

Artículo Original/ Original Article

Detección molecular de *Escherichia coli* diarreogénica en pacientes pediátricos con síndrome diarreico agudo en Paraguay

Natalie Weiler¹, Maria Orrego¹, Mercedes Alvarez¹, Claudia Huber¹

I Laboratorio Central de Salud Pública. Ministerio de Salud Pública y Bienestar social. Asunción. Paraguay

Cómo referenciar este artículo/
How to reference this article:

Weiler N, Orrego M, Alvarez M, Huber C. Detección molecular de *Escherichia coli* diarreogénicas en pacientes pediátricos con síndrome diarreico agudo. Paraguay. Mem. Inst. Investig. Cienc. Salud. 2017; 15(1): 16-21

RESUMEN

La *Escherichia coli* diarreogénica (ECD) se ha clasificado con base en criterios clínicos, epidemiológicos y moleculares en cinco grupos, cada uno con factores de virulencia específicos. El objetivo fue determinar la prevalencia de ECD en pacientes pediátricos con enfermedad diarreica aguda del Laboratorio Central de Salud Pública en el periodo 2012-2015. Se procesaron muestras de heces con síndrome diarreico agudo, provenientes de pacientes pediátricos, en los cuales se buscó algún gen de virulencia ECD utilizando métodos convencionales de siembra y screening molecular, mediante PCR múltiple con cebadores diseñados específicamente para amplificar los genes de virulencia *elt*, *est*, *eae*, *stx*, *ipaH* y *aggR*. Del total de muestras analizadas, 13% (180/1379) de las muestras presentó algún factor de virulencia compatible con algún patotipo ECD con mayor predominio en niños de 1 a 3 años. La frecuencia de los distintos patotipos fue la siguiente: 61 (34%) ETEC, 40 (22%) EAEC, 41 (23%) EPEC, 27 (15%) EIEC, 7 (4%) STEC y 3 (2%) ETEC/EAEC, 1 (0.5%) ETEC/EAEC/EIEC. El porcentaje de *E. coli* diarreogénicas detectado tiene similitud con lo reportado en otros países de la región, lo que nos indica que estos patógenos son parte importante de la etiología de la enfermedad diarreica aguda infecciosa en la población infantil en nuestro país. Se debe destacar que para el diagnóstico de las diferentes categorías ECD, es necesario disponer de un procedimiento diagnóstico específico dirigido a la detección de los factores de virulencia utilizando métodos moleculares o métodos inmunológicos.

Palabras clave: *Escherichia coli* diarreogénicas, Enfermedad Diarreica Aguda, PCR.

Molecular detection of diarrheogenic *Escherichia coli* in pediatric patients with acute diarrheal syndrome in Paraguay

ABSTRACT

Diarrheagenic *Escherichia coli* (DEC) has been classified based on clinical, epidemiological and molecular criteria in five groups, each with specific virulence factors. The objective was to determine the prevalence of DEC in pediatric patients with acute diarrheal disease of the Central Laboratory of Public Health in the 2012-2015 period. A total of 1447 fecal samples of acute diarrheal syndrome from pediatric patients were processed in which a DEC virulence gene was searched using conventional screening and molecular screening methods with multiple PCR primers specifically designed to amplify virulence genes, *st*, *lt*, *eae*, *stx*, *ipaH* and *aggR*. From the total of analyzed samples, 13% (180/1379) of the samples presented some virulence factor compatible with a DEC pathogen type with greater predominance in children from 1 to 3 years. The frequency of the different pathogen types was as follows: 61 (34%) ETEC, 40 (22%) EAEC, 41 (23%)

Fecha de recepción: diciembre 2016. Fecha de aceptación: febrero 2017

Autor correspondiente: **Nathalie Weiler**. Laboratorio Central de Salud Pública. Ministerio de Salud Pública y Bienestar social. Asunción. Paraguay
E-mail: natalieweiler@gmail.com

EPEC, 27 (15%) EIEC, 7 (4%) STEC and 3 (2% ETEC/EAEC, 1 (0.5%) ETEC/EAEC/EIEC. The percentage of DEC detected is similar to that reported in other countries of the region, which indicates that these pathogens are an important part of the etiology of acute infectious diarrheal disease in children in our country. It should be noted that for the diagnosis of different DEC categories, it is necessary to have a specific diagnostic procedure aimed at the detection of virulence factors using molecular methods or immunodiagnostic methods.

Keywords: Diarrheagenic *Escherichia coli*, Acute Diarrheal Disease, PCR.

INTRODUCCIÓN

Las diarreas infantiles son la principal causa de morbilidad y mortalidad a nivel mundial, particularmente en los países en desarrollo debido a las condiciones de pobreza y falta de medidas sanitarias (1).

A pesar de la existencia de estudios que indican que *Escherichia coli* es un importante agente etiológico de diarrea, generalmente su búsqueda no se tiene en cuenta en el estudio de coprocultivo rutinario. En nuestro país, la búsqueda de patógenos entéricos bacterianos en muestras de heces se limita a el aislamiento de agentes etiológicos como *Salmonella* spp, *Shigella* spp, *Campylobacter* spp, y *E. coli* productora de toxina shiga (2).

La *E. coli* diarreogénica (ECD) requiere diferenciación de *E. coli* comensal de la microbiota intestinal y se clasifica con base en criterios clínicos, epidemiológicos y moleculares en cinco grupos, cada uno con factores de virulencia específicos: *E. coli* Enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* Enteroinvasora (EIEC), *E. coli* Enteropatógena (EPEC), *E. coli* Enteroagregativa (EAEC) y *E. coli* productora de toxina shiga (STEC) (2).

La ETEC se asocia con la diarrea acuosa en los niños de países en vías de desarrollo y son la principal causa de diarrea de los viajeros adultos que visitan zonas endémicas (3), STEC corresponde al grupo más importante de patógenos transmitidos por los alimentos, donde el cuadro de gastroenteritis puede complicarse con colitis hemorrágica o síndrome urémico hemolítico (4), EPEC está relacionada con la diarrea infantil, induce una alteración histopatológica en el intestino conocida como lesión adherencia y eliminación (5) mientras que EAEC está asociada a episodios de diarreas en la población infantil, provocando diversos cuadros desde diarreas agudas a persistentes. Es una de las poco estudiadas, con la característica principal de adhesión con la apariencia de pared de ladrillos apilados en cultivos de células epiteliales HEp-2 (6). EIEC causa diarrea acuosa y disentería en los seres humanos, está muy relacionada con *Shigella* spp., por sus características genéticas, bioquímicas y de virulencia (5,6).

El diagnóstico de ECD es difícil, para identificarlas correctamente deben diferenciarse de miembros no patógenos de la biota normal, generalmente por determinación de los serotipos, lo cual no es determinante, pues muchas de estas bacterias pueden intercambiar material genético y con ello genes de virulencia, por lo que en los últimos años se ha elegido los métodos moleculares como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la detección con resultados rápidos, fiables, con alta sensibilidad y especificidad (7,8) basada en la identificación de la presencia de genes de virulencia específicos, que están ausentes en cepas no patógenas (9,10).

En Paraguay, no tenemos registros de estos tipos de ECD, con excepción de STEC, de la cual se realiza vigilancia rutinaria con todos los coprocultivos que se remiten al Laboratorio Central de Salud Pública, por lo que vemos necesaria la realización de este estudio para visualizar la prevalencia de dichos tipos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizó un estudio retrospectivo, observacional de corte transversal con un muestreo no probabilístico de casos consecutivos. Los pacientes que fueron incluidos en el estudio presentaban cuadro diarreico agudo caracterizado por la presencia de tres o más deposiciones líquidas, mucosas y/o sanguinolentas con solicitud médica de coprocultivos, con o sin presencia de leucocitos y sin tratamiento antimicrobiano antes de la toma de muestra. Fueron respetadas las normas éticas de estudios poblacionales.

Muestras clínicas. Muestras de heces de pacientes pediátricos con síndrome diarreico agudo, remitidas por las distintas instituciones de salud al Laboratorio Central de Salud Pública en el periodo comprendido entre enero 2012 y diciembre 2015.

Identificación del patógeno. Las muestras de heces, recogida en medio de transporte de Cary Blair modificado, se cultivaron en Agar Mac Conkey y Mac Conkey sorbitol. Las placas con crecimiento fueron utilizadas para la búsqueda de ECD, según el Manual de Procedimientos de EDAS INEI-ANLIS 2011.

Screening molecular para detección de ECD. Para la detección de las ECD, se realizó la extracción de ADN en tritón 1X de un pool de 5 a 10 colonias diferentes tanto lactosa y/o sorbitol positiva como negativa a partir de las placas de Mac Conkey y Mac Conkey sorbitol, según el Manual de Procedimientos de EDAS INEI-ANLIS 2011. Se utilizaron primers diseñados específicamente para amplificar siete genes de virulencia diferentes en dos protocolos de PCR de punto final múltiple con cepas de referencias como controles positivos (Tabla 1). Estos protocolos fueron denominados Multi 1 para la detección de ETEC, EPEC y la Multi 2 para la detección de EIEC, EAEC y STEC. Revelados en gel de Agarosa al 1% con Buffer TAE 0.5x por Electroforesis (100V, 30 min) según Manual de Procedimientos de EDAS INEI-ANLIS 2011. (Figuras 1 y 2).

Tabla 1. Clasificación de las DEC y sus genes de virulencia.

Abreviatura	Descripción	Genes de virulencia
ETEC	<i>E. coli</i> Enterotoxigénica	<i>st, lt</i>
EPEC	<i>E. coli</i> Enteropatógena	<i>eaeA</i>
EIEC	<i>E. coli</i> Enteroinvasiva	<i>ipaH</i>
STEC/EHEC	<i>E. coli</i> productora de shiga toxina o Enterohemorrágica	<i>eaeA, stx1, stx2</i>
EAEC	<i>E. coli</i> Enteroagregativa	<i>aggR</i>

RESULTADOS

De las 1.379 muestras de heces recolectadas de pacientes pediátricos durante el periodo de estudio, 180 (13 %) presentaron algunos de los siete genes de virulencia estudiados.

En este estudio, la población más afectada correspondió al grupo etario comprendido entre 1 a 3 años, con una prevalencia de 43% (78/180). (Figura 1)

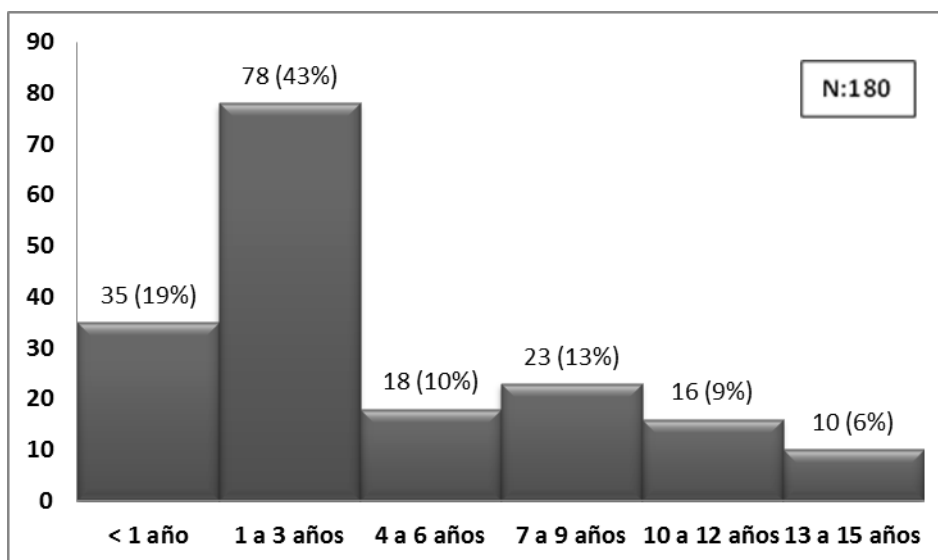


Figura 1. Distribución etaria de pacientes con detección de *E. coli* diarreogénicas. n= 180

La distribución de patotipos encontrada en la población pediátrica que presentaron algún gen de virulencia (n= 180) fue la siguiente: 61 (34%) ETEC, 40 (22%) EAEC, 41 (23%) EPEC, 27 (15%) EIEC, 7 (4%) STEC, ETEC/EAEC 3 (2%) y ETEC/EAEC/EIEC 1 (0,5%) (Figura 2).

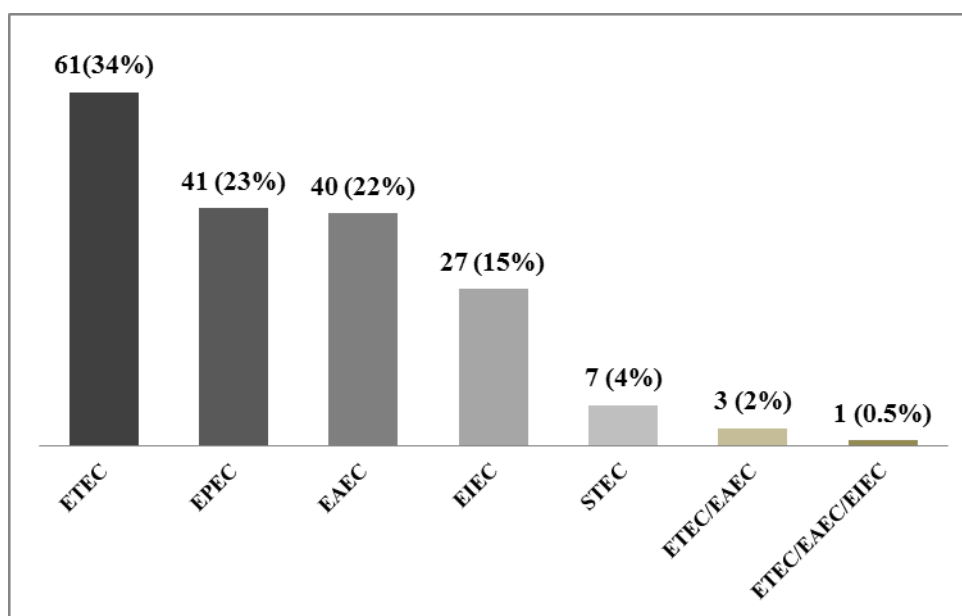


Figura 2. Frecuencia de *E. coli* diarreogénicas. n =180

Los patotipos de ECD se encuentran distribuidos en todos los grupos etarios en estudio, con una mayor proporción de detección de EAEC, EPEC y ETEC de <1 hasta 3 años y una disminución de los mismos a partir de 10 años (Tabla 2).

Tabla 2. Distribución de los patotipos de *E. coli* diarreogénicas según grupo etario.

	EAEC	EPEC	ETEC	EIEC	STEC
< 1 año	10	13	9	1	1
1-3 años	20	19	26	10	3
4-6 años	2	1	8	7	0
7-9 años	5	3	10	3	0
10-12 años	1	4	4	4	2
13-15 años	2	1	4	2	1

DISCUSIÓN

La PCR es una técnica que, dada su especificidad y confiabilidad, permite distinguir cepas de ECD de las cepas de *E. coli* pertenecientes a la microbiota normal. Esta herramienta es de importancia, posibilitando alcanzar un diagnóstico de certeza que permita conocer la realidad epidemiológica de las Enfermedades Diarreicas Agudas (EDAS).

La prevalencia encontrada fue relativamente baja con respecto a otros estudios realizados como el de Ochoa *et al.* en Perú en el 2011 con un 31,5% (10), Hannaoui *et al.* (11) en el 2010 con un 19%, Canizalez *et al.* (12) en el 2016 con un 23%. Este resultado puede deberse al rango etario elegido en este estudio con respecto a los citados anteriormente. Se destaca la mayor presentación de ECD en niños de 1 a 3 años, que disminuye a partir de los 9 años, lo que coincide con los estudios de Canizalez *et al.* (12), Dedeić-Ljubović *et al.* (13) y respalda los estudios realizados por Ochoa *et al.* (10), Hannaoui *et al.* (11) y Iijima *et al.* (15) enfocados en la población pediátrica de menores o hasta 5 años.

La mayor frecuencia de patotipos encontrada fue de ETEC, EPEC y EAEC, lo que coincide con los estudios de Canizalez *et al.* (12) y Hannaoui *et al.* 2010. (11)

Hubo un predominio del patotipo ETEC (34%) que fue encontrado en todos los grupos etarios, presentándose en otros estudios como el de Iijima *et al.* (15) con un 16% y Dedeić-Ljubović *et al.* con un 22% (13). ETEC es de gran importancia a nivel clínico en lactantes, principalmente en niños menores de dos años, y en particular durante los

primeros seis meses de vida. Debería replantearse su rol como agente etiológico de diarrea, una vez descartada la presencia de cualquier otro tipo de patógeno entérico u otra causa no infecciosa. (14)

EPEC fue el segundo patotipo más frecuente (23%), destacándose como principal patotipo en menores de 1 año, así como en otros estudios como el de Bueris *et al.* (14) con el 10%, Iijima *et al.* (15) con un 16,7%, Hannaoui *et al.* (11) con un 10,6%. El EPEC es un patotipo reconocido como agente causal de diarrea severa infantil y fuertemente asociado en menores de 1 año, principalmente en niños pobres de centros urbanos. La frecuencia disminuye con la edad y los adultos rara vez adquieren infecciones por EPEC, salvo condiciones excepcionales. (12,14)

El tercer patotipo más frecuente encontrado en este estudio fue EAEC (22%), que en los demás estudios se encuentra como primero o segundo en cuanto a frecuencia entre ECD lo presentan como el de mayor frecuencia con 45%, 11% y 11% (12-14). Las infecciones por EAEC han sido identificadas en varias regiones del mundo con presentación en niños y adultos que viven en países de desarrollo así como en viajeros. (12)

EIEC con una frecuencia del 15% coincidiendo con otros estudios como cuarto o quinto patotipo en cuanto a frecuencia. EIEC causan diarrea acuosa y disentería en seres humanos. Sus características bioquímicas, genéticas y de virulencia está muy relacionadas con *Shigella spp.* (13)

STEC fue el patotipo de menor frecuencia (4%), pero de gran importancia en cuanto a virulencia y patogenicidad. Algunos estudios no reportan casos de STEC como Iijima *et al.* (15) y Nguyen *et al.* (16) Bueris *et al.* presentan una frecuencia de 0.5%. (17)

La prevalencia encontrada en pacientes con diarrea tiene similitud con lo reportado en otros países de la región, lo que nos indica que estos patógenos son parte importante de la etiología de la enfermedad diarreica aguda infecciosa en la población infantil en nuestro país. Lo anterior justifica la búsqueda y detección de estos patógenos entéricos en coprocultivos y la utilización de métodos de biología molecular para arribar a un correcto diagnóstico etiológico que permita comprender mejor la epidemiología de estos patógenos y contribuir al diagnóstico y a la implementación de medidas sanitarias de prevención y control.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Rodríguez G. Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos. México, D.F., México. Salud Pública Mex 2002; 44:464-75. Disponible en: <http://www.insp.mx/salud/index.html>
2. Esquivel P, Lifschitz V, Losch L, Medina M, Pato A, Cacciamani A. et al. Caracterización molecular de aislamientos de *Escherichia coli* productores de diarrea en niños y adultos de la ciudad de Corrientes, Argentina. Corrientes, Argentina. 2009. Facultad de Medicina, Universidad Nacional del Nordeste, Corrientes, Argentina. Rev Panam Infectol 2010;12(3):17-21.
3. Kagambega A, Martikainen O, Lienemann T, Siitonen A, Traore AS, Barro N et al. Diarrheagenic *Escherichia coli* detected by 16-plex PCR in raw meat and beef intestines sold at local markets in Ouagadougou, Burkina Faso. Bacteriology Unit, Department of Infectious Disease Surveillance and Control. 2012. Int J Food Microbiol. 2012 Feb 1; 153(1-2):154-8. DOI:10.1016/j.ijfoodmicro.2011.10.032
4. Aidar-Ugrinovich L, Blanco J, Blanco M, Blanco JE, Leomil L, Dahbi G, et al. Serotypes, virulence genes, and intimin types of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and enteropathogenic *E. coli* (EPEC) isolated from calves in São Paulo, Brazil. Int J Food Microbiol. 2007 Apr 20;115(3):297-306.
5. Vidal J, Canizález A, Gutiérrez J, Navarro F. Patogénesis molecular, epidemiología y diagnóstico de *Escherichia coli* enteropatógena. Salud Pública de México, 2007;49(5):376-86.
6. Arias I, Caceres O, Figueroa M, Huguet J, Camiña M. *Escherichia coli* enteroagregativa en niños con diarrea de un hospital de Lima. Rev. perú. med. exp. salud publica [online] 2004;21(3):176-8.
7. Ochoa T, Contreras C, Mosquito S. Alcances sobre la situación epidemiológica de las *E. coli* diarreogénicas aisladas de niños peruanos. Can Pediatr 2010; 34(3):133-38.
8. Varela G, Jasinski C, Gadea P, Tanzi M, Mota M, Arenas C et al. *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. Méd. Urug. 2007 Sep;23(3):153-63.
9. Toma C, Yan L, Higa N, Nakasone N, Chinen I, Baschkier A, et al. Multiplex PCR Assay for identification of Human Diarrheagenic *Escherichia coli*. J Clin Microbiol. 2003 Jun; 41(6):2669-71.
 10. Ochoa T, Mercado E, Durand D, Rivera F, Mosquito S, Contreras C, et al. Frecuencia y patotipos de *Escherichia coli* diarreogénicas en niños peruanos con y sin diarrea. Rev. Peru Med Exp Salud Pública 2011; 28(1):13-20.
 11. Hannaoui E, Villalobos L, Martínez R, Maldonado A, Hagel I, Bastardo J. *Escherichia coli* diarreogénica asociada a casos de diarrea aguda en niños de Cumaná, Venezuela. Invest Clin 2010;51(4):489-500.
 12. Canizalez A, Flores H, Gonzalez E, Velazquez J, Vidal J, Muro S. Surveillance of Diarrheagenic *Escherichia coli* Strains Isolated from Diarrhea Cases from Children, Adults and Elderly at Northwest of Mexico. Front. Microbiol. 2016;7:1924.
 13. Dedeić-Ljubović A, Hukić M, Bekić D, Zvizdić A. Frequency and distribution of diarrhoeagenic *Escherichia coli* strains isolated from pediatric patients with diarrhea in Bosnia and Herzegovina. Bosnian Journal of Basic Medical Sciences 2009; 9(2): 148-55. <https://www.researchgate.net/publication/26256738>.
 14. Nataro JP, Kaper JB. Diarrheagenic *Escherichia coli*. Clin Microbiol Rev. 1998 Jan; 11(1):142-201.
 15. Iijima Y, Oundo J, Hibino T, Saidi S, Hinenoya A, Osawa K, et al. High Prevalence of Diarrheagenic *Escherichia coli* among Children with Diarrhea in Kenya. Jpn. J. Infect. Dis., 2017;70:80-3.
 16. Nguyen T, Le Van P, Le Huy Ch, Nguyen K, Weintraub A. Detection and Characterization of Diarrheagenic *Escherichia coli* form Young Children in Hanoi, Vietnam. J Clin Microbiol. 2005 Feb;43(2):755-60.
 17. Bueris V, Palma M, Romano C, Fernandes M, Franzolin M, Baquerizo M. Detection of diarrheagenic *Escherichia coli* from children with and without diarrhea in Salvador, Bahia, Brazil. Mem. Inst. Oswaldo Cruz [Internet] 2007;102(7):839-44.