
***Escherichia coli* diarreogénica asociada a casos de diarrea aguda en niños de Cumaná, Venezuela.**

Erika Hannaoui¹, Luz Villalobos¹, Rosa Martínez¹, Antonio Maldonado¹, Isabel Hagel² y Jesús Bastardo¹.

¹Grupo de Gastroenteritis Infecciosa, Postgrado en Biología Aplicada, Universidad de Oriente, Núcleo de Sucre, Cumaná e

²Intituto de Biomedicina, Universidad Central de Venezuela. Caracas. Venezuela.

Palabras clave: *Escherichia coli* diarreogénica, niños, diarrea aguda.

Resumen. Para establecer la prevalencia de cepas de *E. coli* diarreogénicas (ECD) asociadas a casos de diarrea aguda infantil en Cumaná, Venezuela; se tomaron muestras de heces de 200 niños con enfermedad diarreica aguda, menores de 5 años, y de 30 niños sanos incluidos como control. El aislamiento e identificación bacteriana se realizó por coprocultivos y pruebas bioquímicas convencionales. Para determinar la presencia de los genes de patogenicidad de cada tipo de ECD se usó la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), determinando los genes *eae* y *bfp* (ECEP), *st* y *lt* (ECET), *ipaH* y *virF* (ECEI), *Stx1/Stx2* (ECST), *aafII* (ECEA) y *daaE* (ECAD). Se realizaron 169 aislamientos de *E. coli*, de las cuales se determinó por PCR que el 10,65% fueron positivas para ECEP (1,18% “típicas”; 9,47% “atípicas”); ECET (5,91%); ECEA (1,78%); ECEI (0,59%). No se observaron diferencias estadísticas significativas en cuanto a la frecuencia de cada “patotipo” en relación a la edad, pero si en relación con el sexo ($p < 0,05$). Las características clínicas más relevantes fueron: fiebre, vómito y dolor abdominal y el mayor porcentaje de los niños afectados estuvo en las clases obrera y marginal. Estos resultados muestran que las cepas de ECD, son agentes etiológicos importantes en la enfermedad diarreica aguda infecciosa en la población infantil de Cumaná.

Diarrheogenic *Escherichia coli* associated with acute diarrhea in children of Cumana, Venezuela.

Invest Clin 2010; 51(4): 489 - 500

Key words: diarrheogenic *Escherichia coli*, children, acute diarrhea.

Abstract. To establish the prevalence of strains of diarrheogenic *Escherichia coli* (DEC) associated to acute diarrhea in children of Cumaná, Venezuela, stool samples were taken from 200 children aged < 5 years with acute diarrheal disease, and from 30 healthy children used as control. Isolation and bacterial identification was performed by conventional biochemical tests and stool cultures. The presence of pathogenic genes of each type of DEC was investigated by the technique of polymerase chain reaction (PCR), determining the genes *eae* and *bfp* (EPEC), *st* and *lt* (ETEC), *ipaH* and *virF* (EIEC) *Stx1/Stx2* (STEC), *aqfII* (EAEC) and *daaE* (ADEC). From 169 *E. coli* isolates we determined by PCR 10.65% positive for EPEC (1.18% "typical", 9.47% "atypical"); ETEC (5.91%); EAEC (1.78 %), EIEC (0.59%). There were no statistically significant differences regarding the frequency of each "pathotype" in relation to age, but it did occur when related to the sex ($p < 0.05$). The most relevant clinical features were: fever, vomiting and abdominal pain and the greatest percentage of children affected were of the working and marginal classes. These results shown that the strains of DEC are important etiological agents in acute infectious diarrhea in children of Cumaná.

Recibido: 08-09-09. *Aceptado:* 03-06-10.

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades diarreicas constituyen un problema de salud pública en el mundo, especialmente en los países en desarrollo, donde representan una relevante causa de morbilidad y mortalidad en niños menores de 5 años (1). Se ha estimado que en Venezuela ocurren 1,32 millones de episodios anuales de diarrea, con una mediana de 2,2 episodios por niño y año, cifra muy similar a la registrada en todo el mundo: 2,5 episodios por niño por año (2). En los últimos años, las diarreas han representado en Venezuela la novena causa de muerte en la población en general y la segunda causa de mortalidad en menores de 4 años (3). De acuerdo al anuario de mortalidad del Ministerio del Poder Popular para la Salud

(MPPS) (4), se ubican a las diarreas y gastroenteritis de origen infeccioso en el estado Sucre, en la quinta posición entre las diez principales causas de mortalidad infantil.

En esta afección se ha involucrado además de otros patógenos entéricos, una variedad de agentes causales de origen bacteriano: *Salmonella*, *Shigella*, *Campylobacter*, *Vibrio cholerae* y *Escherichia coli* diarreogénicas (5).

E. coli es, en general, considerada flora normal del intestino humano, pero se han descrito seis grupos bien definidos, implicados en procesos diarreicos, los cuales son: *E. coli* enteropatógenas (ECEP), las cuales a su vez han sido clasificadas como ECEP típicas o atípicas, de acuerdo a la presencia o ausencia de la adhesina bfp respectivamente.

te; *E. coli* enterotoxigénica (ECET); *E. coli* enteroinvasiva (ECEI); *E. coli* shigatoxigénica (ECST); *E. coli* enteroagregativa (ECEA) y *E. coli* adherencia difusa (ECAD) (6).

Los estudios habituales de laboratorio (coprocultivo y pruebas bioquímicas) tienen un valor limitado, pues no permiten discriminar entre la *E. coli* comensal y la causante de patología gastrointestinal (7). Para la detección de *E. coli* diarregénicas, existen reacciones bioquímicas, la serotipificación, los ensayos fenotípicos basados en características de virulencia y algunos métodos moleculares entre los que se incluyen la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), y la hibridación de sondas de ADN; que tienen alta sensibilidad y especificidad (8).

Se ha demostrado que *E. coli* enteropatógenas se encuentran contaminando alimentos de diversos orígenes (9-11) lo que evidencia una manera de mantener circulantes las cepas infecciosas en la población, principalmente en la infantil, que como bien se sabe es muy susceptible a estas infecciones. Ante estas circunstancias, nos propusimos investigar la presencia de *E. coli* diarregénicas en niños con diarrea aguda en Cumaná-Venezuela, con el fin de conocer los "patotipos" circulantes y su implicación en el cuadro diarregico agudo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Población y muestra

Durante el periodo marzo 2006- julio 2007, se recolectaron 200 muestras de heces fecales provenientes de niños menores de 5 años de edad, que fueron llevados al servicio de emergencia pediátrica del Hospital Universitario "Antonio Patricio de Alcalá" (HUAPA) de Cumaná, Venezuela, por presentar cuadro diarregico, con heces blandas o líquidas, con o sin sangre, con o sin moco, sin previo tratamiento antibiótico en un lapso no mayor de una semana. Se re-

colectaron además 30 muestras de niños en el mismo intervalo de edad y que no consultaban por síndrome diarregico, para ser incluidos como controles.

A cada representante del niño en estudio se le informó y pidió el consentimiento por escrito para la toma de muestra, siguiendo los criterios de Helsinki (12) y luego del consentimiento del representante, se realizó una encuesta para obtener datos epidemiológicos y socioeconómicos y poder realizar el Graffar correspondiente (13). Posteriormente se tomó la muestra de heces, y un hisopado rectal que se mantuvo en medio de transporte Cary Blair.

Aislamiento e identificación

Se realizó la siembra de las heces por extensión y agotamiento, en placas de los ágares: Levine, MacConkey, *Salmonella-Shigella* (SS), xilosa lisina desoxicolato de sodio (XLD), deoxirribonucleasa (DNasa) (Difco-BBL Laboratories) y del hisopado se sembró en agar base selectivo para *Campylobacter* (Campy) (Oxoid), incubándose a 37°C por 24 horas, excepto agar Campy que se incubó a 42°C por 48 horas en microaerofilia, esto con la finalidad de realizar el coprocultivo completo. Las colonias con las características morfológicas típicas o sospechosas de *Escherichia coli* fueron aisladas en número de cinco, e identificadas con las pruebas bioquímicas convencionales (14). Las otras bacterias aisladas, se identificaron por pruebas bioquímicas, para determinar su posible asociación con *E. coli* diarregénicas y a su vez, darle información al médico.

Confirmación de las cepas de *E. coli* diarregénicas

Se utilizó la PCR y como templado se usó el ADN total, el cual fue obtenido por procedimiento estándar de extracción por lisis (15). A todas las *E. coli* aisladas (de pacientes y controles), se les investigó los ge-

nes de virulencia, realizando una mezcla de reacción con un volumen final de 25 μ L; para detectar la amplificación de cada uno de los siguientes genes: *eae* y *bfp* (ECEP), siguiendo los protocolos descritos por Fagan y col. (16), y Vidal y col. (17) respectivamente; *st* y *lt* (ECET), por el protocolo de Monday y col. (18); *stx1* y *stx2* (ECST), siguiendo el protocolo de Monday y col. (18). Los genes *ipaH* y *virF* (ECEI) siguiendo el protocolo de Vidal y col. (17) y las que amplifiquen dichos genes, en vista a que los mismos son compartidos con el género *Shigella*, se les realizó adicionalmente las pruebas de utilización del Acetato, ONPG (orto-nitrofenil- β -D-galactopiranosido) y la actividad MUG (producción de la enzima β -D-glucorinadasa) y pruebas confirmatorias con el empleo de las galerías ID32E (BioMérieux, France), para diferenciarlas. Los genes *aafII* (ECEA) y *daaE* (ECAD), se detectaron de acuerdo al protocolo de Vidal y col. (17).

Los ensayos de PCR se realizaron en un termociclador Gene Amp Perkin-Elmer Applied Biosystems 9700 y los productos de la PCR fueron revelados por electroforesis en gel de agarosa al 2%, teñido con bromuro de etidio (19). Se utilizó un marcador de peso molecular de 1500 pb (Promega, USA) y los geles fueron fotografiados bajo luz ultravioleta, utilizando el sistema de fotodocumentación modelo Gel Doc (BioRad, USA).

Análisis estadístico

Los resultados obtenidos fueron procesados por el paquete estadístico SPSS/PC versión 12.0, mediante análisis descriptivo porcentual y prueba estadística chi-cuadrado a un 95% de confiabilidad (20).

RESULTADOS

De las 200 muestras de heces provenientes de niños con diarrea aguda, se aisló *E. coli* de 169 niños. De éstos se encontró *E. coli* diarreogénicas (ECD) en 32 casos (18,93%). La distribución de estos 32 aislamientos, de acuerdo a la edad de los pacientes se muestra en la Tabla I.

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

De los 200 niños con enfermedad diarreica aguda, además de *E. coli* diarreogénicas se aislaron otros géneros bacterianos patógenos entéricos, dentro de los cuales se encontraron: *Salmonella* sp (11 aislamientos, 5,5%) y *Campylobacter* sp (5 aislamientos, 2,5%). Otros géneros no patógenos o de dudosa patogenicidad encontrados en los coprocultivos fueron: *Citrobacter* sp, *Klebsiella* sp, *Enterobacter* sp, *Serratia* sp, y

TABLA I
RELACIÓN ENTRE LA EDAD Y LA DISTRIBUCIÓN PORCENTUAL DE *E. coli* DIARREOGÉNICAS, AISLADAS DE NIÑOS CON DIARREA AGUDA

Grupos Etarios	ECEP Nº (%)	ECET Nº (%)	ECEA Nº (%)	ECEI Nº (%)
0-6 meses	5 (27,78)	1 (10)	0	0
7-12 meses	4 (22,22)	3 (30)	0	0
13-24 meses	8 (44,44)	4 (40)	3 (100)	1 (100)
> 24 meses	1 (5,56)	2 (20)	0	0
Total	18 (100)	10 (100)	3 (100)	1 (100)

ns: no significativo ($p > 0,05$).

Proteus sp en un 57%, con los cuales *E. coli* diarreogénica no tuvo asociación.

El tipo más frecuente de *E. coli* aislado fue ECEP, con el 10,65% (18/169), al amplificar el gen *eae* (Fig. 1). Sólo dos cepas amplificaron el gen *eae* y el gen *bfp* (1,18%), clasificándose como ECEP “típicas” (Fig. 2), mientras que las 16 cepas restantes (9,47%) fueron clasificadas como ECEP “atípicas”.

ECET fue detectada en 10 cepas de los 169 aislamientos de *E. coli* (5,91%), en todas ellas sólo amplificó el gen *st* que codifica para la toxina termoestable (Fig. 3). ECEI sólo se obtuvo en un caso (0,59%), cepa en la cual amplificaron los genes *ipaH*

y *virF* (Fig. 4). En tres *E. coli* amplificó el gen de patogenicidad *aafII* (1,78%), permitiendo clasificarlas como ECEA (Fig. 5).

En las *E. coli* aisladas de niños con diarrea, no se obtuvo amplificación de los genes *Stx1/Stx2* y *daaE*. De las 30 muestras provenientes de niños controles, se aisló *E. coli* en 25 casos, ninguno de dichos aislamientos amplificó los genes de patogenicidad evaluados.

Se observó que el aislamiento de las cepas *E. coli* diarreogénicas fue mayor en los meses más cálidos (marzo, abril y mayo). Las características clínicas presentes en la infección por cada una de las ECD de los niños con diarrea, se muestran en la Ta-

TABLA II
RELACIÓN ENTRE EL SEXO Y LA DISTRIBUCIÓN PORCENTUAL DE *E. coli* DIARREOGÉNICAS, AISLADAS DE NIÑOS CON DIARREA AGUDA

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

*(p < 0,05 en relación a femenino).

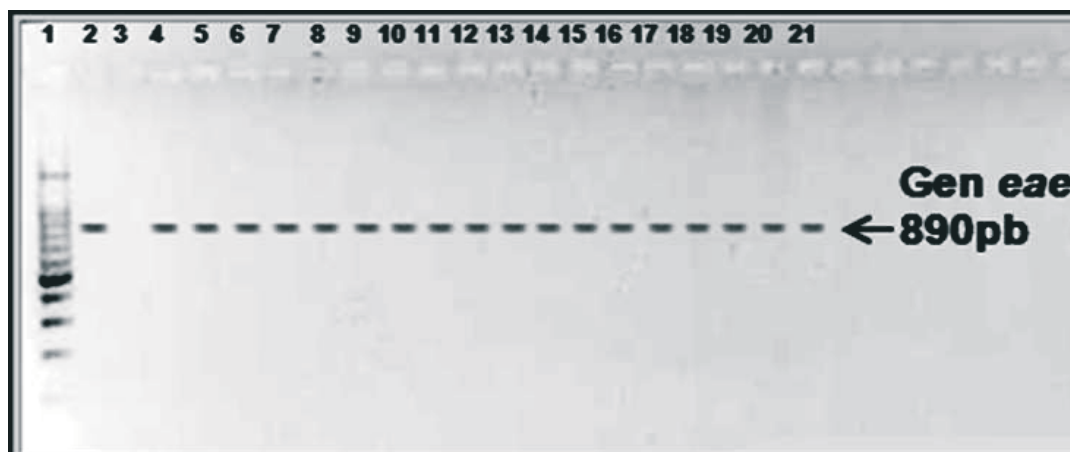


Fig. 1. Amplificación por PCR para el gen *eae* (ECEP). Pozos: (1) marcador de peso de ADN (Promega, USA); (2) control positivo (*E. coli* O157:H7); (3) control negativo (*E. coli* ATCC 25922); (4): *E. coli* 6; (5): *E. coli* 8; (6): *E. coli* 22; (7): *E. coli* 24; (8): *E. coli* 26; (9): *E. coli* 37; (10): *E. coli* 38; (11): *E. coli* 55; (12): *E. coli* 59; (13): *E. coli* 62; (14): *E. coli* 63; (15): *E. coli* 74; (16): *E. coli* 89; (17): *E. coli* 96; (18): *E. coli* 104; (19): *E. coli* 128; (20): *E. coli* 136; (21): *E. coli* 157.

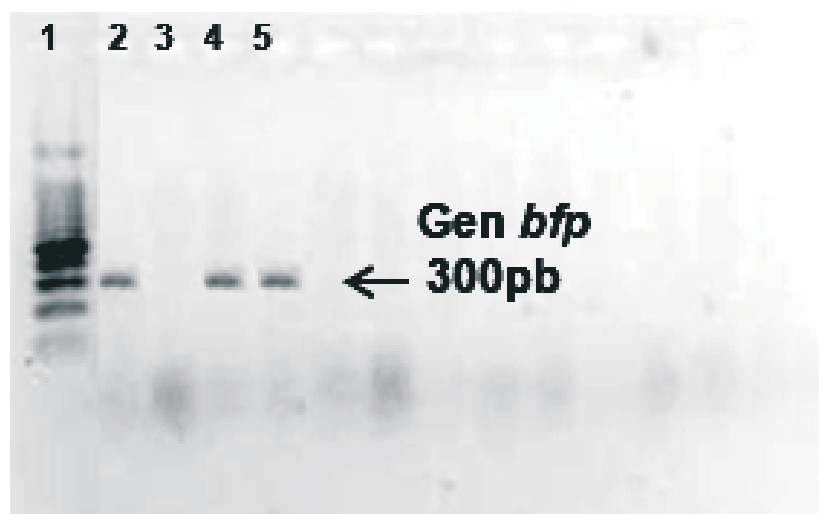


Fig. 2. Amplificación por PCR para el gen *bfp* (ECEP). Pozos: (1) marcador de peso de ADN (Promega, USA); (2) control positivo (*E. coli* O55:H7); (3) control negativo (*E. coli* ATCC 25922); (4): *E. coli* 37; (5): *E. coli* 136.



Fig. 3. Amplificación por PCR para el gen *st* (ECET). Pozos: (1) marcador de peso de ADN (Promega, USA); (2) control positivo (*E. coli* O15:H11); (3) control negativo (*E. coli* ATCC 25922); (4): *E. coli* 2; (5): *E. coli* 12; (6): *E. coli* 16; (7): *E. coli* 31; (8): *E. coli* 97; (9): *E. coli* 106; (10): *E. coli* 135; (11): *E. coli* 140; (12): *E. coli* 155; (13): *E. coli* 199.

bla III, en la misma no se obtuvo diferencias estadísticas significativas y se demostró que la fiebre, el dolor abdominal y los vómitos, son las principales manifestaciones clínicas en la enfermedad diarreica aguda, causada por las ECD.

El porcentaje de aislamientos de los diversos tipos de *E. coli* diarreogénicas aisladas de acuerdo al tipo de alimentación reci-

bida por los niños con diarrea aguda de los cuales fueron aisladas, se muestran en la Tabla IV. En la misma puede observarse como los mayores porcentajes de aislamientos de todos los tipos de ECD, se encuentran en los niños alimentados con leche no materna y otros alimentos. Los porcentajes de aislamiento de las *E. coli* diarreogénicas y su relación con la condición socioeconó-

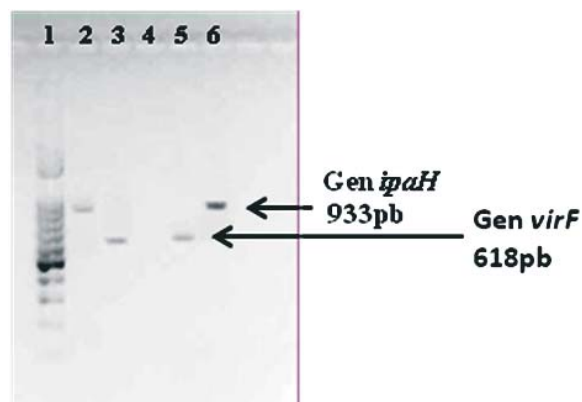


Fig. 4. Amplificación por PCR para de los genes *ipaH* y *virF* (ECEI). Pozos: (1) marcador de peso de ADN (Promega, USA); (2) control positivo gen *ipaH* (*E. coli* O28:NM); (3) control positivo gen *virF* (*E. coli* O28:NM); (4): control negativo (*E. coli* ATCC 25922); (5): *E. coli* 72, (amplificación del gen *virF*); (6): *E. coli* 72, (amplificación del gen *ipaH*).

mica del núcleo familiar, se muestran en la Tabla V. En la misma no se observan diferencias estadísticas significativas y los mayores porcentajes de niños diarreicos con ECD se encuentran en las clases obrera y marginal.

DISCUSIÓN

De los 200 niños con diarrea aguda, se aisló *E. coli* en 169 de ellos, lográndose identificar *E. coli* diarreogénica (ECD) por la técnica de la PCR en 32 cepas (18,93%). Este alto porcentaje nos indica que las mismas, son patógenos bacterianos importantes dentro de la etiología de la enfermedad diarreica aguda infecciosa en la población infantil estudiada. Según reportes de investigaciones previas, los porcentajes de aislamientos de ECD, se encuentran entre 7-35% (21-23).

La relación entre la edad de los niños y la enfermedad diarreica aguda (EDA) producida por cada una de las ECD, resultó estadísticamente no significativa ($p > 0,05$),

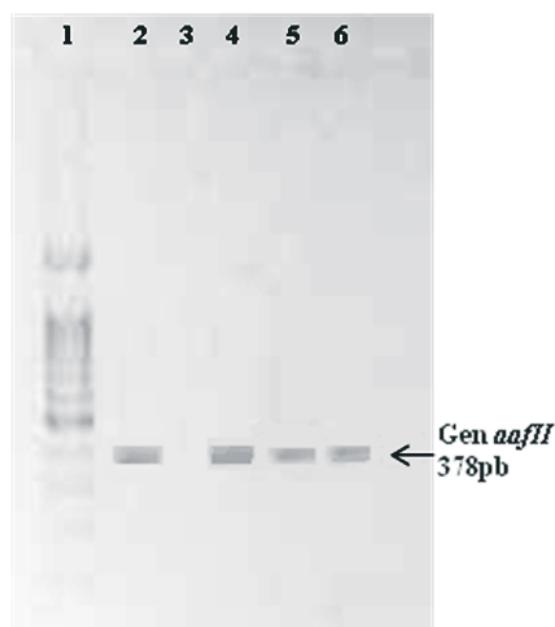


Fig. 5. Amplificación por PCR para el gen *affII* (ECEA). Pozos: (1) marcador de peso de ADN (Promega, USA); (2) control positivo (*E. coli* O42); (3) control negativo (*E. coli* ATCC 25922); (4): *E. coli* 132; (5): *E. coli* 164; (6): *E. coli* 168.

observándose en general, que los mayores porcentajes de aislamientos fue en los niños entre 13 y 24 meses de edad. Estos resultados coinciden con los reportados por Afset y col. (24), que encontraron los mayores porcentajes de aislamientos de ECD en niños entre 12-23 meses de edad.

Se debe considerar que ECEP presentó un alto porcentaje de aislamientos (27,78%) en los niños entre 0-6 meses, y que ECET tuvo altos porcentajes de aislamientos (30%) en niños entre 7-12 meses. Todos estos resultados coinciden con otras investigaciones que han indicado que los niños menores de 2 años representan la población infantil con mayor susceptibilidad a la infección por ECD, reportando la mayor prevalencia, en el caso de ECEP, en lactantes menores de 6 meses; mientras ECET está principalmente asociada a diarreas acuosas, en niños menores de 2 años de países en vías de desarrollo (6, 25).

TABLA III
 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS PRESENTES EN NIÑOS CON ENFERMEDAD DIARREICA AGUDA CAUSADA POR CADA TIPO DE *E. coli* DIARREOGÉNICA

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

No se encontraron diferencias significativas entre los grupos.

TABLA IV
 RELACIÓN DE LOS PORCENTAJES DE AISLAMIENTOS DE *E. coli* DIARREOGÉNICAS, CON EL TIPO DE ALIMENTACIÓN RECIBIDA POR LOS NIÑOS CON DIARREA AGUDA

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

No se encontraron diferencias significativas entre los grupos.

TABLA V
 RELACIÓN DE LOS PORCENTAJES DE AISLAMIENTOS DE *E. coli* DIARREOGÉNICAS CON LA CONDICIÓN SOCIOECONÓMICA DEL NÚCLEO FAMILIAR DE LOS NIÑOS CON DIARREA AGUDA

Graffar	ECEP N = 18	ECET N = 10	ECEI N = 1	ECEA N = 3
Media baja	4 (22,22%)	1 (10%)	0	0
Obrera	9 (50%)	7 (70%)	1 (100%)	1 (33,33%)
Marginal	5 (27,78%)	2 (20%)	0	2 (66,67%)

No se encontraron diferencias significativas entre los grupos.

Se observaron diferencias estadísticas significativas ($p < 0,05$) entre el sexo y el porcentaje de aislamientos de cada una de las ECD, demostrándose un mayor número de infectados en infantes del sexo masculino para la mayoría de los "patotipos"

(ECEP, ECEA y ECEI), mientras que ECET, fue mayormente aislada en pacientes de sexo femenino (80%). En general, se obtuvo un mayor porcentaje de aislamientos en niños que en niñas, coincidiendo con otros estudios que mostraron al sexo masculino

más susceptible a enfermedad diarreica aguda (21, 26). Esto podría explicarse con base en planteamientos que indican que los varones son más susceptibles a las infecciones, que las niñas debido a que el cromosoma humano (X) es el que porta los genes del control del nivel de anticuerpos de tipo IgM, que tienen funciones importantes en la inmunidad (27). Sin embargo, se obtuvieron altos porcentajes de aislamientos de ECEP en el sexo femenino (80%), por lo cual habría que realizar estudios que abarquen una mayor población, para obtener un número mayor de aislamientos en este "patotipo" de *E. coli*, y determinar si en efecto es más común en niñas que en niños, o fue un hallazgo casual en la población estudiada.

Se obtuvieron 18 aislamientos de ECEP (10,65%), de los cuales 2 cepas (1,18%) correspondieron a *E. coli* enteropatógena "típicas" por la presencia de los genes *eae* y *bfp*, y 16 cepas (9,47%) a *E. coli* enteropatógena "atípicas", con solo la amplificación del gen *eae*. Estos resultados coinciden con estudios realizados en Reino Unido, que demostraron una frecuencia mayor de aislamientos de cepas ECEP "atípicas" que de cepas "típicas" procedentes de niños con gastroenteritis (28); y los reportados por Añset y col. (25) quienes obtuvieron mayores aislamientos de ECEP "atípicas" en niños con diarrea en Noruega.

El rol de los cultivos de ECEP "atípicas" en regiones menos desarrolladas no es claro todavía, sin embargo, trabajos realizados en zonas de Brasil y Vietnam sugieren un papel importante de dichas cepas en la etiología de la gastroenteritis infantil (29, 30).

ECET fue aislada de 10 de niños con diarrea aguda (5,92%), en todas ellas solo amplificó el gen *st*. Estos resultados concuerdan con los reportados por Chávez y col. (31), quienes buscaron detectar las toxinas LT y ST de ECET en diferentes tipos

de muestras (aire, agua, suelo, alimentos y heces de niños y adultos), y hallaron LT (*lt*) con mayor frecuencia en muestras clínicas de adultos, mientras que las muestras clínicas de niños, no presentaron amplificación de este gen, sino para el gen *st* que codifica la toxina ST.

Los genes *virF* e *ipaH* fueron amplificados en una sola cepa (0,59%), se debe acotar que estos genes además de poseerlos ECEI también los tiene presente el género *Shigella*, debido a que ambos patógenos presentan características bioquímicas y genéticas similares (6). Sin embargo, dicha cepa fue ONPG (+), Acetato (+) y MUG (+). La prueba MUG adquiere mayor relevancia en la caracterización de ECEI, dado que *Escherichia coli* a excepción del serotipo O157:H7, utiliza la enzima 4-metilumbeliferone-β-D-glucoroine, mostrando la fluorescencia típica ante la luz ultravioleta, permitiendo la identificación rápida del género *Escherichia*. Por el contrario el género *Shigella*, es MUG negativa (10). Los resultados obtenidos son similares a los reportados por Ratchtrachenchai y col. (32), quienes aislaron a ECEI en un 0,5% de niños de Tailandia. Por su parte Vieira y col. (33), recolectaron muestras de heces de pacientes diarreicos en 22 comunidades rurales en el noroeste de Ecuador, y evaluaron por PCR la infección de ECD en los mismos, encontrando como patógeno más frecuente ECEI (3,2%).

ECEA logró detectarse por la amplificación del gen *aafII* de 3 cepas. El preciso mecanismo por el cual ECEA causa diarrea, no ha sido bien determinado hasta el momento (34) y no existen reportes de prevalencia de este "patotipo" de ECD en Venezuela. En Gabón se detectó 10,67% de ECEA con el gen *aafII*, en pacientes entre 6 y 24 meses de edad (35). Spano y col. (36) encontraron ECEA en 4,6%, en niños mayores de 12 meses, dato que concuerda con los resultados obtenidos en esta investiga-

ción, donde el porcentaje total de aislamientos estuvo dentro de dicho intervalo de edad (13-24 meses), aunque fue hallada en un porcentaje mucho menor (1,78%). Este "patotipo" de ECD es mayormente responsable de diarreas persistentes en países desarrollados (37, 38).

En países en vías de desarrollo, la frecuencia de aislamientos de cepas patógenas de *E. coli* a menudo se encuentra asociada con diarrea aguda, principalmente en niños menores de 5 años (39, 40). En Venezuela, Urrestarazu y col. (41) reportaron que en niños menores de 5 años con diarrea aguda, el 9% de las cepas patógenas aisladas eran ECEP de los serogrupos O clásicos, y otro 5% estaba conformado por cepas ECET. Araque y Bastardo (42) reportaron que en niños menores de 1 año, ECEP tuvo el mayor porcentaje de aislamientos.

Las características clínicas fueron similares en todas las ECD evaluadas, lo que no permitió discriminar entre la infección por un tipo de ECD en particular. Se observó que la mayoría de los aislamientos se realizó de niños alimentados de leche no materna mas otros alimentos y de acuerdo al Graffar la mayoría de los niños fueron de padres de clase obrera y marginal, lo cual hace suponer que las condiciones de vida de los niños son sanitaria e higiénicamente deficientes, favoreciendo la transmisión de la bacteria de persona a persona, por agua y/o alimentos contaminados (43-45). En tal sentido, se hace necesario aplicar medidas de prevención e higiene para el control de la diarrea, logrando así disminuir los altos índices de morbilidad infantil en la región.

AGRADECIMIENTO

Al proyecto Multicéntrico Nacional No G-2005000371, financiado por el Fondo Nacional de Ciencia y Tecnología (FONACIT) de Venezuela.

REFERENCIAS

1. **Guerrant R, Schorling J, McAuliffe J, De Souza M.** Diarrhea as a cause and effect of malnutrition: diarrhea prevents catch-up growth and malnutrition increases diarrhea frequency and duration. *Am J Trop Med Hyg* 1992; 47(1):28-35.
2. **Bern C, Martinez J, De Zoisa I, Glass R.** The magnitude of the global problem of diarrhoeal disease: a ten-year update. *Bull World Health Organ* 1992; 70(6):705-714.
3. **Ministerio de Sanidad y Asistencia Social (MSAS).** Boletín Epidemiológico Semana N° 52. Caracas, Dirección de Vigilancia Epidemiológica, 1998; 49(3836):650.
4. **Ministerio del Poder Popular para la Salud (MPPS).** 2006. Anuario de Mortalidad 2005. Caracas, Dirección General de Epidemiología, 2006; 218:1-363.
5. **Guerrant R, Van Gildert T.** Practice guidelines for the management of infectious diarrhea. *Cin Infect Dis* 2001; 32: 331-351.
6. **Nataro J, Kaper J.** Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev* 1998; 11: 142-201.
7. **Echevarría P, Savarino S, Yamamoto T.** *E. coli* diarrea. *Clin Gastroent* 1993; 7(2): 243-262.
8. **Calderón R.** Manual de procedimientos para la investigación de brotes de infecciones intrahospitalarias producidas por bacterias mediante métodos de biología molecular. *Inst Nac de Salud* 2002; Serie de normas técnicas N° 35, 1-28.
9. **Villalobos LB, Elguezabal L.** Detección de posible *E. coli* enteropatógena en el bivalvo *Pinctada imbricata* comercializado en Cumaná, Venezuela *Bol Inst Oceanog* 2002; 39:17-23.
10. **Villalobos LB.** Caracterización de cepas de *Escherichia coli* enteroinvasiva, aislada de un producto cárnico. *Rev Cien FCV-LUZ* 2003; 13:7-11.
11. **Martínez R, Villalobos LB.** Ocurrencia de *Escherichia coli* enteropatógena en Moluscos Bivalvos en Cumaná, Venezuela. *Rev Cien FCV-LUZ* 2005; 15(2):163-167.

12. **Pan American Health Organization (PAHO).** Ethical guidelines for research involving human subjects. 2004 Washington, DC.
13. **Méndez-Castellano H.** Estratificación Social y Biología Humana. Método de Graffar modificado. Arch Ven Puer Ped 1986; 49: 93-110.
14. **Koneman E, Allen S, Janda W, Schreckenberger P, Winn W.** Diagnostic Microbiology. Color atlas and textbook, 5th ed., 1997 Lippincott, Philadelphia.
15. **Rivas M, Leotta G, Chinen I.** Manual de procedimientos diagnósticos y caracterización de *Escherichia coli* O157 productor de toxina Shiga a partir de alimentos. Centro regional de referencia del WHO Global Salm Surv para América del Sur. 2007. 139 pp.
16. **Fagan P, Hornitzky M, Bettelheim K, Djordjevic S.** Detection of shiga-like toxin (*stx1* and *stx2*), intimin (*eaeA*), and enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) hemolysin (EHEC *hlyA*) genes in animal feces by multiplex PCR. Appl Environ Microbiol 1999; 65:868-872.
17. **Vidal M, Krüger E, Durán C, Lagos R, Levine M, Prado V, Toro C, Vidal R.** Single Multiplex PCR Assay To Identify Simultaneously the Six Categories of Diarrheagenic *Escherichia coli* Associated with Enteric Infections. J Clin Microbiol 2005; 43(10):5362-5365.
18. **Monday S, Keys C, Hanson P, Shen Y, Whittam T, Feng P.** Produce Isolates of the *Escherichia coli* Ont:H52 Serotype That Carry both Shiga Toxin 1 and Stable Toxin Genes. Appl Environ Microbiol 2006; 72(4): 3062-3065.
19. **Eisenstein B.** The polymerase chain reaction. A new method of using molecular genetics for medical diagnosis. New Engl J Med 1990; 322:178-183.
20. **Wayne, D.** Estadística. Base para el Análisis de las Ciencias de la Salud. Limusa, S.A. de C.V., México. 1988.
21. **Varela G, Jasinski C, Gadea P, Tanzi M, Mota M, Arenas C, González S, González G, Pardo L, Sirok A, Schelotto F.** *Escherichia coli* enteropatógeno clásico (EPEC) asociado a casos de diarrea en niños usuarios del Hospital Pereira Rossell. Aspectos clínicos y características de las cepas involucradas. Rev Med Urug 2007; 23:153-163.
22. **Yang J, Wu F, Tsai J, Mu J, Lin L, Chen K, Kuo S, Chiang C, Wu H.** Comparison between O Serotyping Method and Multiplex Real-Time PCR To Identify Diarrheagenic *Escherichia coli* in Taiwan. J Clin Microbiol 2007; 45(11):3620-3625.
23. **Hien B, Scheutz F, Cam P, Serichantalergs O, Huong T, Thu T, Dalsgaard A.** Diarrheagenic *Escherichia coli* and *Shigella* strains isolated from children in a hospital case-control study in Hanoi, Vietnam. J Clin Microbiol 2008; 46(3): 996-1004.
24. **Afset J, Bergh K, Bevanger L.** High prevalence of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) in Norwegian children with diarrhea. J Med Microbiol 2003; 52:1015-1019.
25. **Kaper J, Nataro J, Mobley H.** Pathogenic *Escherichia coli*. Nat Rev Microbiol 2004; 2:123-140.
26. **Cermeño J, Hernandez I, Camaripano M, Medina N, Guevara A, Hernández C.** Etiología de diarrea aguda en niños menores de 5 años. Ciudad Bolívar, Venezuela. Rev Soc Ven Microbiol 2008; 28(1):30-42.
27. **Valverde J, Farias E.** Sepsis: Factores de riesgo en recién nacidos pretérmino. Rev Fac Med 2007; 30(1): 68-72.
28. **Sotland S, Smith H, Cheasty T, Said B, Willshaw G, Stokes N.** Use of gene probes and adhesion tests to characterize *E. coli* belonging to enteropathogenic serogroups isolated in United Kingdom. J Med Microbiol 1996; 44:438-443.
29. **Trabulsi L, Keller R, Tardelli T.** Typical and atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. Emerg Infect Dis 2002; 8:508-513.
30. **Nguyen T, Le Van P, Huy C, Nguyen K, Weintraub A.** Detection and characterization of diarrheagenic *Escherichia coli* from young children in Hanoi, Vietnam. J Clin Microbiol 2005; 43:755-60.
31. **Chávez E, Martínez L, Cedillo M, Gil C, Avelino F, Castañeda E.** Identificación de cepas de ECET de diferentes ambientes. Enf Inf Microbiol 2007; 27(3):70-74.

32. **Ratchtrachenchai O, Subpasu S, Hayashi H, Ba-Thein W.** Prevalence of childhood diarrhea-associated *Escherichia coli* in Thailand. *J Med Microbiol* 2004; 53:237-243.
33. **Vieira N, Bates S, Solberg O, Ponce K, Howsmon R, Cevallos W, Trueba G, Riley L, Eisenberg J.** High prevalence of enteroinvasive *Escherichia coli* isolated in a remote region of northern coastal Ecuador. *Am J Trop Med Hyg* 2007; 76(3): 528-533.
34. **Savarino S, Fasano A, Watson J, Martin B, Levine M, Guandalini S, Guerry P.** Enterotoxigenic *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1 represents another subfamily of *E. coli* heat-stable toxin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 90:3093-3097.
35. **Presterl E, Zwick R, Reichmann S, Aichelburg A, Winkler S, Kreamsner P, Graninger W.** Frequency and virulence properties of diarrheagenic *Escherichia coli* in children with diarrhea in Gabon. *Am J Trop Med Hyg* 2003; 69(4):406-410.
36. **Spano L, Sadvovsky D, Seguí P, Saick K, Kitagawa S, Pereira F, Fagundes U, Scaletsky I.** Age-specific prevalence of diffusely adherent *Escherichia coli* in Brazilian children with acute diarrhoea. *J Med Microbiol* 2008; 57:359-363.
37. **Jiang Z, Lowe B, Veerenker M, Ashley D, Steffen R, Tornieporth N, von Sonnenburg F, Waiyaki P, DuPont H.** Prevalence of enteric pathogens among international travelers with diarrhea acquired in Kenya (Mombasa), India (Goa), or Jamaica (Montego Bay). *J Infect Dis* 2002; 185: 497-502.
38. **Adachi J, Jiang Z, Mathewson J, Verenker M, Thompson S, Martinez F, Steffen R, Eriesson C, DuPont H.** Enterotoxigenic *Escherichia coli* as a major etiologic agent in travel's diarrhea in 3 regions of the world. *Clin Infect Dis* 2001; 32:1706-1709.
39. **Clarke S, Haigh R, Freestone P, Williams P.** Virulence of enteropathogenic *Escherichia coli*, a global pathogen. *Clin Microbiol Rev* 2003; 16(3):365-378.
40. **Franzolin M, Barbosa R, Keller R, Tardelli T, Beutin L, Lima M, Milroy C, Strina A, Ribeiro H, Rachid L.** Prevalence of diarrheagenic *Escherichia coli* in children with diarrhea in Salvador, Bahia, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2005; 100(4):359-363.
41. **Urrestarazu M, Liprandi F, Pérez E, González R, Pérez I.** Características etiológicas, clínicas y sociodemográficas de la diarrea aguda en Venezuela. *Rev Panam Salud Publica* 1999; 6(3):149-154.
42. **Araque Y, Bastardo J.** Estudio bacteriológico de la diarrea aguda infantil en Cumaná, estado Sucre. *Saber* 1999; 11(1):45-51.
43. **Cheng AC, McDonald JR, Thielman NM.** Infectious diarrhea in developed and developing countries. *J Clin Gastroenterol* 2005; 39(9):757-773.
44. **Steiner T, Samie A, Guerrant R.** Infectious Diarrhea: New Pathogens and New Challenges in Developed and Developing Areas. *Clin Infect Dis* 2006; 43:408-410.
45. **Durán T.** Diarrea aguda en niños. *Rev Pa-cña Med Fam* 2007; 4(5):30-33.