



Fenotipos de resistencia a antibióticos en cepas de *Escherichia coli* diarreogénicas detectadas en infantes mediante reacción en cadena de la polimerasa multiplex

Gloria Luz Paniagua-Contreras,* Eric Monroy-Pérez,* Sergio Vaca-Pacheco*

RESUMEN

El propósito de este estudio fue determinar la resistencia a antibióticos en cepas de *E. coli* diarreogénicas detectadas en infantes por el método de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) multiplex. Las muestras fecales obtenidas de niños con diarrea (grupo de pacientes, $n = 174$) y de niños sin síntomas de enfermedad (grupo control, $n = 30$) fueron analizadas. El 25.2% ($n = 44$) de las muestras diarreicas fue positivo para algún tipo de *E. coli*. Los patotipos encontrados fueron VTEC con el 12% ($n = 21$), de las cuales dos cepas pertenecieron al serogrupo O157:H7; ETEC 8.6% ($n = 15$); EPEC 2.9% ($n = 5$); EIEC 1.7% ($n = 3$). Solamente una muestra del grupo control fue positiva para *E. coli* diarreogénica (ETEC, 0.6%). La mayoría de las cepas fueron resistentes a cefalotina, carbenicilina, ampicilina y trimetoprim/sulfametoxazol. *Entamoeba histolytica/Entamoeba dispar* fue identificada en el 66% ($n = 114$) de los niños enfermos, seguido de *Giardia intestinalis* con el 50% ($n = 50$), *Shigella flexneri* con el 3% ($n = 3$), *Shigella sonnei* con el 2% ($n = 2$) y *Salmonella typhimurium* con el 2% ($n = 2$). *Entamoeba histolytica/Entamoeba dispar*, y *Giardia intestinalis* fueron encontradas en el 50% ($n = 15$) y 56.6% ($n = 17$) del grupo control, respectivamente. La asociación de varios enteropatógenos en los infantes enfermos, reflejó lo agudo de las infecciones, por lo que fue necesario iniciar inmediatamente el tratamiento médico correspondiente.

Palabras clave: Antibióticos, *Escherichia coli*, PCR.

ABSTRACT

The aim of this study was to determine the resistance to antibiotics in strains of *E. coli* diarrhoeogenic detected by multiplex PCR in children. Fecal samples obtained from children diagnosed as positive for diarrhea (patient group, $n=174$) and from children without symptoms of the disease (control group, $n= 30$) were analyzed. 25.2% ($n = 44$) of the diarrheal samples were positive for diarrhoeogenic *E. coli*. The pathotypes found were VTEC 12% ($n = 21$, from which two strains belonged to the serogroup O157:H7); ETEC 8.6% ($n = 15$); EPEC 2.9% ($n = 5$); EIEC 1.7% ($n = 3$). Only one sample from the control group was positive for diarrhoeogenic *E. coli* (ETEC, 0.6%). The most of the strains were resistant to cephalotin, carbenicillin, ampicillin and trimethoprim/sulfamethoxazole. *Entamoeba histolytica/Entamoeba dispar* was identified in 66% ($n = 114$) of the samples from the patient group, followed by *Giardia intestinalis* in 50% ($n = 50$), *Shigella flexneri* in 3%, ($n = 3$), *Shigella sonnei* in 2% ($n = 2$), and *Salmonella typhimurium* in 2% ($n = 2$). *Entamoeba histolytica/Entamoeba dispar*, and *Giardia intestinalis* were found in 50% ($n=15$) and 56.6% ($n=17$) of the control group samples, respectively. The associations of several enteropathogens in children from the patient group indicate the severity of the infection; for this reason, medical treatment was initiated immediately.

Key words: Antibiotics, *Escherichia coli*, PCR.

* Laboratorio Clínico, Clínica Universitaria de la Salud Integral, Facultad de Estudios Superiores FES Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México.

INTRODUCCIÓN

En los países subdesarrollados, las infecciones diarreicas agudas representan la segunda causa de muerte en infantes,¹ con un total de 1.5 millones de muertes cada año por agentes como *Escherichia coli*, rotavirus, *Vibrio cholerae* y *Shigella*.² Las cepas diarreogénicas de *E. coli* pueden ser divididas en seis grupos: *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* enteropatógena (EPEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC) y *E. coli* de adherencia difusa (DAEC).³ Las cepas de ETEC producen la toxina termolábil (LT) y la toxina termoestable (ST), que actúan incrementando los niveles de adenosina-5'- (AMPc) y guanosina-5'- monofosfato cíclico (GMPc), respectivamente, esto provoca que las células de las criptas intestinales aumenten la secreción de agua y electrolitos, con la consecuente disminución en la absorción por las vellosidades, manifestándose como diarrea acuosa.⁴ En EPEC, se ha involucrado al pilus BFP (*bundle-forming pilus*) que participa en el proceso infeccioso al promover la adherencia íntima a los enterocitos, posteriormente se produce la polimerización de la actina del citoesqueleto, seguida de la destrucción de las microvellosidades.⁵ Los cambios bioquímicos relacionados con este proceso son los que inducen probablemente la secreción de agua y electrolitos al espacio intraluminal, produciendo diarrea aguda.^{6,7} En EIEC, el mecanismo de patogenicidad es la invasividad que se inicia con la adherencia de la bacteria a las microvellosidades de la mucosa del intestino grueso, seguida por la entrada a la célula en donde se multiplica e invade a las células vecinas. La destrucción de las células desencadena el proceso de inflamación y la aparición de diarrea con moco y sangre (disentería), muy similar a la producida por *Shigella*.⁵ EHEC produce lesiones del tipo de "adherencia y esfacelación" como en EPEC, además de la producción de dos toxinas (verotoxina I y II) que producen lisis de la línea celular VERO en cultivo. La producción de diarrea aguda y crónica en niños se debe a la acción de las toxinas y a la adherencia al enterocito por sus fimbrias.⁸

El tratamiento antimicrobiano de las infecciones diarreicas ocasionadas por los patotipos de *E. coli* ha cambiado en los últimos años, debido a que las bacterias se han seleccionado como resistentes a los antibióticos que en el pasado eran considerados de primera elección,⁹ como la tetraciclina, estreptomycin, amoxicilina, cefalotina, ticarcilina¹⁰ y al trimetoprim con sulfametoxazol.¹¹ De esta manera el éxito

del tratamiento médico adecuado de las infecciones ocasionadas por los grupos diarreogénicos de *E. coli* va a depender de la identificación precisa del agente causal. Entre los métodos de diagnóstico clínico utilizados para la identificación de los patotipos de *E. coli*, se encuentra la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la cual es una técnica que nos ofrece resultados rápidos, confiables y con elevada especificidad y sensibilidad.¹²

Debido a que en nuestro país las infecciones diarreicas en infantes continúan siendo un problema de consideración, el propósito de este estudio clínico fue determinar la resistencia a antibióticos en cepas pertenecientes a distintos grupos de *E. coli* detectadas en diarrea de infantes con el método de PCR multiplex.

MATERIAL Y MÉTODOS

Muestras clínicas. Durante el periodo de septiembre del 2005 a septiembre del 2007 se analizaron las muestras diarreicas de un total de 174 niños que acudieron para atención médica a la Clínica Universitaria de la Salud Integral Iztacala (CUSI-I), Facultad de Estudios Superiores (FES) Iztacala de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), además de procesarse las heces de 30 niños clínicamente sanos (grupo control). Los niños enfermos incluidos en este estudio presentaron diarrea caracterizada por la ocurrencia de tres o más evacuaciones, suelta, líquida y blanda en un periodo de 24 horas. Algunos manifestaron en la materia fecal trazas de sangre. La información sobre otros factores como desórdenes gastrointestinales, viajes, tratamiento reciente con antibióticos, etcétera, fue obtenida a través de un cuestionario.

Para la detección de *E. coli*, las muestras fueron sembradas en el medio de agar MacConkey (DIBICO) e incubadas a 37° C por 24 horas. Adicionalmente, las muestras se sembraron en el agar TCBS para *Vibrio* y en el agar para *Salmonella-Shigella*.

Los distintos parásitos fueron identificados por el método de flotación de Faust.

Cepas bacterianas. Las cepas de referencia de *E. coli* utilizadas como control para la PCR fueron: ETEC ATCC 35401 (*eltB* y *estA*); EPEC ATCC 43887 (*bfpA* y *eaeA*); EHEC ATCC 43890 (*vt1*, *eaeA*); EHEC ATCC 43889 (*vt2*, *eaeA*); EIEC ATCC 43893 (*ial*) y *E. coli* ATCC 11775 sin genes de virulencia (control negativo).

ADN templado para PCR. Para obtener el ADN bacteriano, después de la incubación de 24 horas, se

colectaron las bacterias del cultivo y se suspendieron en 5 mL de PBS (pH, 7.2) a una densidad aproximada de 10^9 bacterias. El ADN templado fue extraído por ebullición por 20 minutos, seguido por centrifugación a 12,000 revoluciones por minuto (rpm) durante 10 minutos. El sobrenadante fue utilizado para el procesamiento de PCR.

Desarrollo del PCR multiplex. El método de PCR multiplex y los oligonucleótidos (*Cuadro I*) que nosotros utilizamos para la detección de los genes de virulencia de las cepas diarreogénicas de *E. coli* han sido previamente descritos.¹³ El volumen final de la mezcla de reacción para PCR fue de 25 μ L, la cual contenía 3 μ L de ADN templado, 4 μ L de nucleasa free water estéril, 1 μ L de cada uno de los 18 oligonucleótidos a una concentración de 10 pmol (todos los primers fueron de Sigma-Genosys), 1.5 mmol de $MgCl_2$, 0.5 U de AmpliTaq polimerase y 100 mmol de dNTPs (PuRetagTM Ready-To-GoTM PCR beads). La amplificación del ADN fue realizado en un termociclador modelo CGI-96, bajo las siguientes condiciones: desnaturalización inicial a 96 °C por cuatro minutos; seguido de 30 ciclos a 94 °C por 20 segundos, 20 segundos a 55 °C y 10 segundos a 70 °C. Por último una extensión final a 72 °C durante siete minutos.

Después de la amplificación, 10 μ L de cada muestra fue analizada por electroforesis en geles de

agarosa al 2% para *E. coli* bajo las siguientes condiciones: 120 volts, 94 miliampers por 120 minutos. Los geles fueron teñidos con bromuro de etidio (BrEt) y fotografiados bajo luz ultravioleta, utilizando el sistema de fotodocumentación modelo GEL LOGIC 100 (KODAK). La PCR fue considerada como positiva cuando una banda o bandas de tamaño igual al de nuestras cepas controles de referencia fueron observadas y no extra bandas. Los genes de virulencia que nosotros detectamos para *E. coli* fueron los siguientes: ETEC positivo, detección de *eltB* (*heat-labile enterotoxin gene*) y/o *estA* (*heat-stable enterotoxin gene*); EPEC positivo, detección de *eaeA* (*structural gene for intimin*) y *bfpA* (*structural gene for the bundle-forming pilus*); VTEC positivo, detección de *eaeA* (*structural gene for intimin*) y *vt1* (*verotoxin 1 gene*) o *vt2* (*verotoxin 2 gene*); EIEC/*Shigella* positivo, detección de *ial* (*invasion-associated locus of the invasion plasmid found in*); *E. coli* O157:H7 positivo, detección del gene *fliC* (expresa el antígeno flagelar H7) previamente descrito¹⁴ y un fragmento de ADN característico de *E. coli* O157 (*Cuadro I*).

Susceptibilidad a los antibióticos de las cepas de *E. coli* identificadas. Una vez identificadas las cepas diarreogénicas de *E. coli*, se determinó la susceptibilidad a 12 antibióticos (cefalotina, carbeni-

Cuadro I. Oligonucleótidos utilizados en la detección de *E. coli* por PCR multiplex.

Primer	GEN	Secuencia del primer (5' a 3')	Tamaño de la amplificación (pb)
VT1	<i>vt1</i>	GAAGAGTCCGTGGGATTACG AGCGATGCAGCTATTAATAA	130
VT2	<i>Vt2</i>	ACCGTTTTTCAGATTTTGACACATA TACACAGGAGCAGTTTCAGACAGT	298
VTEC/EPEC	<i>eaeA</i>	CACACGAATAAACTGACTAAAATG AAAAACGCTGACCCGCACCTAAAT	376
EPEC	<i>bfpA</i>	TTCTTGGTGCTTGCGTGTCTTTT TTTTGTTTGTGTATCTTTGTAA'	367
ETEC-LT	<i>eltB</i>	TCTCTATGTGCATACGGAGC CCATACTGATTGCCGCAAT	322
ETEC-ST	<i>estA</i>	GCTAAACCAGTAGAGGTCTTCAAAA CCCGGTACAGAGCAGGATTACAACA	147
EIEC/ <i>Shigella</i>	<i>ial</i>	CTGGTAGGTATGGTGAGG CCAGGCCAACAATTATTTCC'	320
FLICH7	<i>fliC</i>	GCGCTGTGCGAGTTCTATCGAGC CAACGGTGACTTTATCGCCATTCC	625
O157	—	GTTACATTTGCTCCTGGGGCTAA CATACCGAYKACGCCGATCTGTT	500

cilina, ampicilina, trimetoprim con sulfametoxazol, cefotaxima, cloramfenicol, pefloxacina, gentamicina, netilmicina, nitrofurantoína, amikacina y ceftriaxona) por el método de Kirby-Bauer.

Análisis de los datos. Para determinar si existían diferencias estadísticas entre nuestros pacientes y nuestro grupo control los datos se evaluaron con la prueba de χ^2 .

RESULTADOS

Niños estudiados. El promedio de edad de los niños con diarrea fue de seis años (rango: dos a 12 años) y el del grupo control de siete años (rango: 2 a 13). El 51% de los infantes correspondió al sexo femenino y el 49% al masculino. Los niños enfermos que acudieron a la Clínica Universitaria de la Salud Integral de la FES Iztacala, habían presentado diarrea en un tiempo promedio de 24 horas, caracterizada por episodios de tres o más evacuaciones sueltas o líquidas. Las heces del 3% de los niños enfermos fueron sanguinolentas. El 47% de los niños enfermos además de la diarrea habían presentado síntomas de dolor abdominal, vómito, temperatura (38-39 °C) o fiebre (> 39 °C). El 12% de los niños enfermos necesitó de rehidratación.

Detección de los grupos de *E. coli* mediante PCR multiplex. En el *cuadro II* se aprecia que el 25.2% (n = 44) de las muestras de los niños con diarrea fue positivo para algún tipo de *E. coli*, dentro de los cuales la prevalencia de VTEC fue del 12% (n = 21), ETEC del 8.6% (n = 15), EPEC del 2.9% (n = 5) y EIEC del 1.7% (n = 3). Para el grupo control (n = 30), solamente una muestra fue positiva para un tipo de *E. coli* (ETEC, 0.6%).

La prevalencia de *E. coli* diarreogénica en ambos grupos fue significativamente diferente (p < 0.001).

Cuadro II. Prevalencia de *E. coli* en los niños enfermos y en el grupo control.

Grupo diarreogénico de <i>E. coli</i>	Niños con diarrea (N = 174)		Niños sanos (N = 30)	
	n	%	n	%
VTEC	21	12.0	0	0.0
ETEC	15	8.6	1	0.6
EPEC	5	2.9	0	0.0
EIEC	3	1.7	0	0.0
Total	44	25.2	1	0.6

Cuadro III. Distribución de los genes de virulencia de las cepas de *E. coli* diarreogénicas aisladas de las muestras clínicas.

Genes detectados en las cepas diarreogénicas de <i>E. coli</i>	Niños con diarrea (N = 174)		Niños sanos (N = 30)	
	n	%	n	%
VTEC				
vt1+vt2+eaeA	16	9.1	0	0.0
vt2+eaeA	3	1.7	0	0.0
vt1+eaeA	2	1.2	0	0.0
ETEC				
estA	7	4.0	1	0.6
eltB	7	4.0	0	0.0
estA+eltB	1	0.6	0	0.0
EPEC				
eaeA	3	1.7	0	0.0
eaeA + bfpA	2	1.2		
EIEC				
ial	3	1.7	0	0.0
Total	44	25.2	1	0.6

Caracterización de las cepas diarreogénicas de *E. coli* aisladas de las muestras clínicas. A partir de las 21 cepas de VTEC identificadas en el grupo de niños con diarrea, la asociación de los genes vt1 + vt2 + eaeA se detectó en 16 (9.1%) casos, vt2 + eaeA en tres (1.7%) y vt1 + eaeA en dos (1.2%) (*Cuadro III*, *Figura 1*). Para ETEC, el gen estA (codifica la toxina termoestable) se detectó en siete (4.0%) casos, el gen eltB (codifica la toxina termolábil) en siete (4.0%) casos y la asociación estA + eltB en un (0.6%) caso. Para EPEC, el gen eaeA se detectó en tres (1.7%) ocasiones y la asociación de eaeA + bfpA en dos (1.2%). Para EIEC, el gen ial se identificó en el 1.7% de las cepas (tres casos). Finalmente para el grupo control (n = 30), ETEC se detectó en una muestra, donde la presencia del gen estA que codifica la toxina termoestable se identificó en el 0.6% (n=1).

Detección de *E. coli* perteneciente al serogrupo O157:H7. Utilizando los oligonucleótidos FLICH7 y O157, nosotros detectamos que dos de las 21 cepas de VTEC detectadas en los niños enfermos pertenecieron al serogrupo O157:H7. En la *figura 2* se distinguen los distintos genes de VTEC (vt1, vt2, eaeA y fliC) y un fragmento amplificado de ADN correspondiente a *E. coli* O157:H7.

Fenotipos de resistencia a antibióticos en las cepas de *E. coli* diarreogénicas. En el *cuadro IV*

se aprecia que el 52.2% de las cepas de VTEC (n = 21) detectadas en las muestras de los infantes mediante PCR multiplex fue resistente a cefalotina; 53% a carbenicilina; 48.8% a ampicilina; 44.4% a trimetoprim/sulfametoxazol; 20% a cefotaxima; 15.5% al cloramfenicol; 13.3% a pefloxacin; 13% a gentamicina; 12.2% a netilmicina; 5.5% a nitrofurantoína; 4.4 % a amikacina; y 4% a ceftriaxona.

Para ETEC (n = 15) el 54% de las cepas presentó resistencia a cefalotina; 47% a carbenicilina; 50% a ampicilina; 39% al trimetoprim/sulfametoxazol; 24% a cefotaxima; 18% al cloramfenicol; 16% a pefloxacin; 15.8% a gentamicina; 15% a netilmicina; 7% a nitrofurantoína; 6% a amikacina y 5% a ceftriaxona.

El 58% de las cepas de EPEC (n = 5) fue resistente a ampicilina; 49% a cefalotina; 48% a carbenicilina; 33% al trimetoprim/sulfametoxazol; 30% a cefo-

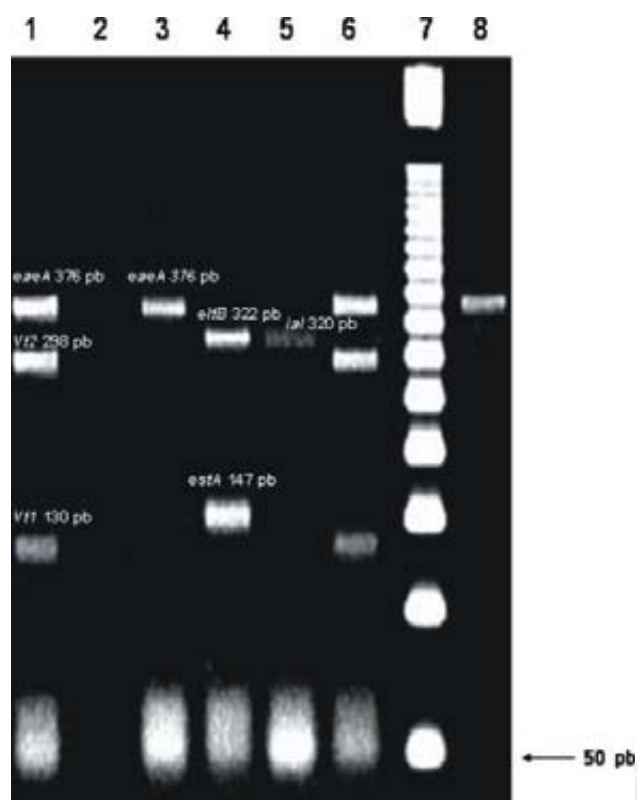


Figura 1. Detección mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) multiplex de las cepas de *E. coli* obtenidas de las muestras diarreicas de los pacientes analizados. Línea 1: VTEC (vt1, vt2 y eaeA). Línea 2: Control negativo (*E. coli* ATCC11775). Línea 3: EPEC (eaeA y bfpA). Línea 4: ETEC (eltB y estA). Línea 5: EIEC (ial). Línea 6: VTEC (vt1, vt2 y eaeA). Línea 7: 50-pb ladder. Línea 8: EPEC ATCC43887 (eaeA y bfpA).

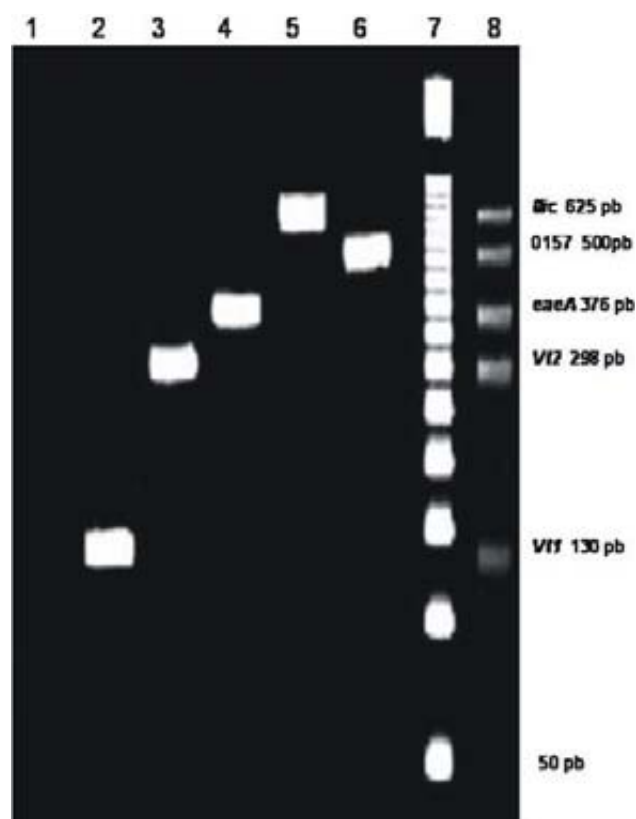


Figura 2. Identificación de *E. coli* perteneciente al serogrupo 0157:H7. Línea 1: Control negativo (*E. coli* ATCC11775). Línea 2: vt1. Línea 3: vt2. Línea 4: eaeA. Línea 5: fliC. Línea 6: 0157. Línea 7: 50-pb ladder. Línea 8: VTEC perteneciente al serogrupo 0157:H7 detectada en un niño enfermo.

taxima; 25% al cloramfenicol; 24% a pefloxacin; 21% a gentamicina; 19% a netilmicina; 12% a nitrofurantoína; 10% a amikacina y 8% a ceftriaxona.

Para EIEC (n = 3) el 57% de las cepas fue resistente a cefalotina; 53% a ampicilina; 43% a carbenicilina; 33% al trimetoprim/sulfametoxazol; 29% a cefotaxima; 25% al cloramfenicol; 23% a pefloxacin; 22% a gentamicina; 21% a netilmicina; 15% a nitrofurantoína; 13% a amikacina y 14% a ceftriaxona.

Otros enteropatógenos identificados. En este estudio, además de los grupos de *E. coli* detectados mediante PCR en las muestras de los infantes, se encontraron asociados otros patógenos (Cuadro V). El parásito *Entamoeba histolytica*/*Entamoeba dispar* se identificó en 66% (n = 114) de los niños enfermos, seguido de *Giardia intestinalis* en 50% (n = 50), *Shigella flexneri* en 3% (n = 3), *Shigella sonnei* en 2% (n = 2), al igual que *Salmonella typhimurium* (n = 2). Para el grupo de niños sanos (grupo control), la pre-

valencia de *Entamoeba histolytica*/*Entamoeba dispar* fue del 50% (n = 15) y de *Giardia intestinalis* del 56.6% (n = 17). La prevalencia de los enteropatógenos detectada en ambos grupos fue significativamente diferente ($p < 0.001$).

DISCUSIÓN

Para simplificar la identificación de cepas patógenas de *E. coli* en muestras diarreicas de infantes, nosotros utilizamos un método de PCR multiplex que nos ayudó a detectar en una sola reacción y por medio de nueve pares de primers los marcadores genéticos de virulencia de los grupos ETEC, EPEC, VTEC y EIEC. La PCR es una técnica que, dada su especificidad y confiabilidad, permite distinguir entre cepas de *E. coli* diarreogénicas de las cepas de *E. coli* pertenecientes a la flora normal.

En este estudio se detectó a *E. coli* diarreogénica en el 25.2% (n = 44) de las muestras analizadas de los niños con diarrea y sólo en 0.6 % (n = 1) del grupo control ($p < 0.001$) (*Cuadro II*). Nuestros datos son parecidos a los reportados en un estudio realizado en niños en Hanoi, Vietnam, en donde se identificó a *E. coli* diarreogénica por PCR multiplex en el 22.5% de los niños con diarrea.¹⁵ La presencia de los grupos diarreogénicos de *E. coli* ha sido detectada en otras partes del mundo.¹⁶⁻²⁰

En este estudio, VTEC (*Cuadro II*) ocupó el primer lugar con una prevalencia del 12% (n = 21) para el grupo de niños con diarrea (n = 174). La presencia de VTEC parece tener distribución mundial; sin embargo, ha sido estudiada con mayor detalle en los Estados Unidos, Canadá, Argentina y Europa.²¹ Por ejemplo, en 1995, Blanco y colaboradores estudiaron la incidencia de VTEC en coprocultivos de pa-

Cuadro IV. Fenotipos de resistencia a antibióticos de los patotipos de *E. coli* identificados en los infantes.

Antibiótico	Porcentaje de resistencia a antibióticos en los distintos grupos de <i>E. coli</i>			
	VTEC (N = 21)	ETEC (N = 15)	EPEC (N = 5)	EIEC (N = 3)
Cefalotina	52.2	54.0	58.0	57.0
Carbenicilina	53.0	47.0	49.0	43.0
Ampicilina	48.8	50.0	48.0	53.0
Trimetoprim/sulfametoxazol	44.4	39.0	33.0	33.0
Cefotaxima	20.0	24.0	30.0	29.0
Cloramfenicol	15.5	18.0	25.0	25.0
Pefloxacina	13.3	16.0	24.0	23.0
Gentamicina	13.0	15.8	21.0	22.0
Netilmicina	12.2	15.0	19.0	21.0
Nitrofurantoina	5.5	7.0	12.0	15.0
Amikacina	4.4	6.0	10.0	13.0
Ceftriaxona	4.0	5.0	8.0	14.0

Cuadro V. Prevalencia de enteropatógenos en los niños enfermos y sanos.

Enteropatógeno	Niños con diarrea (N = 174)		Niños sin diarrea (N = 30)	
	n	%	n	%
<i>Entamoeba histolytica</i> / <i>Entamoeba dispar</i>	114	66.0	15	50.0
<i>Giardia intestinalis</i>	50	29.0	17	56.6
<i>Shigella flexneri</i>	3	1.7	0	
<i>Shigella sonnei</i>	2	1.1	0	
<i>Salmonella thyphimurium</i>	2	1.1	0	

cientes con alteraciones gastrointestinales en Lugo, España, detectando VTEC en 21 de los 1,649 casos estudiados (1.3%).²² En esta comunidad Gallega se ha observado un incremento progresivo de la incidencia de VTEC, desde el 0.9% en 1993 hasta el 1.9% en 1995.

En este trabajo, describimos que de los 21 casos VTEC PCR positivos, en el grupo de niños con diarrea ($n = 21$, Cuadro III), en 16 (9.1%) se identificó a los genes *vt1* + *vt2* + *eaeA*, en 3 (1.7%) *vt2* + *eaeA* y en 2 (1.2%) *vt1* + *eaeA*. Nuestros datos contrastan con los reportados por Svenungsson y colaboradores,¹³ quienes describieron que de los nueve pacientes VTEC positivos, dos fueron positivos para *vt1*, siete para *vt2* y seis para *eaeA*.

En nuestro estudio reportamos que dos de las 27 cepas de VTEC detectadas en el grupo de niños enfermos, pertenecieron al serogrupo O157:H7 (Figura 2). Se ha reportado que en los Estados Unidos de América existen anualmente 20,000 infecciones ocasionadas por *E. coli* O157:H7, con un total de 250 defunciones.²³ Se ha descrito que para los Estados Unidos *E. coli* O157:H7 es considerada la cuarta enfermedad infecciosa transmitida por alimentos.²⁴

La prevalencia de ETEC (Cuadro II) en este trabajo fue del 8.6% ($n = 15$) para el grupo de niños con diarrea ($n = 174$), y del 0.6% (un caso) en el grupo control ($n = 30$), la cual es parecida a la reportada en otros países.^{25,26} No obstante que en nuestro trabajo ETEC ocupó el segundo lugar, existen reportes en nuestro país,²⁷ como en otras partes del mundo,²⁸ que ETEC es el grupo diarreogénico aislado con mayor frecuencia, sobre todo en zonas con condiciones sanitarias precarias. ETEC es considerado un patógeno importante en lactantes, principalmente en niños menores de dos años, y en particular durante los primeros seis meses de vida, en donde la frecuencia de aislamiento de este grupo en niños con diarrea es de 10 a 30%.²⁹ Nosotros describimos que del total de casos positivos para ETEC en el grupo con diarrea ($n = 15$), la presencia del gen *estA* (expresa la toxina termolábil) fue positiva en siete casos (4.0%), *eltB* (expresa la toxina termoestable) en cuatro (4.0%) y *estA* + *eltB* en uno (0.6%). Nuestros porcentajes contrastan con los reportados por Svenungsson y colaboradores,¹³ quienes encontraron que de los 62 casos positivos para ETEC por PCR multiplex, 12 (20%) fueron positivos para *estA*, 28 (45%) para *eltB* y 22 (35%) para ambos genes; mientras que en el estudio realizado por Trung y asociados¹⁵ en niños con diarrea ($n = 587$) y en niños sin diarrea ($n = 249$), se encontró que de los 14 casos positivos para ETEC, siete (50%) fueron positivos

para *eltB*, cuatro (28.5%) para *estA* y tres (21.5%) para ambos genes (*eltB* + *estA*).

En nuestro estudio la prevalencia de EPEC fue del 2.9% (Cuadro III) para el grupo de niños con diarrea ($n = 174$). EPEC tiene una elevada tasa de mortalidad y morbilidad en infantes menores de dos años, principalmente en países subdesarrollados,³ en donde se ha demostrado que del 30 al 40% de los infantes con diarrea en México,^{30,31} Brasil³² y Sudáfrica³³ puede ser atribuido a EPEC. Detectamos que el 1.7% de las cepas aisladas del grupo de niños con diarrea fue *eaeA* PCR positivos (cepas atípicas) y el 1.2% *eaeA* + *bfpA* PCR positivos (cepas típicas). Trung Vu y colaboradores¹⁵ reportaron que las 39 cepas de EPEC detectadas en los niños con diarrea y las 11 identificadas en el grupo control fueron *eaeA* positivo y *bfpA* negativo (cepas atípicas). El pili BFP (*bundle-forming pilus*) codificado por *bfpA* es un factor de virulencia característico que participa en el proceso infeccioso al promover la adherencia a enterocitos. Se ha descrito que estas fimbrias son producidas bajo ciertas condiciones de cultivo,³ por lo que probablemente éste sea el motivo por el que no se detectó en todas nuestras cepas. En este trabajo describimos que los tamaños de los fragmentos de ADN amplificados para *eaeA* (376 pb) y *bfpA* (367 pb) fueron muy similares, por lo que fue necesario desarrollar un ensayo de PCR con los oligonucleótidos para ambos genes por separado después del PCR multiplex con el propósito de confirmar el resultado.

La prevalencia de EIEC en el grupo de niños con diarrea fue del 1.7% ($n = 3$) para el grupo de niños con diarrea ($n = 174$) (Cuadro III), el cual es muy parecido al 2% reportado en Hanoi, Vietnam¹⁵, así como al 0.86% descrito en un brote ocasionado por *E. coli* en el municipio de Chalco, México.²⁷ Se estima que la incidencia de EIEC en los países desarrollados,³ como en Iberoamérica es baja.³⁴

Debido a que las cepas de EIEC y las cepas de *Shigella* se encuentran cercanamente relacionadas en términos de su virulencia y de otras propiedades fenotípicas,^{35,36} los métodos de detección de *ial* por PCR no pueden ser usados para diferenciar entre especies de *Shigella* y cepas de EIEC, por lo que en este estudio las cepas *ial* positivas fueron consideradas EIEC si no aglutinaron con antisueros específicos para especies de *Shigella*.

En este estudio se observó que las cepas de VTEC, ETEC, EPEC y EIEC, presentaron elevada resistencia a la cefalotina, carbenicilina, ampicilina, trimetoprim/sulfametoxazol y cefotaxima (Cuadro IV).

El elevado porcentaje de resistencia a los antibióticos de los patotipos de *E. coli* refleja que en la actualidad es importante realizar pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos de los agentes causales, con la finalidad de prescribir el antimicrobiano más adecuado. Nuestros porcentajes de resistencia bacteriana a estos agentes contrastan con los encontrados en nuestro país durante el periodo de 1989 a 1990, en donde el 49% de las cepas de *E. coli* diarreogénicas ($n = 74$) identificadas fueron resistentes a doxiciclina, 35% a ampicilina y 9% al trimetoprim/sulfametoxazol,³⁷ y con los descritos en un estudio reciente realizado en 65 cepas de *E. coli* aisladas de infecciones diarreicas de adultos y niños, en donde se encontró que 38.5% de las cepas fue resistente a la tetraciclina, 26% a estreptomycin, 26% a ticarcilina, 24.6% a amoxicilina y 21.5% a cefalotina.¹⁰ El surgimiento de nuevas cepas de *E. coli* diarreogénicas multirresistentes a los antimicrobianos en nuestro país y en otras partes del mundo ha ocasionado con el tiempo que el tratamiento médico adecuado con antibióticos sea cada vez más complicado, sobre todo en los infantes, en quienes las tasas de morbilidad y mortalidad son muy elevadas.³⁸

En este estudio describimos que la amiba *Entamoeba histolytica/Entamoeba dispar* se detectó en el 66% ($n = 114$) de los niños enfermos y en el 50% de los niños sanos ($n = 30$) (Cuadro V). A nivel mundial, la amibiasis está catalogada como la tercera parasitosis causante de muerte; alrededor del 10 a 20% de la población mundial se considera infectada y el 10% de esta población sufre de enfermedad, con una letalidad que oscila entre el 0.1 y 0.25% (en números: 500 millones de infectados, 50 millones de enfermos y entre 40 y 110 mil muertes)³⁹.

La prevalencia de *Giardia intestinalis* en este trabajo para el grupo de niños con diarrea fue del 29% ($n = 50$) y del 17% (56.6%) para el grupo control ($n = 30$) (Cuadro V). *G. intestinalis* es el protozoario de distribución cosmopolita que afecta principalmente a la población infantil de los países subdesarrollados. Nuestros porcentajes de prevalencia para este parásito coinciden con la reportada en un estudio previo realizado en 818 individuos, distribuidos en 162 familias ubicadas en asentamientos irregulares de la Delegación Magdalena Contreras en la Ciudad de México, en donde se detectó a *G. intestinalis* en el 29.9% de los individuos⁴⁰.

En este estudio describimos que la prevalencia de *Shigella flexneri* ($n = 3$) y *Shigella sonnei* ($n = 2$) en el grupo de niños con diarrea (Cuadro V) fue baja en comparación con la reportada por Trung y colabora-

dores¹⁵ y por Svenungsson y asociados.¹³ La presencia de *Shigella* en infantes ha sido identificada en otras partes del mundo.^{16,17}

En nuestro trabajo, la prevalencia de *S. typhimurium* fue del 1.1% ($n = 2$) (Cuadro V). La salmonelosis en nuestro país, como en otras partes del mundo, continúa siendo un serio problema de salud pública por resolver. En México la prevalencia de éste y otros serotipos ha sido reportado por Gutiérrez y colaboradores,⁴¹ quienes en un estudio en el que se analizaron 24,934 cepas de *Salmonella* recuperadas de pacientes infectados en diversos centros de salud públicos y privados de la República Mexicana en el periodo de 1972 a 1999, identificaron un total de 199 serotipos distintos, entre los cuales *S. typhimurium* se identificó en 3,225 ocasiones.

El elevado porcentaje de patógenos detectados en los infantes estudiados, coincide con lo propuesto por Shariff y colaboradores,⁴² quienes describieron que la diarrea ocasionada por enteropatógenos representa una de las causas más comunes de morbilidad y mortalidad en infantes de países subdesarrollados.

La importante cantidad de los grupos diarreogénicos de *E. coli* y de otros enteropatógenos identificados en los infantes, principalmente en los niños con diarrea, reflejó lo agudo de las infecciones, por lo que fue necesario iniciar de inmediato el tratamiento médico correspondiente como rehidratación oral, probiótico, prescripción de metronidazol y posteriormente la administración del antibiótico de acuerdo a la respuesta de la sensibilidad bacteriana observada en el antibiograma. Los niños asintomáticos también se vieron beneficiados con la administración oportuna del antiparasitario.

El uso de la PCR multiplex en este estudio se caracterizó como una importante herramienta de biología molecular en la identificación rápida, y contundente de los distintos patotipos de *E. coli* en la diarrea de los infantes.

La marcada resistencia a los antibióticos encontrada en las cepas diarreogénicas de *E. coli*, demostró la importancia de realizar las pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos, con la finalidad de prescribir el tratamiento médico preciso.

AGRADECIMIENTOS

Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGA-PA, UNAM), Proyecto PAPIME PE200705.

BIBLIOGRAFÍA

1. Kosek M, Bern C, Guerrant RL. The global burden of diarrhoeal disease, as estimated from studies published between 1992 and 2000. Bull WHO 2003; 81: 197-204.

2. Huilan S, Zhen LG, Mathan MM, Mathew MM, Olarte J, Espejo R, Khin MU, Ghafoor MA, Khan MA, Sami Z. Etiology of acute diarrhoea among children in developing countries: a multicentre study in five countries. *Bull WHO* 1991; 69: 549–555.
3. Nataro JP, Kaper JB. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev* 1998; 11: 142–201.
4. Eslava C, Villaseca JM, Cravioto A. Cepas de *Escherichia coli* relacionadas con la diarrea. En: Giono-Cerezo S, Escobar-Gutiérrez A, Valdespino GJL (eds). Diagnóstico de laboratorio de infecciones gastrointestinales. México: Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos, 1993; 251–265.
5. Girón JA, Yue AS, Schoolnik GK. An inducible bundle-forming pilus of Enteropathogenic *Escherichia coli*. *Science* 1991; 254: 710–713.
6. Girón JA, Donnenberg MS, Martin WC, Jarvis KG, Kaper JB. Distribution of the bundle-forming pilus structural gene (bfpA) among enteropathogenic *Escherichia coli*. *J Infect Dis* 1993; 168: 1037–1041.
7. Levine MM, Edelman R. Enteropathogenic *Escherichia coli* of classic serotypes associated with infant diarrhea: Epidemiology and pathogenesis. *Epidemiol Rev* 1984; 6: 31–51.
8. Fukushima H, Hoshina K, Gomyoda M. Selective isolation of eae-positive strains of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 1684–1687.
9. Boerlin P, Travis R, Gyles CL, Reid-Smith R, Janecko N, Lim H, Nicholson V, McEwen AS, Friendship R, Archambault M. Antimicrobial Resistance and Virulence Genes of *Escherichia coli* Isolates from Swine in Notario. *Appl Environ Microbiol* 2005; 71: 6753–6761.
10. Al-Gallas N, Abbassi SM, Hassan AB, Aissa RB. Genotypic and phenotypic profiles of enterotoxigenic *Escherichia coli* associated with acute diarrhea in Tunis, Tunisia. *Current Microbiol* 2007; 55: 47–55.
11. Maradi S, Georgiladakis, Tselentis Y, Samonis G. A 5 years study of the bacterial pathogens associated with acute diarrhoea on the islands of Crete, Greece, and their resistance to antibiotics. *Eur J Epidemiol* 2002; 18: 85–90.
12. Bellin T, Pulz M, Matussek A, Hempen HG, Gunzer F. Rapid detection of enterohemorrhagic *Escherichia coli* by real-time PCR with fluorescent hybridization probes. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 370–374.
13. Svenungsson B, Lagergren A, Ekwall E, Evengård B, Hedlund KO, Kärnell A, Löfdahl S, Svensson L, Weintraub A. Enteropathogens in adult patients with diarrhea and healthy control subjects: A 1-year prospective study in a Swedish clinic for infectious diseases. *Clin Infect Dis* 2000; 30: 770–778.
14. Gannon VPJ, D'Souza S, Graham T, King RK, Rahn K, Read S. Use of flagellar H7 gene as target in multiplex PCR assays and improved specificity in identification of enterohemorrhagic *Escherichia coli* strains. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 656–662.
15. Trung VN, Phung LV, Chinh LH, Khanh NG, Andrej W. Detection and characterization of diarrheagenic *Escherichia coli* from young children in Hanoi, Vietnam. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 755–760.
16. Albert MJ, Faruque SM, Faruque ASG, Neogl PKB, Ansaruzzaman M, Bhuiyan NA, Alam K, Akbar MS. Controlled study of *Escherichia coli* diarrheal infections in Bangladeshi children. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 973–977.
17. Okeke IN, Lamikanra A, Steinru H, CK, Kaper JB. Characterization of *Escherichia coli* strains from cases of childhood diarrhea in Provincial Southwestern Nigeria. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 7–12.
18. González R, Díaz C, Marino M, Cloralt R, Pequenez M, Pérez SI. Age-specific prevalence of *Escherichia coli* with localized and aggregative adherence in Venezuelan infants with acute diarrhea. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 1103–1107.
19. Puccinelli OP, Silva T, Gleiciene MF, Alves F, De Almeida CRP, Durlacher Rui, Pereira da Silva HL. Enteropathogens associated with diarrheal disease in infants of poor urban areas of Porto Velho, Rondônia: a preliminary study. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, 2001; 96 (5): 621–625.
20. Torres ME, Pérez MC, Schelotto F, Varela G, Parodi V, Alende F, Falconi E, Dell'acqua L, Gaione P, Méndez V M, Ferrari AM, Montano, Zanetta AE, Acuña AM, Chiparelli H, Ingold E. Etiology of children's diarrhea in Montevideo, Uruguay: Associated pathogens and unusual isolates. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 2134–2139.
21. Griffin PM, Tauxe RV. The epidemiology of infections caused by *Escherichia coli* O157: H7, other enterohemorrhagic *E. coli*, and the associated hemolytic uremic syndrome. *Epidemiol Rev* 1991; 13: 60–98.
22. Blanco M, Blanco JE, Blanco J, González EA, Alonso MP. Prevalence and characteristics of human and bovine verotoxigenic *Escherichia coli* strains isolated in Galicia (northwestern Spain). *Eur J Epidemiol* 1996; 12: 13–19.
23. Boyce TG, Swerdlow DL, Griffin PM. Current concepts: *Escherichia coli* O157: H7 and the hemolytic-uremic syndrome. *N Engl J Med* 1995; 333: 364–368.
24. Marks S, Roberts T. *E. coli* O157: H7 ranks as the fourth most costly foodborne disease. *Food Saf* 1993; 51–55.
25. Viboud GI, Jouve MJ, Binsztein N, Vergara M, Rivas M, Quiroga M, Svennerholm AM. Prospective cohort study of enterotoxigenic *Escherichia coli* infections in Argentinean children. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 2829–2833.
26. Wolk M, Ohad E, Shafran R, Safir S, Cohen Y, Wiklund G, Svennerholm AM. Epidemiological aspects of enterotoxigenic *Escherichia coli* diarrhoea in infants in the Jerusalem area. *Public Health Rev* 1995; 23: 25–33.
27. Cortés OIA, Rodríguez AG, Moreno EEA, Tenorio LJM, Torres MBP, Montiel VE. Brote causado por *Escherichia coli* en Chalco, México. *Sal Pub Mex* 2002; 44: 297–302.
28. Qadri F, Das SK, Faruque AS, Fuchs GJ, Albert MJ, Sack RB. 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* 2000; 38: 27–31.
29. Rodríguez AG. Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. *Sal Pub Mex* 2002; 44: 464–475.
30. Cravioto A, Reyes RE, Ortega R. Prospective study of diarrhoeal disease in a cohort of rural Mexican children: Incidence and isolated pathogens during the first two years of life. *Epidemiol Rev* 1988; 101: 123.
31. Cravioto A, Reyes RE, Trujillo F, Uribe F, Navarro A, de la Roca JM, Hernandez JM, Perez G, Vazquez V. Risk of diarrhea during the first year of life associated with initial and subsequent colonization by specific enteropathogens. *Am Epidemiol* 1990; 131: 886–904.
32. Gomes TAT, Rassi V, Macdonald KL, Ramos SRTS, Trabulsi LR, Vieira MAM, Guth BEC, Candeias JAN, Ivey C, Toledo MRF, Blake PA. Enteropathogens associated with acute diarrheal disease in urban infants in São Paulo, Brazil. *J Infect Dis* 1991; 164: 331–337.

33. Browne Robins RM, Levine MM, Rowe B, Gabriel EM. Failure to detect conventional enterotoxins in classical enteropathogenic (serotyped) *Escherichia coli* strains of proven pathogenicity Infect. Immun 1982; 38: 798-801.
34. Valdespino JL, García ML, Del Río A. Epidemiología y etiología de las diarreas infecciosas. El caso de México. Rev Lat Microbiol 1994; 36 (4): 307-324.
35. Kopecko DJL, Baron S, Buysse J. Genetic determinants of virulence in *Shigella* and dysenteric strains of *Escherichia coli*: Their involvement in the pathogenesis of dysentery. Curr Top Microbiol Immunol 1985; 118: 71-95.
36. Makino S, Sasakawa C, Yoshikawa M. Genetic relatedness of the basic replicon of the virulence plasmid in shigellae and enteroinvasive *Escherichia coli*. Microbiol Pathog 1988; 5: 267-274.
37. DuPont HL, Ericsson CD, Mathewson JJ, de la Cabada FJ, Conrad DA. Oral aztreonam, a poorly absorbed yet effective therapy for bacterial diarrhea in US travelers to Mexico. JAMA 1992; 267: 1932-1935.
38. Bern C, Martines J, Zousa I, Glass RI. The magnitude of the global problem of diarrhoeal disease: A ten years update. Bull WHO. 1992; 70: 705-714.
39. Walsh JA. Problems in recognition and diagnosis of amebiasis: Estimation of the global magnitude of morbidity and mortality. Rev Infect Dis. 1986; 8: 228-237.
40. Sánchez-Vega JT, Zavala JT, Guerrero LR, Cabello RR, Sánchez DR, García CR. Frecuencia de parasitosis intestinales en asentamientos humanos irregulares. Rev Fac Med 2000; 3; 80-83.
41. Gutiérrez GL, Montiel VE, Aguilera PP, González AMC. Serotipos de *Salmonella* identificadas en los servicios de salud de México. Sal Pub Mex 2000; 42: 490-495.
42. Shariff MMK, Bhan SK, Das BK, Saini S, Kumar R. Evaluation of the fluorescence actin staining test for detection of enteropathogenic *Escherichia coli*. J Clin Microbiol 1993; 31: 386-389.

Correspondencia:

M en C. Gloria Luz Paniagua Contreras
 Paris 259,
 Col. Jardines de Bellavista
 54054 Tlalnepantla
 Estado de México
 Tel/Fax: 56 23 13 91
 E-mail: mya@servidor.unam.mx