

ARTÍCULO ORIGINAL

Identificación de *Escherichia coli* enteropatógena en niños con síndrome diarreico agudo del Estado Sucre, Venezuela

Elvia Michelli^{1,2}, Adriana Millán¹, Hectorina Rodulfo¹, Mirian Michelli¹,
Jesús Luiggi¹, Numirin Carreño¹, Marcos de Donato¹

¹ Laboratorio de Genética Molecular, Instituto de Investigaciones en Biomedicina y Ciencias Aplicadas "Dra. Susan Tai", Universidad de Oriente, Cumaná, Sucre, Venezuela

² Laboratorio de Microbiología Clínica, Departamento de Bioanálisis, Universidad de Oriente, Cumaná, Sucre, Venezuela

Introducción. *Escherichia coli* es uno de los principales agentes causales del síndrome diarreico agudo.

Objetivo. Identificar grupos clonales de *E. coli* enteropatógena en 485 casos de diarrea aguda en niños entre 0 y 10 años de edad atendidos en centros de salud de los municipios de Arismendi, Benítez y Sucre del estado Sucre, Venezuela, entre marzo y diciembre de 2011.

Materiales y métodos. Previo consentimiento informado, se recolectaron muestras fecales y se identificó *E. coli* mediante coprocultivo estándar y serología con antisueros polivalentes y monovalentes. Se aisló el ADN y se amplificaron los genes *eae* (intimina) y *bfpA* (bundlina) mediante dos pruebas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) múltiples.

Resultados. En 39,6 % de los coprocultivos se determinó la presencia de infección bacteriana. La prevalencia de *E. coli* fue de 54,7 %; 82,9 % de estas cepas fue positivo por serología para los serogrupos y el serotipo evaluados, principalmente en niños entre los 0 y los 2 años (37,9 %). El 48,6 % de las cepas de *E. coli* amplificaron para el gen *eae* y, de estas, 58,8 % se clasificó como cepas de *E. coli* enteropatógena típica (*eae+* y *bfp+*). El ECEP II fue el serogrupo más frecuente (38,7 %), con predominio de bacterias *E. coli* enteropatógenas típicas (60 %). El alelo β de la intimina fue el más identificado (74,5 %) en las cepas positivas para el gen *eae*. Solo se identificaron cuatro cepas con el serotipo O157:H7 utilizando antisueros, las cuales no amplificaron mediante PCR para los genes *eae* y *bfpA*.

Conclusiones. Este estudio demostró la importancia de aplicar pruebas moleculares en la identificación de las cepas de *E. coli* causantes de diarrea de diversa gravedad.

Palabras clave: *Escherichia coli*, *Escherichia coli* enteropatógena, enfermedades gastrointestinales, diarrea, reacción en cadena de la polimerasa.

doi: <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v36i0.2928>

Identification of enteropathogenic *Escherichia coli* in children with acute diarrheic syndrome from Sucre State, Venezuela

Introduction: Diarrheagenic *Escherichia coli* is an important causative agent of acute diarrheic syndrome.

Objective: To identify clonal groups of enteropathogenic *E. coli* (EPEC), in 485 children with acute diarrhea aged 0 to 10 years attending health care centers in Arismendi, Benítez and Sucre municipalities, Sucre state, Venezuela, from March to December, 2011.

Materials and methods: After obtaining the informed consent, stool samples were collected. *Escherichia coli* was identified using standard coproculture methods and serology with polyvalent and monovalent antisera. DNA was isolated, and *eae* (intimin) and *bfpA* (bundlin) genes were amplified through two multiplex polymerase chain reactions (PCR).

Results: The presence of bacterial infection was determined in 39.6% of coprocultures. The prevalence of *E. coli* was 54.7%; 82.9% of these isolates were positive by serology for the evaluated serogroups and serotypes, which were mostly identified in children between 0 and 2 years (37.9%); 48.6% of *E. coli* strains amplified the *eae* gene; of these, 58.8% were classified as typical EPEC (*eae+* y *bfp+*). EPEC II was the most common serogroup (38.7%), with predominance of typical EPEC

Contribución de los autores:

Elvia Michelli, Hectorina Rodulfo y Marcos De Donato: concepción y diseño del estudio

Adriana Millán, Mirian Michelli, Jesús Luiggi y Numirin Carreño: recolección y procesamiento de muestras

Elvia Michelli: redacción del manuscrito

Todos los autores participaron en el análisis y la interpretación de los datos.

(60%). In positive strains for *eae* gene, the β intimin allele was the most frequently identified (74.5%). Only four strains with O157:H7 serotype were identified, which showed no PCR amplification of the *eae* and *bfpA* genes.

Conclusion: This study showed the importance of molecular tests to identify diarrheagenic *E. coli* strains causing clinical conditions of varying severity.

Key words: *Escherichia coli*, enteropathogenic *Escherichia coli*, gastrointestinal diseases, diarrhea, polymerase chain reaction.

doi: <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v36i0.2928>

El síndrome diarreico agudo representa un problema de salud pública mundial, aunque con variaciones regionales en su incidencia, y en la diversidad y frecuencia de los agentes etiológicos involucrados.

Entre los microorganismos causantes de diarrea aguda se encuentran las cepas de *Escherichia coli*, las cuales se clasifican en los siguientes seis patotipos según sus características clínicas y epidemiológicas, y los factores específicos que determinan su virulencia: *E. coli* enteropatógena (ECEP), *E. coli* enterohemorrágica (ECEH), *E. coli* enterotoxigénica (ECET), *E. coli* enteroinvasiva (ECEI), *E. coli* enteroagregativa (ECEAgg) y *E. coli* de adherencia difusa (ECAD) (1-3).

Las cepas ECEP causan diarreas acuosas; la adherencia a los enterocitos es un evento clave en su patogenia, la cual tiene dos fases. La primera fase involucra la expresión de los genes *bfp* (codificados en el plásmido denominado factor de adherencia a EPEC, pEAF), los cuales codifican las fimbrias formadoras de penachos (*bundle forming pili*, BFP), las que, a su vez, median la formación de microcolonias, originando un fenotipo llamado de adherencia localizada (4,5). Según se dé la presencia del plásmido EAF o no, las ECEP se clasifican como ECEP típicas, que contienen dicho plásmido, y ECEP atípicas, las cuales no lo poseen. Las cepas ECEP atípicas presentan una adherencia semejante a la localizada, la difusa o la agregativa (5-7). La segunda fase de la adherencia está definida por la expresión del gen *eae* codificado en la isla de patogenia denominada locus de borrado del enterocito (*Locus of Enterocyte Effacement*, LEE), que codifica la proteína intimina.

Correspondencia:

Elvia Michelli, Laboratorio de Genética Molecular, Instituto de Investigaciones en Biomedicina y Ciencias Aplicadas "Dra. Susan Tai", Universidad de Oriente, Avenida Universidad, Cerro del Medio, Cumaná, Sucre, Venezuela
Teléfonos: (58-412) 699 3098 y (293) 451 5684
melvia@udo.edu.ve y elviamicelli@yahoo.com

Recibido: 13/07/15; aceptado: 19/03/16

Esta proteína media la formación del fenotipo de adherencia y borrado (*attaching and effacing*, A/E), caracterizado por la adherencia íntima de la bacteria al enterocito con la subsiguiente destrucción de las microvellosidades y el rearreglo del citoesqueleto celular, lo cual resulta en la formación de una estructura en forma de pedestal en el sitio de unión de la bacteria y el enterocito (6,8,9).

En varios estudios a nivel mundial se ha demostrado que los patotipos de *E. coli* causante de diarrea usualmente están involucrados en la etiología de la diarrea en niños (3,10), con una elevada frecuencia de ECEP típicas y atípicas como agente patógeno único o asociado a otros agentes microbianos (11-16). Asimismo, diversos estudios en Venezuela coinciden en señalar el importante papel de estas cepas en el síndrome diarreico agudo infantil, como se demostró en una investigación de 754 niños de Caracas, en la cual se determinó la significación epidemiológica de los aislamientos de *E. coli* con fenotipo de adherencia localizada en cultivos celulares (17). En una investigación de 200 niños con síndrome diarreico agudo en Cumaná, estado Sucre, se obtuvieron 169 aislamientos de *E. coli*, en los cuales las cepas ECEP fueron las más frecuentemente identificadas (10,7 %: 1,2 %, ECEP típicas y 9,5 %, ECEP atípicas) (18). En otro estudio en Cumaná, se sugirió que había circulación de cepas de *E. coli* causantes de diarrea y productoras de Stx (*Shiga-like toxins*) diferentes al serotipo O157:H7, y se señaló su participación en la etiología del síndrome diarreico agudo en niños menores de tres años (19).

La diversidad genética de las cepas de *E. coli* causantes de diarrea ha puesto de relieve la utilidad de las herramientas moleculares en los estudios epidemiológicos orientados a la identificación y clasificación de los patotipos mediante la detección de genes cromosómicos o plasmídicos responsables de su patogenia, los cuales están ausentes en las cepas comensales de *E. coli* (9,20). Dado que el síndrome diarreico agudo es una causa importante de morbimortalidad en niños y que las cepas de

E. coli causantes de diarrea se encuentran entre sus principales agentes etiológicos, en este trabajo se identificaron los grupos clonales de ECEP mediante técnicas moleculares en niños con síndrome diarreico agudo atendidos en centros asistenciales del estado Sucre, con el fin de caracterizar la epidemiología de las cepas circulantes y, así, contribuir en la adopción de las medidas de control pertinentes.

Materiales y métodos

Tipo de estudio

Se hizo un estudio descriptivo de corte transversal.

Criterios de inclusión y de exclusión

Los pacientes incluidos en el estudio presentaban síndrome diarreico agudo con un tiempo de evolución no mayor de 72 horas en el momento de su evaluación clínica; se excluyeron del estudio todos los niños que habían recibido tratamiento antimicrobiano durante el mes anterior a la toma de muestras.

Muestras

Entre los meses de marzo y diciembre de 2011 se recolectaron 485 muestras fecales por emisión espontánea de niños entre los 0 y 10 años de edad, que luego se guardaron en envases plásticos estériles; 84 de los niños fueron atendidos en el Ambulatorio de Caituco y, 74, en el de Llanada de Cangua, en los municipios rurales de Benítez y Arismendi, respectivamente. Los otros 327 niños asistieron al Laboratorio Clínico Comunitario y a los Ambulatorios de La Llanada y Brasil, parroquia Altigracia, al Ambulatorio "Dr. Ramón Martínez" de Las Palomas, parroquia Ayacucho, y al Hospital Ambulatorio "Salvador Allende", parroquia Valentín Valiente, todos ubicados en el municipio de Sucre del estado Sucre, Venezuela.

Diagnóstico microbiológico

En las dos horas siguientes a su recolección, una porción de las muestras fecales se emulsionó en infusión de cerebro y corazón, luego se inoculó por extensión y agotamiento en placas con los siguientes medios de cultivo selectivos diferenciales McConkey: *Salmonella-Shigella*, eosina de azul de metileno y agar de xilosa, lisina y desoxicolato de sodio. Posteriormente, las placas se incubaron en aerobiosis a 35 ° C durante 18 a 24 horas (21).

Las colonias con características fenotípicas sugeridas de *E. coli* se identificaron mediante técnicas bioquímicas, siguiendo los protocolos estándar

(21,22). A todas las cepas confirmadas como *E. coli* se les hizo la prueba de sorbitol. En las pruebas bioquímicas se utilizaron las cepas certificadas de *E. coli* (ATCC 25922) y *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) como controles positivo y negativo, respectivamente, provenientes del Centro Venezolano de Colecciones Microbiológicas (CVCM).

Caracterización serológica de las cepas de *Escherichia coli*

Los serogrupos de las cepas de *E. coli* se determinaron mediante la técnica de aglutinación en láminas a partir de un cultivo puro en agar nutritivo y con antisueros polivalentes, con los siguientes resultados: ECEP: I (O26, O55, O111 y O45), II (O86, O119, O127 y O88), III (O125, O126 y O128) y IV (O114, O142 y O158); ECET: I (O6, O25, O27, O78 y O168), II (O26, O63, O155, O166 y O148) y III (O8, O15, O115, O159 y O169); y ECEI: I (O112ac, O152 y O164), II (O29, O143 y O144) y III (O28, O124, O136 y O167). Con el antisuero monovalente para ECEH se identificó el serotipo O157:H7. La identificación se llevó a cabo según el procedimiento sugerido por la Fundación Venezolana para el Estudio de la Salud Infantil (FUVESIN) (23). Se utilizaron como controles positivos las cepas de *E. coli* identificadas como CVCM 514 (O55:K59), CVCM 511 (O86:H34), CVCM 516 (O125:K70:H19), CVCM 1014 (O114:K90:H32) y CVCM 442 (O157:H7), y la cepa de *P. aeruginosa* ATCC 27853 se usó como control negativo.

Diagnóstico molecular de ECEP y ECEH

El ADN se aisló a partir de cepas de *E. coli* identificadas bioquímicamente y cultivadas en caldo Luria Bertani, las cuales se incubaron a 37 ° C durante toda la noche, utilizando el estuche comercial Wizard Genomic DNA Purification Kit™ (Promega) y siguiendo las especificaciones del fabricante. Se hizo una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) múltiple con los oligos AE11/ eaeK4 (amplicón de 526 pb del gen *eae*), que codifica para la proteína intimina, y BFP3/BFP2 (amplicón de 209 pb del gen *bfpA*), que codifica para la bundlina de la fimbria BFP, siguiendo los protocolos descritos previamente (24,25).

En la identificación de las formas alélicas α , β y γ del gen *eae*, se utilizó otra PCR múltiple siguiendo el procedimiento descrito por Reid, et al. (26), en el cual se utilizaron simultáneamente el par de oligonucleótidos *eae* P1/P2, que amplifican un fragmento de 917 pb común para las cepas de ECEP y ECEH, y los pares de oligonucleótidos

P1/Eco ϵ ae α (amplicón 1.648 pb), P1/Eco ϵ ae β (amplicón 1.926 pb) y P1/Eco ϵ ae γ (amplicón 1.770 pb), cuyos amplicones son específicos de las cepas ECEP 1, ECEP 2 y ECEH 1, respectivamente (26).

En las PCR se utilizaron como controles positivos las cepas de *E. coli* ATCC 25922, CVCM 442 (O157:H7), CVCM 511 (O86:H34), CVCM 988 (O78:H12) y CVCM 514 (O55:K59), y la ATCC 27853 de *P. aeruginosa* como control negativo.

Todas las reacciones de amplificación se hicieron en un equipo ABI 2400 (Applied Biosystems) y los productos amplificados se visualizaron por electroforesis en geles de agarosa al 2 % teñidos con bromuro de etidio (0,05 %) bajo luz ultravioleta.

Análisis de los resultados

Las cepas ECEP se clasificaron como típicas cuando amplificaron los genes *eae* y *bfpA* (*eae+* y *bfp+*), mientras que las ECEP atípicas se definieron como *eae+* y *bfp-* (8). El análisis de los datos clínicos y epidemiológicos se hizo mediante la prueba de ji al cuadrado con el programa estadístico SPSS® (versión 18). Todas las pruebas se hicieron con 95 % de confiabilidad.

Consideraciones éticas

A los padres o representantes de los niños se les solicitó firmar un consentimiento después de informarles la naturaleza y la importancia de la investigación, así como sobre los posibles riesgos. Se les aclaró que el estudio se ajustaría a los principios establecidos en la Declaración de Helsinki (27). En el manejo de los pacientes y de su información se siguieron las normas de bioética y bioseguridad establecidas por la Comisión de Bioética y Bioseguridad del Instituto de Investigaciones en Biomedicina y Ciencias Aplicadas "Dra. Susan Tai".

Resultados

A partir de los coprocultivos de los 485 pacientes incluidos en el estudio, se determinó la presencia de infecciones bacterianas en 39,6 % de ellos (192/485), sobre todo en los pacientes de 0 a 4 años de edad (51 %) y en los provenientes del municipio de Sucre (92,2 %) (cuadro 1). En 54,69 % (105/192) de las muestras positivas se identificó *E. coli*. En los pacientes portadores de *E. coli* se reportó más de uno de los signos y síntomas clínicos asociados al síndrome diarreico agudo.

Cuadro 1. Distribución de los niños con coprocultivos positivos e identificación de *Escherichia coli* según su procedencia, grupos de edad (de dos años cada uno), sexo y características clínicas asociadas al síndrome diarreico agudo

Parámetros	Individuos con SDA		Coprocultivos positivos		p	<i>E. coli</i> positiva		
	n	%	n	%		n	%	p
Procedencia					<0,0001*			<0,0001*
Rural [†]	158/485	32,58	15/158	9,49		7/15	46,67	
Urbana [‡]	327/485	67,43	177/327	54,13		98/177	55,37	
Sexo					0,0397			1,9975
Femenino	249/485	51,34	97/249	38,96		47/97	48,45	
Masculino	236/485	48,66	95/236	40,25		58/95	61,05	
Grupos de edad (años)					0,0070*			0,6013
0 a 2	177/485	36,50	65/177	36,72		41/65	63,08	
3 a 4	82/485	16,90	33/82	40,24		16/33	48,48	
5 a 6	77/485	15,90	27/77	35,06		13/27	48,15	
7 a 8	57/485	11,80	16/57	28,07		11/16	68,75	
9 a 10	92/485	19,00	51/92	55,43		24/51	47,06	
Características clínicas								
Moco [§]	105/485	21,65	47/105	44,76	0,8976	24/47	51,06	0,0045*
Sangre [§]	1/485	0,21	0/1	-	-	-	-	-
Moco y sangre [§]	14/485	2,89	5/14	35,71	0,1339	2/5	40,00	1,2466
DA	76/485	15,67	30/76	39,47	0,1816	17/30	56,67	1,1050
F	97/485	20,00	28/97	28,87	0,1108	13/28	46,43	0,1611
V/N	47/485	9,69	16/47	34,04	0,0117*	8/16	50,00	0,0117*
DA/F	31/485	6,39	10/31	32,26	0,1595	7/10	70,00	0,0006*
DA/V/N	11/485	2,27	8/11	72,73	0,0735	4/8	50,00	0,0071*
DA/F/V/N	17/485	3,51	8/17	47,06	0,9015	6/8	75,00	0,0032*
F/V/N	13/485	2,68	8/13	61,54	0,3160	6/8	75,00	0,8933

SDA: síndrome diarreico agudo; Rural[†]: municipios de Arismendi y Benítez; Urbana[‡]: municipio de Sucre; §: características macroscópicas de las muestras fecales; DA: dolor abdominal; F: fiebre; V: vómitos; N: náuseas; *: prueba de ji al cuadrado estadísticamente significativa

En el cuadro 2 se presenta la identificación serológica de las 105 cepas de *E. coli*, de las cuales 82,9 % (87/105) fue positivo para alguno de los serogrupos y serotipos evaluados, mientras que 17,1 % (18/105) de ellas no aglutinó. El serogrupo ECEP II fue el más frecuente, con 38,9 % (38/105), seguido del ECEP III, con 18,9 % (19/105); en una cepa se identificó el ECEI y en cuatro cepas, el ECEH. La distribución de los serogrupos identificados según la procedencia de los pacientes, evidenció su predominio en las muestras fecales recolectadas en el municipio urbano de Sucre; los más frecuentes fueron los serogrupos ECEP II, con 38,8 % (38/98), y ECEP III, con 19,4 % (19/98); las cuatro cepas de ECEH identificadas también se encontraron en pacientes del municipio de Sucre, mientras que la única cepa ECEI se identificó en un paciente procedente de una zona rural (Llanada de Cangua). Los serogrupos de *E. coli* se distribuyeron de forma similar en niños. Los serogrupos de *E. coli* identificados se presentaron

con mayor frecuencia en los pacientes entre 0 y 2 años de edad, con 37,9 % (33/87), sobre todo el ECEP II, con 57,6 % (19/33), y el ECEP III, con 21,2 % (7/33) (cuadro 2).

En la figura 1A se presentan parcialmente los resultados obtenidos a partir de la amplificación mediante PCR múltiple de los genes *eae* (intimina) y *bfpA* (bundlina) en las cepas de *E. coli*, y se observa que hubo amplificación para el gen *eae* solo y para ambos genes; sin embargo, el gen *bfp* siempre amplificó junto con intimina en las muestras evaluadas. En la figura 1B se observan ejemplos de la amplificación de las formas alélicas α , β y γ del gen *eae*.

En el cuadro 3 se presentan en detalle los resultados de las pruebas de PCR según la clasificación serológica de las 105 cepas de *E. coli* (17 cepas ECEP I, 38 ECEP II, 19 ECEP III, 8 ECEP IV, 4 ECEH, 1 ECEI y 18 cepas que no aglutinaron); se resalta el hecho de que en 48,6 % (51/105) de los

Cuadro 2. Distribución de los serotipos de *Escherichia coli* identificados en los niños estudiados según su procedencia, grupos de edad (de dos años cada uno), sexo y características clínicas asociadas al síndrome diarreico agudo

Parámetros	Serotipificación de <i>Escherichia coli</i>													
	ECEP 1		ECEP 2		ECEP 3		ECEP 4		ECEH		ECEI 1		NA	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Procedencia														
Rural ^f	2	11,76	-	-	-	-	2	25,00	-	-	1	100,0	2	11,11
Urbana ^g	15	88,24	38	100,0	19	100,0	6	75,00	4	100,0	-	-	16	88,89
Total	17	100,0	38	100,0	19	100,0	8	100,0	4	100,0	1	100,0	18	100,0
Sexo														
Femenino	8	47,06	20	52,63	6	31,58	4	50,00	1	25,00	1	100,0	7	38,89
Masculino	9	52,94	18	47,37	13	68,42	4	50,00	3	75,00	-	-	11	61,11
Total	17	100,0	38	100,0	19	100,0	8	100,0	4	100,0	1	100,0	18	100,0
Grupos de edad (años)														
0 a 2	4	23,53	19	50,00	7	36,84	2	25,00	1	25,00	-	-	8	44,44
3 a 4	4	23,53	3	7,89	4	21,05	-	-	1	25,00	-	-	4	22,22
5 a 6	1	5,88	2	5,26	3	15,79	5	62,50	1	25,00	1	100,0	-	-
7 a 8	2	11,76	5	13,16	2	10,53	-	-	-	-	-	-	2	11,11
9 a 10	6	35,29	9	23,68	3	15,79	1	12,50	1	25,00	-	-	4	22,22
Total	17	100,0	38	100,0	19	100,0	8	100,0	4	100,0	1	100,0	18	100,0
Características clínicas														
Solo diarrea	2	11,76	7	18,42	6	31,58	2	25,00	2	50,00	1	100,0	3	16,67
Moco ^h	3	17,65	9	23,68	3	15,79	3	37,50	-	-	-	-	5	27,28
Moco y sangre ^h	1	5,88	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	5,56
DA	2	11,76	6	15,79	4	21,05	1	12,50	1	25,00	-	-	3	16,67
F	2	11,76	6	15,79	-	-	-	-	-	-	-	-	3	16,67
V/N	4	23,53	1	2,63	4	21,05	-	-	-	-	-	-	-	-
DA/F	3	17,65	1	2,63	-	-	1	12,50	1	25,00	-	-	-	-
DA/V/N	-	-	1	2,63	1	5,26	-	-	-	-	-	-	1	5,56
DA/F/V/N	-	-	3	7,89	1	5,26	1	12,50	-	-	-	-	1	5,56
F/V/N	-	-	4	10,53	-	-	-	-	-	-	-	-	1	5,56
Total	17	100,0	38	100,0	19	100,0	8	100,0	4	100,0	1	100,0	18	100,0

SDA: síndrome diarreico agudo; Rural^f: municipios de Arismendi y Benítez; Urbano^g: municipio de Sucre; ^h: características macroscópicas de las muestras fecales; NA: no aglutinante; DA: dolor abdominal; F: fiebre; V: vómitos; N: náuseas

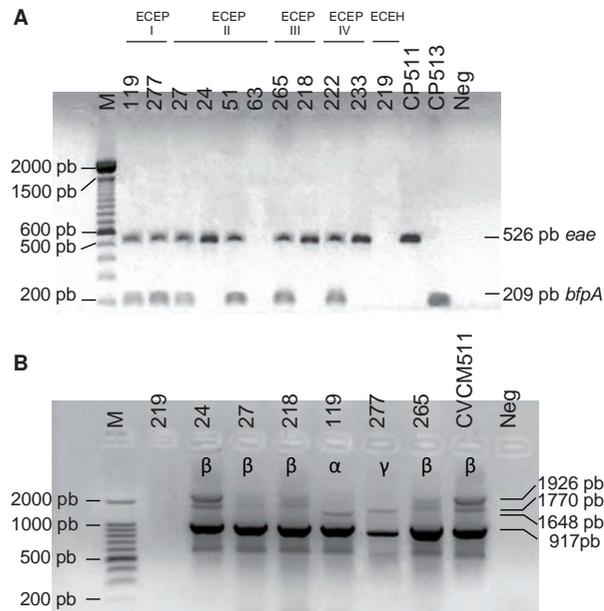


Figura 1. A. Amplificación por PCR múltiple de los genes de intimina (*eae*) y producción de fimbrias (*bfp*) con fragmentos de 526 y 209 pb, respectivamente. Electroforesis en gel de agarosa al 2 % teñido con bromuro de etidio. Cepas utilizadas: 119 y 277 (identificadas como ECEP I); 27, 24, 51 y 63 (ECEP II); 265 y 218 (ECEP III); 222 y 233 (ECEP IV); la cepa 219 se identificó como ECEH. Controles positivos (CP): cepas CVCM511 y CVCM513. Control negativo (Neg): agua. M: marcador de peso molecular de 100 pb (Invitrogen). **B.** Amplificación por PCR múltiple de los genes de intimina (*eae*) con las variantes alélicas α (1.648 pb), β (1.926 pb) y γ (1.770 pb) y el fragmento común para la mayoría de los genes *eae* de 917 pb. Electroforesis en gel de agarosa al 2 % teñido con bromuro de etidio. Cepas utilizadas: 219 (identificada como ECEH); 24 y 27 (ECEP II); 218 y 265 (ECEP III); 119 y 277 (ECEP I). Control positivo (CP): cepa CVCM 511. Control negativo (Neg): agua. M: marcador de peso molecular de 100 pb (Invitrogen)

casos se obtuvieron amplicones para el gen *eae*, que 58,8 % (30/51) se clasificó como cepas ECEP típicas (*eae+* y *bfp+*) y que el 41,2 % (21/51) restante se identificó como cepas ECEP atípicas (*eae+* y *bfp-*). El 95,1 % (48/51) de las amplificaciones del gen *eae* se encontró en cepas ECEP (ECEP típicas: 60 %, 15/25 y ECEP atípicas: 40 %, 10/25); las tres cepas restantes (una ECEP típica y dos ECEP atípicas) se clasificaron serológicamente como no aglutinantes. Las cuatro cepas ECEH con el serotipo O157:H7 identificadas mediante antiseros presentaron fermentación de sorbitol, pero no amplificaron en las PCR para la detección de los genes *eae* y *bfpA*.

La distribución de los genes amplificados según el serogrupo de *E. coli* reveló que los mayores porcentajes de cepas ECEP típicas: 50 % (15/30), y ECEP atípicas: 47,6 % (10/21), se encontraron

en el serogrupo ECEP II. El reporte de los alelos de intimina mostró que el alelo β fue el más frecuentemente identificado entre las cepas positivas para el gen *eae* (74,5 %, 38/51). En las cepas ECEP I se detectó la presencia de los alelos α (57,1 %, 4/7), β (28,6 %, 2/7) y γ (14,3 %, 1/7). En las cepas ECEP II y III solo se detectó la presencia del alelo β (86,7 %, 13/15 y 71,4 %, 10/14, respectivamente). En 15,7 % (8/51) de las cepas positivas para el gen *eae* no hubo amplificación de las formas alélicas evaluadas (cuadro 3).

Discusión

Las cepas de *E. coli* causantes de diarrea se cuentan entre los agentes etiológicos bacterianos más frecuentemente asociados a enfermedades diarreicas agudas, hecho que confirman los hallazgos de la presente investigación, en la cual se identificaron cepas de *E. coli* en 54,7 % de las 192 muestras de heces de los coprocultivos con infección bacteriana, principalmente en los participantes provenientes del municipio urbano de Sucre y en niños de 0 a 4 años de edad. Estos resultados coinciden con reportes previos de estudios en países en desarrollo, según los cuales las tasas de mortalidad y morbilidad infantil por síndrome diarreico agudo comúnmente se asocian a la edad y a la condición social (3,10,28-30). Además, estas enfermedades son más frecuentes durante los primeros dos años de vida, lo cual refleja un patrón que combina el declive de los niveles de anticuerpos maternos, la pérdida de inmunidad activa en el infante y la introducción de alimentos potencialmente contaminados con bacterias fecales (1,29).

Por otro lado, el diagnóstico serológico permitió identificar un elevado porcentaje de cepas positivas para los serogrupos de ECEP, principalmente ECEP II (38,9 %) y ECEP III (18,9 %), mientras que las cepas ECEP I y ECEP IV se identificaron con menor frecuencia (17,3 y 8,2 %, respectivamente); solo se identificaron una cepa ECEI y cuatro con el serotipo ECEH.

Son numerosos los trabajos en los cuales se reporta un rol determinante de las cepas de *E. coli* causantes de diarrea en infecciones entéricas, lo que demuestra que su correcta identificación es de invaluable ayuda, particularmente en poblaciones con alto riesgo de contraer enfermedades infecciosas (1,2,29,30). Por otra parte, estos resultados son esenciales para cualquier estrategia de control epidemiológico adecuado y para las correspondientes medidas de prevención (1).

Cuadro 3. Resultados de la amplificación de los genes *bfp* y *eae* según la serotipificación de las cepas de *Escherichia coli* identificadas en las muestras fecales de los niños estudiados

Serotipo	n	Detección del gen <i>eae</i>	Detección del gen <i>bfp</i>	Formas alélicas del gen <i>eae</i>			P1/P2	
				α	β	γ		
ECEP [Ⓜ] I (N=17)	2	+	+	+	-	-	+	
	1	+	+	-	+	-	+	
	1	+	+	-	-	+	+	
	2	+	-	+	-	-	+	
	1	+	-	-	+	-	+	
	10	-	-	-	-	-	-	
	ECEP II (n=38)	13	+	+	-	+	-	+
		2	+	+	-	-	-	+
		10	+	-	-	-	-	+
		13	-	-	-	-	-	-
ECEP III (n=19)	7	+	+	-	+	-	+	
	2	+	+	-	-	-	+	
	3	+	-	-	+	-	+	
	2	+	-	-	-	-	+	
	5	-	-	-	-	-	-	
ECEP IV (n=8)	1	+	+	-	-	-	+	
	1	+	-	-	-	-	+	
	6	-	-	-	-	-	-	
ECEH [Ⓢ] (n=4)	4	-	-	-	-	-	-	
ECEI [Ⓢ] (n=1)	1	-	-	-	-	-	-	
No aglutinante (n=18)	1	+	+	-	+	-	+	
	2	+	-	-	+	-	+	
	15	-	-	-	-	-	-	
Totales	105	51	30	4	38	1	51	

Ⓜ: ECEP: *Escherichia coli* enteropatógena; Ⓢ: ECEH: *Escherichia coli* enterohemorrágica; Ⓢ: ECEI: *Escherichia coli* enteroinvasiva

La distribución de los serogrupos de *E. coli* por edad evidenció que la mayoría se presentó en los niños entre los 0 y 2 años. La característica epidemiológica más sobresaliente de las infecciones por ECEP es su distribución casi exclusivamente en niños menores de dos años; este patrón se ha asociado a los factores socioepidemiológicos determinantes en este grupo de edad y a su inmadurez inmunológica (10,18,30). Asimismo, se ha sugerido que en los mayores de dos años se pueden aislar cepas ECEP sin que haya una correlación estadística entre dichas cepas y los casos de enfermedad infecciosa (31).

Al evaluar los signos y síntomas clínicos de los pacientes, aquellos con resultado positivo para ECEP, además de diarrea acuosa, presentaban moco visible en heces y dolor abdominal. Cabe resaltar que la infección por ECEP puede tener diversos grados de gravedad y que, a diferencia de los resultados de esta investigación, puede presentarse acompañada de vómito y fiebre (16).

Según el serogrupo de *E. coli* identificado, en los resultados de la amplificación de los genes *eae* y *bfpA* predominaron las cepas ECEP típicas frente a

las atípicas y en ambos casos el serogrupo ECEP II fue el más frecuente. Este hallazgo es similar al reportado por Blanco, *et al.* (32), en Uruguay, quienes encontraron una mayor frecuencia de cepas ECEP típicas (57/71) que de ECEP atípicas (14/71) al evaluar 71 aislamientos a partir de muestras fecales de niños con diarrea. Por otra parte, el resultado de la presente investigación difiere de un estudio llevado a cabo en Perú, en el cual se evaluaron niños con diarrea y sin diarrea (grupo de control) y se reportó que las cepas ECEP atípicas fueron el patotipo de *E. coli* más común en los niños con diarrea (73 %) y en los del grupo de control (87 %) (33).

Se ha determinado que la distribución geográfica de las cepas ECEP típicas y ECEP atípicas es variable, y que las atípicas predominan en los países industrializados mientras que en los países en desarrollo se observa una baja frecuencia de ECEP típicas y una frecuencia relativamente alta de cepas ECEP atípicas (34,35).

Se ha establecido, asimismo, que las cepas típicas de ECEP están asociadas a la diarrea en niños. Sin embargo, el subgrupo de cepas ECEP

atípicas se considera como patógeno bacteriano emergente involucrado en casos esporádicos y brotes de diarreas, lo cual exige más estudios epidemiológicos y de virulencia (36).

La falta de correlación entre el diagnóstico serológico y el molecular de estas cepas, es un hecho conocido. En este sentido, se ha señalado una discordancia entre el perfil de patogenia, ya sea por determinación de los genes específicos o de los patrones fenotípicos de adherencia de las cepas, y la pertenencia a los serogrupos de ECEP (37). Sánchez, *et al.* (35), proponen que la diversidad de cepas circulantes, los eventos de transferencia horizontal, el estado nutricional del huésped, el uso de antibióticos y las condiciones sanitarias, podrían afectar la relación entre los genes de patogenia y virulencia y un serogrupo o serotipo determinado.

El reporte de los alelos de intimina mostró que el β fue el más frecuentemente identificado. En los estudios llevados a cabo en este campo se ha evidenciado la acentuada frecuencia con que se identifica el alelo β de la intimina en pacientes con cuadros diarreicos y en individuos aparentemente sanos, sin que se observe una correlación entre los serogrupos de *E. coli* y el tipo de intimina identificado (15,33,35).

La expresión de algunos alelos de la intimina se ha asociado con el tropismo tisular de cepas de *E. coli* causantes de diarrea (38-41). Sin embargo, la frecuencia de los alelos de intimina evaluados en el presente estudio concordó con otros reportes previos, en los cuales no se encontraron diferencias significativas en la distribución de estos alelos en las cepas ECEP típicas y atípicas, o en la condición clínica de los pacientes (33,35).

En el presente estudio se identificaron ocho cepas positivas para el gen *eae* en las cuales no hubo amplificación de los alelos de intimina α , β y γ , hecho que podría atribuirse a la gran variabilidad genética descrita para este gen, cuya caracterización ha revelado la existencia de 29 variantes alélicas (32).

Debido a la especificidad de los iniciadores utilizados para los alelos específicos de linaje que codifican Int- α , Int- β e Int- γ , este método no solo provee una vía rápida para la identificación de agentes patógenos dentro de los principales grupos clonales de ECEP, sino que constituye una herramienta para su diagnóstico específico en casos en los cuales el tratamiento apropiado es clave en el curso de la enfermedad (42).

La diversidad genética de las cepas de *E. coli* causantes de diarrea aisladas en personas sanas y en pacientes, se ha comprobado suficientemente, lo que justifica la necesidad de llevar a cabo más estudios epidemiológicos que utilicen herramientas moleculares para detectar factores de virulencia. En el caso particular de las cepas ECEP, esta consideración es clave dado el gran riesgo para la salud pública que representan. Asimismo, este estudio evidenció la importancia del diagnóstico complementario de las pruebas microbiológicas de rutina para la detección e identificación de cepas de *E. coli* causantes de diarrea, por ser estas las implicadas en condiciones clínicas de diversa gravedad.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener conflictos de intereses financieros, políticos o académicos en la elaboración del presente trabajo.

Financiación

Esta investigación fue parcialmente financiada por el Consejo de Investigación del Núcleo de Sucre de la Universidad de Oriente a través del proyecto identificado con el número CI-5-1005-1157/03.

Referencias

1. **Organización Mundial de Gastroenterología.** Diarrea aguda en adultos y niños: una perspectiva mundial. Guía práctica de la Organización Mundial de Gastroenterología, 2012. Fecha de consulta: 21 de octubre de 2014. Disponible en: http://www.worldgastroenterology.org/assets/.../diarrea_aguda_en_adultos.pdf
2. **Kaper JB, Nataro JP, Mobley HL.** Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol.* 2004;2:123-40. <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro818>
3. **Onanuga A, Igbeneghu O, Lamikanra A.** A study of the prevalence of diarrhoeagenic *Escherichia coli* in children from Gwagwalada, Federal Capital Territory, Nigeria. *J Pan African Med.* 2014;17:146. <http://dx.doi.org/10.11604/pamj.2014.17.146.3369>
4. **Vidal JE, Cañizález-Román A, Gutiérrez-Jiménez J, Navarro-García F.** Patogénesis molecular, epidemiología y diagnóstico de *Escherichia coli* enteropatógena. *Salud Pública Mex.* 2007;49:376-86.
5. **Hernandes RT, De la Cruz M, Yamamoto D, Girón JA, Gomes TA.** Dissection of the role of pili and type 2 and 3 secretion systems in adherence and biofilm formation of an atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strain. *Infect Immun.* 2013;81:3793-802. <http://dx.doi.org/10.1128/IAI.00620-13>
6. **Nougayrède JP, Fernandes P, Donnberg MS.** Adhesion of enteropathogenic *Escherichia coli* to host cells. *Cell Microbiol.* 2003;5:359-72.
7. **Nascimento H, Silva L, Souza R, Silva N, Scaletsky I.** Phenotypic and genotypic characteristics associated with

- biofilm formation in clinical isolates of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* (aEPEC) strains. BMC Microbiol. 2014;14:184. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2180-14-184>
8. **Nataro J, Kaper J.** Diarrheagenic *Escherichia coli*. Clin Microbiol Rev. 1998; 11:142-201.
 9. **Zhang WL, Köhler B, Oswald E, Beutin L, Karch H, Morabito S, et al.** Genetic diversity of intimin genes of attaching and effacing *Escherichia coli* strains. J Clin Microbiol. 2002;40:4486-92. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.40.12.4486-4492.2002>
 10. **Moyo SJ, Gro N, Matee MI, Kitundu J, Myrmel H, Mylvaganam H, et al.** Age specific aetiological agents of diarrhoea in hospitalized children aged less than five years in Dar es Salaam, Tanzania. BMC Pediatrics. 2011;11:19. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2431-11-19>
 11. **Behiry IK, Abada EA, Ahmed EA, Labeeb RS.** Enteropathogenic *Escherichia coli* associated with diarrhea in children in Cairo, Egypt. J Scient World. 2011;11:2613-9. <http://dx.doi.org/10.1100/2011/485381>
 12. **Amisano G, Fornasero S, Migliaretti G, Caramello S, Tarasco V, Savino F.** Diarrheagenic *Escherichia coli* in acute gastroenteritis in infants in North-West Italy. New Microbiol. 2011;34:45-51.
 13. **Paniagua GL, Monroy E, García-González O, Alonso J, Negrete E, Vaca S.** Two or more enteropathogens are associated with diarrhoea in Mexican children. Ann Clin Microbiol Antimicrob. 2007;6:17. <http://dx.doi.org/10.1186/1476-0711-6-17>
 14. **de Moura C, Fregolente MC, Martini IJ, Domingos DF, da Silva EJ, Ferraz MM, et al.** Prevalence of enteropathogens in normal feces from healthy children at an infant day care in Brazil. J Infect Dev Ctries. 2012;6:176-80. <http://dx.doi.org/10.3855/jidc.1982>
 15. **Pitondo-Silva A, Nakazato G, Falcão JP, Irino K, Martínez R, Darini AL, et al.** Phenotypic and genetic features of enteropathogenic *Escherichia coli* isolates from diarrheal children in the Ribeirão Preto metropolitan area, São Paulo State, Brazil. APMIS. 2015;123:128-35. <http://dx.doi.org/10.1111/apm.12314>
 16. **Gambandé T, Damiano M, Borda N, Notario R, Aita J.** Prevalence of the bacteria causing diarrhea in a Rosario Hospital, Argentina. Rev Fac Cien Med Univ Nac Córdoba. 2006;63:36-8.
 17. **González R, Díaz C, Mariño M, Cloralt R, Pequeneze M, Pérez-Schael I.** Age-specific prevalence of *Escherichia coli* with localized and aggregative adherence in Venezuelan infants with acute diarrhea. J Clin Microbiol. 1997;35:1103-7.
 18. **Hannaoui E, Villalobos L, Martínez R, Maldonado A, Hagel I, Bastardo J.** *Escherichia coli* diarregénica asociada a casos de diarrea aguda en niños de Cumaná, Venezuela. Invest Clin. 2010;51:489-500.
 19. **Villalobos L, Martínez R, Blanco A, Maldonado A, Bastardo J.** Detección molecular de *Escherichia coli* productor de shiga toxina (Stx1) y rotavirus en heces de niños con diarrea. Invest Clin. 2008;49:387-95.
 20. **Delannoy S, Beutin L, Fach P.** Towards a molecular definition of enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC): Detection of genes located on O island 57 as markers to distinguish EHEC from closely related enteropathogenic *E. coli* strains. J Clin Microbiol. 2013;51:1083-8. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.02864-12>
 21. **Winn WC, Allen SD, Janda WM, Koneman EW, Procop GW, Schrenckenberger PC.** Koneman: Diagnóstico microbiológico. Texto y atlas en color. Sexta edición. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana; 2008
 22. **MacFaddin, J.** Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. Tercera edición. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana; 2003.
 23. **Fundación Venezolana para el Estudio de la Salud Infantil (FUVESIN).** Productos biológicos. Sueros aglutinantes para el diagnóstico de bacterias productoras de diarrea. Caracas: Universidad Central de Venezuela; 2005.
 24. **Yamazaki M, Saito M, Inuzaka K, Shima S, Taniwaki H, Itoh K.** *eaeA* genes in *Escherichia coli* derived from Japanese patients with sporadic diarrhea. Kansenshogaku Zasshi. 1997;71:1059-65.
 25. **Kimata K, Shima T, Shimizu M, Tanaka D, Isoe J, Gyobu Y, et al.** Rapid categorization of pathogenic *Escherichia coli* by multiplex PCR. Microbiol Immunol. 2005;49:485-92. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1348-0421.2005.tb03752.x>
 26. **Reid S, Betting D, Whittam T.** Molecular detection and identification of intimin alleles in pathogenic *Escherichia coli* by multiplex PCR. J Clin Microbiol. 1999;37:2719-22.
 27. **Council for International Organizations of Medical Sciences (CIOMS).** International ethical guidelines for biomedical research involving human subjects. 2002. Geneva, Switzerland. Fecha de consulta: 21 de octubre de 2014. Disponible en: http://www.cioms.ch/publications/layout_guide2002.pdf
 28. **Estrada-García T, López-Saucedo C, Thompson-Bonilla R, Abonce M, López-Hernández D, Santos JI, et al.** Association of diarrheagenic *Escherichia coli* pathotypes with infection and diarrhea among Mexican children and association of atypical enteropathogenic *E. coli* with acute diarrhea. J Clin Microbiol. 2009;47:93-8. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.01166-08>
 29. **Cabrera-Gaytán DA, Maldonado-Burgos MA, Rojas-Mendoza T, Grajales-Muñiz C.** Enfermedad diarreica aguda en niños menores de cinco años de edad: aportaciones de los núcleos trazadores de vigilancia epidemiológica 2012-2013. Arch Inv Mat Inf. 2013;3:118-25.
 30. **Orlandi P, Magalhães G, Matos N, Silva B, Penatti M, Nogueira P, et al.** Etiology of diarrhea in children of Porto Velho, Amazon region. Braz J Med Biol Res. 2006;39:507-17. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-879X2006000400011>
 31. **Rappelli P, Folgosa E, Solinas M, Dacosta J, Pisanu C, Sidat M, et al.** Pathogenic enteric *Escherichia coli* in children with and without diarrhea in Maputo, Mozambique. FEMS Immunol Med Microbiol. 2005;43:67-72. <http://dx.doi.org/10.1016/j.femsim.2004.07.006>
 32. **Blanco M, Blanco JE, Dahbi G, Mora A, Alonso MP, Varela G, et al.** Typing of intimin (*eae*) genes from enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) isolated from children with diarrhoea in Montevideo, Uruguay: Identification of two novel intimin variants (muB and xiR/beta2B). J Med Microbiol. 2006;55:1165-74. <http://dx.doi.org/10.1099/jmm.0.46518-0>

33. **Contreras CA, Ochoa TJ, Lacher DW, DebRoy C, Navarro A, Talledo M, et al.** Allelic variability of critical virulence genes (*eae*, *bfpA* and *perA*) in typical and atypical enteropathogenic *Escherichia coli* in Peruvian children. *J Med Microbiol.* 2010;59:2531. <http://dx.doi.org/10.1099/jmm.0.013706-0>
34. **Trabulsi R, Keller R, Gomes T.** Typical and atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. *Emerg Infect Dis.* 2002; 8:508-13. <http://dx.doi.org/10.3201/eid0805.010385>
35. **Sánchez S, Romecín P, Guachalla L, Iñiguez V.** 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. *Arch Pediatr Urug.* 2006;77:195-208. <http://dx.doi.org/10.4067/S0370-41062006000400013>
36. **Magalhães CA, Rossato SS, Barbosa AS, dos Santos TO, Elias WP, Sircili MP, et al.** The ability of haemolysins expressed by atypical enteropathogenic *Escherichia coli* to bind to extracellular matrix components. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2011;106:146-52. <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762011000200005>
37. **Watterworth L, Topp E, Schraft H, Leung K.** Multiplex PCR-DNA probe assay for the detection of pathogenic *Escherichia coli*. *J Microbiol Methods.* 2005;60:93-105. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mimet.2004.08.016>
38. **Torres AG, Zhou X, Kaper J B.** Adherence of diarrheagenic *Escherichia coli* strains to epithelial cells. *Infect Immun.* 2005;73:18-29. <http://dx.doi.org/10.1128/IAI.73.1.18-29.2005>
39. **Phillips AD, Navabpoura S, Hicksa S, Dougan G, Wallisb T, Frankelc G.** Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 target Peyer's patches in humans and cause attaching/effacing lesions in both human and bovine intestine. *Gut.* 2000;47:377-81. <http://dx.doi.org/10.1136/gut.47.3.377>
40. **Cantey JR, Inman LR.** Diarrhea due to *Escherichia coli* strain RDEC-1 in the rabbit: The Peyer's patch as the initial site of attachment and colonization. *J Infect Dis.* 1981;143:440-6. <http://dx.doi.org/10.1093/infdis/143.3.440>
41. **Fitzhenry RJ, Pickard DJ, Hartland EL, Reece S, Dougan G, Phillips AD, et al.** Intimin type influences the site of human intestinal mucosal colonization by enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Gut.* 2002;50: 180-5. <http://dx.doi.org/10.1136/gut.50.2.180>
42. **Vidal R, Vidal M, Lagos R, Levine M, Prado V.** Multiplex PCR for diagnosis of enteric infections associated with diarrheagenic *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol.* 2004;42: 1787-9. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.42.4.1787-1789.2004>