luego con un patrón de cloruro de bario equivalente a 0,5 MacFarland ($1,5 \times 10^8$ bacterias/ml). La concentración se ajustó agregando SSF a la suspensión, en caso de una mayor turbidez de la misma con relación al patrón MacFarland.

Posteriormente al ajuste de la turbidez se sumergió un hisopo de algodón, estéril, en la suspensión del inóculo se rotó varias veces, y se presionó firmemente sobre las paredes internas del tubo a fin de quitar el exceso.

Se inoculó una placa de agar Müeller-Hinton, pasando el hisopo tres veces por toda la superficie del agar, rotando la placa aproximadamente 60° para asegurar una distribución uniforme del inóculo. Se esperó aproximadamente 3 minutos antes de colocar los discos antibióticos los cuales fueron los siguientes: Cf: 5µg, CN: 10µg, ATM: 30µg, TE: 30µg, SXT: 25µg, IPM: 10µg, CFM: 5µg, y SAM: 20µg.

Se invirtieron las placas e incubaron a 37°C por 24 h, procediendo a realizar la lectura de las zonas de inhibición alrededor del disco, mediante plantillas milimetradas. Las medidas de las zonas de inhibición fueron correlacionadas con tablas interpretativas de "Standards" publicadas por el Clinical and Laboratory Standar Institute (CLSI, 2006). Las cuales suministran un correlativo interpretativo (susceptible, intermedio y resistente).

Obtención de datos clínicos, epidemiológicos y evaluación de las características socioeconómicas de los individuos estudiados

Todos los datos de interés fueron obtenidos mediante encuesta, con ayuda de personal médico, y la ubicación de los participantes en los diferentes estratos socioeconómicos, se realizó de acuerdo con el método de Graffar, modificado para Venezuela por Méndez-Castellanos (1986).

Análisis estadístico

Los resultados obtenidos fueron procesados utilizando el programa SPSS/PC versión 12.0, mediante análisis descriptivo porcentual. Para establecer diferencias significativas entre los valores de los dos grupos en estudio, se utilizó Chi-cuadrado con corrección de Yate's a un 95% de confiabilidad (Wayne, 1988).

RESULTADOS

De las 200 muestras de heces provenientes de niños con diarrea aguda, se aisló *E. coli* sólo de 169 niños. El 54,44% (92/169) correspondieron a pacientes de sexo masculino, y el 45,56% (77/169) al sexo femenino. De los 30 niños controles que formaron parte del estudio, se aisló *E. coli* de 25 de ellos., perteneciendo el 56% (14/25) al sexo masculino y 44% (11/25) al sexo femenino.

En los 169 niños con diarrea aguda de los cuales se aisló *E. coli*, se diagnosticó *E. coli* diarreogénicas (ECD) por la técnica de PCR en 32 casos (18,93%), distribuidos de la siguiente manera: 18 ECEP, 10 ECET, 3 ECEA y 1 ECEI, (no se aisló ECST ni ECAD), la distribución de estos 32 aislamientos de acuerdo a la edad de los niños, se muestran en la tabla 1.

Tabla 1.- Relación entre la edad y la distribución porcentual de *E coli* diarreogénicas, aisladas de niños con diarrea aguda.

Intervalo de Edad	ECEP Nº (%)	ECET Nº (%)	ECEA Nº (%)	ECEI Nº (%)	p
0 - 6 meses	5 (27,78%)	1 (10%)	0	0	
7 - 12 meses	4 (22,22%)	3 (30%)	0	0	
13 – 24 meses	8 (44,44%)	4 (40%)	3 (100%)	1 (100%)	0,60ns
> 24 meses	1 (5,56%)	2 (20%)	0	0	
Total:	18 (100%)	10 (100%)	3 (100%)	1 (100%)	

ns: no significativo ($p > 0,05$). Nº: número. (%): porcentaje.

La relación entre los porcentajes de aislamientos de las 32 cepas de ECD determinadas por la técnica de PCR, de acuerdo al sexo reveló diferencias estadísticas significativas ($p < 0,05$), encontrándose los mayores porcentajes de aislamientos en el sexo masculino (Tabla 2).

Tabla 2.- Relación entre el sexo y la distribución porcentual de *E coli* diarreogénicas, aisladas de niños con diarrea aguda.

Sexo	ECEP Nº (%)	ECET Nº (%)	ECEA Nº (%)	ECEI Nº (%)	P
Femenino	7 (38,89%)	8 (80%)	0	0	
Masculino	11 (61,11%)	2 (20%)	3 (100%)	1 (100%)	0,038*
Total:	18 (100%)	10 (100%)	3 (100%)	1 (100%)	

*: significativo ($p < 0,05$). N°: número. (%): porcentaje.

De los 200 niños con enfermedad diarreica aguda, además de *E. coli* diarreogénicas se aislaron otros géneros bacterianos patógenos entéricos: *Salmonella sp* (11 aislamientos, 5,5%) y *Campylobacter sp* (5 aislamientos, 2,5%). También se aislaron géneros no patógenos o de dudosa patogenicidad: *Citrobacter sp*, *Klebsiella sp*, *Enterobacter sp*, *Serratia sp*, y *Proteus sp*. La frecuencia de aislamientos de todos estos géneros bacterianos se muestran en la figura 1.

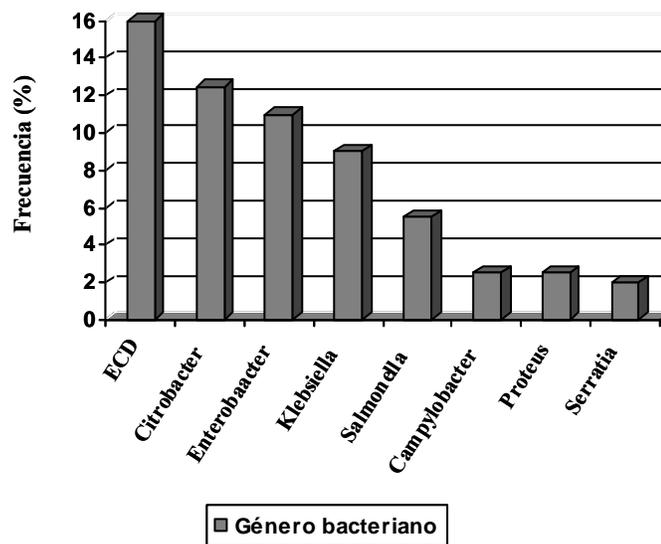


Figura 1. Frecuencia de los géneros bacterianos aislados de los coprocultivos realizados a 200 niños con enfermedad diarreica aguda.

En algunos niños con diarrea por ECD, la misma se aisló como único patógeno bacteriano, mientras en otros casos se encontró asociada a otra bacteria (Tabla 3).

Tabla 3.- Asociación de cada tipo de *E coli* diarreogénica con otros géneros bacterianos.

Género bacteriano	ECEP N° (%)	ECET N° (%)	ECEA N° (%)	ECEI N° (%)	P
<i>Enterobacter sp</i>	2 (11,11%)	0	0	0	
<i>Klebsiella sp</i>	1 (5,56%)	1 (10%)	0	0	
<i>Citrobacter sp</i>	1 (5,56%)	3 (30%)	0	0	
<i>Salmonella sp</i>	1 (5,56%)	1 (10%)	1 (33,33%)	0	0,84 ns
<i>Proteus sp</i>	1 (5,56%)	0	0	0	
Sin otra bacteria	13 (72,22%)	5 (50%)	2 (66,67%)	1 (100%)	

ns: no significativo ($p > 0,05$). N°: número. (%): porcentaje.

El tipo más frecuente de *E. coli* aislado fue ECEP, con el 10,65% (18/169), en dichas cepas amplificó el gen *eae* (Figura 2). En 2 de las cepas anteriormente citadas, además de amplificar el gen *eae* amplificó el gen *bfp* (1,18%), de allí que fueran clasificadas como ECEP "típicas" (Figura 3), mientras que las 16 cepas restantes (9,47%) fueron clasificadas como ECEP "atípicas", porque sólo amplificó el gen *eae*.

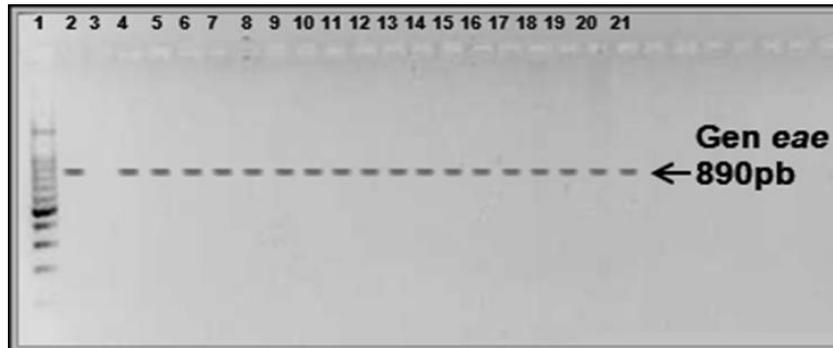


Figura 2. Amplificación por PCR para el gen eae (ECEP)

Pozos: (1) marcador de peso de ADN; (2) control positivo; (3) control negativo; (4): cepa 6; (5): cepa 8; (6): cepa 22; (7): cepa 24; (8): cepa 26; (9): cepa 37; (10): cepa 38; (11): cepa 55; (12): cepa 59; (13): cepa 62; (14): cepa 63; (15): cepa 74 (16): cepa 89; (17): cepa 96; (18): cepa 104; (19): cepa 128; (20): cepa 136; (21): cepa 157.

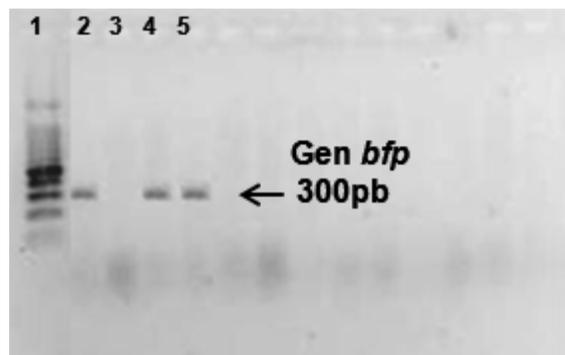


Figura 3. Amplificación por PCR para el gen bfp (ECEP)

Pozos: (1) marcador de peso de ADN; (2) control positivo; (3) control negativo; (4): cepa 37; (5): cepa 136.

ECET fue detectada en 10 cepas, de los 169 aislamientos de *E. coli* (5,91%), en todas ellas sólo amplificó el gen *st* que codifica para la toxina termoestable (Figura 4).

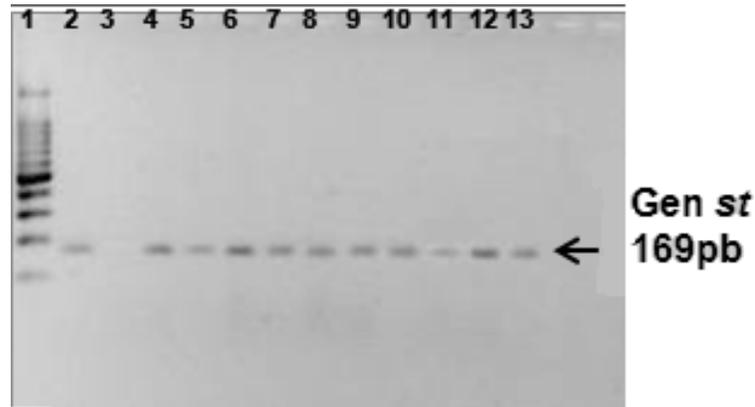


Figura 4. Amplificación por PCR para el gen st (ECET)

Pozos: (1) marcador de peso de ADN; (2) control positivo; (3) control negativo; (4): cepa 2; (5): cepa 12; (6): cepa 16; (7): cepa 31; (8): cepa 97; (9): cepa 106; (10): cepa 135; (11): cepa 140; (12): cepa 155; (13): cepa 199.

ECEI sólo se obtuvo en un caso (0,59%), cepa en la cual amplificaron los genes *ipaH* y *virF* (Figura 5). En vista a que el género *Shigella* también posee estos genes de patogenicidad, fue necesario diferenciar ambos géneros, para lo cual se le aplicó a dicha cepa las pruebas bioquímicas del acetato, el ONPG y el caldo EC con MUG (Villalobos, 2003; Terragno, *et al.*, 2007), las cuales dieron resultados positivos, confirmando la presencia del género *E. coli*.

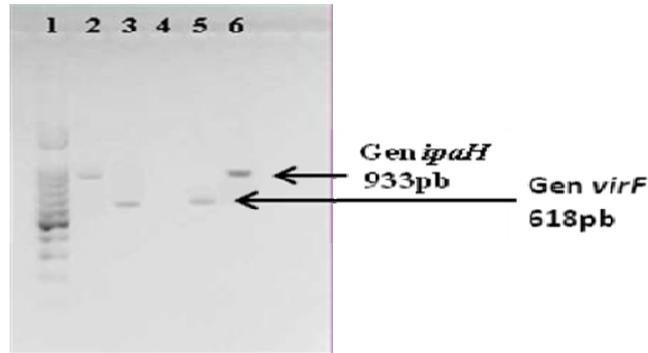


Figura 5. Amplificación por PCR para de los genes *ipaH* y *virF* (ECEI)

Pozos: (1) marcador de peso de ADN; (2) control positivo gen *ipaH*; (3) control positivo gen *virF*; (4): control negativo; (5): cepa 72, amplificación del gen *virF*; (6): cepa 72, amplificación del gen *ipaH*.

En 3 cepas de *E. coli* amplificó el gen de patogenicidad *aafII* (1,78%), permitiendo clasificarlas como ECEA (Figura 6).

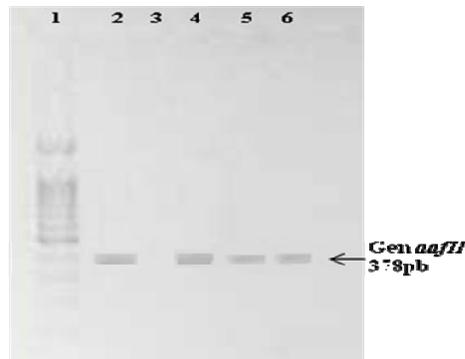


Figura 6. Amplificación por PCR para el gen *aafII* (ECEA)

Pozos: (1) marcador de peso de ADN; (2) control positivo; (3) control negativo; (4): cepa 132; (5): cepa 164; (6): cepa 168.

No se obtuvo amplificación de los genes *Stx1/Stx2* y *daaE* por la técnica de PCR, por consiguiente se puede inferir que en los niños que forman parte de este estudio no hubo circulación de las cepas de tipo ECST y ECAD respectivamente, como causantes de síndrome diarreico. De las 30 muestras provenientes de niños

controles, se aisló *E. coli* en 25 casos, ninguno de dichos aislamientos, amplificó los genes de patogenicidad correspondientes a ECD, mediante la técnica de PCR.

Para la determinación de la sensibilidad a antibióticos se ensayó la cepa control *E. coli* ATCC 25922, la cual no mostró resistencia a ninguno de los antibióticos evaluados, sin embargo, los aislamientos de ECEP (18 casos), mostraron mayor resistencia a SAM (50%), TE (38,89%) y SXT (38,89%). Los aislamientos de ECET mostraron mayor resistencia a los mismos antibióticos pero en diferente proporción: SXT (80%), SAM (70%) y TE (60%). La cepa de ECEI aislada, sólo fue resistente a TE, mientras que los 3 aislamientos de ECEA fueron sensibles a todos los antibióticos empleados en este estudio.

Los aislamientos provenientes de niños controles mostraron mayor resistencia a los antibióticos: SAM (68%), CFM (48%) y TE (40%). Todas las cepas en estudio, tanto las ECD como las *E. coli* aisladas de niños controles, fueron más sensibles a los antibióticos: Cf, ATM, CN, e IPM.

La asociación entre las cepas provenientes de niños con diarrea (D) y control (C), y el porcentaje de sensibilidad o resistencia al antibiótico, se muestra en la tabla 4. Se observó que cefixima fue el único antibiótico que presentó un valor altamente significativo ($p < 0,001$).

Tabla 4.- Origen de la cepa de *E. coli* diarreogénica y porcentaje de sensibilidad o resistencia a los antibióticos evaluados.

Antibióticos	Grupos Nº	Sensible Nº (%)	Res – Interm Nº (%)	χ^2
Ciprofloxacina	D (32)	31 (96,88%)	1 (3,20 %)	0,00 ns
	C (25)	25 (100%)	0 (0%)	
Gentamicina	D (32)	30 (93,75%)	2 (6,25%)	0,57 ns
	C (25)	21 (84%)	4 (16%)	
Aztreonam	D (32)	31 (96,88%)	1 (3,20%)	0,00 ns
	C (25)	24 (96%)	1 (4%)	
Tetraciclina	D (32)	18 (56,25%)	14 (43,75%)	0,00 ns
	C (25)	15 (60%)	10 (40%)	
Sulfametoxazol/ trimetoprim	D (32)	17 (53,12%)	15 (46,88%)	0,31 ns
	C (25)	16 (64%)	9 (36%)	
Imipenem	D (32)	32 (100%)	0 (0%)	0
	C (25)	25 (100%)	0 (0%)	
Ampicilina/sulbactam	D (32)	15 (46,88%)	17 (53,12%)	0,75 ns
	C (25)	8 (32%)	17 (68%)	
Cefixima	D (32)	30 (93,75 %)	2 (6,25%)	11,05 ***
	C (25)	13 (52%)	12 (48%)	

***= altamente significativo ($p < 0,001$); ns: no significativo ($p > 0,05$); Res-Inter.: resistente – intermedio; χ^2 : chi-cuadrado. Nº: número. (%): porcentaje.

ECEP y ECET, presentaron una distribución relativamente estable a lo largo del año, aunque hubo mayor aislamiento de las cepas *E. coli* diarreogénicas en los meses más cálidos: marzo, abril y mayo, con la excepción de ECEP que mostró también un aislamiento alto en el mes de junio (22,22%). Los resultados se muestran en la tabla 5.

Tabla 5.- Meses del año y porcentajes de aislamiento de cepas de *E. coli* diarreogénicas de los niños con diarrea aguda.

Mes	ECEP Nº (%)	ECET Nº (%)	ECEI Nº (%)	ECEA Nº (%)	P
Febrero	1 (5,56%)	0	0	0	
Marzo	4 (22,22%)	4 (40%)	0	1 (33,33%)	
Abril	4 (22,22%)	3 (30%)	0	0	
Mayo	1 (5,56%)	0	0	2 (66,67%)	
Junio	4 (22,22%)	0	0	0	0,22 ns
Julio	1 (5,56%)	1(10%)	1 (100%)	0	
Agosto	1 (5,56%)	0	0	0	
Septiembre	1 (5,56%)	1 (10%)	0	0	
Noviembre	1 (5,56%)	1(10%)	0	0	
Total:	18 (100%)	10 (100%)	1 (100%)	3 (100%)	

ns: no significativo ($p > 0,05$). Nº: número. (%): porcentaje.

Las características macroscópicas de las heces de los niños que presentaron EDA por cada una de las *E. coli* diarreogénicas, se muestran en la tabla 6, en la

misma se observa que los mayores porcentajes de aislamientos de ECD fueron de heces líquidas con moco.

Tabla 6.- Características de las heces de niños diarreicos con *E. coli* diarreogénica.

Características de las heces	ECEP Nº= 18	ECET Nº= 10	ECEI Nº= 1	ECEA Nº= 3	P
Blandas	3 (16,67%)	2 (20%)	0	1 (33,33%)	
Semilíquidas	9 (50%)	4 (40%)	0	1 (33,33%)	
Líquidas	3 (16,67%)	3 (30%)	1 (100%)	0	
Semilíquidas y líquidas	3 (16,67%)	1 (10%)	0	1 (33,33%)	0,92 ns
Presencia de moco	11 (61,11%)	5 (50%)	1 (100%)	2 (66,67%)	
Presencia moco y sangre	1 (5,56%)	2 (20%)	0	0	

ns: no significativo ($p > 0,05$). Nº: número. (%): porcentaje.

Las características clínicas presentes en la infección por cada una de las ECD de los niños con diarrea, se muestran en la tabla 7, en la misma no se obtuvo diferencias estadísticas, y se demuestra que la fiebre, el dolor abdominal y los vómitos, son las principales manifestaciones clínicas en la EDA causada por las ECD evaluadas.

Tabla 7.- Características clínicas presentes en niños con enfermedad diarreica aguda causada por cada tipo de *E. coli* diarreogénica.

Características clínicas	ECEP Nº= 18	ECET Nº= 10	ECEI Nº= 1	ECEA Nº= 3	P
Fiebre	13 (72,22%)	4 (40%)	1 (100%)	1 (33,33%)	
Nº evacuaciones (≥ 4)	10 (55,56%)	7 (70%)	0	1 (33,33%)	
Presencia de vómitos	5 (27,78%)	5 (50%)	0	2 (66,67%)	
Deshidratación:					0,96 ns
No presente	8 (44,44%)	4 (40%)	1 (100%)	2 (66,67%)	
Leve ($\leq 5\%$)	10 (55,56%)	6 (60%)	0	1 (33,33%)	
Dolor abdominal	13 (72,22%)	6 (60%)	1 (100%)	2 (66,67%)	

ns: no significativo ($p > 0,05$). Nº: número. (%): porcentaje.

El porcentaje de aislamiento de los diversos tipos de *E. coli* diarreogénicas de acuerdo al tipo de alimentación recibida por los niños con diarrea aguda, se muestran en la tabla 8. En la misma puede observarse como los mayores porcentajes de aislamientos de todos los tipos de ECD evaluados, se encuentran en los niños alimentados de leche no materna más otros alimentos.

Tabla 8.- Relación de los porcentajes de aislamientos de *E. coli* diarreogénicas, con el tipo de alimentación recibida por los niños con diarrea aguda.

Tipo de alimentación	ECEP Nº= 18	ECET Nº= 10	ECEI Nº= 1	ECEA Nº= 3	P
Leche materna más agua	1 (5,56%)	0	0	0	
Leche materna más otros alimentos	2 (11,11%)	2 (20%)	0	0	0,93 ns
Leche materna más leche no materna	2 (11,11%)	0	0	0	
Leche no materna más otros alimentos	13 (72,22%)	8 (80%)	1 (100%)	3 (100%)	

ns: no significativo ($p > 0,05$). Nº: número. (%): porcentaje.

Los porcentajes de aislamiento de las *E. coli* diarreogénicas y su relación con la condición socioeconómica del núcleo familiar al cual pertenecían los niños con diarrea aguda, se muestran en la Tabla 9. En la misma no se observan diferencias estadísticas, y los mayores porcentajes de niños diarreicos con ECD se encuentran en las clases obrera y marginal.

Tabla 9.- Relación de los porcentajes de aislamientos de *E. coli* diarreogénicas con la condición socioeconómica del núcleo familiar de los niños con diarrea aguda.

Graffar	ECEP Nº= 18	ECET Nº= 10	ECEI Nº= 1	ECEA Nº= 3	P
Media baja	4 (22,22%)	1 (10%)	0	0	
Obrera	9 (50%)	7 (70%)	1 (100%)	1 (33,33%)	0,61 ns
Marginal	5 (27,78%)	2 (20%)	0	2 (66,67%)	

ns: no significativo ($p > 0,05$). Nº: número. (%): porcentaje.

DISCUSIÓN

De los 200 niños con diarrea aguda, se aisló *E. coli* en 169 de ellos, lográndose identificar *E. coli* diarreogénicas (ECD) por la técnica de PCR, en 32 cepas (18,93%), lo cual indica que son patógenos bacterianos importantes en la etiología de la enfermedad diarreica aguda infecciosa en la población infantil de Cumaná. Según reportes de investigaciones previas, los porcentajes de aislamientos de ECD, se encuentran entre el 7 y 35% (Varela *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2007; Hien *et al.*, 2008), rango dentro del cual se encuentra el porcentaje de aislamientos obtenido en esta investigación.

La relación entre la edad de los niños y la enfermedad diarreica aguda (EDA) producida por cada una de las ECD, originó resultados estadísticamente no significativos ($p > 0,05$), observándose en general que los mayores porcentajes de aislamientos fue en los niños entre 13 y 24 meses de edad, Estos resultados coinciden con los reportados por Afset *et al.* (2003), que encontraron los mayores porcentajes de aislamientos de ECD en niños entre 12 – 23 meses de edad.

Se debe considerar que ECEP presentó un alto porcentaje de aislamientos (27,78%) en los niños entre 0-6 meses, y que ECET tuvo altos porcentajes de aislamientos (30%) en niños entre 7-12 meses. Todos estos resultados coinciden con otras investigaciones que han reportado que los niños menores de 2 años, son la población infantil con mayor susceptibilidad a la infección por ECD, reportando la mayor prevalencia, en el caso de ECEP, en lactantes menores de 6 meses; mientras ECET está principalmente asociada a diarrea acuosa con deshidratación, en niños menores de 2 años, de países en vías de desarrollo (Nataro and Kaper, 1998; Kaper *et al.*, 2004).

Se ha descrito que las enfermedades diarreicas ocurren durante los dos primeros años de vida, con una incidencia mayor en lactantes de seis a once meses de edad (cuando se produce el destete), esto quizá es debido a los efectos combinados de la disminución de anticuerpos adquiridos de la madre, la falta de inmunidad activa en el menor de 1 año, el contacto directo con las heces humanas o animales cuando el niño comienza a gatear y la introducción de alimentos que pueden estar contaminados con los enteropatógenos (Bazabe *et al.*, 2007).

En la tabla 2, se muestra la relación entre el sexo y los porcentajes de aislamientos de cada una de las ECD, en la misma se observan diferencias estadísticas significativas ($p < 0,05$), con un mayor número de infectados en infantes del sexo masculino para la mayoría de los "patotipos" (ECEP, ECEA y ECEI), mientras que ECET, fue mayormente aislada en niños de sexo femenino (80%). En general, se obtuvo un mayor porcentaje de aislamientos en el sexo masculino (17 de 32 cepas; 53,12%), que en el femenino (15 de 32 cepas; 46,88%), coincidiendo estos resultados con otros estudios que reportan al sexo masculino como más susceptible a enfermedad diarreica aguda (Ramírez *et al.*, 2001; Varela *et al.*, 2007; Cermeño *et al.*, 2008; Tomat *et al.*, 2009).

Los mayores porcentajes de niños del sexo masculino con EDA podría explicarse con base en planteamientos que indican que los varones tienen mayor susceptibilidad a las infecciones que las niñas, probablemente porque estas al poseer dos cromosomas X tendrán mayor protección, ya que un gen localizado en el cromosoma humano X controla el nivel de anticuerpos de tipo IgM, los cuales tienen funciones importantes dentro de la inmunidad como, actuar frente antígenos extraños al huésped, promover la fagocitosis de microorganismos por los macrófagos y leucocitos polimorfonucleares, además de ser potentes activadores del sistema de complemento (Valverde *et al.*, 2007; Bazabe *et al.*, 2008). Sin embargo, se

obtuvieron altos porcentajes de aislamientos de ECET en el sexo femenino (80%), lo cual sugiere la necesidad de realizar estudios que abarquen una mayor población, que permita obtener un mayor número de aislamientos de este "patotipo" de *E. coli*, y determinar si en efecto es más común en niñas que en niños, o fue simplemente un hallazgo casual. Contrario a estos argumentos, otros autores señalan que el sexo no juega un rol importante en la prevalencia de enteropatógenos (Paniagua *et al.* 2007).

En los 200 niños con EDA, además de aislar ECD, se encontraron otros géneros bacterianos patógenos entéricos entre los cuales se encontraron *Salmonella* (5,5%) y *Campylobacter* (2,5%), destacándose con estos resultados la importancia de *E. coli* diarreogénicas, *Salmonella sp* y *Campylobacter sp*, como agentes bacterianos asociados a diarrea aguda en niños menores de 5 años en Cumaná. Estos resultados sustentan que la exposición a contaminación fecal es clave en el establecimiento de los cuadros diarreicos gastrointestinales diagnosticados en esta población, debido a que la forma de transmisión de *E. coli* es principalmente fecal – oral generalmente por manos o alimentos contaminados (Sánchez *et al.*, 2006). La organización mundial de la salud (WHO, 1992) señala que las enfermedades diarreicas son más frecuentes durante los primeros 2 años de vida, reflejando un patrón que combina el declive de anticuerpos maternos, con la escasa inmunidad activa en el infante, e introducción de alimentos potencialmente contaminados con bacterias fecales.

Otros géneros bacterianos no patógenos o de dudosa patogenicidad aislados de los niños con EDA fueron: *Citrobacter* (12,5%), *Enterobacter* (11%), *Klebsiella* (9%), *Proteus* (2,5%) y *Serratia* (2%). Estos resultados coinciden con los obtenidos por Sánchez *et al.* (2005) quienes realizaron coprocultivos a 212 niños y hallaron altos porcentajes de aislamientos de los géneros *Klebsiella* y *Enterobacter*.

En algunos casos, las 32 cepas de ECD aisladas, se encontraron asociadas a otro géneros patógenos bacteriano como *Salmonella sp* (9,37%; 3/32) y no patógenos o de dudosa patogenicidad como: *Klebsiella sp*, *Citrobacter sp*, *Enterobacter sp*, *Proteus sp*, sin embargo, ECD se aisló como único patógeno bacteriano en un alto porcentaje (65,63%; 21/32). La información estadística reveló, que cada tipo de ECD no tiene una asociación específica con algún otro género bacteriano.

Se obtuvo 18 aislamientos de ECEP (10,65%), de los cuales 2 cepas (1,18%) correspondieron a *E. coli* enteropatógena "típicas" por la presencia de los genes *eae* y *bfp*, y 16 cepas (9,47%) a *E. coli* enteropatógena "atípicas", con solo la amplificación del gen *eae*. Estos resultados coinciden con estudios realizados en Reino Unido que demostraron una frecuencia mayor de aislamientos de cepas ECEP "atípicas" que de cepas "típicas" a partir de niños con gastroenteritis (Scotland *et al.*, 1996); y los reportados por Afset *et al.* (2003) quienes obtuvieron mayor prevalencia de aislamientos de ECEP "atípicas" (9,8%) en niños con diarrea en Norway.

El rol de los cultivos de de ECEP "atípicas" en regiones menos desarrolladas no es claro, sin embargo, trabajos realizados en zonas de Brasil y Vietnam sugieren un papel importante de dichas cepas como enteropatógenos causantes de gastroenteritis infantil (Trabulsi *et al.*, 2002; Nguyen *et al.*, 2005). Aún cuando podría presumirse que las cepas "típicas" sean más virulentas que las "atípicas", no existen estudios que lo confirmen y se siguen reportando cuadros diarreicos por ECEP "atípicas" (Nguyen *et al.*, 2005; Nguyen *et al.*, 2006).

ECET fue aislada de 10 de niños con diarrea aguda (5,92%), en todas ellas solo amplificó el gen *st*. Estos resultados coinciden con los reportados por Chávez *et al.* (2007), quienes buscaron detectar las toxinas LT y ST de ECET en diferentes tipos de muestras (aire, agua, suelo, alimentos y heces de niños y de adultos), en la ciudad de

Puebla, y hallaron LT (*lt*) con mayor frecuencia en muestras clínicas de adultos, mientras que las muestras clínicas de niños, no presentaron amplificación de este gen, sino para el gen *st* que codifica la toxina ST. En dicho estudio se encontró que esta bacteria estuvo presente en todas las muestras en diferentes porcentajes, hecho que sugiere la biocontaminación con ECET de diferentes ambientes, y que la transmisión de la misma puede deberse a la falta de higiene de las personas. Se ha descrito que ECET es una de las causas bacterianas más frecuente de diarrea en los lactantes, niños y adultos de países en desarrollo y la causa más común de la diarrea del viajero, sin embargo, la frecuencia y, por tanto, la importancia de ECET como causante de diarrea en todo el mundo se encuentra en parte obstaculizada por la dificultad en el reconocimiento de los organismos (Qadri, *et al.*, 2005).

Los genes *virF* e *ipaH* fueron amplificados en una sola cepa de *E. coli* (0,59%), indicando su correspondencia con ECEI. Estos resultados tienen similitud con los estudios de Ratchtrachenchai *et al.* (2004), quienes aislaron a ECEI en un 0,5% de niños de Tailandia. Por su parte Vieira *et al.*, 2007, recolectaron muestras de heces de pacientes diarreicos en 22 comunidades rurales en el noroeste de Ecuador, y evaluaron por PCR la infección de ECD en los mismos, encontrando como patógeno más frecuentemente aislado a ECEI (3,2%).

Se debe acotar que los genes *virF* e *ipaH* además de poseerlos ECEI también los tiene presente el género *Shigella*, debido a que ambos patógenos presentan características bioquímicas y genéticas muy similares (Faundez *et al.*, 1988; Rappelli *et al.*, 2005). Sin embargo, a diferencia de *Shigella*, ECEI puede ser lactosa negativa o positiva, lo cual es un rasgo inusual pero que puede ser posible (Nataro and Kaper, 1998). En este estudio la positividad de estos genes por la técnica de PCR, fue hallada en una cepa lactosa positiva, lo cual es un hallazgo importante de tomar en consideración, debido a que muchos estudios, excluyen las cepas *E. coli* lactosa

positivas como posibles ECEI y, por tanto, se podría estar subestimando la prevalencia de la infección por este enteropatógeno bacteriano (Taylor *et al.*, 1988; Okeke *et al.*, 2000). A la cepa de este estudio que amplificó los genes *virF* e *ipaH*, adicionalmente se le realizó para la confirmación de género las pruebas, ONPG (+), Acetato (+) y MUG (+), de las cuales, la prueba MUG adquiere mayor relevancia en la caracterización de ECEI, dado que *Escherichia coli* a excepción del serotipo O157:H7, utiliza la enzima 4-metilumbeliferil- β -D-glucuronidasa, mostrando la fluorescencia típica ante la luz ultravioleta, por el contrario el género *Shigella*, es MUG negativa (Villalobos, 2003).

ECEA logró detectarse por la amplificación del gen *aafII* de 3 cepas. El preciso mecanismo por el cual ECEA causa diarrea, no ha sido bien determinado hasta el momento (Savarino *et al.*, 1997) y no existen reportes de prevalencia de este "patotipo" en Venezuela. En Gabón se investigó la presencia de ECD en 150 niños menores de 5 años con diarrea, mediante PCR y detectaron 10,67% de ECEA con el gen *aafII*, teniendo 3 tercios de estos pacientes entre 6 y 24 meses de edad (Presterl *et al.*, 2003). Spano *et al.* (2008) encontró ECEA en un 4,6%, en niños mayores de 12 meses, dato que coincide con los resultados obtenidos en esta investigación, donde el porcentaje total de aislamientos estuvo dentro de dicho grupo etario (13-24 meses), aunque fue hallada en un porcentaje mucho menor (1,78%), lo cual puede ser debido a que este "patotipo" de ECD ha sido calificada como responsable de diarreas persistentes en países desarrollados más que en aquellos en vías de desarrollo (Savarino *et al.*, 1993; Itho *et al.*, 1997; Adachi *et al.*, 2001; Jiang *et al.*, 2002; Cohen *et al.*, 2005).

En los niños diarreicos evaluados no logró amplificarse los genes *Stx1/Stx2*, ni *daaE*, pertenecientes a los "patotipos" ECST y ECAD respectivamente, lo cual permite inferir que estos tipos de ECD, no estaban circulando en la población infantil

para el periodo en que fue realizado este estudio. De los 25 niños controles de los cuales se aisló *E. coli*, ninguna de las cepas mostró amplificación de genes de virulencia de ECD, esto quizá es debido a que las cepas ECD se encuentran fuertemente asociadas a casos de diarrea o al tamaño de la muestra control.

En general se halló un 10,65% ECEP, 5,92% ECET, 0,59% ECEI, y 1,78% ECEA en esta población en estudio. Estos resultados coinciden con estudios epidemiológicos realizados en países en vías de desarrollo, incluyendo Latinoamérica, que han demostrado que ECEP y ECET son los dos principales patógenos bacterianos aislados en los casos de diarrea aguda infantil (Clarke *et al.*, 2003; Franzolin *et al.*, 2005).

En estudios realizados en Venezuela, la frecuencia de aislamientos de cepas patógenas de *E. coli* a menudo se encuentra asociada con diarrea aguda y crónica, principalmente en niños menores de 5 años. De esta forma Urrestarazu *et al.* (1999) reportaron que en niños menores de 5 años con diarrea aguda, el 9% de las cepas patógenas aisladas eran ECEP de los serogrupos O clásicos, y otro 5% estaba conformado por cepas ECET. Araque y Bastardo (1999) reportaron que en niños menores de 1 año ECEP tuvo el mayor porcentaje de aislamientos, donde predominaron los serogrupos polivalentes I (O₂₆, O₅₅, O₁₁₁ y O₁₄₅), seguido por el polivalente III (O₁₂₅, O₁₂₆ y O₁₂₈).

Vilchez *et al.* (2009), evaluaron un total de 526 muestras de heces de niños de León - Nicaragua, con el fin de detectar ECD., y obtuvieron mayor frecuencia de ECET en niños con diarrea (20,5%); mientras ECEP atípica, ECEI y ECEA fue detectada con frecuencias de 20,7%, 1,4% y 33,1%, respectivamente, aunque estos porcentajes de aislamientos fueron mayores a los obtenidos en este estudio, coinciden en el hecho de reportar a los "patotipos": ECET, ECEP "atípica", ECEA y ECEI

como causales de EDA en población infantil. A su vez en Mongolia, Sarantuya *et al.* (2005) evaluaron 238 cepas de *E. coli* aisladas de niños con diarrea y aunque hallaron una alta incidencia de ECEA (15,1%), corroboraron que además ECEA, los "patotipos" ECEP, ECET, y ECEI, tienen un peso significativo en asociación con la diarrea pediátrica, lo cual coincide con los resultados obtenidos en Venezuela. Bueris *et al.* (2007) realizaron un estudio para identificar ECD en niños con y sin diarrea en Brasil, hallando 18,7% de prevalencia de ECD en el grupo con diarrea, prevalencia muy similar a los resultados obtenidos en esta investigación (18,93%), sin embargo, su "patotipo" más comúnmente aislado fue ECEA, seguido por ECEP "atípica", ECET y ECST.

En cuanto a la evaluación de la susceptibilidad antimicrobiana en las cepas de ECD aisladas de niños con EDA, es importante resaltar que las cepas ECEP y ECET se comportaron como multiresistentes (resistencia a ≥ 3 antibióticos), en un 50% de los casos. Un alto porcentaje de las cepas (27 de 32), fue resistente a por lo menos un antibiótico. Los patrones de resistencia encontrados pueden estar reflejando los tipos de antibióticos más usados, la extensión de los mecanismos de transferencia horizontal, o la prevalencia de infección de las cepas patógenas en la población (Estrada *et al.*, 2005).

La aplicación del chi-cuadrado para comparar si hay asociación entre la resistencia o susceptibilidad a cierto antimicrobiano y el origen de la *E. coli* (diarrea o control), mostró resultados no estadísticamente no significativos ($p > 0,05$), observándose similitud de patrones de resistencia en ECD y *E. coli* de niños control. Solamente la comparación estadística para el antibiótico cefixima, mostró diferencias altamente significativas ($p < 0,001$), obteniéndose el porcentaje de resistencia más altos en los aislamientos provenientes de niños control (48%) en comparación con el porcentaje de resistencia de cepas ECD (6,25%).

El haber obtenido mayor porcentaje de resistencia en cepas aisladas de niños controles con respecto al antibiótico Cfm, podría explicarse basado en el hecho de que la flora normal comensal del tracto intestinal al estar sujeta a una exposición frecuente a los antibióticos, sobre todo los de administración por vía oral, son un reservorio importante de genes de multiresistencia (Millar and Walsh, 2001; Infante *et al.*, 2005) con capacidad potencial de transmisión a organismos. Se esperaría entonces, mayor similitud entre los patrones de multiresistencia de los enteropatógenos más prevalentes con los de las bacterias de la flora normal, como se observó en este estudio, y en el trabajo entre *Shigella* y *E. coli* no diarreogénicas realizado por Rodas *et al.* (2005).

E. coli como parte de la flora comensal intestinal, tiene particularmente un gran potencial para el desarrollo de la resistencia a antimicrobianos y podría constituirse en un reservorio diseminable de genes de multiresistencia a bacterias patógenas o viceversa. En este contexto, debe también considerarse que gran parte de los factores de virulencia de *E. coli* diarreogénica, al igual que los genes de multiresistencia a antibióticos, se encuentran asociados a elementos móviles. Este fenómeno unido al uso inapropiado de antibióticos, contribuye a la ineficacia de los antibióticos y sus complicaciones en el tratamiento (Sack, 1997; Maraki *et al.*, 2003; Merino and Hreouk, 2004). Por todo esto, es necesario una mayor vigilancia de la terapia antibiótica en los episodios diarreicos complicados, que ameriten tratamiento, siendo importante realizar las pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos, con la finalidad de prescribir el tratamiento preciso.

Las cepas ECD fueron en general encontradas, durante todos los meses del año, pero hubo mayor cantidad de aislamientos en meses cálidos, similar a lo reportado por Rao *et al.* (2003) y Olesen *et al.* (2005). Estos hallazgos confirman que los patógenos causantes de diarrea de origen bacteriano, son mayormente aislados en

meses cálidos, que es cuando se ha comprobado que el microorganismo se reproduce más eficazmente (Nataro and Kaper, 1998).

La relación entre las características macroscópicas de las heces de niños diarreicos y el tipo de ECD aislado, no mostró diferencias estadísticas significativas ($p>0,05$), la mayoría de ellas fueron de consistencia semilíquida y líquidas, con presencia de moco. Datos similares a los encontrados en el presente estudio son los de Corral and Gutiérrez (1987), quienes reportaron leucocitos fecales en el diagnóstico del síndrome diarreico, sin embargo, esta característica macroscópica de las heces también se observa en la diarrea causada por otros patógenos (Cermeño *et al.*, 2008).

Los signos y síntomas clínicos más relevantes en este estudio fueron: fiebre, dolor abdominal y vómitos, iguales a los señalados por Spano *et al.* (2008) en EDA por *E. coli* diarreogénica. De acuerdo a los resultados encontrados en cuanto a la deshidratación (leve), en los niños con ECEP (44,44%), la misma podría deberse a la acción de estas bacterias a nivel intestinal, sobre el propio enterocito causando el borramiento del borde en cepillo (lesiones A/E) y la acción de las diferentes moléculas bacterianas sobre las uniones celulares, efectos que combinados, determinarían una disminución importante de la superficie de adsorción del intestino con la consiguiente pérdida de agua, lo cual también explica la diarrea líquida con moco (Nataro and Kaper, 1998). En los niños con ECET la deshidratación (leve) en el 60% de los casos, viene dada por la elaboración de sus toxinas (LT o ST), las cuales actúan sobre receptores peptídicos natriuréticos y traen como consecuencia un aumento en la secreción de líquidos y electrolitos, provocando una diarrea secretoria copiosa, caracterizada por heces líquidas (Nataro and Kaper, 1998). Por su parte el porcentaje de deshidratación (leve) en los niños con ECEA (33,33%), podría explicarse por la adhesión al epitelio intestinal en forma agregativa

produciendo daño e inflamación de la mucosa intestinal, por lo que un porcentaje alto presenta moco en las heces (66,67%) (Nataro, 2005).

Las características clínicas mostraron similitud en todas las ECD evaluadas. En ECEP y ECEI hubo los mayores porcentajes de niños con fiebre, seguido de ECET y ECEA; mientras que en la infección por ECET hubo mayor número de evacuaciones y vómitos. En la mayoría de los casos no hubo o fue leve el porcentaje de deshidratación, esto puede ser debido a que la evaluación de los niños fue realizada en un momento temprano (agudo) de la aparición de los síntomas de enfermedad diarreica. En general los niños evaluados presentaron dolor abdominal. Esta clínica no permitió discriminar entre la infección por un tipo de ECD en particular, lo cual fue confirmado de manera estadística al obtener diferencias no significativas ($p > 0,05$).

La relación entre los diferentes porcentajes de aislamientos de cada ECD y el tipo de alimentación de los niños, no mostró diferencias estadísticas significativas ($p > 0,05$). Se observó que los mayores aislamientos se hicieron de niños alimentados con leche no materna mas otros alimentos y de acuerdo al Graffar la mayoría de los niños pertenecían a las clases obrera y marginal, lo cual hace suponer que las condiciones de vida de los niños son precarias y las medidas de higiene no están bien implementadas, lo cual favorece la transmisión de la bacteria de persona a persona o por agua y/o alimentos contaminados. Todas estas características clínicas y epidemiológicas, son similares a los reportados en otros estudios en población infantil (Cheng *et al.*, 2005; Steiner *et al.*, 2006). El marco socioeconómico deficiente es entonces el principal factor de riesgo por la precariedad de los servicios sanitarios y la falta de educación (Durán, 2007).

No se encontraron características clínicas definidas que permitieran determinar con certeza el tipo de ECD responsable de la diarrea aguda infecciosa infantil. Para hacer el diagnóstico de *E. coli* diarreogénicas, es necesario realizar estudios que permitan detectar sus factores de virulencia, como por ejemplo, la técnica de la PCR, la cual constituye una herramienta de la biología molecular, que ofrece resultados confiables con elevada especificidad y sensibilidad, pues las técnicas convencionales no permiten diferenciar entre *E. coli* perteneciente a la flora comensal y *E. coli* diarreogénica, además es necesario un mayor control de la terapia antibiótica en estas cepas, que se han vuelto más resistentes a los antimicrobianos, complicando más la patología diarreica e incrementando las tasas de morbilidad y mortalidad infantil.

CONCLUSIONES

De los 200 niños con clínica de EDA, en 169 hubo aislamiento de *E. coli* y de los 30 niños que conformaron el grupo control, en 25 se aisló esta enterobacteria.

Por la técnica de la PCR se amplificó el gen *eae* en 18 cepas aisladas de niños con EDA (10,65%), y de éstos, dos presentaron a su vez el gen *bfp* (1,18%), habiendo entonces la presencia tanto de ECEP "típica" (gen *eae* y *bfp*) como de ECEP "atípicas" (solo el gen *eae*).

La PCR amplificó el gen *st* codificante de la toxina termoestable de ECET en 10 casos (5,92%), mientras que no amplificó el gen *lt* codificante de la toxina termolábil de este "patotipo" bacteriano.

Se amplificó por la técnica de la PCR el gen *affII* de ECEA, en 3 casos (1,78%); y los genes *ipaH* y *virF* de ECEI en un paciente con EDA (0,59%).

No se encontraron diferencias estadísticas significativas entre cada tipo de ECD y la edad de los niños evaluados.

Se encontró diferencias estadísticas significativas entre las ECD y el sexo de los pacientes pediátricos, notándose que, con la excepción de ECET, los otros "patotipos" se aislaron con mayor frecuencia del sexo masculino.

Otros géneros bacterianos asociados a ECD fueron *Salmonella sp*, *Klebsiella sp*, *Citrobacter sp*, *Enterobacter sp* y *Proteus sp*. *Campylobacter sp* no se aisló como patógeno asociado.

Las características clínicas más resaltantes fueron fiebre, vómitos y dolor abdominal.

El estudio de susceptibilidad a los antimicrobianos de las cepas aisladas, mostró diferencias estadísticas altamente significativas para el antibiótico CFM, encontrándose más sensibilidad a este antibiótico en las cepas ECD que las *E. coli* del grupo control. En general las cepas de ECD fueron resistentes a SXT, SAM y TE, mientras que los antibióticos IPM, Cf, CN y ATM mostraron altos porcentajes de sensibilidad.

En la evaluación del tipo de alimentación en los niños con EDA, hubo predominio de aislamientos de ECD en los alimentados con leche no materna mas otros alimentos, sin que se encontraran diferencias estadísticas entre el tipo de alimentación y la infección por cada tipo de ECD aislada.

La estratificación socioeconómica de los niños que formaron parte de este estudio, mostró que todos se ubicaron en los estratos III, IV y V, encontrándose mayores porcentajes de aislamientos de ECD en los estratos IV y V (clases obrera y marginal). La distribución de cada tipo de ECD en función del Graffar, no reporto diferencias estadísticas.

BIBLIOGRAFÍA

- Adachi, J.; Jiang, Z.; Mathewson, J.; Verenkar, M.; Thompson, S.; Martinez, F.; Steffen, R.; Ericsson, C. and DuPont, H. 2001. Enteroaggregative *Escherichia coli* as a major etiologic agent in travel's diarrhea in 3 regions of the world. *Clin Infect Dis.*, 32:1706-1709.
- Adachi, J.; Mathewson, J.; Jiang, Z.; Ericsson, C. and DuPont, H. 2002. Enteric pathogens in Mexican sauces of popular restaurants in Guadalajara, Mexico, and Houston, Texas. *Ann Intern Med.*, 136: 884-887.
- Afset, J.; Bergh, K. and Bevanger, L. 2003. High prevalence of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) in Norwegian children with diarrhea. *J Med Microbiol.*, 52:1015-1019.
- Alikhani, M.; Mirsalehian, A. and Aslani, M. 2006. Detection of typical and atypical enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) in Iranian children with and without diarrhea. *J of Med Microbiol.*, 55:1159–1163.
- Araque, Y. y Bastardo, J. 1999. Estudio bacteriológico de la diarrea aguda infantil en Cumaná, estado Sucre. *Saber.*, 11(1):45-51.
- Baldini, M.; Kaper, J.; Levine, M.; Candy, D. and Moon, H. 1983. Plasmid-mediated adhesion in enteropathogenic *Escherichia coli*. *J Pediatr Gastro Nutr.*, 2:534–538.
- Banwell, J. 1990. Pathophysiology of diarrheal disorders, *Rev Infect Dis.*, 12(1):S30-S35.
- Bauer, A.; Kirby, J. and Turck, M. 1966. Antibiotics susceptibility testing by standardized single disk method. *Am J Pathol.*, 45:493-6
- Bazabe, M.; Sánchez, H.; Galindo, E. and Rodríguez, I. 2008. Enfermedad diarreica aguda en niños menores de cinco años hospitalizados en el hospital Santa Bárbara Honduras. Marzo – Abril 2007. *Rev Electrónica Temas de Investigación en Salud.* v. 2 n.1. Enero – junio 2008.
- Benz, I. and Schmidt, M. 1996. Isolation and serologic characterization of AIDA-I, the adhesin mediating the diffuse adherence phenotype of the diarrhea associated *Escherichia coli* strain 2787 (O126:H27). *Infect Immun.*, 60:13-18.

Bern, C.; Martinez, J.; De Zoisa, I.; and Glass, R. 1992. The magnitude of the global problem of diarrhoeal disease: a ten-year update. *Bull World Health Organ.*, 70(6):705-714.

Bernier, C.; Gounon, P. and LeBouguenec, C. 2002. Identification of an aggregative adhesion fimbria (AAF) type III encoding operon in enteroaggregative *Escherichia coli* as a sensitive probe for detecting the AAF encoding operon family. *Infect Immun.*, 70:4302-4311.

Beutin, L.; Aleksic, S.; Zimmermann, S. and Gleier, K. 1994. Virulence factors and phenotypic traits of verotoxigenic strains of *Escherichia coli* isolated from human patients in Germany. *Med Microbiol Immunol.*, 183:13-21.

Bilge, S.; Clausen, C.; Lau, W. and Moseley, S. 1989. Molecular characterization of a fimbrial adhesin, F1845, mediating diffuse adherence of diarrhea-associated *Escherichia coli* to Hep-2 cells. *J Bacteriol.*, 171:4281-4289.

Bravo, V. and Villalobos, L. 2002. *Escherichia coli* enterohemorrágica en productos cárnicos comercializados en el mercado municipal de Cumaná, Venezuela. *Rev Soc Ven Microbiol.*, 22(2):119-121.

Bueris, V.; Palma, M.; Romano, C.; Fernandes, M.; Regina, M.; Baquerizo, M.; Ramos, S.; Lima, M. and Rachid, L. 2007. Detection of diarrheagenic *Escherichia coli* from children with and without diarrhea in Salvador, Bahia, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 102(7):839-844.

Bukholm, G. and Figenschau, K. 1988. Invasiveness of enterobacterial related to the presence of high molecular weight plasmid. *APMSI*, 96:30-36.

Calderón, R. 2002. Manual de procedimientos para la investigación de brotes de infecciones intrahospitalarias producidas por bacterias mediante métodos de biología molecular. *Inst Nac de Salud*, Serie de normas técnicas N° 35, 1-28.

Cermeño, J.; Hernandez, I.; Camaripano, M.; Medina, N.; Guevara, A. and Hernández, C. 2008. Etiología de diarrea aguda en niños menores de 5 años. Ciudad Bolívar, Venezuela. *Rev Soc Ven Microbiol.*, 28(1):30-42.

Chávez, E.; Martínez, L.; Cedillo, M.; Gil, C.; Avelino, F. and Castañeda, E. 2007. Identificación de cepas de ECET de diferentes ambientes. *Enf Inf Microbiol.*, 27(3):70-74.

Cheng, A.; McDonald, J. and Thielman, N. 2005. Infectious diarrhea in developed and developing countries. *J Clin Gastroenterol.*, 39(9):757-73.

Clarke, S.; Haigh, R.; Freestone, P. and Williams, P. 2003. Virulence of enteropathogenic *Escherichia coli*, a global pathogen. *Clin Microbiol Rev.*, 16(3):365-378.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2007. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; seventeenth informational supplement. Wikler M, Cockerill F, Craig W, Dudley M, Eliopoulos G, Hecht D. M100-S17.

Cohen, M.; Nataro, J.; Bernstein, D.; Hawkins, J.; Roberts, N. and Staat, M. 2005. Prevalence of diarrheagenic *Escherichia coli* in acute childhood enteritis: a prospective controlled study. *J Pediatric.*, 146(1):11-13.

Corral, I. and Gutiérrez, J. 1987. Faecal leukocytes in the diagnosis of ADS. *Pediatr diag.*, 3(5):291-292.

Coria, J.; Villapando, S.; Gómez, D. and Treviño, A. 2001. Aspectos microbiológicos y epidemiológicos para el uso racional de antibióticos en niños con gastroenteritis bacteriana aguda. *Rev Mex Ped.*, 68(5):200-215.

Donneberg, M. and Kaper, J. 1992. Enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun.*, 60:3953-3961.

Drasar, B. and Hill, M. 1974. Human intestinal flora. Academic Press, London, UK.

DuPont, H.; Formal, S.; Hornick, R.; Snyder, M.; Libonati, J.; Sheahan, D.; LaBrec, E. and Kalas, J. 1971. Pathogenesis of *Escherichia coli* diarrhea. *N Engl J Med.* 285(1):1-9.

Durán, T. 2007. Diarrea aguda en niños. *Rev Paceaña Med Fam.*, 4(5):30-33.

Edward P, and Ewing, W. 1972. Identification of Enterobacteriaceae. 3era ed. Burgess Publishing Company. Minneapolis.

Eisenstein, B. 1990. The polymerase chain reaction. A new method of using molecular genetics for medical diagnosis. *New Engl J Med.*, 322:178-183.

Elias, W.; Uber, A.; Tomita, S.; Trabulsi, L. and Gomes, T. 2002. Combinations of putative virulence markers in typical and variant enteroaggregative *Escherichia coli* strains from children with and without diarrhoea. *Epidemiol Infect.*, 129:49-55.

Eslava, C.; Mateo, J. and Cravioto A. 1994. *Cepas de Escherichia coli relacionadas con la diarrea*. En: diagnóstico de laboratorio de infecciones gastrointestinales. Giono, S.; Escobar, A.; Valdespino J. Secretaria de Salud. México, 251 pp.

Ewing, W. 1986. *Identification of Enterobacteriaceae*, 4th ed. Elsevier Science Publishing Co. Inc., New York, NY.

Estrada, T.; Cerna, J., Paheco, L.; Velázquez, R.; Ochoa, T.; Torres, J. and DuPont, H. 2005. Drug-resistant Diarrheogenic *Escherichia coli*, Mexico. *Emerg Inf Dis.*, 11(8): 1306-1308.

Faundez, G.; Figueroa, G.; Troncoso, M. and Cabello, F. 1988. Characterization of enteroinvasive *Escherichia coli* strains isolated from children with diarrhea in Chile. *J Clin Microbiol.*, 26: 928–932.

Feng, P. 1995. *Escherichia coli* serotype O157:H7 novel vehicles of infection and emergente of phenotypic variants. *Emerg Infect Dis.*, 1:47-52.

Franzolin, M.; Barbosa, R.; Keller, R.; Tardelli, T.; Beutin, L.; Lima, M. ; Milroy, C. ; Strina, A. ; Ribeiro, H. and Rachid, L. 2005. Prevalence of diarrheagenic *Escherichia coli* in children with diarrhea in Salvador, Bahia, Brazil. *Mem Inst Osw C.*, 100(4):359-363.

Giammanco, A.; Maggio, M.; Ciarnmanco, G.; Morelli, R.; Minelli, F.; Scheutz, F. and Caprioli, A. 1996. Characteristics of *Escherichia coli* strains belonging to enteropathogenic *E. coli* serogroups isolated in Italy from children with diarrhea. *J Clin Microbiol.*, 34(3):689-694.

Giammanco, G.; Pignato, S.; Grimont, F.; Grimont, P.; Caprioli, A.; Morabito, S. y Giammanco, G. 2002. Characterization of shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 isolated in Italy and in France. *J Clin Microbiol*, 40(12):4619-4624.

González, R.; Díaz, C.; Mariflo, M.; Clorarl, R.; Pequeneze, M. and Pérez-Schel, I. 1997. Age-specific prevalence of *Escherichia coli* with localized and aggregative adherent in Venezuelan infants with acute diarrhea. *J Clin Microbiol.*, 35(5):1103-1107.

Guerrant, R.; Hugues, J.; Lima, N. and Crane, J. 1990. Diarrhea in developed and developing countries: Magnitude, special settings, and etiologies, *Rev Infect Dis.*, 12(1): S41-S50.

- Guerrant, R.; Schorling, J.; McAuliffe, J. and De Souza, M. 1992. Diarrhea as a cause and effect of malnutrition: diarrhea prevents catch-up growth and malnutrition increases diarrhea frequency and duration. *Am J Trop Med Hyg.*, 47(1):28-35.
- Guerrant, R. and Van Gildert, T. 2001. Practice guidelines for the management of infectious diarrhea. *Clin Infect Dis.*, 32:331-351.
- Harrington, S.; Strauman, M.; Abe, C. and Nataro, J. 2005. Aggregative adherence fimbriae contribute to the inflammatory response of epithelial cells infected with enteroaggregative *Escherichia coli*. *Cell Microbiol.*, 7:1565-1578.
- Hechevarría, P.; Savarino, S. and Yamamoto, T. 1993. *E. coli* diarrhea. *Clin Gastroent*, 7(2): 243-262.
- Hicks, S.; Candy, D. and Phillips, A. 1996. Adhesion of enteroaggregative *Escherichia coli* to porcine intestinal mucosa in vitro. *Infect Immun.*, 64:4751-4760.
- Hien, B.; Scheutz, F.; Cam, P.; Serichantalergs, O.; Huong, T.; Thu, T. and Dalsgaard, A. 2008. Diarrheagenic *Escherichia coli* and *Shigella* strains isolated from children in a hospital case-control study in Hanoi, Vietnam. *J Clin Microbiol.*, 46(3): 996-1004.
- Huang, D.; DuPont, H.; Jiang, Z.; Carlin, L. and Okhuysen, P. 2004. Interleukin-8 response in an intestinal HCT-8 cell line infected with enteroaggregative and enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Clin Diagn Lab Immunol.*, 11:548-551.
- Infante, B.; Grape, M.; Larsson, M.; Kristiansson, C.; Pallecchi, L.; Rossolini, G. and Kronvall, G. 2005. Acquired sulphonamide resistance genes in fecal *Escherichia coli* from healthy children in Bolivia and Peru. *J Antimicrob Agents.*, 25(4):308-312.
- Itho, Y.; Nagano, I.; Kunishima, M. and Ezaki, T. 1997. Laboratory investigation of enteroaggregative *Escherichia coli* O untypeable: H10 associated with a massive outbreak of gastrointestinal illness. *J Clin Microbiol.*, 35:2546-2550.
- Jiang, Z.; Lowe, B.; Veerenker, M.; Ashley, D.; Steffen, R.; Tornieporth, N.; von Sonnenburg, F.; Waiyaki, P. and DuPont, H. 2002. Prevalence of enteric pathogens among international travelers with diarrhea acquired in Kenya (Mombasa), India (Goa), or Jamaica (Montego Bay). *J Infect Dis.*, 185:497-502.
- Kaper, J.; Nataro, J. and Mobley, H. 2004. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol.*, 2:123-140.

Koneman, E.; Allen, S.; Janda, W.; Schreckenberger, P. and Winn, W. 1997. *Diagnostic Microbiology*. Color atlas and textbook, 5th ed., Lippincott, Philadelphia.

Kim, J.; Kim, S.; Kwon, N.; Bae, W.; Lim, J.; Koo, H.; Kim, J.; Noh, K.; Jung, W. and Park, Y. 2005. Isolation and identification of *Escherichia coli* O157:H7 using different detection methods and molecular determination by multiplex PCR and RAPD. *J Vet Sci.*, 6(1): 7-19.

Kotloff, K.; Winickoff, J.; Ivanoff, B.; Clemens, J.; Swerdlow, D.; Sansonetti, P.; Adak, G. and Levine, M. 1999. Global burden of *Shigella* infections: implications for vaccine development and implementation of control strategies, *Bull World Health Organ.*, 77(8): 651-66.

Levine, M. 1987. *Escherichia coli* that cause diarrhea: enterotoxigenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic, and enteroadherent. *J Infect Dis.*, 155:377- 389.

Martínez, R. and Villalobos, L. 2005. Ocurrencia de *Escherichia coli* enteropatógena en Moluscos Bivalvos en Cumaná, Venezuela. *Rev Cien Fac Cien V LUZ.*, 15(2):163-167.

Maraki, S.; Georgiladakis, A.; Tselentis, Y. and Samonis, G. 2003. A 5-year study of the bacterial pathogens associated with acute diarrhoea on the island of Crete, Greece, and their resistance to antibiotics. *Eur J Epidemiol.*, 18:85-90.

Méndez-Castellano H. 1986. Estratificación Social y Biología Humana. Método de Graffar modificado. *Arch Ven Puer Ped.*, 49:93-110.

Merino, L. and Hreouk, G. 2001. Resistencia a antibióticos y epidemiología molecular de *Shigella spp* en el nordeste argentino. *Rev Panam S Pub.*, 15(4):219–122.

Millar, M. and Walsh, T. 2001. Carriage of antibiotic resistant bacteria by healthy children. *J. Antimicrob Chemother.*, 47:605-610.

Ministerio de Sanidad y Asistencia Social (MSAS). 1998. Bol Epidemiol Sem, N° 52. Caracas, Dirección de Vigilancia Epidemiológica, 49(3836):650.

Ministerio del Poder Popular para la Salud (MPPS). 2006. *Anuario de Mortalidad 2005*. Caracas, Dirección General de Epidemiología, 218:1-363.

Monday, S.; Keys, C.; Hanson, P.; Shen, Y.; Whittam, T. and Feng, P. 2006. Produce Isolates of the *Escherichia coli* Ont:H52 Serotype That Carry both Shiga Toxin 1 and Stable Toxin Genes. *Appl Environ Microbiol.*, 72(4): 3062–3065.

Moreira,C.; Carneiro, S.; Nataro, J.; Trabulsi, L. and Elias,W. 2003. Role of type I fimbria in the aggregative adhesion pattern of enteroaggregative *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett.*, 226:79-85.

Nataro, J. 2005. Enteroaggregative *Escherichia coli* pathogenesis. *Curr Opin Gastroenterol.*, 21:4-8.

Nataro, J.; Yikang, D.; Giron, J.; Savarino, S.; Kothary, M. and Hall, R. 1993. Aggregative adherence fimbrial expression in enteroaggregative *Escherichia coli* requires two unlinked plasmid regions. *Infect Immun.*, 61:1126-1131.

Nataro, J. and Kaper, J. 1998. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev.*, 11: 142-201.

Nataro, J.; Seriwatana, J.; Fasano, A.; Maneval, D.; Guers, L.; Noriega, F.; Dubovsky, F.; Levine, M. and Morris, J. 1995. Identification and cloning of a novel plasmid encoded enterotoxin of enteroinvasive *Escherichia coli* and *Shigella* strains. *Infect. Immun.*, 63:4721-4728.

Neidhardt, F. 1999. *Escherichia coli and Salmonella: cellular and molecular Biology*. 2th edition. ASM Press, Washington.

Nguyen, T.; Le Van, P.; Huy, C.; Nguyen, K. and Weintraub, A. 2005. Detection and characterization of diarrheagenic *Escherichia coli* from young children in Hanoi, Vietnam. *J Clin Microbiol.*, 43:755-60.

Nguyen, R.; Taylor, L.; Tauschek, M. and Robins, R. 2006. Atypical Enteropathogenic *Escherichia coli* Infection and Prolonged Diarrhea in Children. *Emerg Inf Dis.*, 12(4): 597-603.

Nowrouzian, F.; Hesselmar, B. and Saalman, R. 2003. *Escherichia coli* in Infants' Intestinal Microflora: Colonization Rate, Strain Turnover, and Virulence Gene Carriage. *Pediatric Research.*, 54(1):8-14.

O'Brien, A.; LaVeck, G.; Thompson, M. and Formall, S. 1977. Production of *Shigella dysenteriae* type I- like cytotoxin by *Escherichia coli*. *J Infect Dis.*, 146:763-769.

Okeke, I.; Lamikanra, A.; Steinruck, H. and Kaper, J. 2000. Characterization of *Escherichia coli* strains from cases of childhood diarrhea in provincial southwestern Nigeria. *J Clin Microbiol.*, 38:7-12.

Olesen, B.; Neimann, J.; Böttiger, B.; Ethelberg, S.; Schiellerup, P.; Jensen, C.; Helms, M.; Scheutz, F.; Olsen, K.; Krogfelt, K.; Petersen, E.; Mølbak, K. and Gerner, P. 2005. Etiology of Diarrhea in Young Children in Denmark: a Case-Control Study. *J Clin Microbiol.*, 43(8): 3636–3641.

Pan American Health Organization (PAHO). 2004. Ethical guidelines for research involving human subjects. Washington, DC.

Paniagua, G.; Monroy, E.; García, O.; Alonso, J.; Negrete, E. and Vaca, S. 2007. Two or more enteropathogens are associated with diarrhoea in Mexican children. *Ann Clin Microbiol.*, 6(17):9-18.

Paton, J. and Paton, A. 1998. Pathogenesis and diagnosis of shigatoxin producing *Escherichia coli* infections. *Clin Microbio Rev.*, 11:450–479.

Presterl, E.; Zwick, R.; Reichmann, S.; Aichelburg, A.; Winkler, S.; Kremsner, P. and Graninger, W. 2003. Frequency and virulence properties of diarrheagenic *Escherichia coli* in children with diarrhea in Gabon. *Am J Trop Med Hyg.*, 69(4):406-410.

Qadri, F.; Das, S.; Fauque, A.; Fuchs, G.; Albert, M.; Sack, R. and Svennerholm, A. 2000. Prevalence of toxin types and colonization factors in enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated during a 2-year period from diarrheal patients in Bangladesh, *J Clin Microbiol.*, 38(1):27-31.

Qadri, F., Svennerholm, A., Faruque, A. and Sack, B. 2005. Enterotoxigenic *Escherichia coli* in Developing Countries: Epidemiology, Microbiology, Clinical Features, Treatment, and Prevention. *Clin Microbiol Rev.*, 18(3):465-483.

Ramírez, Y.; Pastorini, J.; Russi, J. and Ferrari, A. 2001. Enfermedad Diarreica Aguda: Características de la población asistida en el CASMU. Abril 1997- Abril 1998. *Arch pediatr Uru.*, 72(2):110 -115.

Rao, M.; Abu-Elyazeed, R.; Savarino, S.; Naficy, A.; Wierzba, T.; Abdel-Messih I.; Shaheen, H.; Frenck, R.; Svennerholm, J. and Clemens, J. 2003. High disease burden of diarrhea due to enterotoxigenic *Escherichia coli* among rural Egyptian infants and young children. *J Clin Microbiol.*, 41:4862-4864.

Rappelli, P.; Folgosa, E.; Solinas, M.; Dacosta, J.; Pisanu, C.; Sidat, M.; Melo, J.; Cappuccinelli, P. and Colombo, M. 2005. Pathogenic enteric *Escherichia coli* in children with and without diarrhea in Maputo, Mozambique. *FEMS Immunol Med Microbiol.*, 43: 67–72.

Rivas, M.; Leotta, G. and Chinen, I. 2007. Manual de procedimientos diagnosticos y caracterización de *Escherichia coli* O157 productor de toxina Shiga a partir de alimentos. Centro regional de referencia del WHO Global Salm Surv para América del Sur. 139 pp.

Robinson, C.; Sinclair, J.; Smith, M. and O'Brien, A. 2006. Shiga toxin of enterohemorrhagic *Escherichia coli* type O157:H7 promotes intestinal colonization. *Proc Natl Acad Sci.*, 103:9667–9672.

Rodas, C.; Halvorsen, K. and Iniguez, V. 2005. Antimicrobial multiresistence associated to integrons in enteropathogens of the childrens diarrhea and *Escherichia coli* of the normal flora in children under 5 years of age in thy ciy of La Paz. *Cuad Hosp Clin.*, 50(2):38-48.

Rodriguez-Angeles, G. 2002. Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. *Salud Pub Mex.*, 44(5):464-476.

Sack, R. 1997. Antimicrobial resistance in organism causing diarrheal diseases. *Clin Infect Dis.* 24:102 - 105.

Sánchez, J.; Feris, J.; Fernández, J.; Pérez, E.; Ramírez, S.; Ortega, G. And Jiménez, L. 2005. Extended spectrum β -lactamase producing *Klebsiella pneumoniae* isolated from neonates in the Dr. Robert Reid Cabral Children's Hospital, Santo Domingo, Dominican Republic. *Rev panam Infectol.*, 7(4):15-20.

Sánchez, S.; Ropmecin, P.; Guachalla, L. and Iñiguez, V. 2006. Caracterización geno-fenotípica de aislados de *Escherichia coli* (AEEC) de pacientes pediátricos con procesos diarreicos infecciosos en la ciudad de La Paz: Implicancias para el diagnóstico y epidemiología de las enfermedades diarreicas agudas. *Rev Chil Pediatr.*, 77(4):412-427.

Sarantuya, J.; Nishi, J.; Wakimoto, N.; Erdene, N.; Nataro, J.; Sheikh, J.; Iwashita, M.; Manago, K.; Tokuda, K.; Yoshinaga, M.; Miyata, K. and Kawano, Y. 2004. Typical Enterohemorrhagic *Escherichia coli* Is the Most Prevalent Pathotype among *E. coli* Strains Causing Diarrhea in Mongolian Children. *J Clin Microbiol.*, 42(1):133-139.

Savarino, S.; Fasano, A.; Watson, J.; Martin, B.; Levine, M.; Guandalini, S. and Guerry, P. 1997. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1 represents another subfamily of *E. coli* heat-stable toxin. *Proc Natl Acad Sci USA.*, 90:3093-3097.

Scotland S.; Smith, H.; Cheasty, T.; Said, B.; Willshaw, G. and Stokes, N. 1996. Use of gene probes and adhesion tests to characterize *E. coli* belonging to enteropathogenic serogroups isolated in United Kingdom. *J Med Microbiol.*, 44:438-443.

Shanta, D.; Dutta, P.; Rajendran, K.; Roy, S.; Pramanik, C. and Bhattacharya, K. 2001. Sensitivity and performance characteristics of dorec PCR with stool samples in comparison to conventional techniques for diagnosis of *Shigella* and enteroinvasive *Escherichia coli* infection in children with acute diarrhea in Calcuta, India. *J Med Microbiol.*, 50:667-674.

Spano, L.; Sadowsky, D.; Seguí, P.; Saick, K.; Kitagawa, S.; Pereira, F.; Fagundes, U. and Scaletsky, I. 2008. Age-specific prevalence of diffusely adherent *Escherichia coli* in Brazilian children with acute diarrhoea. *J Med Microbiol.*, 57:359-363.

Steiner, T.; Samie, A. and Guerrant, R. 2006. Infectious Diarrhea: New Pathogens and New Challenges in Developed and Developing Areas. *Clin Infec Dis.*, 43:408–410.

Tarr, P. 1995. *Escherichia coli* 0157:H7 clinical, diagnostic and epidemiological aspect of human infection. *Clin Infec Dis.*, 20:1-10.

Taylor, D.; Echeverria, P.; Sethabutr, O.; Pitarangsi, C.; Leksomboon, U.; Blacklow, N.; Rowe, B.; Gross, R. and Cross, J. 1988. Clinical and microbiologic features of *Shigella* and enteroinvasive *Escherichia coli* infections detected by DNA hybridization. *J Clin Microbiol.*, 26:1362–1366.

Terragno, R.; Caffer, M.; and Binsztein, N. 2007. Manual de procedimientos diagnosticos y caracterización de *Shigella spp.* Centro regional de referencia del WHO Global Salm Surv para América del Sur. 45 pp.

Tesh, V. and O'Brien, A. 1991. The pathogenic mechanisms of shiga toxin and the shiga-like toxins. *Mol Microbiol.*, 5:1817–1822.

Thiem, V.; Sethabutr, O.; Seidlein, L.; Tung, T.; Canh, D.; Chien, B.; Tho, L.; Lee, H.; Houg, H.; Hale, T.; Clemens, J.; Mason, C. and Trach, D. 2004. Deteteccion of *Shigella* by a PCR Assay targeting the *ipaH* Gene suggest Increased prevalence of Shigellosis in Nha Trang, Vietnam. *J Clin Microbiol.*, 42(5):2031-2035.

- Toma, C.; Lu, Y.; Higa, N.; Nakasone, N.; Chinen, I.; Baschkier, A.; Rivas, M. And Iwanaga, M. 2003. Multiplex PCR assay for identification of human diarrheagenic *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol.*, 41(6):2669-2671.
- Tomat, M.; Remartini, P.; Salinas, B.; Materau, M.; Gonzalez, R.; Rosas, M. and Materan, M. 2009. Síndrome diarreico en niños menores de 5 años. *Salus*, 13(1):75-88.
- Torregrosa. L.; Santos, J.; Rodríguez, R.; Velásquez, L.; and García, J.; Alpuche C. 1996. *Enfermedades diarreicas en el niño*. Interamericana Mc-Graw-Hill, 10a. ed.; México, D.F.
- Tornieporth, N.; John, J.; Salgado, K.; De Jesús, P.; Latham, E.; Melo, M.; Gunzburg, S. and Riley, L. 1995. Differentiation of pathogenic *Escherichia coli* strains in Brazilian childrens by PCR. *J Clin Microbiol*, 33(5):1371-1374.
- Trabulsi, L.; Keller, R.; Tardelli, T. 2002. Typical and atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. *Emerg Infect Dis.*, 8:508-513.
- Urrestarazu, M.; Liprandi, F.; Pérez, E.; González, R. y Pérez, I. 1999. Características etiológicas, clínicas y sociodemográficas de la diarrea aguda en Venezuela. *Rev Pan Salud Public.*, 6(3):149-154.
- Valverde, J. and Farias, E. 2007. Sepsis: Factores de riesgo en recién nacidos pretérmino. *RFM*, 30(1): 68-72.
- Varela, G.; Jasinski, C.; Gadea, P.; Tanzi, M.; Mota, M.; Arenas, C.; González, S.; González, G.; Pardo, L.; Sirok, A. and Schelotto, F. 2007. *Escherichia coli* enteropatógeno clásico (EPEC) asociado a casos de diarrea en niños usuarios del Hospital Pereira Rossell. Aspectos clínicos y características de las cepas involucradas. *Rev Med Urug.*, 23:153-163.
- Vidal, M.; Kruger, E.; Durán, C.; Lagos, R.; Levine, M.; Prado, V.; Toro, C. and Vidal, R. 2005. Single Multiplex PCR Assay To Identify Simultaneously the Six Categories of Diarrheagenic *Escherichia coli* Associated with Enteric Infections. *J Clin Microbiol.*, 43(10):5362–5365.
- Vieira, N.; Bates, S.; Solberg, O.; Ponce, K.; Howsmon, R.; Cevallos, W.; Trueba, G.; Riley, L. and Eisenberg, J. 2007. High prevalence of enteroinvasive *Escherichia coli* isolated in a remote region of northern coastal ecuador. *Am J Trop Med Hyg.*, 76(3):528-533.

Vilchez, S.; Reyes, D.; Paniagua, M.; Bucardo, F.; Möllby, R. and Weintraub, A. 2009. Prevalence of diarrhoeagenic *Escherichia coli* in children from León, Nicaragua. *J Med Microbiol.*, 58:630-637.

Villalobo, L. 2003. Caracterización de cepas de *Escherichia coli* enteroinvasiva, aislada de un producto cárnico. *Rev Científica, FCV LUZ.*, 13:7-11.

Villalobos, L. and Elguezabal, L. 2002. Detección de posible *E. coli* enteropatógena en el bivalvo *Pinctada imbricata* comercializado en Cumaná, Venezuela *Bol Inst Oceanog.*, 39:17-23.

Vizcaya, L.; Flores, A.; Hernández, J.; Nieves, B. y Pérez.-Schael, L. 1999. Origen bacteriano de la enfermedad diarreica aguda en Mérida, Venezuela. *Rev Cubana Med Trop.*, 51(1):14-19.

Wayne, D. 1988. *Estadística*. Base para el Análisis de las Ciencias de la Salud. Limusa, S.A. de C.V., México.

World Health Organization (WHO). 1992. Reading son diarrhea: student manual. Geneva.

Yang, J.; Wu, F.; Tsai, J.; Mu, J.; Lin, L.; Chen, K.; Kuo, S.; Chiang, C. and Wu, H. 2007. Comparison between O Serotyping Method and Multiplex Real-Time PCR To Identify Diarrheagenic *Escherichia coli* in Taiwan. *J Clin Microbiol.*, 45(11):3620–3625.

APÉNDICE

APÉNDICE 1

GRUPO DE GASTROENTERITIS INFECCIOSA
POSTGRADO EN BIOLOGÍA APLICADA
UNIVERSIDAD DE ORIENTE
NÚCLEO DE SUCRE – CUMANÁ

Consentimiento informado para participar en el proyecto “ESTUDIO INTEGRAL DE LAS INFECCIONES GASTROINTESTINALES” - PROYECTO No G-005000371 (FONACIT).

Yo, _____ portador de la cédula de identidad No _____, representante legal de la (o el) menor de edad _____, hago constar que he sido informado de la posible relación existente entre la enfermedad que actualmente presenta mi representado y la infección por bacterias, virus y parásitos, que se encuentran bajo investigación en este proyecto; por lo cual accedo voluntariamente a que se realicen los estudios bacteriológicos, virológicos parasitológicos, y serológicos pertinentes en heces, sangre y saliva, además de datos clínicos y epidemiológicos.

Los resultados serán guardados con estricta confidencialidad y me serán suministrados si lo requiero. Hago explícito que en carácter de representante legal podré retirar a mi representado menor de edad del estudio en el momento en que lo crea conveniente sin ninguna consecuencia.

En Cumaná, a los _____ días del mes de _____ de 2006.

Teléfono de localización: _____

Firma del representante legal _____

C.I. _____

Apellido y nombre del representante legal en letra de imprenta:

Responsable:

Dr. Jesús W. Bastardo O.

Coordinador del Grupo de Gastroenteritis Infecciosa

UDO-Sucre en Cumaná.

APÉNDICE 2

GRUPO DE GASTROENTERITIS INFECCIOSA
POSTGRADO EN BIOLOGÍA APLICADA
UNIVERSIDAD DE ORIENTE
NÚCLEO DE SUCRE - CUMANÁ

HOJA BÁSICA

Actualización de Hoja Básica

Código: _____ Fecha del día: ___/___/___ Tipo de evento: _____

Nombre: _____

Nombre de la madre: _____

Dirección: _____

Sector: _____ Ciudad: _____ Estado: _____

Teléfono: _____ Ubicación (A=Apto./C.= casa/M=
marginal): _____

Graffar: _____ Fecha de nacimiento: ___/___/___ Sexo:

(M=Masc./F=Fem): _____

Estado nutricional: _____ Tipo de
alimentación: _____

Observaciones: _____

Tipo de evento: C= Caso control; D= Episodio de diarrea.

Estado Nutricional: 0= Normal; 1= Grado I; 2= Grado II; 3= Grado III.

Graffar: 1= Clase alta; 2= Media alta; 3= Media baja; 4= Obrera; 5= Marginal.

Tipo de alimentación: 1=Leche materna exclusiva; 2= Leche materna + agua; 3=

Leche materna + otros alimentos; 4= Leche materna + leche no materna; 5= Leche

no materna; 6= Leche no materna + otros alimentos.

GRUPO DE GASTROENTERITIS INFECCIOSA
POSTGRADO EN BIOLOGÍA APLICADA
UNIVERSIDAD DE ORIENTE
NÚCLEO DE SUCRE – CUMANÁ

MÉTODO DE GRAFFAR MODIFICADO

Nombre del Paciente: _____ CÓDIGO: _____

- 1.- Profesión del Jefe de Familia: 1 ___ Universitario
2 ___ Técnico
3 ___ Empleado o pequeño comerciante
4 ___ Obrero Especializado
5 ___ Obrero no especializado
- 2.- Instrucción Madre: 1 ___ Universitaria o Equivalente
2 ___ Secundada Completa o Técnico Superior
3 ___ Secundaria Completa o Técnico Inferior
4 ___ Educación Primaria o Alfabeta
5 ___ Analfabeta
- 3.- Fuente de Ingresos: 1 ___ Rentas
2 ___ Ganancias -- Beneficios-- Honorados
3 ___ Sueldo Mensual (o Quincenal)
4 ___ Salado (Semanal - Diario - Por Tareas)
5 ___ Donaciones -- Trabajos Ocasionales
- 4.- Alojamiento: 1 ___ Óptimo Con Lujo
2 ___ Óptimo Sin Lujo
3 ___ Buenas Condiciones Sanitarias (Espacios Reducidos)
4 ___ Algunas Deficiencias Sanitarias (C/S E. Reducidos)
5 ___ Condiciones Inadecuadas
- Puntaje: Clasificación: 1 ___ Clase Alta (0 — 6)
2 ___ Media Alta (7 - 9)
3 ___ Media Baja (10- 12)
4 ___ Obrera(13- 15)
5 ___ Marginal(16-20)

GRUPO DE GASTROENTERITIS INFECCIOSA
 POS TGRADO EN BIOLOGÍA APLICADA
 UNIVERSIDAD DE ORIENTE
 NÚCLEO DE SUCRE - CUMANA

CÓDIGO: _____

Fecha del día: ___/___/___

HOJA CLÍNICA

NOMBRE DEL NIÑO: _____

SEMANA No: _____

FECHA INICIAL DE EPISODIO: ___/___/___ FECHA FINAL DE
 EPISODIO: ___/___/___

Ubicación (C, A, O, H)	1	2	3	4	5	6	7
CLÍNICA							
No de Evac. (Liq/Semiliq.)	___	___	___	___	___	___	___
Tipo de heces (0-3)	___	___	___	___	___	___	___
Moco-Sangre (0 - 3)	___	___	___	___	___	___	___
No de vómitos	___	___	___	___	___	___	___
Temperatura 0C	___	___	___	___	___	___	___
Deshidratación (0 - 3)	___	___	___	___	___	___	___
TRATAMIENTO							
Hidratación (0 - 3)	___	___	___	___	___	___	___
Antibióticos (0 - 3)	___	___	___	___	___	___	___
ALIMENTACIÓN							
Leche Materna (0 — 2)	___	___	___	___	___	___	___
Leche Artificial (0 - 1)	___	___	___	___	___	___	___
Otros (0-1)	___	___	___	___	___	___	___
MUESTRAS							
Heces (0-4)	___	___	___	___	___	___	___
Sueros (0-1)	___	___	___	___	___	___	___

OBSERVACIONES:

UBICACION (C, A, O, H): C = casa; A = Ambulatorio; O = Observaciones; H = Hospitalización

Nº DE EVAC. LIQUIDAS O SEMILÍQUIDAS: En 24 horas. Ej. 1 0

TIPO DE HECES:

0 = Normales o blandas; 1 = Semilíquidas; 2 = Líquidas
3 = Semilíquidas + Líquidas

MOCO-SANGRE:

0= No; 1= Moco; 2=Sangre; 3= Moco+Sangre

No DE VÓMITOS: En 24 horas. Ej. 0 8

TEMPERATURA: Ej. 38, 50

DESHIDRATACION:

0= No; 1 = Leve ($\leq 5\%$); 2= Moderada ($<10\%$); 3 Grave ($\geq 10\%$)

HIDRATACION:

0= Ni oral / ni parenteral; 1 = Oral; 2 = Parenteral; 3 = Oral + parenteral

ANTIBIÓTICOS: 0= No; 1 = Si

LECHE MATERNA: 0= No; 1= Si; 2 = Materna + Agua.

LECHE ARTIFICIAL: 0= No; 1 = Si

OTROS: 0 = No; 1 = Si

HECES:

0 = No; 1 = Hisopo; 2 = Congelado/PBS; 3 = Fresco

4 = Hisopo + Congelado/PBS + Fresco 5 = Hisopo \pm PBS.

SUEROS: 0= No 1= Si.

GRUPO DE GASTROENTERITIS INFECCIOSA

POSTGRADO EN BIOLOGÍA APLICADA

UNIVERSIDAD DE ORIENTE

NÚCLEO DE SUCRE - CUMANA

EVALUACIÓN EN CASO DE DIARREA

CÓDIGO: _____ FECHA DEL

DIA: _____

APELLIDOS Y NOMBRES:

SEXO: M ___ E ___ EDAD: _____ FECHA Y LUGAR DE

NAC.: _____

NOMBRE DE LA MADRE:

DIRECCION: _____

TELÉFONO: _____

MOTIVO DE LA CONSULTA:

No DE EVACUACIONES: _____

CARACTERÍSTICAS DE LAS EVACUACIONES: Liq. _ Semilíqu. _ Moco: _

Sangre: _

SED: SI _ NO _ APETITO: _____

VÓMITOS: Número _____

Características: _____

EXAMEN FÍSICO:

PESO: _____ PERC. P: _____ TALLA: _____ PERC. T.: _____ TEMP.: _____

Fc: _____ Fr: _____ PC: _____ PBI: _____

FONTANELA ANTERIOR HUNDIDA: SI _ NO _ OJOS HUNDIDOS: SI _

NO _

LÁGRIMAS PRESENTES: SI _ NO _ MUCOSA ORAL SECA: SI _

NO _

SALIVA: FLUIDA _ ESCASA: _____ COLOR DE LA PIEL:

LLENADO CAPILAR: _____ Seg. SIGNO DEL

PLIEGE: _____

TIPO DE RESPIRACIÓN: _____

ESTADO DE CONCIENCIA: _____

DIAGNÓSTICO

CLÍNICO: _____

GRADO DE

DESHIDRATACIÓN: _____

TRATAMIENTO:

HIDRATACIÓN: ORAL _____ PARENTERAL _____

DIETA: _____

OBSERVACIONES: _____

HECES: _____

NOMBRE DEL MÉDICO: _____

FIRMA: _____

GRUPO DE GASTROENTERITIS INFECCIOSA
POSTGRADO EN BIOLOGÍA APLICADA
UNIVERSIDAD DE ORIENTE
NÚCLEO DE SUCRE - CUMANÁ

HISTORIA CLÍNICA

CÓDIGO: _____ FECHA DEL DÍA: _____
APELLIDOS Y NOMBRES: _____
SEXO: M__ F__ EDAD: _____ FECHA Y LUGAR DE NAC.: _____

NOMBRE DE LA MADRE: _____

DIRECCIÓN: _____

TELÉFONO: _____

ANTECEDENTES PERSONALES:

EMBARAZO CONTROLADO: SI__ NO__ EDAD GESTACIONAL: ___semanas.

TIPO DE PARTO: _____

P.A.N.: _____ grs T.A.N.: _____ grs

INMUNIZACIONES: BCG: SI__ NO__ POLIO: ___ TRIPLE: ___ ROTA: ___

SARAMPIÓN: ___

OTRAS: _____

ALIMENTACION: _____

MOTIVO DE LA CONSULTA: _____

ENFERMEDAD ACTUAL: _____

EXAMEN FÍSICO:

PESO: _____ PERC. P: ___ TALLA: _____ PERC. T.: _____ TEMP.: _____

Fc: _____ Fr: _____ P.C.: _____ PERC: _____ P.B.I: _____

ESTADO GENERAL: _____

PIEL: _____

CABEZA: _____

OJOS: _____

ORAL: _____

GANGLIOS LINFÁTICOS: _____

CARDIOPULMONAR: _____

ABDOMEN: _____

GÉNITO- _____

URINARIO: _____

HUESOS, ARTICULACIONES Y _____

MUSCULOS: _____

NEUROLÓGICO: _____

OBSERVACIONES: _____

DIAGNOSTICO: _____

TRATAMIENTO: _____

HECES: _____

SANGRE: _____

NOMBRE DEL MÉDICO: _____

FIRMA: _____

EVOLUCIÓN

ORDEN DE LAS
ANOTACIONES

1. Fecha y hora del
examen.

2. Estado de los
hallazgos positivos
anotados
anteriormente.

3. Nuevos síntomas
y signos.

4. Compilaciones.

5. Cambios de
impresión o
diagnóstico.

6. Tratamiento seguido.

7. Resultados del
tratamiento.

8. Firma del médico.

EVOLUCIÓN

ORDEN DE LAS
ANOTACIONES

1. Fecha y hora del
examen.

2. Estado de los
hallazgos positivos
anotados
anteriormente.

3. Nuevos síntomas
y signos.

4. Compilaciones.

5. Cambios de
impresión o
diagnóstico.

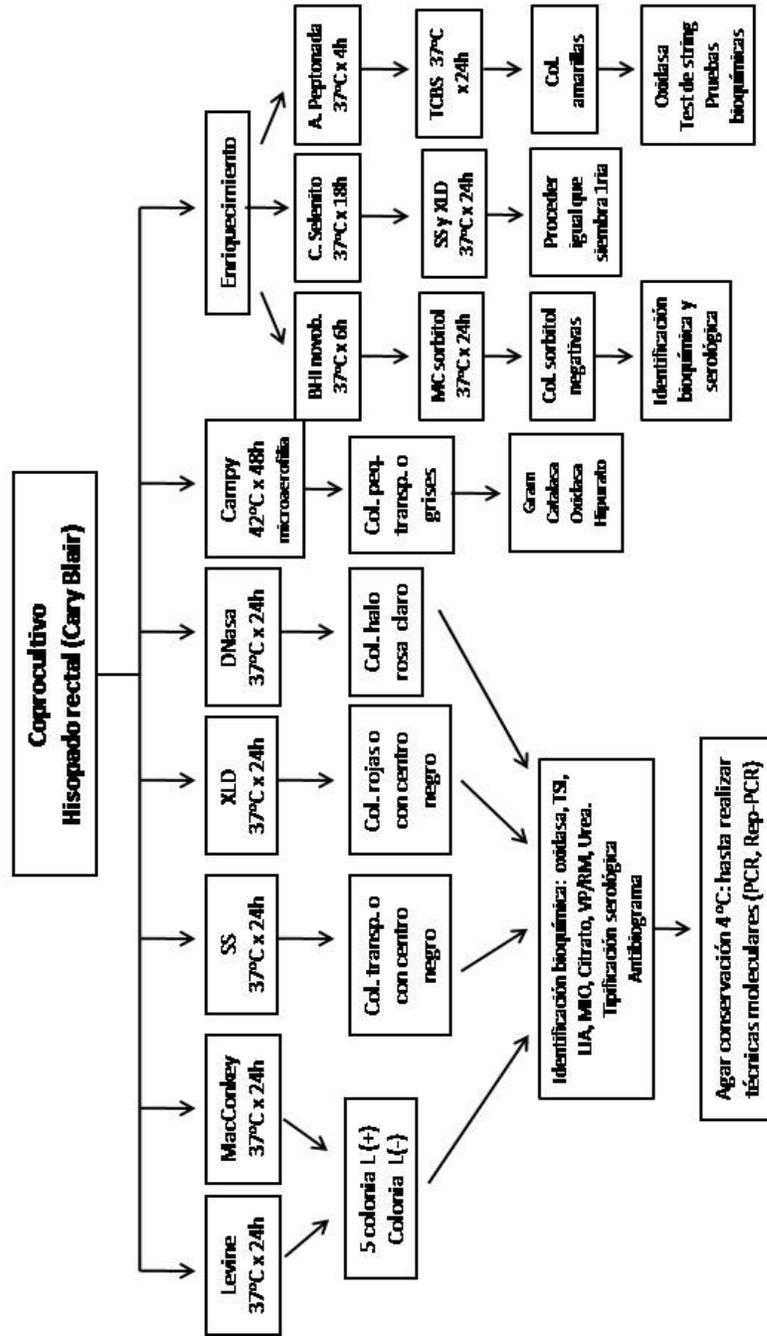
6. Tratamiento seguido.

7. Resultados del
tratamiento.

8. Firma del médico.

APÉNDICE 3

Protocolo de trabajo para el aislamiento e identificación de bacterias por métodos de cultivo y pruebas bioquímicas convencionales, en los niños con diarrea aguda y niños control.



APÉNDICE 4

Perfil bioquímico de las 32 cepas de ECD *Escherichia coli* diarreogénicas identificadas por PCR

Nº de cepa de ECEP	Oxidasa	TSI	LIA	MIO	Citrato	Urea	RM	VP
6	-	A/A +-	K/K +-	+/+/+	-	-	+	-
8	-	A/A +-	K/K --	+/+/+	-	-	+	-
22	-	A/A +-	K/K --	+/+/+	-	-	+	-
24	-	A/A +-	K/K +-	+/+/-	-	-	+	-
26	-	A/A +-	K/K +-	+/+/+	-	-	+	-
37	-	A/A +-	K/K +-	+/+/+	-	-	+	-
38	-	A/A +-	K/K +-	+/+/+	-	-	+	-
55	-	A/A +-	K/K +-	+/+/-	-	-	+	-
59	-	A/A +-	K/K --	+/+/+	-	-	+	-
62	-	A/A +-	K/K +-	+/+/+	-	-	+	-
63	-	A/A +-	K/K +-	+/+/+	-	-	+	-
74	-	A/A +-	K/K +-	+/+/+	-	-	+	-
89	-	A/A +-	K/K +-	+/-/-	-	-	+	-
96	-	A/A +-	K/K +-	+/+/+	-	-	+	-
104	-	K/A +-	K/K +-	+/+/-	-	-	+	-
128	-	A/A +-	K/K +-	+/+/+	-	-	+	-
136	-	A/A +-	K/K +-	+/+/-	-	-	+	-
157	-	A/A +-	K/K +-	+/+/+	-	-	+	-

Nº de cepa de ECET	Oxidasa	TSI	LIA	MIO	Citrato	Urea	RM	VP
2	-	A/A +-	K/K +-	+/+/-	-	-	+	-
12	-	K/A +-	K/K +-	+/+/-	-	-	+	-
16	-	K/A +-	K/K --	+/+/+	+	-	+	-
31	-	A/A +-	K/K --	+/+/+	-	-	+	-
97	-	A/A +-	K/K +-	+/+/+	+	-	+	-
106	-	A/A +-	K/K +-	+/+/+	-	-	+	-
135	-	A/A +-	K/K +-	+/+/+	-	-	+	-
140	-	A/A +-	K/K +-	+/+/+	-	-	+	-
155	-	A/A +-	K/K +-	+/+/+	-	-	+	-
199	-	A/A +-	K/K +-	+/+/+	-	-	+	-

N° de cepa de ECEA	Oxidasa	TSI	LIA	MIO	Citrato	Urea	RM	VP
132	–	A/A +-	K/K +-	+/+/+	–	–	+	–
164	–	A/A +-	K/K +-	+/+/+	–	–	+	–
168	–	A/A +-	K/K --	+/+/+	–	–	+	–

N° de cepa de ECEI	Oxidasa	TSI	LIA	MIO	Citrato	Urea	RM	VP
72	–	K/A +-	K/K --	-/-/-	–	–	+	–

APÉNDICE 5



Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología 2009, 29:13-20

RSVM

Artículo de revisión

Escherichia coli shigatoxigénica: Patogénesis, diagnóstico y tratamiento

Erika Josefina Hannaoui Rodríguez*; Luz Bettina Villalobos; Rosa Elena Martínez Nazaret

Postgrado en Biología Aplicada, Universidad de Oriente, Núcleo de Sucre
Cumaná - Venezuela

Recibido 11 de diciembre de 2008; aceptado 26 de mayo de 2009

Resumen: *Escherichia coli* shigatoxigénica (ECST) pertenece al grupo de las bacterias productoras de diarrea, patología que aún constituye una de las principales causas de morbilidad en niños a nivel mundial. ECST produce una o más toxinas shiga (Stx1, Stx2 y sus variantes), que es su principal factor de patogenicidad, responsable de las complicaciones intestinales y sistémicas. La transmisión puede ocurrir de persona a persona, o a través de agua o alimentos contaminados. Su capacidad de producir brotes epidémicos y la gravedad de las complicaciones de la enteritis, es lo que le confiere a este microorganismo gran importancia en salud pública. Este patógeno no se detecta habitualmente en los laboratorios clínicos por las similitudes bioquímicas y clínicas con otros patógenos entéricos, siendo necesario métodos serológicos y moleculares para su identificación y caracterización definitiva. En este trabajo, hemos revisado la información disponible acerca de la patogenicidad, diagnóstico y tratamiento de la infección producida ECST.

Palabras clave: *E. coli*, toxina shiga, enteropatógeno, enteritis, diagnóstico

Shigatoxigenic *Escherichia coli*: pathogenesis, diagnostic and treatment

Abstract: Shigatoxigenic *Escherichia coli* (STES) belongs to the group of diarrhoea producing bacteria, pathology which still constitutes one of the main causes of morbidity in children at a world wide level. STES produces one or more shiga toxins (Stx1, Stx 2 and their variants) which is their main pathogenicity factor, responsible for the intestinal and systemic complications. Transmission can occur person-to-person, or through contaminated water or food. Its capacity for producing epidemic outbreaks and the seriousness of the enteritis complications are what confers this microorganism great public health importance. This pathogen is not usually detected at clinical laboratories due to its biochemical and clinical similarities with other enterical pathogens, and it necessary to use serological and molecular methods for its definitive identification and characterization. In this paper, we have revised available information regarding pathogenicity, diagnosis and treatment of STES produced infections.

Keywords: *E. coli*, shiga toxin, enteropathogen, enteritis, diagnosis

* Correspondencia:
E-mail: rikajhr@yahoo.com

Introducción

Escherichia coli diarreogénica ha sido clasificada con base en criterios clínicos, epidemiológicos y moleculares en 6 grupos bien definidos: *E. coli* enteropatógena (ECEP), *E. coli* enteroinvasiva (ECEI), *E. coli* enterotoxigénica (ECET), *E. coli* enteroagregativa o enteroadherente (E-CEAgg o ECEA), *E. coli* de adherencia difusa (ECAD) y *E. coli* shigatoxigénica (ECST), dentro de las que se encuentra *E. coli* enterohemorrágica (ECEH) [1,2]. Cada uno de estos grupos tiene factores de patogenicidad específicos que sirven para su identificación y clasificación, así como

diferentes serotipos y serogrupos basados en los antígenos O y H [3,4].

ECST ha recibido diversas designaciones, una de ellas es *E. coli* verotoxigénica (ECVT), nomenclatura que le fue dada, haciendo mención a que la bacteria produce una citotoxina con actividad sobre las células Vero [5], la otra denominación empleada es *E. coli* shigatoxigénica (ECST), o productor de toxina shiga Stx, estas diferentes denominaciones que le ha dado la literatura, han generado confusión, pero en ambos casos (ECVT y ECST), se está refiriendo al mismo "patotipo", es decir, productoras de una o más toxinas de la familia Stx, toxina con características similares a la que produce *Shigella dysenteriae* tipo 1 [3].

El término *E. coli* enterohemorrágica (ECEH), del cual está ampliamente estudiado el serotipo O157:H7, fue asignado a las cepas que ocasionan colitis hemorrágica (CH), y síndrome urémico hemolítico (SUH), y que a su vez sintetizan Stx, causando lesiones A/E (adherencia y esfecelación) sobre las células epiteliales, y poseen un plásmido de 90 Kb que codifica para una enterohemolisina [6,7]. Por lo tanto, ECEH pertenece a un subgrupo de ECST, e incluye una connotación clínica importante, ya que no todas las ECST son patógenas, mientras que todas las ECEH sí lo son [8].

El serotipo de ECEH O157:H7 se caracteriza porque no fermenta el sorbitol, ni la ramnosa y no produce β -glucuronidasa, siendo su principal reservorio el intestino del ganado bovino. Existen otros serotipos de *E. coli* no O157 productores de Stx, altamente virulentos, como: O91:H21/H⁺, O26:H11, O26:H⁺, O111:H⁺, O103:H2, O113:H21, O117:H7, O118:H16, O121:H19, O128:H2/AT⁺, O145:H28/H⁺ y O146:H2, que se han asociado con enfermedad en humanos [9,10]. Se debe tener presente que las cepas ECST no O157:H7, tienen una frecuencia de aislamientos 4 veces mayor, pueden ser sorbitol positivas y actualmente hay más de 200 serotipos [3,9].

ECST, es un patógeno emergente que ha alcanzado preponderancia en Norteamérica, Europa, Japón, y también se ha encontrado en países en vías de desarrollo como México, Chile, Argentina, Brasil, Colombia y Venezuela. En nuestro país por las limitaciones en el diagnóstico, no se cuenta con suficientes registros estadísticos y epidemiológicos, sin embargo, se conoce de su existencia, por algunas investigaciones realizadas, como las de Bravo y Villalobos [11], que determinaron la presencia de *Escherichia coli* enterohemorrágica, en carne molida y chorizos procedentes de diversos expendios del mercado municipal de Cumaná, estado Sucre, y confirmaron la presencia del serotipo O157:H7 en un 3,15%. Narváez *et al.* [12], reportaron este serotipo en muestras de heces de ganado bovino en el municipio Miranda, estado Zulia, donde aislaron 1,94% cepas de *E. coli* O157:H7.

El propósito de este trabajo fue realizar una revisión de la información de *E. coli* shigatoxigénica disponible en la literatura, en relación a sus factores y mecanismos de patogenicidad, diagnóstico y tratamiento, a fin de proporcionar datos de interés en el conocimiento de este patógeno emergente, cuyo diagnóstico de laboratorio clínico presenta serias deficiencias y/o complicaciones, y que es causante de enteritis que puede evolucionar hacia complicaciones intestinales y sistémicas graves, lo cual le confiere gran importancia en salud pública.

Factores de patogenicidad

ECST y ECEH, no sólo expresan la toxina shiga Stx, sino que usualmente poseen otros factores significativos de patogenicidad, como la íntima, una proteína de superficie esencial para la formación de las lesiones de A/E en las células del epitelio gastrointestinal [13] y la enterohemolisina, que está comúnmente asociada a cepas ECEH [14].

Toxina shiga: Es el principal determinante de patogenicidad de ECST, y su síntesis está relacionada con la presencia de un bacteriófago Stx que está insertado en el genoma [13,15]. La familia de las toxinas Stx contiene dos grupos principales denominados Stx1 y Stx2, inmunológicamente diferentes; una misma cepa puede sintetizar una de ellas o ambas, e inclusive múltiples variantes de Stx2 [16-18].

La toxina Stx está integrada por dos subunidades: A y B. La subunidad A, puede ser escindida proteolíticamente, produciendo un fragmento A1 de 28 kDa, y otro A2 de 4 kDa, unidos a través de un puente disulfuro. El péptido A1 es el que posee la actividad enzimática, en tanto que el A2, es responsable de la unión de la subunidad A al pentámero que conforma la subunidad B. La subunidad B está constituida por cinco unidades idénticas, que se fijan al receptor de la célula blanco, el glucolípido Gb3 (globotriaosylceramide), presente en las células eucarióticas humanas [3]. La toxina shiga, daña células intestinales, vasculares y renales [19], es codificada por genes *stx* que son llevados por bacteriófagos lisogénicos y pueden ser adquiridos por genes transferidos horizontalmente [20]. La Stx1 es idéntica a la toxina producida por *Shigella dysenteriae* tipo 1, excepto en algunos casos, en los que se aprecia un residuo de diferencia [3].

Estudios epidemiológicos han demostrado que Stx2 es el más importante factor patogenicidad asociado con enfermedad humana severa [19,21]. La Stx2 tiene diversas variantes que han recibido los nombres de Stx2c, Stx2v, Stx2e, etc, se conocen unas 22 variantes, de acuerdo a su variabilidad antigénica, diferencias en su toxicidad en tejidos celulares y animales, su capacidad para ser activadas por elastasa de ratón, y diferencias en las secuencias aminoácidas o nucleotídicas [18,22].

Enterohemolisina: El plásmido de 60 MDa (pO157) encontrado en las cepas de *E. coli* O157:H7 y en otras ECST de origen humano, contiene los genes que codifican para la enterohemolisina Ent-Hly o EHEC-Hly [23,24]. La enterohemolisina se expresa en muchas de las cepas ECST, y es una proteína perteneciente a la familia de las citolisinas formadoras de poros (RTX)s, siendo el gen que codifica su síntesis, *ehxA*. Esta desempeña un papel, aún no bien explicado, en la lisis de los eritrocitos, a fin de que estos liberen los grupos hemo, moléculas necesarias para mejorar el crecimiento de este patógeno [25-279].

Íntima: Es una proteína de membrana externa de 97 kDa, la cual es codificada por el gen *eae* (27), produce extensas lesiones de adhesión y borrado en las células del colon, como resultado de la adherencia íntima del microorganismo a las células epiteliales. Su interacción con las microvellosidades da lugar a la lesión característica de adherencia íntima con formación de un cáliz, elongación y caída de las microvellosidades conocida como A/E "adherencia y esfecelación" [3,28].

Aunque el gen *eae* es el principal implicado en la lesión A/E, existen otros genes involucrados en este fenómeno (*esp*, *sep*, *tir*), todos estos se agrupan en una isla de patogenicidad cromosómica LEE "Locus Enterocyte Efface-

ment" (igual a la encontrada en ECEP), éste es un fragmento cromosomal que codifica varias funciones, entre ellas un sistema de secreción tipo III, y la secreción de varias proteínas que inician señales intracelulares [3]. ECST también produce los receptores Tir (translocated intimin receptor) a los que se unirá la intimina. Los receptores Tir son translocados por el sistema de secreción tipo III (complejo oligomérico a modo de anillo con un poro central de unos 20 nm), y en el enterocito son fosforilados y se insertan en la membrana para la unión de la intimina y la posterior formación de la lesión A/E [29,30].

Mecanismo de patogenicidad

Esta bacteria se transmite por vía fecal-oral, y la forma de infección humana más frecuente, es a través de la carne de bovino mal cocida. La transmisión de persona a persona también ha sido demostrada [11]. Ocurrida la infección, cuya dosis infectante es mínima, su mecanismo de patogenicidad viene dado en gran parte por la toxina shiga. Una vez que la toxina Stx (subunidad B) se ha fijado a su receptor Gb3, es endocitada la subunidad A, transportada al aparato de Golgi y posteriormente hasta el retículo endoplásmico rugoso, para inhibir luego la síntesis proteica. La StxA, en ambas toxinas shiga, son N-glucosidasas altamente selectivas, que depurinan un residuo específico de adenina de la subunidad ribosomal 60S de la célula eucariótica, esto bloquea la síntesis de proteína y conduce a la muerte celular [31].

Es probable que el daño de la mucosa intestinal por la Stx, el lipopolisacárido (LPS), y otros mediadores de inflamación, promuevan la translocación de la toxina a la circulación. Ya en la circulación sanguínea la Stx va hacia la célula blanco que posee el receptor específico: en el intestino, el SNC y el riñón. En el humano se encuentran altos niveles de Gb3 en el riñón, específicamente en la región cortical [32].

La Stx citotóxica para las células endoteliales del riñón humano, causa una típica histopatología renal que incluye edema en las células del endotelio glomerular y deposición de plaquetas dentro del glomérulo, estas lesiones endoteliales conducen al estrechamiento de la luz de los capilares y a la oclusión de los vasos glomerulares, a través de la acumulación de plaquetas y fibrina [32]. Diversas investigaciones permiten establecer que Stx induce la expresión de citocinas proinflamatorias, tales como TNF α e IL-6, que pueden potenciar el efecto citotóxico de la Stx sobre las células endoteliales vasculares humanas [31].

La enteritis por ECST necesita una baja dosis infectiva (se estima entre 100 a 1000 bacterias), el período de incubación fluctúa entre 3 y 4 días, el síntoma inicial es diarrea no sanguinolenta que puede evolucionar hasta tornarse sanguinolenta, la cual puede ser precedida de dolores y calambres abdominales, fiebre de corta duración acompañada por vómitos. En cuanto al desarrollo de las alteraciones extraintestinales, los reportes incluyen trastornos cardíacos y neurológicos asociados al SUH y a púrpura trombocitopénica trombótica, cuyas consecuencias pueden resultar fatales [33].

Diagnóstico

Han existido y aun se estudian y proponen varios métodos y/o estrategias para diagnosticar a ECST, estas difieren en complejidad, sensibilidad, especificidad y costo. El aislamiento de ECST permite su caracterización por una variedad de métodos, incluyendo serotipificación O:H, caracterización del fago, polimorfismo de los fragmento de restricción, electroforesis en gel de campo pulsado, amplificación y secuenciación del ADN, entre otros, algunos de los cuales, son de uso limitado en el laboratorio clínico, por su elevado costo y necesidad de personal especializado, pero son de gran importancia desde el punto de vista epidemiológico, sobre todo al aparecer un brote.

Cultivo y métodos inmunológicos para ECST O157: Por mucho tiempo, el medio de cultivo en agar MacConkey sorbitol (AMCS) fue el método más empleado para el aislamiento de ECST, debido a el predominio de O157:H7 y O157:H2, como agentes etiológicos de enfermedad en humanos en Norteamérica y Europa. La mayoría de estas cepas no pueden fermentar sorbitol (colonias incoloras en AMCS), que las distingue de las *E. coli* de origen fecal pertenecientes a otros serotipos [35,36].

Comercialmente se encuentran disponibles varios reactivos de aglutinación al látex, para detectar el antígeno O157 y H7, y así confirmar las colonias sospechosas [37]. También pueden usarse métodos de ELISA para la detección rápida del antígeno O157 en muestras fecales, los cuales tienen buena sensibilidad [38]; sin embargo, es necesario corroborar la producción de Stx, debido a que no todas las O157 son productoras de esta toxina, esto limita la sensibilidad del cultivo en AMCS, otra limitante es la incapacidad de reconocer la cepa O157 cuando su concentración es menor al 1% de la flora gastrointestinal. Sin embargo, se ha mejorado el índice del aislamiento de ECST O157 agregándole cefixima al medio, para inhibir a otros microorganismo como *Proteus* spp. y así han surgido varias modificaciones para hacer este medio de cultivo, más selectivo a cepas ECST pertenecientes al serogrupo O157 [39,40], incluyendo el shock ácido propuesto por Grant [41].

La enfermedad producida por ECST, está asociada a muchos otros serogrupos, y aunque algunas son sorbitol negativas, la mayoría son sorbitol positivas [42,43], debido a ello, la eficacia de este medio (AMCS) variará de acuerdo con el predominio local del serotipo de ECST, por lo que aislar solo las sorbitol negativas, produce un sesgo significativo en el diagnóstico de este patógeno [44].

Métodos de cultivo para cepas ECST no O157: No hay característica bioquímica definitiva para distinguir cepas de ECST pertenecientes a serogrupos diferentes del O157, lo que complica el aislamiento de tal microorganismo. Sin embargo, casi todos los O157 y una proporción significativa de cepas no O157 producen enterohemolisina Hly_e, y pertenecen al subgrupo de ECEH [3]. Estas cepas EHEC-Hly_e muestran zonas hemolíticas en agar sangre, después de 24 h de incubación. La producción de EHEC-Hly_e tiene un

alto valor predictivo positivo, pues se ha demostrado que las cepas de *E. coli* enterohemolíticas son a su vez productoras de Stx [45], mientras que, en las Hly negativas, no se puede predecir si producirá o no Sxt [45]. Recientemente Aldick *et al.* [46], identificaron 5 cepas raras de *E. coli* aisladas, de casos de SUH, que presentaban gen *hly* y no producían Stx.

Análisis de citotoxicidad en cultivos de tejido: La sensibilidad de células Vero (células de riñón de mono verde), a Stx fue observada por Konowalchuk *et al.* [47], y la citotoxicidad para esta línea celular sigue siendo el patrón de oro para la confirmación de aislamientos de *E. coli* productor de toxina shiga. Estas células tienen una alta concentración de Gb3 y de Gb4 (el receptor preferido para Stx2e, presente en cerdos) en sus membranas plasmáticas, y pueden ser utilizadas para detectar todas las variantes de Stx conocidas. Las células HeLa (células de carcinoma cervicouterino) también se han utilizado, pero esta línea celular carece de Gb4 y por lo tanto es menos sensible a Stx2e. Este método tiene limitaciones porque no todos los laboratorios microbiológicos realizan cultivo de tejido de células Vero, además el diagnóstico rápido es importante, y los resultados de la prueba de citotoxicidad no están disponibles sino hasta después de 48 a 72 h, que sería el tiempo de desarrollo de esta línea celular [48,49].

ELISA para la detección directa de Stx: Los análisis mediante ELISA (del inglés enzyme linked immunosorbent assays) juegan un papel importante en el diagnóstico, porque pueden detectar la presencia de ECST (o de otra especie que produzca Stx), de cualquier sero-grupo. Actualmente se han creado muchas variantes de esta técnica diagnóstica, siendo afectada la sensibilidad de los métodos de ELISA por un número de variables como, los tipos de anticuerpos usados, y el tipo y cantidad de Stx producida por una cepa dada. ELISA es generalmente menos sensible que el análisis de verocitotoxicidad, pero más asequible de realizar en los laboratorios de análisis clínico [50,51].

Hibridación con sondas de ADN: La necesidad de determinar la presencia de los genes *stx1* y *stx2*, permitió el desarrollo de las sondas de ADN para la detección de ECST. Inicialmente, las sondas eran etiquetadas con P 32 o S 35 y fueron utilizadas para probar una gran cantidad de aislamientos de *E. coli* para la presencia de genes *stx* por hibridación de un fragmento de ADN de la colonia con la sonda marcada [52]. Estos procedimientos son altamente sensibles y específicos, y cuando son rigurosas las condiciones en las que se realiza, las cepas que poseen *stx1* y *stx2*, o ambas, pueden ser distinguidas. Actualmente las sondas *stx* son marcadas con material no radiactivo como digoxigenina y biotina, sin pérdida de sensibilidad o especificidad [52,53].

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR): Este método permite la amplificación de los genes *stx*. Los extractos de DNA de las colonias aisladas de los cultivos pueden ser utilizados como moldes. Los productos específicos de

la PCR son revelados por electroforesis en gel del agarosa al 2%, teñido con bromuro de etidium [54]. Hasta la fecha, los análisis de PCR para la detección de *stx*, han combinado diversos pares de oligonucleótidos para *stx1* y *stx2*, y las variantes de *stx2*, en algunos casos [54-56]. La PCR también tiene utilidad para la detección de los genes que codifican otros factores de patogenicidad en cepas de ECST, tales como *eaeA* y *ehxA*. Esta información puede ser significativa porque hay relación entre la presencia de estos genes y la capacidad de ECST de causar enfermedad humana. Así, un caso de diarrea aguda producido por una cepa de ECST, también positiva para *eaeA* y *ehxA*, tendría aumentado el riesgo de desarrollar complicaciones tales como SUH [57].

Diagnóstico serológico: El diagnóstico serológico de la enfermedad provocada por ECST es conveniente cuando el número de ECST en heces es pequeño, y pueda ser imperceptible por el PCR. Los anticuerpos contra Stx o el LPS se han propuesto como marcadores de infección reciente, pero se debe considerar el periodo agudo y convaleciente de la enfermedad, probándose el incremento o descenso de los títulos de anticuerpos en el suero.

Se ha descrito el análisis de inmunoblot para los anticuerpos contra Stx1, el cual es más específico y sensible que ELISA y puede ser una herramienta útil para estudios seroepidemiológicos [58]. Otro estudio es el análisis de hemaglutinación para anti-LPS que implica el uso de eritrocitos de ovejas cubiertos con LPS de una gama de serogrupos, incluyendo el O157 [59].

Actualmente se emplean métodos diagnósticos basados en la detección del serotipo con el antisuero, y estos han incrementado su uso en el laboratorio clínico por su bajo costo y fácil realización, sin embargo, se debe tener presente que no todos los serotipos, son verdaderamente patogénicos [60], pues el marcador del serotipo no le confiere patogenicidad a la cepa; o la similaridad de algunos antígenos, puede dar falsos positivos [2]. Para estos casos ha sido propuesto el uso de la PCR, la cual puede reducir el alto grado de falsos positivos obtenidos por serotipificación [61].

La selección del mejor método diagnóstico de ECST implicará lograr un equilibrio entre tiempo, especificidad, sensibilidad, y costo de los mismos. El laboratorio clínico de microbiología debe establecer el cultivo de las muestras fecales para constatar la presencia de ECST y poder realizar el diagnóstico microbiológico y molecular. El análisis de PCR de muestras aisladas de cultivos fecales, es probablemente el método más sensible y específico para la detección de ECST. Pero la mayoría de los laboratorios carecen de la capacidad de investigación por PCR o de análisis de verocitotoxicidad, que aunque es lenta, es una alternativa altamente satisfactoria, y emplean métodos tales como, ELISA para detección de Stx y enterohemolisina, análisis para detección del LPS, serología para la serotipificación, etc, que aunque son útiles en ciertas circunstancias, ellos son secundarios por razones de baja sensibilidad, o incapacidad de detectar todas las ECST.

Tratamiento

La diarrea suele ser una afección autolimitada y la intervención terapéutica debe realizarse en función a los síntomas presentados. Los objetivos de una terapéutica eficaz serían: limitar la severidad y/o duración de síntomas gastrointestinales; prevenir las complicaciones sistémicas peligrosas para la vida tales como el SUH; y prevenir la expansión de la infección a otras personas. Para el tratamiento pueden usarse las siguientes estrategias:

Uso de antibióticos: Ciertos estudios sugieren asociación entre la administración de antibióticos con el aumento del riesgo a desarrollar SUH [62]. Sin embargo, en otra investigación realizada en Minnesota (EEUU), se le administró antibióticos a un grupo de pacientes que padecía de síndrome diarreico con evolución a SUH, y la enfermedad se tornó más leve [63]. Por otra parte, se ha demostrado que la proporción de los pacientes que progresaron de diarrea sanguinolenta a SUH es más baja, cuando los antibióticos son administrados en un plazo de 3 días del inicio de síntomas, comparados con los pacientes que no son tratados o a los que se les suministró antibióticos más adelante en el curso de la infección [64]. Además se ha reportado que la administración tardía del trimetoprim sulfametoxazol a los pacientes infectado con ECST O157, no previene la progresión a SUH [65].

Los antibióticos que dan lugar a lisis de la célula bacteriana, pueden aumentar la cantidad de Stx libre en el lumen del intestino, y quedar así disponible la toxina para la absorción sistémica. Este efecto es más pronunciado con antibióticos, tales como, trimetoprim sulfametoxazol y ciprofloxacina, que interfieren con síntesis de ADN bacteriano [66]. En segundo lugar, se ha observado un alto índice de resistencia a antibióticos de las cepas ECST, y el tratamiento inadecuado le puede conferir una ventaja selectiva a ésta, sobre otros miembros de la flora intestinal [67,68].

Existen estudios *in vitro* sobre la acción de ciertos antibióticos en la producción de las Stx1 y Stx2, donde se ha demostrado que la ampicilina, imipenem, cefaclor, ceftazidima, sulfatrimetoprim, son capaces de aumentar la liberación de ambas toxinas. La fosfomicina, si bien aumenta la liberación de ambas toxinas, sólo aumenta la incidencia de SUH cuando se usa después de los 7 días de comenzada la infección [69]. Los inhibidores de la síntesis proteica como la doxiciclina, tetraciclina y kanamicina, impiden que aumente la liberación de toxinas, pero tienen poca acción lítica sobre la bacteria [70].

Estrategias terapéuticas dirigidas contra Stx: Considerando la alta afinidad de Stx1 y Stx2 por el receptor Gb3, una estrategia podría ser la administración oral de análogos de Gb3 con capacidad para unir Stx y evitar su traslocación. Así se realizó un estudio multicéntrico controlado que evaluó los efectos de un compuesto formado por una matriz de silicona no absorbible que tenía ligado Gb3 (SYNSORB-Pk). Los pacientes que recibieron SYN-SORB-Pk tuvieron evolución similar del SUH que aque-

hos que no lo recibieron [71] lo que sugirió que una vez que comienza la diarrea sanguinolenta y la toxina ya llegó a la vasculatura sanguínea, impedir el pasaje de más Stx por la barrera intestinal, no presenta mayores beneficios.

La posibilidad de administrar absorbentes de toxina a nivel sistémico, así como anticuerpos monoclonales que neutralicen la citotoxicidad por bloqueo de los sitios de unión de la toxina Stx, puede ser otra estrategia a ser considerada [72]. En estudios previos se ha observado que mutantes no tóxicos de Stx2B, neutralizaron la acción de la toxina en mucosa colónica humana *in vitro*, y en células epiteliales tubulares renales humanas en cultivo [73]. Sin embargo, para que esta estrategia sea considerada válida deberá ser ensayada en un modelo animal de SUH que reproduzca la enfermedad humana. Recientemente se demostró en un modelo de ratón nulo para la síntesis del Gb3/CD77 (knock-out), que el daño tisular producido por Stx desaparece [73]. Esos resultados sugieren que la estrategia de neutralizar los receptores de Gb3 en los órganos blanco, puede ser un método efectivo para protegerlos contra los desórdenes relacionados con la patogénesis de ECST.

Uso de vacunas: Las vacunas basadas en Stx pueden ser eficaces en la prevención del SUH y la severidad de síntomas gastrointestinales. Se ha demostrado eficacia protectora de las vacunas para la protección contra Stx2e en cerdos; además se ha sugerido la inmunización transcutánea con la subunidad StxB como una práctica provechosa para la prevención o reducción de patología, aunque debe probarse su eficacia en humanos [74].

También pueden usarse vacunas para prevenir la colonización del intestino por ECST. Se espera que vacunas dirigidas contra los factores de colonización, por ejemplo, la intimina de ECST, puede ser un blanco apropiada para la vacunación, por lo menos para la mayoría de las cepas patógenas humanas de ECST, que la producen [75].

Las vacunas dirigidas contra LPS también pueden ser eficaces, puesto que la experiencia con otros patógenos entéricos sugiere que IgG específico presente en el suero contra LPS, puede dirigirse hacia el lumen del intestino en cantidades suficientes como para bloquear la colonización, sin embargo, debe acentuarse, que las vacunas basadas en LPS proporcionarán solamente protección serotipo específico [76].

Conclusiones

En este trabajo se planteó la revisión de la biología de ECST, con particular énfasis en su patogénesis, diagnóstico y tratamiento. La patogénesis de este microorganismo involucra diversos niveles de interacción entre la bacteria y su hospedero, constituyendo cada una de las etapas de ese proceso, oportunidades para el desarrollo de terapias, y/o estrategias de prevención, a manera de controlar la aparición o dispersión de un brote. La infección por ECST parece ser de distribución universal, pero su prevalencia no se conoce en detalle en países en vías de desarrollo, detectándose siempre en forma de casos esporádicos. Sin em-

bargo, es posible que su frecuencia como causante de patología, esté infravalorada por las limitaciones que existen en torno a su diagnóstico. Diversos estudios han descrito la utilidad de la PCR como una técnica confiable, de alta sensibilidad y especificidad, en el diagnóstico de ECST. Su utilización en el ámbito de laboratorios clínicos no es de rutina en nuestro país, sin embargo, cada laboratorio debe elegir una técnica apropiada (serológica o molecular), a fin de poder detectarla de forma precoz y abordar eficientemente la patología causada por este patógeno emergente, causante de enfermedad gastrointestinal.

Referencias

- Tornieporth N, Jonh J, Salgado K, De Jesus P, Latham E, Melo M, et al. Differentiation of Pathogenic *Escherichia coli* strains in Brazilian Children by PCR. *J Clin Microbiol.* 1995; 33: 1371-4.
- Tamaki Y, Narimatsu H, Miyazato T, Nakasone N, Higa N, Tama C, et al. The relation ship between O-antigen and pathogenic genes of diarrhea-associated *Escherichia coli*. *Jpn J Infect Dis.* 2005; 58: 65-9.
- Nataro J, Kaper J. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev.* 1998; 11:142-201.
- Aranda R, Fagundes U, Scatelsky I. Evaluation of multiplex PCRs for diagnosis of infection with diarrheagenic *Escherichia coli* and *Shigella spp.* *J Clin Microbiol.* 2004; 42: 5849-53.
- Konowalchuck J, Speirs JL, Stavric S. Vero response to a cytotoxin of *Escherichia coli*. *Infect Immun.* 1997; 18: 775-9.
- O'Brien A, GD LaVeck, MR Thompson, Formal SB. Production of *Shigella dysenteriae* type I-like cytotoxin by *Escherichia coli*. *J Infect Dis.* 1977; 146: 763-9.
- Levine M, Xu J, Kaper J, Lior H, Prado V, Tall B. A DNA probe to identify enterohemorrhagic *Escherichia coli* of O157:H7 and other serotypes that cause hemorrhagic colitis and hemolytic uremic syndrome. *J Infect Dis.* 1987; 156: 175-82.
- Kaper J, Nataro J, Mobley H. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol.* 2004; 2: 123-40.
- Blanco J, Blanco M, Alonso M, Mora A, Dahbi G, Coira MA, et al. Serotypes, Virulence Genes and Intimin Types of Shiga Toxin (Verotoxin)-Producing *Escherichia coli* Isolates from Human Patients: Prevalence in Lugo (Spain) from 1992 through 1999. *J Clin Microbiol.* 2004; 42: 311-9.
- Beutin L, Krause G, Zimmermann S, Kaulfuss S, Gleier K. Characterization of shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from human patients in Germany over a 3 year period. *J Clin Microbiol.* 2004; 42: 1099-8.
- Bravo V, Villalobos L. *Escherichia coli* enterohemorrágica en productos cárnicos comercializados en el mercado municipal de Cumaná, Venezuela. *Rev Soc Ven Microbiol.* 2002; 22: 119-21.
- Narváez C, Carruyo G, Moreno M, Rodas A, Hoet A, Wittum T. Aislamiento de *Escherichia coli* O157:H7 en muestras de heces de ganado bovino doble propósito del municipio Miranda, estado Zulia, Venezuela. *Rev Cient.* 2007; 17: 239-45.
- Frankel G, Phillips A, Novakova M, Batchelor M, Hicks S, Dougan G. Generation of *Escherichia coli* derivatives with differing biological activities using site-directed mutagenesis of the intimin C-terminus domain. *Mol Microbiol.* 1998; 29: 559-70.
- Welinder-Olsson, C, Badenfors M, Cheasty T, Kjellin E, Kaijser B. Genetic profiling of enterohemorrhagic *Escherichia coli* strain in relation to clonality and clinical signs of infection. *J Clin Microbiol.* 2002; 40: 959-64.
- Galli I, Leotta G, Gugliardi M, Rivas M. In silico analysis of the capability of two polymerase chain reaction techniques for *stx* gene detection. *Rev Argent Microbiol.* 2008; 40(1): 9-12.
- O'Brien AD, Hofems EK. Shiga and shiga-like toxins. *Microbiol Revs.* 1987; 57: 206-20.
- Cravioto A, Vázquez V, Soria A, Navarro A, Ortiz M. Producción de citotoxina tipo Shiga (SLT)1 en cepas de *Escherichia coli* aisladas de niños con diarrea en una comunidad rural. *Boletín Med Hosp Infant Mex.* 1988; 45: 206-10.
- Bettelheim K, Beutin L. Rapid laboratory identification and characterization of verocytotoxigenic (Shiga toxin-producing) *Escherichia coli* (VETC/STEC). *J Appl Microbiol.* 2003; 95: 205-17.
- Law, D. The history and evolution of *Escherichia coli* O157 and other Shiga toxin producing *E. coli*. *W J of Microbiol Biotech.* 2000; 16: 701-9.
- Municsa M, Jofre J. Abundance in sewage of bacteriophages infecting *Escherichia coli* O157:H7. *Methods Mol Biol.* 2004; 268: 79-88.
- Boerlin P, McEwen S, Boerlin-Petzold F, Wilson J, Johnson R, Gyles C. Associations between virulence factors of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* and disease in humans. *J. Clin. Microbiol.* 1999; 37: 497-503.
- Loukiadis E, Kerouredan M, Beutin L, Oswald E, Brugere H. Characterization of ShigaToxin Gene (*stx*) Positive and Intimin Gene (*eae*)-Positive *Escherichia coli* Isolates from Wastewater of Slaughterhouses in France. *Appl Environ Microbiol.* 2006; 72(5): 3245-51.
- Beutin L, Aleksic S, Zimmermann S, Gleier K. Virulence factors and phenotypic traits of verotoxigenic strains of *Escherichia coli* isolated from human patients in Germany. *Med Microbiol Immunol.* 1994; 183: 13-21.
- Schmidt H, Beutin L, Karch H. Molecular analysis of the plasmid-encoded hemolysin of *Escherichia coli* O157:H7 strain 933. *Infect Immun.* 1995; 63: 1055-63.
- Karch H, Heeseemann J, Laufs R, O'Brien A, Tacked C, Levin M. A plasmid of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 is required for expression of a new fibrillar antigen and for adhesion to epithelial cells. *Infect Immun.* 1987; 55: 455-69.
- Goldwater P, Bettelheim K. New perspectives on the role of *Escherichia coli* O157:H7 and other enterohaemorrhagic *E. coli* serotypes in human disease. *J Med Microbiol.* 1998; 47: 1039-45.
- Donnenberg M, Tzipori S, McKee M, O'Brien A, Alroy J, Kaper B. The role of the *eae* gene of enterohemorrhagic *Escherichia coli* in intimate attachment *in vitro* and in a porcine model. *J Clin Invest.* 1993; 92: 1418-24.
- Sherman P, Soni R, Karmali M. Attaching and Effacing adherence of Vero cytotoxin-producing *Escherichia coli* to rabbit intestinal epithelium *in vivo*. *Infect Immun.* 1988; 56: 756-61.
- Perna N, George F, Mayhew G, Pósfai G, Elliott S, Donnenberg M, et al. Molecular evolution of a pathogenicity island from Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Infect Immun.* 1998; 66: 3810-7.
- Hartland E, Daniell S, Delahay R, Neves B, Wallis T, Shaw R, et al. The type III protein translocation system of enteropathogenic *Escherichia coli* involves EspA-EspB protein interactions. *Mol Microbiol.* 2000; 35: 1483-92.

31. Tesh V, O'Brien A. The pathogenic mechanisms of shiga toxin and the shiga-like toxins. *Mol Microbiol.* 1991; 5:1817-22.
32. Paton J, Paton A. Pathogenesis and diagnosis of shigatoxin producing *Escherichia coli* infections. *Clin Microbiol Rev.* 1998; 11:450-79.
33. Robinson C, Sinclair J, Smith M, O'Brien A. Shiga toxin of enterohemorrhagic *Escherichia coli* type O157:H7 promotes intestinal colonization. *Proc Natl Acad Sci.* 2006; 103:9667-72.
34. Tarr P. *Escherichia coli* O157:H7: Clinical, diagnostic and epidemiological aspects of human infections. *Clin Infect Dis.* 1995; 20:1-10.
35. March S, Ratnam S. Sorbitol-MacConkey medium for detection of *Escherichia coli* O157:H7 associated with hemorrhagic colitis. *J Clin Microbiol.* 1986; 23:869-72.
36. Krishnan C, Fitzgerald V, Dakin S, Behme R. Laboratory investigation of outbreak of hemorrhagic colitis caused by *Escherichia coli* O157:H7. *J Clin Microbiol.* 1987; 25:1043-7.
37. Sowers E, Wells J, Strockbine N. Evaluation of commercial latex reagents for identification of O157 and H7 antigens of *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol.* 1996; 34:1286-9.
38. Park, C, Vandel N, Hixon D. Rapid immunoassay for detection of *Escherichia coli* O157 directly from stool specimens. *J Clin Microbiol.* 1996; 34:988-90.
39. Chapman P, Siddons C, Zadik P, Jewes L. An improved selective medium for the isolation of *Escherichia coli* O157. *J Med Microbiol.* 1991; 35:107-10.
40. Fagan P, Hornitzky M, Bettelheim K, Djordjevic S. Detection of shiga-like toxin (stx1 and stx2), intimin (eaeA), and enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) hemolysin (EHEC hlyA) genes in animal feces by multiplex PCR. *Appl Environ Microbiol.* 1999; 65:768-82.
41. Grant M. Comparison of *Escherichia coli* O157:H7 enrichment in spiked produce samples. *J Food Prot.* 2008; 71:139-45.
42. Ojeda A, Prado V, Martínez J, Arellano C, Borezyk A, Johnson W, Lior H, Levine M. Sorbitol-negative phenotype among enterohemorrhagic *Escherichia coli* strains of different serotypes and from different sources. *J Clin Microbiol.* 1995; 33:2199-201.
43. Ammon A, Petersen LR, Karch H. A large outbreak of hemolytic uremic syndrome caused by an unusual sorbitol-fermenting strain of *Escherichia coli* O157:H. *J Infect Dis.* 1999; 179:1274-7.
44. Sue K. Role of the Laboratory in the Diagnosis of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* Infections. *J Microbiol.* 2002; 40:2711-5.
45. Beutin L, Montenegro M, Orskov I, Orskov F, Prada J, Zimmermann S, et al. Close association of verotoxin (Shiga-like toxin) production with enterohemolysin production in strains of *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol.* 1989; 27:2559-64.
46. Aldick T, Bielaszewska M, Zhang W, Brockmeyer J, Schmidt H, Friedrich A, et al. Hemolysin from Shiga toxin-negative *Escherichia coli* O26 strains injures microvascular endothelium. *Microb Infect.* 2007; 9:282-90.
47. Konowalchuck J, Speirs JL, Stavric S. Vero response to a cytotoxin of *Escherichia coli*. *Infect Immun.* 1997; 18:775-9.
48. Hammermueller J, Gyles C. The development of a rapid bioluminescent Vero cell assay. In M. A. Karmali and A. G. Goglio editors, Recent advances in verocytotoxin-producing *Escherichia coli* infections. Amsterdam. Elsevier Science BV. 1994. p. 113-6.
49. Marzocca M, Marucci P, Sica M, Alvarez E. Detección de *Escherichia coli* O157: H7 en carne picada fresca y hamburguesas congeladas. *Rev Argent Microbiol.* 2006; 38:38-40.
50. Downes F, Green J, Greene K, Strockbine N, Wells J, Wachsmuth I. Development and evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays for detection of Shiga-like toxin I and Shiga-like toxin II. *J Clin Microbiol.* 1989; 27:1292-7.
51. Bennett A, MacPhee S, Betts R. Evaluation of methods for the isolation and detection of *Escherichia coli* O157 in minced beef. *Let App Microbiol.* 2008; 20:375-9.
52. Thomas A, Smith H, Willshaw G, Rowe B. Non-radioactively labelled polynucleotide and oligonucleotide DNA probes, for selectively detecting *Escherichia coli* strains producing Vero cytotoxins VT1, VT2, and VT2 variant. *Mol Cell Probes.* 1991; 5:129-35.
53. Jablonski E, Moomaw E, Tullis R, Ruth J. Preparation of oligodeoxynucleotide-alkaline phosphatase conjugates and their use as hybridization probes. *Nucleic Acids.* 1986; 14:6115-28.
54. Toma C, Lu Y, Higa N, Nakasone N, Chinen I, Baschkiev A, Rivas M, Iwanaga M. Multiplex PCR Assay for Identification of Human Diarrheagenic *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol.* 2003; 41:2669-71.
55. Pollard D, Johnson W, Lior H, Tyler S, Rozee K. Rapid and specific detection of verotoxin genes in *Escherichia coli* by the polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol.* 1990; 28:540-5.
56. Vidal M, Carreño M, Vidal R, Arellano C, Solari V, Prado V. Evaluación de técnicas moleculares e inmunoenzimáticas para la detección de *E coli* enterohemorrágico en brotes de tóxi-infecciones alimentarias. *Rev Med Chile.* 2002; 130:603-9.
57. Karch H and Meyer T. Single primer pair for amplifying segments of distinct Shiga-like toxin genes by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol.* 1989; 27:2751-7.
58. Raymond D, Karmali M, Clarke J, Winkler M, Petric M. Comparison of the Western blot assay with the neutralizing-antibody and enzyme-linked immunosorbent assays for measuring antibody to verocytotoxin I. *J Clin Microbiol.* 1997; 35:609-13.
59. Bitzan M, Karch H. Indirect hemagglutination assay for diagnosis of *Escherichia coli* O157 infection in patients with hemolytic-uremic syndrome. *J Clin Microbiol.* 1992; 30:1174-8.
60. Paciorek, J. Virulence properties of *Escherichia coli* fecal strains isolated in Poland from healthy children and strains belonging to serogroups O18, O26, O44, O86, O126 and O127 isolated from children with diarrhea. *J Med Microbiol.* 2002; 51:548-56.
61. Ji-Rong Y, Fang-Tzy W, Jin-Lai T, Jung-Jung M, Ling-Fen L, Kuang-Lo Ch, et al. Comparison between O Serotyping Method and Multiplex Real-Time PCR To Identify Diarrheagenic *Escherichia coli* in Taiwan. *J Clin Microbiol.* 2007; 45:3620-5.
62. Riley L, Remis R, Helgerson S, McGee H, Wells J, Davis B, et al. Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. *N Engl J Med* 1983; 308:681-85.
63. Martin D, MacDonald K, White K, Soler J, Osterholm M. The epidemiology and clinical aspects of the hemolytic uremic syndrome in Minnesota. *N Engl J Med.* 1990; 323:1161-7.
64. Shiomi M, Togawa M, Fujita K, Murata R. Effect of early oral fluoroquinolones in hemorrhagic colitis due to *Escherichia coli* O157 : H7. *Pediatr Int.* 1999; 41:228-32.

65. Proulx F, Turgeon J, Delage G, Lafleur L, Chicoine L. Randomized controlled trial of antibiotic therapy for *Escherichia coli* O157:H7 enteritis. *J Pediatr*. 1992; 121:299-303.
66. Walterspiel J, Ashkenazi S, Morrow A, Cleary T. Effect of subinhibitory concentrations of antibiotics on extracellular Shiga-like toxin I. *Infection*. 1992; 20:25-9.
67. Cordovez A, Prado V, Maggi L, Cordero J, Martínez J, Misraji A, et al. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* associated with hemolytic-uremic syndrome in Chilean children. *J Clin Microbiol*. 1992; 30:2153-7.
68. Prado V, Basualdo W, Arellano C, Martínez J, Levine M: Susceptibilidad in vitro de *Escherichia coli* enterohemorrágicas frente a 11 antimicrobianos. *Rev Med Chile*. 1995; 123:1085-90.
69. Yoh M, Aoki T, Akao M, Sakaue Y, Tsubura E, Honda T. Report of a questionnaire about enterohemorrhagic *Escherichia coli* cases caused in the area including Sakai City in 1996. *Kansenshogaku Zasshi*. 1997; 71:1144-54.
70. Ito T, Akino E, Hiramatsu K. Evaluation of antibiotics used for enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 enteritis-effect of various antibiotics on extracellular release of verotoxin. *Kansenshogaku Zasshi*. 1997; 71:130-5.
71. Trachtman H, Cnaan A, Christen E, Gibbs K, Zhao S, Acheson D, et al. Effect of an oral Shiga toxin-binding agent on diarrhea-associated hemolytic uremic syndrome in children: a randomized controlled trial. *JAMA*. 2003; 290:1337-44.
72. Thorpe C. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infection. *Clin Infect Dis*. 2004; 38:1299-303.
73. Castro-Parodi M, Levi L, Ibarra C. Neutralización de la acción de la toxina Shiga por un péptido de Stx2B que no tiene efecto citotóxico per se. *Medicina (Buenos Aires)*. 2005; 65:108.
74. Zhu C, Yu J, Yang Z, Davis K, Rios H, Wang B, et al. Protection against Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Infection by Transcutaneous Immunization with Shiga Toxin Subunit B. *Clin Vac Immunol*. 2008; 15:359-66.
75. Butterton J, Ryan E, Acheson D, Calderwood S. Coexpression of the B subunit of Shiga toxin I and EaeA from enterohemorrhagic *Escherichia coli* in *Vibrio cholerae* vaccine strains. *Infect Immun*. 1997; 65:2127-35.
76. Konadu E, Donohue A, Calderwood S, Pozsgay V, Shiloach J, Robbins J, Szu S. Syntheses and Immunologic Properties of *Escherichia coli* O157 O-Specific Polysaccharide and Shiga Toxin I B Subunit Conjugates in Mice. *Infect Immun*. 1999; 67:6191-3.

HOJA DE METADATOS

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 1/5

Título	IDENTIFICACIÓN POR PCR Y SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA DE CEPAS DE <i>Escherichia coli</i> DIARREOGÉNICAS, AISLADAS DE NIÑOS CON DIARREA AGUDA EN CUMANÁ, VENEZUELA.
Subtítulo	

Autor(es)

Apellidos y Nombres	Código CVLAC / e-mail	
	Hannaoui R., Erika J.	CVLAC
e-mail		erikajhr@yahoo.com
e-mail		
	CVLAC	
	e-mail	
	e-mail	
	CVLAC	
	e-mail	
	e-mail	
	CVLAC	
	e-mail	
	e-mail	

Palabras o frases claves:

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)
Susceptibilidad antimicrobiana
<i>Escherichia coli</i> diarreogénicas
Niños
Diarrea aguda

Líneas y sublíneas de investigación:

Área	Subárea
Ciencias	Biología Aplicada
	Microbiología

Resumen (abstract):

Con la finalidad de establecer la prevalencia de cepas de *E. coli* patógenas asociadas a casos de diarrea aguda infantil en Cumaná, se tomaron muestras de heces de 200 niños con enfermedad diarreica aguda (EDA), de ambos sexos, menores de 5 años, que acudieron al Hospital de Cumaná, y 30 muestras de heces de niños de ambos sexos y en el mismo grupo de edad, que no presentaron cuadro diarreico, para ser usados como control. El aislamiento e identificación de las cepas bacterianas se realizó por métodos bioquímicos convencionales. Para la identificación de los genes de patogenicidad se empleó la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), determinando la presencia de los genes *eae* y *bfp* para *E. coli* enteropatógena (ECEP), *st* y *lt* para *E. coli* enterotoxigénica (ECET), *ipaH* y *virF* para *E. coli* enteroinvasiva (ECEI), *Sxt1* y *Sxt2* para *E. coli* shigatoxigénica (ECST), *aafII* para *E. coli* enteroagregativa (ECEA), y *daaE* para *E. coli* de adherencia difusa (ECAD). La susceptibilidad a los antibióticos se efectuó por la técnica de difusión en placa. Además se aplicó encuesta para la obtención de datos clínicos y epidemiológicos de interés. Los datos obtenidos fueron procesados por estadística descriptiva porcentual y la prueba Chi-cuadrado a un 95% de confiabilidad. De los 200 niños con EDA, se aisló *E. coli* de 169, y de los 30 niños controles, se aisló *E. coli* de 25 de ellos. Por PCR se determinó que de las cepas de *E. coli* aisladas de niños con EDA, el 10,65% fueron positivas para ECEP, 5,91% para ECET, 1,78% fueron ECEA y 0,59% se correspondieron a ECEI, no se hallaron cepas ECST ni ECAD. En las cepas de *E. coli* aisladas de niños control no hubo amplificación por PCR de ninguno de los genes de patogenicidad evaluados. Al realizar la distribución porcentual de acuerdo a la edad, y el porcentaje de aislamientos de cada tipo de *E. coli* diarreogénica (ECD), se hallaron diferencias estadísticas no significativas ($p > 0,05$), sin embargo, en la distribución porcentual de acuerdo al sexo y el porcentaje de aislamientos de cada ECD, se encontraron diferencias estadísticas significativas ($p < 0,05$), observándose que los "patotipos" ECEP, ECEA y ECEI tuvieron mayor porcentaje de aislamientos en niños del sexo masculino, mientras que ECET fue mayormente aislada del sexo femenino. De los niños con enfermedad diarreica aguda, además de ECD se aislaron otros géneros bacterianos patógenos entéricos: *Salmonella sp* (5,92%) y *Campylobacter sp* (2,96%). Otros géneros bacterianos no patógenos o de dudosa patogenicidad encontrados asociados a *E. coli* en los niños con EDA fueron: *Citrobacter sp*, *Klebsiella sp*, *Enterobacter sp*, *Serratia sp*, y *Proteus sp*, en un 57% de los casos. Se evaluó la susceptibilidad de las cepas a los antimicrobianos: ciprofloxacina (Cf), gentamicina (CN), aztreonam (ATM), tetraciclina (TE), sulfametoxazol/trimetoprim (SXT), imipenem (IPM), cefixima (CFM), ampicilina/sulbactam (SAM). Las ECD mostraron mayor resistencia a los antibióticos SAM, TE y SXT. El tipo de alimentación de estos niños no se asoció con la aparición de un tipo en particular de ECD, pero los mayores porcentajes de aislamiento de estas cepas se hallaron en niños alimentados con leche no materna más otros alimentos. La mayoría de los niños con ECD se encontraron en las clases obrera y marginal. En vista a que *E. coli* diarreogénica tiene una alta asociación con EDA en niños de Cumaná (18,93%), debe dársele mayor importancia a su

identificación en los coprocultivos, a fin de lograr un mejor manejo y control de esta afección tanto en niños como en adultos.

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 3/5

Contribuidores:

Apellidos y Nombres	ROL / Código CVLAC / e-mail				
Villalobos, Luz B.	ROL	CA <input type="checkbox"/>	AS <input checked="" type="checkbox"/>	TU <input type="checkbox"/>	JU <input type="checkbox"/>
	CVLAC	5162987			
	e-mail	lbvillalobosb@yahoo.com			
	e-mail				
Araque, Yasmina	ROL	CA <input type="checkbox"/>	AS <input type="checkbox"/>	TU <input type="checkbox"/>	JU <input checked="" type="checkbox"/>
	CVLAC	8000717			
	e-mail	yamasi40@gmail.com			
	e-mail				
Pedroza, Raquel	ROL	CA <input type="checkbox"/>	AS <input type="checkbox"/>	TU <input type="checkbox"/>	JU <input checked="" type="checkbox"/>
	CVLAC	3414339			
	e-mail	raquelpedroza@cantv.net			
	e-mail				
	ROL	CA <input type="checkbox"/>	AS <input type="checkbox"/>	TU <input type="checkbox"/>	JU <input type="checkbox"/>
	CVLAC				
	e-mail				
	e-mail				

Fecha de discusión y aprobación:

Año Mes Día

2009	11	26
-------------	-----------	-----------

Lenguaje: SPA _____

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 4/5

Archivo(s):

Nombre de archivo	Tipo MIME
PG_erikahannaoui.doc	APPLICATION/WORD

Alcance:

Espacial : _____ (Opcional)

Temporal: _____ (Opcional)

Título o Grado asociado con el trabajo:

Maestría en Biología Aplicada, Mención: Microbiología

Nivel Asociado con el Trabajo: Magíster Scientiarum

Área de Estudio:

Microbiología

Institución(es) que garantiza(n) el Título o grado:

Universidad de Oriente, Núcleo de Sucre



Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso –
5/5

Derechos:

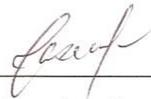
Como autora de este trabajo de investigación doy plena libertad para la publicación de la información en él contenida por las personas interesadas, siempre que se respeten los derechos de autor y se cite la información tomada de la misma de la manera adecuada, dándole el reconocimiento y mérito apropiado al autor.



Licda. Erika J. Hannaoui R.
AUTOR 1



MSc. Luz B., Villalobos
TUTOR



Dra. Yasmina Araque
JURADO 1



Dra. Raquel Pedroza
JURADO 2

POR LA SUBCOMISIÓN DE TESIS:

