

***Escherichia coli* diarrogénicos, identificación de patotipos y fenotipos de resistencia antimicrobiana en aislados cubanos**

Diarrheagenic *Escherichia coli*: identification of pathotypes and antimicrobial resistance phenotypes in Cuban isolates

Adalberto Águila Sánchez^{1*} <https://orcid.org/0000-0003-0259-4394>

Ariadna Rodríguez¹ <https://orcid.org/0000-0002-0618-7158>

Anabel Fernández Abreu¹ <https://orcid.org/0000-0002-5395-5041>

Yanaika Cruz Infante¹ <https://orcid.org/0000-0002-9825-2737>

Laura Bravo Fariñas¹ <https://orcid.org/0000-0003-2183-3119>

Jenny L. Hernández Martínez¹ <https://orcid.org/0000-0003-1018-6757>

Sussel Blanco¹ <https://orcid.org/0000-0001-6726-819X>

Diana Bebelagua¹ <https://orcid.org/0000-0002-4776-1064>

¹ Instituto de Medicina Tropical Pedro Kourí (IPK). La Habana, Cuba.

*Autor para la correspondencia: adalberto@ipk.sld.cu

RESUMEN

Introducción: En los países en vías de desarrollo las enfermedades diarreicas agudas son causa frecuente de morbilidad y mortalidad. Entre las primeras causas se encuentra *Escherichia coli* diarrogénicos, que afecta a pacientes en edades extremas de la vida y con inmunodeficiencias.

Objetivo: Identificar los patotipos de *Escherichia coli* diarrogénicos que más inciden y los fenotipos de resistencia antimicrobiana expresados por el patotipo predominante.

Métodos: Se estudiaron 184 aislamientos procedentes de 15 centros provinciales de Higiene, Epidemiología y Microbiología de Cuba e Isla de la Juventud. La investigación se realizó desde julio de 2012 hasta febrero de 2014. La identificación de género, especie y patotipos fue realizada por métodos de diagnóstico convencional y molecular. La determinación de la susceptibilidad antimicrobiana se realizó por el método de Bauer y Kirby, y las normas del *Clinical and Laboratory Institute Standards* de 2013.

Resultados: Se identificaron 108 (58 %) *Escherichia coli* diarrogénicos. Los patotipos confirmados fueron: en la PCR múltiple 1, 5 (6 %) de *Escherichia coli* enteropatogénico, 4 (4 %) de enterotoxigénico y 0 (0 %) de enterohemorrágico. La PCR múltiple 2 reveló 72 (82 %) *Escherichia coli* enteroagregativo, que resultó el predominante en el estudio. La PCR 3 (simple) detectó 7 (8 %) de enteroinvasivo. El 100 % del patotipo predominante mostró resistencia, al menos a un antimicrobiano de los probados, un solo patrón de resistencia a dos antimicrobianos, y nueve patrones de multiresistencia.

Conclusiones: El estudio demuestra la importancia del uso de pruebas moleculares rápidas para la confirmación de los patotipos de *E. coli* diarrogénicos, los que provocan deshidratación ligera, complicaciones graves y la muerte. Se logra identificar los cuatro patotipos más frecuentes y *E. coli* enteroagregativo, el de mayor incidencia en la población estudiada. El patotipo predominante mostró altos porcentaje de resistencia antimicrobiana a betalactámicos y buena sensibilidad antimicrobiana a los aminoglucósidos y cefalosporinas de tercera generación. La investigación aporta conocimientos, no revelados en estudios anteriores con aislados cubanos, lo que es considerado de alto valor para los clínicos, pediatras y epidemiólogos del país.

Palabras clave: *Escherichia coli* diarrogénicos; patotipos; PCR; resistencia antimicrobiana.

ABSTRACT

Introduction: Acute diarrheal disease is a frequent cause of morbidity and mortality in developing countries. One of the leading causes is diarrheagenic *Escherichia coli*, which affects patients at extreme ages and with immunodeficiencies.

Objective: Identify the most active pathotypes of diarrheagenic *Escherichia coli* and the antimicrobial resistance phenotypes expressed by the prevailing pathotype.

Methods: A study was conducted from July 2012 to February 2014 of 184 isolates obtained from 15 provincial Hygiene, Epidemiology and Microbiology Centers in Cuba and the Isle of Youth. Identification of the genus, species and pathotypes was based on conventional and molecular diagnostic methods. Determination of antimicrobial susceptibility was performed by the Bauer-Kirby method in compliance with guidelines from the Clinical and Laboratory Standards Institute of 2013.

Results: A total 108 (58%) diarrheagenic *Escherichia coli* were identified. The following pathotypes were confirmed: Multiplex PCR 1 revealed 5 (6%) enteropathogenic, 4 (4%) enterotoxigenic and 0 (0%) enterohemorrhagic *Escherichia coli*. Multiplex PCR 2 found 72 (82%) enteroaggregative *Escherichia coli*, which was the prevailing type in the study. PCR

3 (simple) detected 7 (8%) enteroinvasive *Escherichia coli*. 100% of the prevailing pathotype displayed resistance to at least one of the antimicrobials tested, a single resistance pattern to two antimicrobials, and nine multiresistance patterns.

Conclusions: The study showed the importance of the use of rapid molecular tests to confirm diarrheagenic *E. coli* pathotypes, which cause mild dehydration, serious complications and death. Identification could be done of the four most common pathotypes and enteroaggregative *E. coli*, the one with the highest incidence in the study population. The prevailing pathotype displayed high percentages of antimicrobial resistance to beta-lactams and good antimicrobial sensitivity to third-generation cephalosporins and aminoglycosides. The study contributed knowledge not revealed by previous research about Cuban isolates. Such information is considered to be highly valuable for clinicians, pediatricians and epidemiologists in the country.

Keywords: diarrheagenic *Escherichia coli*; pathotypes; PCR; antimicrobial resistance.

Recibido: 31/01/2019

Aceptado: 24/02/2020

Introducción

Las enfermedades diarreicas agudas (EDA) provocadas por enteropatógenos constituyen una causa frecuente de morbilidad y mortalidad en países en vías de desarrollo, que inciden principalmente en niños menores de 5 años y adultos de más de 65 años de edad. *Escherichia coli* diarrogénicos (ECD) es el principal anaerobio facultativo de la microbiota que reside en el colon humano.⁽¹⁾ El huésped humano es colonizado desde el nacimiento por *Escherichia coli* que reside permanentemente en el intestino y establece una relación simbiótica con el individuo, toda la vida.⁽¹⁾ De acuerdo con los factores de virulencia y patogenicidad ECD se clasifica en seis patotipos: *E. coli* enteropatógena (ECEP), enterotoxigénica (ECET), enteroinvasiva (ECEI), enterohemorrágica (ECEH) o productora de toxina Shiga (STEC), *enteroagregativa* (ECEAgg) y *E. coli* enteroadherente (ECEA) con dos variantes, de adherencia difusa (ECAD) y localizada (ECAL).⁽²⁾

Cada patotipo posee atributos de virulencia que condicionan la patogenia, las manifestaciones clínicas, la epidemiología y el tratamiento. La resistencia antimicrobiana constituye uno de los principales problemas a nivel mundial.^(3,4)

A partir de la identificación fenotípica, molecular y la determinación de la susceptibilidad antimicrobiana de ECD se conocen los fenotipos de resistencia y multiresistencia antimicrobiana de los patotipos que más circulan en el territorio nacional. El conocimiento de los patrones de resistencia antimicrobiana, permite una mejor orientación del tratamiento empírico, sobre todo cuando es imprescindible imponer tratamiento con antimicrobiano por el estado del paciente. Por la homogeneidad bioquímica de *E. coli* de microbiota y ECD, la identificación debe hacerse por métodos moleculares, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés) que detecta genes codificadores de factores de virulencia, y determinante de patogenicidad.^(5,6)

En su mayoría las EDA son de naturaleza infecciosas y producidas por enteropatógenos prevaleciendo ECD, la mayoría autolimitadas cuando el paciente es inmunocompetente.^(7,8)

Por la importancia que reviste el microorganismo como causa de EDA, en el presente trabajo se pesquisaron cinco patotipos de seis reconocidos internacionalmente, para conocer cuales inciden más en la población cubana, teniendo en cuenta que el estudio se realizó por un muestreo representativo a partir de aislamientos procedentes de las 15 provincias del país y del municipio especial Isla de la Juventud.

Con los resultados de la actual investigación se pretende fortalecer y orientar el trabajo de los clínicos, los pediatras y los epidemiólogos en los centros de asistencia médica y en las unidades de cuidados intensivos. Los resultados son de suma importancia a la hora de implementar un tratamiento con antimicrobiano de primera línea o la definición de alternativas. El trabajo constituye el primero realizado en Cuba a partir de aislamientos de muestras de heces humanas; los anteriores no incluyen el pesquisaje de hasta cinco patotipos, ni la confirmación del diagnóstico por PCR. La determinación del fenotipo de resistencia antimicrobiana fue realizada, solo al patotipo más representado en el estudio.

Por tanto, el objetivo fue identificar los patotipos de ECD que más inciden y los fenotipos de resistencia antimicrobiana expresados por el patotipo predominante.

Métodos

Aislamientos clínicos

Se estudiaron 184 aislamientos con un diagnóstico presuntivo de ECD, obtenidos desde julio de 2012 hasta febrero de 2014. Todos procedentes de los 15 centros provinciales de Higiene, Epidemiología y Microbiología (CPHEM) e Isla de la Juventud. Se recibieron en el Laboratorio Nacional de Referencia de Enfermedades Diarreicas Agudas del IPK (LNR-EDA-IPK), donde se realizó la confirmación diagnóstica y la susceptibilidad antimicrobiana del patotipo predominante

Identificación por métodos convencionales

Los aislados recibidos se procesaron e identificaron por los procedimientos del manual de operación PNO-A-36-01 del LNR-EDA-IPK, las pruebas bioquímicas y criterios de interpretación, según lo propuesto por *MacFaddin*,⁽⁹⁾ los que permitieron realizar el diagnóstico de género y especie de *E. coli*. Los aislados, después de confirmados, se inocularon en el medio caldo triptona soya (CTS) con glicerol al 15 %, conservado a -20 °C.⁽¹⁰⁾

Métodos moleculares para determinar los factores de virulencia

El ADN se obtuvo por método de extracción 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.⁽¹¹⁾ Los PCR fueron realizados con termociclador Mastercycler personal (Eppendorf, Alemania). Como controles positivos se utilizaron el ADN de las cepas (ECEP, ECET, ECEH, ECEI y ECEAgg), de referencia internacional del Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas “Dr. Carlos G. Malbrán”, Buenos Aires, Argentina. Centro de Referencia Regional para el diagnóstico de ECD, las que se muestran en la tabla 1. Como control de reactivos se utilizó la mezcla de PCR, solo con agua MiliQ (Sigma-Aldrich) sin ADN.

Tabla 1 - Cepas de referencia internacional utilizadas como controles positivos para la identificación de patotipos de *E. coli* diarrogénicos

Cepas	Factores de virulencia	Categoría
<i>E. coli</i> (10 407)	<i>LT/ST</i> (+)	ECET
<i>E. coli</i> (E-23 48/69, O127:H6)	<i>eae</i> (+)	ECEP
<i>E. coli</i> (17-2)	<i>CVD432; aspU</i>	ECEA
<i>E. coli</i> (EDL 933, O157:H7)	<i>stx 1 y 2, eae</i> (+)	ECEH
<i>E. coli</i> (12-2)	<i>ipaH</i>	ECEI
<i>E. coli</i> * DH5a	<i>sin factores</i> (-)	-

*Cepa utilizada como control negativo en las reacciones de PCR.

La detección de atributos genéticos propios de los 5 patotipos de ECD (ECEP, ECET, ECEH, ECEI y ECEAgg), se detectaron por medio de tres PCR de punto final (dos múltiples y uno simple) empleándose los cebadores descritos por Toma y otros,⁽¹²⁾ en los que se detectan marcadores de virulencia: *eae* (gen de intimina para ECEP), *stx1-stx2* (toxina de ECEH) y *elt-est* (enterotoxinas LT y ST de ECET). En el segundo PCR múltiple los marcadores utilizados fueron: *aspU* y *CVD432* (pertenecientes a ECEAgg). En la tercera reacción de PCR de ECEI, se utilizó *IpaH* que define ECEI.

La detección de los factores de virulencia se realizó siguiendo el protocolo sugerido por Toma y otros,⁽¹²⁾ quienes describen los pasos para la preparación de la mezcla de PCR, la concentración de los reactivos, el volumen final de la reacción, así como el programa de amplificación y procedimientos para la lectura de los resultados en la corrida de electroforesis submarina. Además se siguieron las recomendaciones para el uso de los reactivos y paquetes diagnóstico utilizados (QIAGEN, Alemania).

Se realizaron estudios de susceptibilidad antimicrobiana al patotipo predominante, para conocer los fenotipos de resistencia antimicrobiana. Se utilizó el método de difusión en disco (*Bauer-Kirby*), empleando 14 drogas antimicrobianas recomendadas por el Clinical and Laboratory Institute Standards (CLSI) del 2013,⁽¹³⁾ para Enterobacterias: ampicilina (AMP, 10 µg de concentración); ciprofloxacina (CIP, 5 µg); gentamicina (CN, 10 µg); cloranfenicol (C, 30 µg); amikacina (AK, 30 µg); ceftriaxona (CRO, 30 µg); trimetoprim-sulfametoxazol (SXT, 1,25/23,75 µg); amoxicilina (AML, 30 µg); estreptomina (S, 10 µg); kanamicina (K, 30 µg); amoxicilina-ácido clavulánico (AUG, 20/10 µg); eritromicina (E, 15 µg); azitromicina (AZM, 15 µg) y tetraciclina (TE, 30 µg). Se tomaron los puntos de corte para

cada antimicrobiano según normas del CLSI del 2013,⁽¹³⁾ para la clasificación de aislamientos resistentes, sensibilidad intermedia y sensible. Las cepas de referencia utilizadas en la normalización del estudio de susceptibilidad antimicrobiana fueron *E. coli* 25922 y 35218, *Pseudomonas aeruginosa* 27853 y *Staphylococcus aureus* 29213, *Enterococcus faecalis* 33186.

Resultados

Aislamientos clínicos

De un total de 184 aislamientos, se identificaron 108 (58,7 %); 88 (81,48 %) correspondieron a cuatro de los cinco patotipos pesquisados en la investigación. Predominó ECEAgg con 72 (82 %) aislamientos, 7 (8 %) correspondieron a ECEI, 5 (6 %) se identificaron como ECEP y 4 (4 %) pertenecieron a ECET. No se confirmaron aislamientos de ECEH. El 6,0 % (11/184) resultaron no viables y 65 (35,3 %) aislamientos correspondieron a otras enterobacterias entre ellas, *Enterobacter* spp., *Citrobacter* spp., *Klebsiella* spp. y *Serratias* sp. En la figura 1 se muestra el número de aislamientos recuperados por año de estudio. Un grupo de 20 (18,52 %) aislados fueron definidos como *E. coli* no relacionado con ninguno de los cinco patotipos investigados.

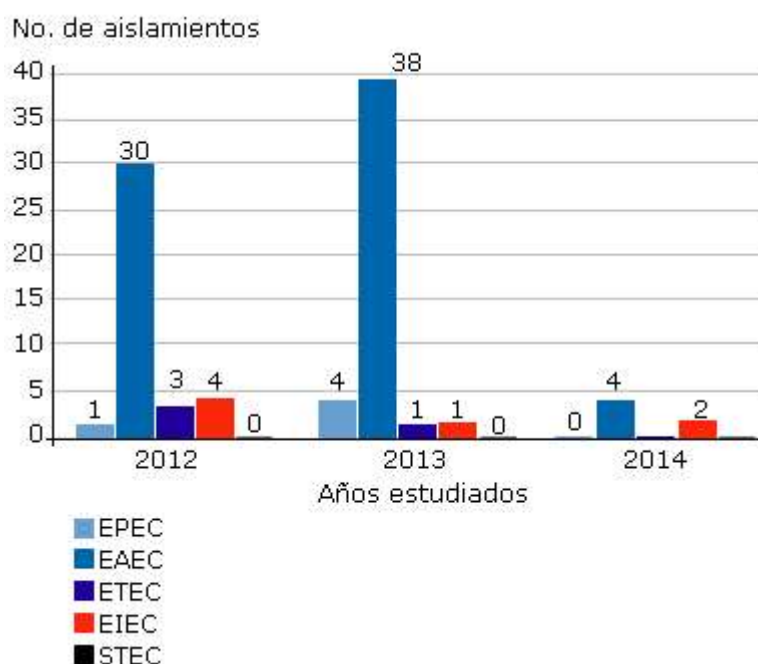
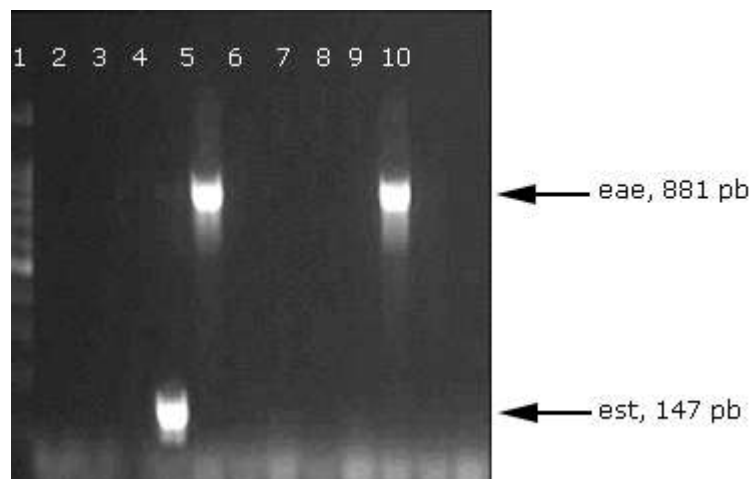


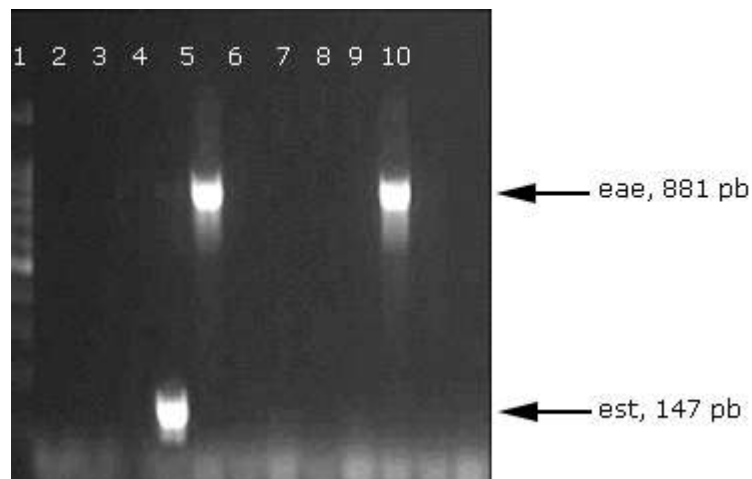
Fig. 1 - Distribución del número total de patotipos identificados y su relación con el año en que fueron aislados.

En las figuras 2 y 3, aparecen los resultados de la PCR múltiple 1, se visualizaron los genes amplificados correspondientes a ECEP (*eae*), y ECET (*est*). La figura 4 representa los resultados de la PCR múltiple 2, en la que se observaron los genes (*aspU* y *CVD 432*), de ECEAgg. En la figura 5 aparecen los resultados del PCR simple 3, en la que se muestra el gen *IpaH* de ECEI.



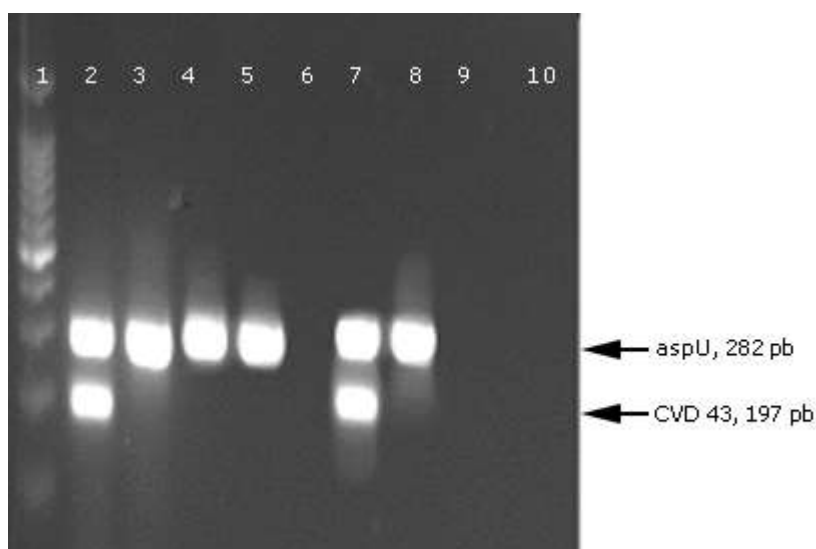
Carril 1: PM marcador de peso molecular (100 pb *ladder*); carriles 2 y 3, control de reacción; carriles 4, 5, 6, 7, 8, 9, 11 y 12: aislamientos problemas: carriles 9 y 11: positivos para el gen *eae* de EPEC.

Fig. 2 - Electroforesis submarina en gel de agarosa al 2 %. Ensayo de PCR múltiple 1 para detectar el gen *stx* de EHEC, *eae* de EPEC, *est* y *elt* en ETEC.



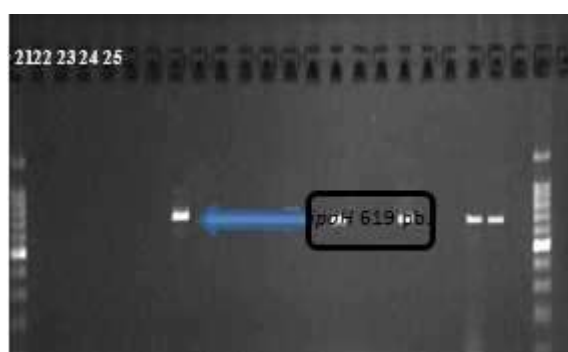
Carril 1: PM marcador de peso molecular (100 pb *ladder*); carriles: 2 y 3: controles de reacción; carriles 4, 7, 8, 9, 10, 12 y 13 aislamientos problemas; carril 5: positivo para el gen *est* de ETEC; carriles 6 y 11: positivos para el gen *eae* característico de EPEC.

Fig. 3 - Electroforesis submarina en gel de agarosa al 2 %. Ensayo PCR múltiple 1, detección de los genes *stx* de EHEC, *eae* de EPEC, *est* y *elt* en ETEC.



Carril 1: PM marcador de peso molecular (100 pb *ladder*); carriles 2 y 7: positivos para los genes *aspU* y *CVD 432*; carriles 3, 4, 5 y 8: positivos para el gen *aspU*; carril 6: aislamiento negativo; carriles 9 y 10: controles de reacción.

Fig. 4 -Electroforesis submarina en gel de agarosa al 2 %. Ensayo de PCR múltiple 2 para detectar los genes *aspU* y *CVD 432* de EAEC.



Carriles 1 y 24: PM marcador de peso molecular (100 pb *ladder*); carriles 2 y 3: control de reacción; carriles desde 4 hasta 23: aislamientos problemas; carriles 8, 13, 15, 18, 21 y 22: positivos al gen *ipaH* de EIEC.

Fig. 5. - Electroforesis submarina en gel de agarosa al 2 %. Ensayo de PCR simple, detecta el gen *ipaH* de EIEC.

Susceptibilidad antimicrobiana del patotipo ECEAgg, predominante

El estudio de resistencia antimicrobiana reveló que el 100 % de los aislamientos confirmados de ECEAgg, mostraron resistencia al menos a un antimicrobiano, resultó un solo patrón de resistencia a dos antimicrobianos y nueve multirresistentes que comprometían, entre tres a nueve aislamientos. Se registraron altos porcentajes de resistencia para los betalactámicos y muy buena sensibilidad para los aminoglucósidos y cefalosporinas de tercera generación. Los resultados del comportamiento de los aislamientos de ECEAgg, frente a los 14 antimicrobianos probados se muestran en la tabla 2.

Tabla 2 - Se muestran los porcentajes de resistencia antimicrobiana a los 14 antimicrobianos probados. n= 72

Antimicrobiano	Abreviatura	% existente	Antimicrobiano	Abreviatura	% resistente
Amoxicilina-ácido clavulánico	AUG	100	Ciprofloxacina	CIP	18,1
Amoxicilina	AML	100	Azitromicina	AZM	16,7
Eritromicina	E	88,9	Gentamicina	CN	8,3
Ampicilina	AMP	87,5	Cloramfenicol	C	8,3
Trimetoprim-sulfametoxazol	SXT	44,4	Ceftriaxona	CRO	6,9
Tetraciclina	TE	33,3	Kanamicina	K	6,9
Estreptomina	S	25,0	Amikacina	AK	0

Discusión

Los aislamientos que resultaron no viables pudieron perder su capacidad de reproducción por el envío al LNR-EDA-IPK, muy cercano al tiempo límite. Lo anterior es posible por el agotamiento de nutrientes en el medio de transporte.⁽¹⁴⁾ La identificación de otros enteropatógenos bacterianos, no ECD como causa de diarrea, revelan las dificultades que aún persisten con este diagnóstico en la Red Nacional de Laboratorios de Microbiología, influyendo en ambos casos, la disponibilidad y calidad de los medios de cultivos de identificación y el tiempo entre la elaboración y su uso (normas de calidad para los medios de cultivos y transporte), así como la experiencia del operador encargado del trabajo de diagnóstico microbiológico. En investigaciones realizadas en otros países de Latinoamérica se describe el fenómeno de la coinfección de ECD con otros patógenos gramnegativos aspecto a tener en cuenta cuando analizamos nuestros resultados.⁽¹⁵⁾ Se hace necesario continuar insistiendo en la comunicación entre el LNR-EDA-IPK con los CPHEM del país y los laboratorios de la Red Nacional, con el objetivo de perfeccionar y mejorar la calidad del diagnóstico microbiológico.⁽¹⁶⁾

El estudio identificó un porcentaje mayor al 50,0 % cuando se combinaron los métodos convencionales, los marcadores fenotípicos y la realización de la PCR. Estudios similares realizados en América Latina,⁽¹⁷⁾ en Paraguay logran porcentajes inferiores, y en México⁽⁷⁾ señalan una recuperación del 23 % de aislados de ECD.

Después de establecida la comparación con otros estudios, fue evidente que en el actual trabajo se alcanzó un porcentaje mayor de recuperación de aislados de ECD, respecto a los estudios que lo antecedieron.

El patotipo ECEAgg predominó en la actual investigación, resultado que coincidió con otros trabajos,⁽¹⁸⁾ que lo identifican como el patotipo más frecuente en más del 60 % de los aislamientos. El estudio de esos autores se realizó con 85 muestras obtenidas de niños con diarreas o sin estas; mientras que el actual estudio procesó un mayor número de aislamientos, y obtuvo un porcentaje más alto de ECEAgg. Este patotipo está considerado entre los que más inciden en los países en vías de desarrollo y hasta en países desarrollados, el cual afectando a niños menores de 5 años, adultos y personas con VIH. Se informa como causa de grandes brotes de diarreas en Europa, Japón, México, La India y Reino Unido. Clasifica como un microorganismo emergente y segunda causa de diarrea del viajero. Causa inflamación de la mucosa intestinal, que afecta la adsorción de nutrientes y provoca la desnutrición y el bajo nivel de desarrollo intelectual, incluso el fenómeno puede ocurrir en pacientes sin episodios de diarreas agudas. Se considera causa frecuente de diarreas persistentes en niños y adultos; en los pequeños justifica el pobre desarrollo físico y cognoscitivo.⁽¹⁹⁾

Se informa que un alto porcentaje de cepas de ECEAgg poseen un plásmido (CVD 432), responsable del proceso diarreico.⁽²⁰⁾ Estudios epidemiológicos sugieren una mayor patogenicidad en los aislamientos con presencia del CVD 432, que en los carentes de este gen.⁽²¹⁾ En otros estudios realizados en Perú,⁽²²⁾ encuentran que el patotipo predominante es ECEAgg. Otro aspecto a tener en cuenta es que como se conoce en los últimos años aumenta el consumo de comida chatarra, sobre todo en zonas urbanas, se trata de que este patotipo se relaciona como un fuerte contaminante de agua y alimentos, a esto se agrega el insuficiente lavado de las manos, que contribuye al aumento de las infecciones cruzadas con ECEAgg, como agente de diarreas.

Con respecto al patotipo ECEP existió una marcada diferencia entre los resultados obtenidos en la actual investigación y lo señalado por *Pavani Tilak* y otros,⁽²³⁾ quienes estudiaron 100 aislados de ECD, con el 36,8 % de ECEP. Se observó diferencia entre lo obtenido en el estudio actual y lo identificado por *Amela* y otros,⁽²⁴⁾ en que el patotipo ECEP representa el 54 %, sin embargo los resultados del estudio realizado por estos autores estuvieron más relacionados con el obtenido por *Nakhjavani* y otros,⁽²⁵⁾ en que ECEP se presenta en el 5,6 % de sus aislamientos, se ha determinado que ECEP es el principal agente causal de enfermedades diarreicas de origen bacteriano en niños menores de 5 años.⁽²⁶⁾

Aunque en el actual trabajo la frecuencia de aislamiento fue baja, sin embargo coinciden con otros resultados internacionales,⁽¹⁷⁾ en que ECEP constituyó el segundo patotipo identificado, con la diferencia en los porcentajes obtenidos y el número de aislados estudiados para cada caso. Se trata de dos estudios que procesan aislados que parten de muestras diarreicas, en que ECEP resultó el segundo más aislado. Independientemente de que ambos estudios no coinciden, se infiere que se trata de un patotipo a considerar en estudios donde se relacionan las EDA y niños menores de 5 años.

El bajo porcentaje obtenido en el presente trabajo pudo estar relacionado con el empleo de un solo marcador genético, el gen *eae*, quizás con la incorporación de otros genes como el *fbp* se pudiera haber confirmado un mayor porcentaje de aislamientos de ECEP.⁽²⁷⁾

Los resultados obtenidos con el patotipo ECET, no coincidieron con otros autores, un ejemplo, los mostrados por *Ochoa* y otros,⁽²⁸⁾ quienes confirman que la toxina más frecuente en sus aislados fue la termolábil (LT). Sin embargo los resultados del actual trabajo coincidieron con los obtenidos por *Moyo* y otros,⁽²⁹⁾ quienes en un estudio similar, pero realizado en Argentina en 2010, detectan tres cepas de ECET con el gen *est* y en ninguno de los casos encuentran de manera simultánea las dos enterotoxinas.

En el estudio realizado por *Weiler* y otros,⁽¹⁷⁾ ECET resultó el más frecuente con el 34 %, de un total de 61 aislados en que se detectaron ambos genes, *lt* y *st*, mientras que en el actual estudio se obtuvo 6 %, de un total de 88 aislados, los que mostraron solo el gen *st*. Quizás estos resultados estén influenciado por el hecho de que el estudio de *Weiler* y otros,⁽¹⁷⁾ fue realizado con muestras de niños menores de 5 años, mientras que en el actual procedían de niños y de adultos con diferentes edades.

El patotipo ECEI es capaz de invadir la mucosa intestinal y causar cuadros de disentería bacilar. Estudios anteriores revelan la baja incidencia respecto al resto de los patotipos, su presentación sobre todo, en forma de brotes entre niños de países en vías de desarrollo.⁽³⁰⁾ Investigadores en Brasil sobre enteropatógenos involucrados en la diarrea infantil, demuestran semejante resultado en cuanto a la frecuencia de aislamiento, que en el actual estudio con la identificación de este patotipo.⁽³¹⁾ Por otra parte, *Sánchez* y otros,⁽³²⁾ identificaron un porcentaje de ECEI, aun más bajo que el obtenido en el estudio actual, a pesar de que su investigación se realiza con más aislamientos de ECD.

En un trabajo realizado por *Bernedo* en 2008, en Cuba, señalan el 4,6 % de ECEH entre los aislamientos de ECD procesados. En el actual trabajo no se obtuvieron aislamientos del patotipo ECEH, por lo que hubo diferencias con los resultados de *Leotta* y otros.⁽¹¹⁾ Ambos trabajos se realizan con aislados de pacientes con diarreas agudas. La no recuperación en el

actual trabajo hace reflexionar y considerar la utilización de caldos de enriquecimiento selectivos (ej. caldo tetrionato con cefixime y telurito de potasio) recomendado por otros autores para el aislamiento de ECEH. Este patotipo se considera un patógeno zoonótico y emergente capaz de causar enfermedades graves: la colitis hemorrágica (CH) y El síndrome urémico hemolítico (SUH), OPS/OMS recomiendan la creación de sistemas de vigilancia robustos, en el que se incluya este enteropatógeno, para lograr su diagnóstico de manera oportuna.⁽³²⁾ En Israel realizan un estudio para la confirmación diagnóstica de ECD por *Tobias* y otros.⁽³³⁾ Esos autores confirman por PCR los mismos patotipos que en el actual estudio, solo que no hubo correspondencia con el orden de frecuencia de los aislamientos. Por ejemplo, *Tobias* y otros,⁽³³⁾ obtienen el siguiente orden decreciente ECEP, ECEAgg y ECET y en el actual trabajo el orden correspondió a ECEAgg, ECEP y ECET, con un predominio de ECEAgg y la no detección de ECEH.

En cuanto al patotipo ECEA y sus variantes, que no fue incluido en el diseño y objetivo del estudio, se hace necesario aclarar que los genes *afa*, *dray*, *daa*, codificadores de una familia de adhesinas, han sido muy utilizados para su caracterización, pero estos pueden estar presentes también en cepas de *E. coli* no patogénicas. Por lo tanto, debido a esas peculiaridades se recomienda la inclusión de adherencia en cultivos de células Hep-2 o Hela como regla de oro, para la definición del patotipo en particular.^(33,34)

En los últimos años, se producen cambios en la epidemiología de la resistencia a los antimicrobianos de las enterobacterias. Por una parte, existe el tránsito de patógenos hospitalarios a los centros sociosanitarios, lo que convierte a esos centros en un reservorio de microorganismos. Al mismo tiempo, aparecen algunas bacterias multirresistentes, como patógenos de adquisición comunitaria (ej. *E. coli* productora de betalactamasa de espectro extendido).⁽³⁵⁾

Aunque las EDA por ECD constituyen una enfermedad autolimitada, sobre todo en los niños mayores y adultos inmunocompetentes, sin embargo, en muchas ocasiones los pacientes que llegan a los centros de salud no cuentan con un estado inmunológico adecuado y por ello necesitan tratamiento antimicrobiano, además de la reposición de líquidos y electrolitos. El uso de los antimicrobianos en las infecciones diarreicas ocasionadas por patógenos entéricos ha cambiado, pues las bacterias adquieren resistencia a los antibióticos considerados de primera línea en el pasado.^(36,37)

En el actual estudio se obtuvieron resultados similares a los de *DeFrancesco* y otros.^(37,38) Ellos observan una alta sensibilidad para la amikacina y la ciprofloxacina en los aislados de ECD obtenidos de niños de procedencia rural en Brasil. Los fenotipos de resistencias

obtenidos en el actual trabajo casi no difieren de los informados por *Amaya* y otros,⁽³⁸⁾ en Nicaragua. *Canizalez* y otros,^(5,7) señalan un patrón de multirresistencia AMP/SXT/T, en el que aparecen antimicrobianos comprometidos por registrar altos porcentajes de resistencia, en el actual estudio es también uno de los patrones de multirresistencia más frecuente, entre los aislados. Otro aspecto en el que coincidieron ambos trabajos es en el predominio del patotipo ECEAgg, con altos porcentajes de resistencia hacia la mayoría de los antimicrobianos investigados. Similar a los resultados obtenidos en el actual estudio, *Amaya* y otros⁽³⁸⁾ encuentran elevados porcentajes de resistencia a los siguientes antimicrobianos AMP, SXT, AML y AUG.

Por otra parte, *Ochoa* y otros,⁽³⁹⁾ como resultado de su estudio, plantearon haber obtenido altos porcentajes de resistencia antimicrobiana en ECEAgg, al compararlos con otros patotipos de ECD, lo que se debe al uso frecuente e indiscriminado de los antimicrobianos (alta presión selectiva), este patotipo causa a menudo diarreas tipo crónicas y también puede encontrarse en hospederos asintomáticos.

Conclusiones

El estudio demuestra la importancia del uso de pruebas moleculares rápidas para la confirmación de los patotipos de ECD, los que provocan deshidratación ligera, complicaciones graves y la muerte. Se logra identificar los cuatro patotipos más frecuentes y *E. coli* enteroagregativo, el de mayor incidencia en la población estudiada. El patotipo predominante mostró altos porcentaje de resistencia antimicrobiana a betalactámicos y buena sensibilidad antimicrobiana a los aminoglucósidos y cefalosporinas de tercera generación. La investigación aporta conocimientos, no revelados en estudios anteriores con aislados cubanos, lo que es considerado de alto valor para los clínicos, pediatras y epidemiólogos del país.

Referencias bibliográficas

1. Organización Mundial de Gastroenterología. Diarrea aguda en adultos y niños: una perspectiva mundial. Guía práctica de la Organización Mundial de Gastroenterología. 2012 [acceso 07/01/19]. Disponible en: <https://www.worldgastroenterology.org/UserFiles/file/guidelines/acute-diarrhea-spanish-2012.pdf>

2. 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.
3. Moyo SJ. Age specific aetiological agents of diarrhoea in hospitalized children aged less than five years in Dar es Salaam, Tanzania. BMC Pediatrics. 2011;11:19.
4. French GL. The continuing crisis in antibiotic resistance. Int J Antimicrob Agents. 2010;3653:53-7.
5. 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.
6. Barreto Argilagos G, Hernández Cisneros R, Santiago García L, Ortiz López A. Presencia de *E. coli* enteropatógenas en pacientes con diarrea aguda, Rev Elect Archivo Médico de Camagüey. 2001;5(2)4-6.
7. Iijima Y. High Prevalence of Diarrheagenic *Escherichia coli* among Children with Diarrhea in Kenya. Jpn J Infect Dis. 2017;70:80-3.
8. Kimata K, Shima T, Shimizu M, Tanaka D, Isobe J, Gyobu Y, et al. Rapid categorization of pathogenic *Escherichia coli* by multiplex PCR. Microbiol Immunol. 2005;49:485-92.
9. MacFaddin JF. Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. 3^{era} ed. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana; 2003.
10. Brenner DJ. Facultatively anaerobic Gram-negative rods. In: Krieg NR, Holt JG. Bergey's manual of systematic bacteriology. 9th ed. Baltimore: Lippincott Williams and Wilkins: 1994. p. 175-290.
11. Leotta GA, Chinen I, Epsztein S, Rivas M. Validación de una técnica de PCR múltiple para la detección de *Escherichia coli* productor de toxina Shiga. Rev Argentina de Microbiología. March 2005;37:1-10.
12. Toma C, Lu Y, Higa N, Nakasone N, Chinen I, Baschkier A, et al. Multiplex PCR assay for identification of human diarrheagenic *Escherichia coli*. J Clin Microbiol. 2003;41:2669-71.
13. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests. Informational Supplement (M02–A12). 12th ed. Wayne, PA, USA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2013.
14. Valdés-Dapena MM. Enterobacterias. En: Llop A, Valdés-Dapena MM, Zuazo JL, eds. Microbiología y parasitología médica. Tomo 1. La Habana: Editorial Ciencias Médicas; 2001. p. 251-80.

15. Ruiz-Roldán L, Martínez-Puchol S, Gomes C, Palma N, Riveros M, Ocampo K, et al. Presencia de *Enterobacteriaceae* y *Escherichia coli* multirresistente a antimicrobianos en carne adquirida en mercados tradicionales en Lima. Rev Peru Med Exp Salud Publica. 2018;35(3):425-32. doi:10.17843/rpmesp.2018.353.3737
16. Dominguez Guilarte OL. Estandarización del diagnóstico de *Escherichia coli* con capacidad de producir verotoxinas y enterohemolisina. Tesis para optar por el título de licenciado en microbiología. La Habana: Instituto de Medicina Tropical Pedro Kourí; 2004.
17. Weiler N, Orrego M, Alvarez M, Huber C. Detección molecular de *Escherichia coli* diarregénica en pacientes pediátricos con síndrome diarreico agudo en Paraguay. Mem Inst Investig Cienc Salud. 2017;15(1):16-21.
18. Ochoa TJ, Mercado EH, Durand D, Rivera FP, Mosquito S, Contreras CM, et al. Frecuencia y patotipos de *Escherichia coli* diarregénica en niños peruanos con y sin diarrea. Rev Peru Med Exp Salud Publica. 2011;8(1):13-20.
19. Boll EJ, Ayala-Lujan J, Szabady RL, Louissaint C, Smith RZ, Krogfelt KA, et al. Enteraggregative *Escherichia coli* adherence fimbriae drive inflammatory cell recruitment via interactions with epithelial MUC1. mBio 2017;8:e00717-17.
20. Vila Estape J, Zboromyrska Y. Brotes epidémicos causados por *Escherichia coli* diarregénicas. Gastroenterol Hepatol. 2011;2:9-12.
21. Sabrina JM, Samwel Y, Mecky I, Langeland N, Mylvaganam H. Identification of diarrheagenic *Escherichia coli* isolated from infants and children in Dar es Salaam, Tanzania. BMC Infectious Diseases. 2007;7:92.
22. Acosta GJ, Vigo NI, Durand D, Riveros M, Arango S, Zambruni M. Diarrheagenic *Escherichia coli*: Prevalence and Pathotype Distribution in Children from Peruvian Rural Communities. Am J Trop Med Hyg. 2016;7:574-9.
23. Pavani Tilak G, Mudaliar JG. Role of Enteropathogenic *Escherichia coli* in Paediatric Diarrhoeas in South India. Mat Soc Med. 2012;24(3):178-81.
24. Amela D, Mirsada H y Daria K. Diarrhoeagenic *Escherichia coli* strains isolated from pediatric patients with Diarrhoea in Bosnia and Herzegovina. Bosnian J Basic Med Sci. 2009;9(2):148-55.
25. Nakhjavani FA, Emaneini M, Hosseini H, Iman-Eini H, Aligholi M. Molecular analysis of typical and atypical enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) isolated from children with diarrhea. J Med Microbiol. 2013;62:191-5.

26. Vílchez S, Reyes D, Paniagua M, Bucardo F, Möllby R, Weintraub A. Prevalence of diarrhoeagenic *Escherichia coli* in children from Leon, Nicaragua. J Med Microbiol. 2009;58:630-7.
27. Marcelo MG, Esquivel P, Lifschitz V, Medina ML, Silvina L, Merino LA. Detección de *E. colidiarrogénicas* en niños de barrios humildes de Corrientes, Argentina. Rev Cubana Med Trop. 2010;62(1):56-65.
28. Ochoa TJ, Contreras C, Mosquito S. Alcances sobre la situación epidemiológica de las *E. coli* diarregénicas aisladas de niños peruanos. Can Pediatr. 2010;34(3):133-8.
29. Moyo SJ, Maselle SY, Matee MI, Langeland N, Mylvaganam H. Identification of diarrheagenic *Escherichia coli* isolated from infants and children in Dar es Salaam, Tanzania. BMC Infect Dis. 2007;7:92.
30. Regua-Mangia AH, Gomes TA, Vieira MA, Andrade JR, Irino K, Teixeira LM. Frequency and characteristics of diarrhoeagenic *Escherichiacoli* strains isolated from children with and without Diarrhea in Rio de Janeiro, Brazil. J Infect. 2010;48(2):161-7.
31. Michelacci V, Prosseda G, Maugliani A. Characterization of an emergent clone of enteroinvasive *Escherichia coli* circulating in Europe. Clin Microbiol Infect. 2016;22(3):287.e11-9.
32. Sánchez S, Martínez R, Alonso JM, Rey J. Aspectos clínicos y patogénicos de las infecciones por *Escherichia coli* O157:H7 y otros *E. coli* verotoxigénicos. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2010;28:370-4.
33. Tobias J, Kassem E, Rubinstein U, Bialik A, Vutukuru SR, Armando Navaro A, et al. Involvement of main diarrheagenic *Escherichia coli*, with emphasis on enteroaggregative *E. coli*, in severe non-epidemic pediatric diarrhea in a high-income country. Published Online. 2015 Feb 21. doi: 10.1186/s12879-015-0804-4
34. Jenkins CM, Tembo H, Chart T, Cheasty GA, Willshaw AD. Phillips Detection of enteroaggregative *Escherichia coli* in faecal samples from patients in the community with diarrhea. J Med Microbiol. 2006;11:1493-7.
35. Díaz-Agero Pérez C, López-Fresneña N, Rincon Carlavilla AL, Hernandez Garcia, M, Ruiz-Garbajosa P, Aranaz-Andrés JM, et al. Local prevalence of extended-spectrum-lactamase (ESBL) producing Enterobacteriaceae intestinal carriers at admission and co-expression of ESBL and OXA-48 carbapenemase in *Klebsiella pneumoniae*: A prevalence survey in a Spanish University Hospital. BMJ Open. 2019;9:e024879.

36. 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.
37. DeFrancesco AS, Tanih NF, Samie A, Guerrant RL, Bessong PO. Antibiotic resistance patterns and beta-lactamase identification in *Escherichia coli* isolated from young children in rural Limpopo Province, South Africa: The MAL-ED cohort. *S Afr Med J.* 2017;107(3):205-14.
38. Amaya E, Reyes D, Vilchez S, Paniagua M, Mollby R, Nord CE, et al. Antibiotic resistance patterns of intestinal *Escherichia coli* isolates from Nicaraguan children. *J Med Microbiol.* 2011;60:216-22.
39. Ochoa TJ, Ruiz J, Molina M, Del Valle LJ, Vargas M, Gil AI, et al. High frequency of antimicrobial drug resistance of diarrheagenic *Escherichia coli* in infants in Peru. *Am J Trop Med Hyg.* 2009;81:296-301.

Conflicto de intereses

No se declara conflicto de intereses.

Contribuciones de los autores

Adalberto Águila Sánchez: Diseño de la investigación; supervisión del cronograma de trabajo, en los estudios microbilógicos y de biología molecular; interpretación de resultados, su discusión y conclusiones.

Ariadna Rodríguez: Diseño de la investigación; en los estudios microbilógicos y de biología molecular; interpretación de resultados y su discusión.

Anabel Fernández Abreu: Ejecución de los estudios microbilógicos, interpretación de los resultados.

Yanaika Cruz Infante: Participación en la ejecución de los estudios microbilógicos, interpretación de resultados y conclusiones.

Laura Bravo Fariñas: Diseño de la investigación, supervisión e interpretación de los resultados.

Jenny L. Hernández Martínez: Garantía de los medios de cultivo y reactivos, y ejecución de los estudios microbilógicos.

Sussel Blanco: Garantía de la recuperación de aislados, medios de cultivo y reactivos; participación en los estudios microbilógicos

Diana Bebelagua: Participación en la ejecución de los estudios microbilógicos.