

© Derechos de autor  
Patricio Rojas Silva  
2008

## **Dedicatoria**

Me gustaría dedicar este trabajo a mi esposa Rosita Mateus, a mis padres María de Lourdes Silva y Patricio Rojas, y a mis tíos Víctor Hugo y Silvia Rojas por su amor y apoyo incondicional.

## **Agradecimientos**

Me gustaría agradecer a mis hermanos Jorge y David por estar siempre a mi lado, a mi familia por el aliento y cariño que siempre me otorgan. También, quisiera agradecer a la Universidad San Francisco de Quito por haberme brindado la oportunidad de continuar mi carrera académica, a los profesores de la Maestría de Microbiología, en especial a los doctores Gabriel Trueba y Manuel Baldeón porque más que conocimientos me enseñaron actitudes. Igualmente, quisiera agradecer a todos mis compañeros de la Maestría por haberme honrado con su amistad. Finalmente, quisiera extender mi agradecimiento a todo el personal del Proyecto ECODESS, quienes me facilitaron todo el material para la realización de mi tesis.

## Resumen

Existen seis patotipos diferentes de *Escherichia coli* diarreogénicos, cada uno con sus características epidemiológicas y patogénicas propias. Sin embargo, *Escherichia coli* enterotoxigénica (ETEC) es la principal causa de diarrea bacteriana en todo el mundo, y está asociada como agente causal de la diarrea del viajero. Las cepas de ETEC pueden tener uno o los dos tipos de enterotoxinas, existiendo así tres variedades: ETEC-LT, ETEC-ST, y ETEC-LT/ST. Los objetivos de este estudio fueron: primero determinar la frecuencia de *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), Shigellae, y *E. coli* enteropatogénica (EPEC); segundo determinar la frecuencia de los tres tipos de ETEC; y tercero hacer un análisis genotípico mediante PFGE de los aislados de ETEC para demostrar su grado de relación genética. El estudio se realizó entre marzo 2006 a julio 2007 como un estudio caso-control en 22 comunidades de la costa noroccidental del Ecuador. La infección fue valorada mediante reacción de PCR específica para los genes *eltA* (LT) y *estA* (STh) de ETEC que afecta a humanos, el gen *ipaH* de EIEC y Shigellae, y el gen *bfpA* de EPEC. Se realizó una prueba de electroforesis de campo pulsado (PFGE) para valorar la clonalidad entre los aislados de ETEC. El patotipo diarreogénico de *E. coli* mayormente identificado fue EIEC, seguido de ETEC, Shigellae y EPEC en ese orden. ETEC-LT representó la principal forma de las ETECs aisladas. Los aislados de ETEC no demostraron tener un solo patrón de clonalidad a pesar de provenir de comunidades remotas. Se identificaron dos aislados provenientes de un mismo individuo con diferente patrón de clonalidad y con el gen *eltA* idéntico lo que sugiere un posible evento de transferencia horizontal de genes (HGT).

## Abstract

There are six different types of diarrheagenic *Escherichia coli*, each one with its own characteristics. However, enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) is the main bacterial agent that causes diarrhea worldwide, and it is also associated with traveler's diarrhea. ETEC strains could harbor one or two types of enterotoxins, so there are 3 varieties: ETEC-LT, ETEC-ST, and ETEC-LT/ST. The main goals of this study were: determine prevalence of enterotoxigenic *E. coli* (ETEC), enteroinvasiva *E. coli* (EIEC), Shigellae, and enteropathogenic *E. coli* (EPEC); determine the prevalence of the three varieties of ETEC; and finally make a genotyping analysis by pulse-field electrophoresis (PFGE) of ETEC isolates to show their genetic relation. The study was done between March 2006 and July 2007, stool samples were collected in case-control studies in 22 coastal rural communities in northwestern Ecuador. Infection was assessed by PCR specific for *eltA* (LT) and *estA* (STh) genes of human ETEC, the *ipaH* gene of both EIEC and Shigellae, and the *bfpA* gene EPEC. The pathogenic *E. coli* most frequently identified were EIEC and ETEC, followed by Shigellae and EPEC. ETEC-LT was the principal type of ETEC. ETEC isolates did not show one clonal genotype. We identified two isolates from one subject with a different genotype and the same *eltA* gene, so this finding suggested a likely event of horizontal gene transfer (HGT).

## Tabla de contenidos

<b>1. Introducción</b>	
1.1. Enfermedad diarreica y diarrea del viajero .....	1
1.2. <i>Escherichia coli</i> .....	2
1.3. Patotipos de <i>Escherichia coli</i> .....	3
1.4. <i>Escherichia coli</i> enterotoxigénica (ETEC) .....	3
1.4.1. Epidemiología de ETEC .....	4
1.4.2. Patogenia de ETEC .....	7
1.4.3 Enterotoxinas de ETEC .....	8
1.5. Justificación y objetivos del estudio .....	10
 <b>2. Materiales y Métodos</b>	
2.1. Origen de las muestras .....	11
2.2. Diseño del estudio .....	11
2.3. Muestras de heces y aislados .....	12
2.4. Detección de patotipos diarreogénicas de <i>E. coli</i> mediante PCR .....	12
2.5. Recuperación y preservación de los aislados positivos .....	14
2.6. Susceptibilidad a los antibióticos .....	14
2.7. Genotipificación mediante electroforesis de campo pulsado (PFGE) .....	14
2.8. Secuenciamiento del gen <i>eltA</i> .....	16
2.9. Cepas de referencia .....	16
2.10. Análisis estadístico .....	17
 <b>3. Resultados</b>	
3.1. Análisis epidemiológico de <i>E. coli</i> diarreogénicas y <i>Shigellae</i> .....	18
3.2. Análisis epidemiológico de ETEC .....	19
3.3. Genotificación de los aislados ETEC mediante PFGE .....	20
3.4. Secuenciamiento del gen <i>eltA</i> de los aislados 28A y 28C ETEC .....	21
 <b>4. Discusión</b>	
4.1. Patotipos de <i>E. coli</i> y <i>Shigellae</i> de marzo 2006 a julio 2007 .....	22
4.2. Aislados de ETEC de marzo 2006 a julio 2007 .....	24
4.3. Genotipificación por PFGE de ETEC .....	25
<b>5. Conclusiones</b> .....	26
<b>6. Recomendaciones</b> .....	27
<b>7. Referencias</b> .....	28
<b>8. Figuras</b> .....	34
<b>9. Tablas</b> .....	55

## Lista de Figuras

Figura 1. Zonas de riesgo para diarrea del viajero a nivel mundial.

Figura 2. Mapa de la zona del estudio en el noroeste de la provincia de Esmeraldas.

Figura 3. Validación de la prueba de PCR con cepas controles para detectar *Escherichia coli* diarreogénicas y *Shigellae*.

Figura 4. Número total y porcentual de aislados positivos para patotipos diarreogénicos detectados mediante PCR en las 1125 muestras provenientes de las 22 comunidades entre marzo 2006 a julio 2007.

Figura 5. Número total y porcentual de aislados positivos para patotipos diarreogénicos detectados por PCR en el grupo *E. coli* lactosa positivas (Lac+) entre marzo 2006 a julio 2007.

Figura 6. Número total y porcentual de aislados positivos para patotipos diarreogénicos detectados por PCR en el grupo *E. coli* lactosa negativas (Lac -) y *Shigellae* entre marzo 2006 a julio 2007.

Figura 7. Frecuencia de los Aislados ETEC Positivos Estratificados por tipos de enterotoxina, y por Casos y Controles (Total de Aislados ETEC positivos = 51).

Figura 8. Aislados positivos para ETEC-LT detectados por PCR de enero y marzo 2007.

Figura 9. Aislados positivos para ETEC-LT detectados por PCR de enero 2007 de los muestras 32 y 46, y mayo 2007.

Figura 10. Aislados positivos para ETEC-LT detectados por PCR de abril, mayo, junio y julio 2007.

Figura 11. Aislados positivos para ETEC-ST detectados por PCR de enero y mayo 2007.

Figura 12. Gel de PFGE de los aislados de ETEC obtenidos de enero 2007.

Figura 13. Dendrograma de ETECs aislados durante enero 2007 en base al patrón de bandas generado por PFGE de la figura 14.

Figura 14. Gel de PFGE de los aislados de ETEC obtenidos de marzo, abril, mayo y julio 2007.

Figura 15. Dendrograma de ETECs aislados durante marzo, abril, mayo y julio 2007 en base al patrón de bandas generado por PFGE de la figura 14.

Figura 16. Gel de PFGE de los aislados de ETEC obtenidos de mayo 2007.

Figura 17. Dendrograma de ETECs aislados durante mayo 2007 en base al patrón de bandas generado por PFGE de la figura 16.

Figura 18. Gel de PFGE de los aislados de ETEC obtenidos de junio 2007.

Figura 19. Dendrograma de ETECs aislados durante junio 2007 en base al patrón de bandas generado por PFGE de la figura 18.

Figura 20. Amplificación de gen *eltA* de los aislado 28A y 28C de mayo 2007.

Figura 21. Dendrograma generado con las secuencias del gen *eltA* de los aislados 28A y 28C y otras secuencias obtenidos del GenBank .

## Lista de Tablas

Tabla 1. Características del genoma de *E. coli* E24377A ETEC y de sus plásmidos.

Tabla 2. Características de las enterotoxinas producidas por ETEC.

Tabla 3. Características de las 22 comunidades participantes en el estudio, pertenecientes al cantón Eloy Alfaro, ubicadas en el noroeste de la provincia de Esmeraldas.

Tabla 4. Concentraciones de reactivos para PCR de patotipos diarreogénicos de *E. coli*.

Tabla 5. Caracterización de los aislados de *Escherichia coli* fermentadores de lactosa obtenidos entre marzo 2006 a julio 2007. EIEC: *E. coli* enteroinvasiva, ETEC: *E. coli* enterotoxigénica, EPEC: *E. coli* enteropatógena.

Tabla 6. Caracterización de los aislados de *Escherichia coli* no fermentadores de lactosa y *Shigellae* obtenidos entre marzo 2006 a julio 2007.

Tabla 7. Patotipos diarreogénicos de *E. coli* y *Shigellae* estratificados por casos y controles entre marzo 2006 a julio 2007.

Tabla 8. Patotipos de *E. coli* y *Shigellae* estratificados por edad, y por casos (D+) y controles (D-) entre marzo 2006 a julio 2007.

Tabla 9. Coinfecciones distribuidas por grupo de edad, y entre casos y controles.

Tabla 10. Distribución del tipo de toxina de ETEC en relación a la edad, y el riesgo de desarrollar diarrea entre marzo 2006 a julio 2007 [casos (D+) y controles (D-)].

Tabla 11. Prevalencia total de ETEC por edades en la población evaluada durante marzo 2006 a julio 2007 (N= población evaluada).

Tabla 12. Tipo de resistencia a los antibióticos de los aislados ETECs de enero a julio 2007.

Tabla 13. Resumen de los aislados ETEC positivos estudiados mediante PFGE de enero a julio 2007.

## 1. Introducción

Los estudios epidemiológicos sobre enfermedad diarreica aplicando técnicas moleculares son de altísimo valor debido al impacto en la salud pública. En este trabajo se valora la presencia de varios patotipos diarregénicos de *Escherichia coli*, y en particular, se analiza los aislados de *Escherichia coli* Enterotoxigénica (ETEC) en comunidades rurales de la costa del Ecuador mediante la detección con PCR (reacción en cadena de la polimerasa); igualmente, se evalúa la relación clonal que existe entre los aislados de ETEC mediante electroforesis de campo pulsado (PFGE).

### 1.1. Enfermedad diarreica y diarrea del viajero

La enfermedad diarreica continúa siendo la segunda causa de mortalidad en los niños menores de 5 años en todo el mundo; es así que, la frecuencia total de mortalidad en el mundo por diarrea en niños menores de 5 años asciende al 16.5% para ambos sexos (1), pero en los países no industrializados representa el 21% con 2,5 millones de muertes anuales (2). Las estimaciones de la mortalidad ascienden a 4,9 niños por 1000 cada año en los países en desarrollo como resultado de enfermedad diarreica en los 5 primeros años de vida; igualmente, la incidencia promedio para los niños menores de 5 años es de 3.2 episodios por niño y por año (2). Las causas principales de muerte de la enfermedad diarreica son la deshidratación y el desbalance electrolítico, y por esta razón los grupos etarios más vulnerables lo constituyen los niños menores de 5 años y los ancianos. Dentro de los principales agentes microbiológicos causales de diarrea aguda se incluyen Rotavirus y otros tipos de virus intestinales, variedades diarregénicas de *Escherichia coli*, *Salmonella spp.*, *Shigellae.*, *Campylobacter jejuni*, *Vibrio cholerae*, *Entamoeba histolytica*, entre otros agentes (3).

Dentro de los problemas de salud pública mundiales relacionadas con la enfermedad diarreica aguda se encuentra la diarrea del viajero, la cual constituye un serio problema para los turistas,

especialmente niños (4). El riesgo es mayor al ingresar a países en desarrollo, del 20 al 50 % de los visitantes provenientes de países industrializados desarrollarán al menos un episodio de diarrea (5). La principal ruta de transmisión es fecal-oral debido al agua o alimentos contaminados (6). Más del 90% de los episodios se desarrollan dentro de las dos primeras semanas de arribo al país extranjero y el desbalance hidroelectrolítico es la complicación más común y seria (7). Los patógenos relacionados con el desarrollo de diarrea del viajero son principalmente *Escherichia coli* enterotoxigénica y enteroagregativa, *Campylobacter jejuni*, *Salmonella spp.*, y *Shigellae.*, Norovirus y Rotavirus. El agente causal más común en América Latina, Caribe y el Medio Oriente es *Escherichia coli* enterotoxigénica con un 29% de los casos (8). En la Figura 1 se muestran las zonas de riesgo para diarrea del viajero a nivel mundial.

## **1.2. *Escherichia coli***

*Escherichia coli* (*E. coli*) es un bacilo Gram negativo, anaerobio facultativo, que se clasifica dentro de la familia Enterobacteriaceae, en el grupo de las  $\gamma$ -Proteobacterias (9). Coloniza el intestino de mamíferos y aves, y puede sobrevivir en el medio ambiente (10). *E. coli* representa menos del 1% de la microbiota intestinal humana, pero es la bacteria anaerobia facultativa más común en este nicho, probablemente porque puede metabolizar en forma más efectiva el gluconato (11). Su genoma se compone de 4'639,221 pb (*E. coli* K12), y contiene 4,288 genes que codifican para proteínas de los cuales el 38% no tienen una función atribuida. Además, en el genoma se encuentran elementos de inserción (IS), remanentes de fagos, y otras evidencias de transferencia horizontal de genes lo cual indica una gran plasticidad de este genoma (12). Las variedades patógenas pueden contener  $10^6$  más bases que la cepa K12 de laboratorio (13). Esta diferencia de tamaño se debe en gran parte a transferencia horizontal de genes (HGT) lo que le permite a *E. coli* la adquisición de nuevas funciones como la patogenicidad (10). Típicamente la virulencia en *E. coli* se asocia con la presencia de agrupamientos de genes conocidos como islas de patogenicidad (14), las cuales pueden encontrarse codificadas en el genoma y/o en plásmidos. Wirth, *et al.*

emplearon las secuencias de 7 genes esenciales (housekeeping) provenientes de diferentes *E. coli* para demostrar que la recombinación es un proceso ampliamente distribuido dentro de las especies; y que el grupo de cepas patógenas tienen la capacidad de generar nuevas combinaciones, algunas incluso pueden conferir la virulencia (10).

### **1.3. Patotipos de *Escherichia coli***

Las variedades patogénicas se agrupan en tres patotipos principales: las que causan infección intestinal/diarrea, las que causan infecciones de vías urinarias, y las que originan meningitis y sepsis (11).

Las variedades de *Escherichia coli* patogénicas intestinales (*E. coli* diarreogénicas [DAE]) han sido clasificadas en seis patotipos: enterotoxigénica (ETEC), enteropatogénica (EPEC), enteroinvasiva (EIEC), enterohemorrágica (EHEC), enteroagregativa (EAEC) y de adherencia difusa (DAEC). Entre todos estos patotipos ocasionan cerca de 650 millones de casos anualmente, con 160 millones de casos de diarrea y entre 800.000 a 1 millón de muertes al año, sobretodo en niños menores de 5 años en países en desarrollo (16).

Esta clasificación se basa en los factores de virulencia y en las manifestaciones clínicas de la infección. Las características de patogenicidad en estos 6 patotipos están definidas por dos configuraciones genéticas: los plásmidos de virulencia y/o las islas de patogenicidad cromosómicas (15).

### **1.4. *Escherichia coli* enterotoxigénica (ETEC)**

*Escherichia coli* enterotoxigénica (ETEC) se define como un patotipo diarreogénico de *E. coli* que puede adherirse al intestino delgado debido a su capacidad de colonizar los enterocitos mediante los antígenos o factores de colonización (CFAs), y producir uno de los dos siguientes tipos de enterotoxinas: una termolábil denominada LT y otra termoestable denominada ST (16). Las

enterotoxinas y los CFAs son codificados en plásmidos conjugativos o no conjugativos (17,18). Los no conjugativos pueden ser complementados en trans para su movilización, y además en los plásmidos se pueden encontrar genes de resistencia a antibióticos y a compuestos mercuriales (19, 20, 21).

La pérdida de plásmidos que expresan CFA/I o de CFA/II se relaciona con la pérdida de ST y de LT, lo cual confirma que estos determinantes de virulencia se codifican en forma conjunta (22, 23). Igualmente se demostró que CFA/I está asociado con ST y CFA/II con ST y LT (23). Una cepa de ETEC puede tener diferentes plásmidos que codifiquen LT o ST, por ejemplo en la cepa *E. coli* H10407 existe un plásmido que codifica para CFA/I y ST-A2, y otro plásmido que codifica para LT y ST-A2 (24). Sin embargo, hasta el momento no se han podido caracterizar todos los plásmidos que portan los genes de las toxinas LT o ST así como CFAs, debido a que la mayoría de cepas ETEC portan varios tipos de plásmidos conjugativos y no conjugativos (22, 25, 26).

En la Tabla 1 se muestran los plásmidos que hasta el momento han sido totalmente secuenciados y publicados en el GenBank de Pubmed, entre los genes de los plásmidos constan muchos relacionados con elementos IS (transposones), así como genes de conjugación.

Además de que los genes de enterotoxinas se ubican en plásmidos, también hay evidencia de que se encuentran dentro de elementos genéticos móviles. Por ejemplo, los genes *eltA*, *eltB* están flanqueados por secuencias repetidas, lo que sugirió que estos genes se encontraban ubicados en transposones (27). Igualmente, el gen *estA* se ubica en un transposón (28).

#### **1.4.1. Epidemiología de ETEC**

ETEC es la principal causa bacteriana de diarrea en todo el mundo por cepas diarreogénicas de *E. coli* (29), y representa 210 millones de episodios de diarrea y 380000 muertes anualmente (2). Infecciones similares causadas por cepas de ETEC específicas para cada especie animal se han

detectado en bovinos y porcinos, sobre todo a los terneros y lechones, lo que resulta en pérdidas económicas para este sector productivo (30).

Las cepas de ETEC están relacionadas con dos tipos de síndromes: diarrea en niños menores de 5 años y la diarrea del viajero. La enfermedad se presenta como una diarrea secretoria de inicio súbito luego de ingerir alimentos o agua contaminados. A pesar de que se trata de una enfermedad autolimitada, la diarrea puede producir deshidratación severa con desbalance hidroelectrolítico y muerte (16).

Gupta y colaboradores reportaron en una revisión sistemática, que incluía 15 estudios de países con índice de desarrollo bajo y medio entre los años 1984 a 2005, que el rango de incidencia cruda de la infección por ETEC entre los diferentes países era muy amplio (39 casos por 1000 personas-año entre 1985 a 1986 en la India, en comparación con 4460 casos por 1000 personas-año entre 1997-1998 en Guinea Bissau). En América Latina, el estudio más reciente reportado fue de Nicaragua entre 1991 a 1994 con una incidencia cruda de 660 casos por 1000 personas-año. Igualmente, se reporta que el pico de incidencia ocurre entre los 6 a 18 meses de edad. Además, al parecer, es menos probable que las cepas ETEC-LT produzcan enfermedad en comparación con las cepas ETEC-ST o ETEC-LT/ST (31). Vieira *et al.* en Ecuador reportaron que la prevalencia total de ETEC en la costa norte de la Provincia de Esmeraldas era de 1.3 por 100 habitantes, para los < 5 años fue de 1.6 por 1000, > 5 a 20 años 2.1 por 1000, y para > 20 años 0.4 por 1000. Este estudio representa el primero en el Ecuador que evalúa la prevalencia de *E. coli* diarreogénicas, y el primero en realizarse en comunidades rurales ecuatorianas (32).

Al-Gallas *et al.* en Túnez reportaron que la principal bacteria aislada en los niños con diarrea fue ETEC con 32.3%, mientras que en el grupo control fue del 37% (n=115 niños con diarrea y n=54 controles); en tanto que, en los adultos con diarrea ETEC representó la segunda bacteria aislada con el 12.3%, pero en el grupo control fue la primera bacteria aislada con 31% (n=73 adultos con

diarrea y n=29 controles). ETEC-ST representó el principal tipo en todo los grupos y fue la que estuvo más asociada con la generación de diarrea, especialmente en niños ( $P = 0.004$ ). El estudio se llevó a cabo en 9 centros hospitalarios de Tunisia durante Noviembre de 2001 a Noviembre 2004 y la determinación del tipo de toxinas se realizó mediante PCR (33). Otro estudio llevado a cabo en Egipto por Peruski *et al.* demostró que de 242 casos de diarrea, 125 fueron debidos a ETEC, y 95 de estos fueron estudiados en su patrones fenotípicos lo cual evidenció que 57 cepas producían ST, 34 LT y 9 ambas toxinas. El estudio abarcó un periodo de 2 años y se realizó en 3 comunidades periurbanas de Egipto. La determinación del tipo de toxinas se hizo mediante ELISA (34).

En Jakarta, Indonesia, Oyoyo *et al.* reportaron que de 6,615 aislados de *E. coli* provenientes de 1,323 pacientes, 246 pacientes (19%) fueron positivos para ETEC; y ST representó el 72%, LT el 23 % y LT/ST el 9%. El estudio se llevó a cabo en 5 centros hospitalarios y la presencia de toxinas se determinó mediante ELISA (35).

En una cohorte de 321 niños de áreas urbanas seguidos desde el nacimiento hasta los 2 años de edad se determinó la incidencia de ETEC en Bangladesh. ETEC resultó ser el patógeno más común con 19,5% en los niños con diarrea (Rotavirus representó el 10%), y el fenotipo de toxina predominante fue ST (36).

En estos cuatro estudios hechos en África y el Sudeste Asiático la prevalencia de ETEC-ST es mayor a la de los otros 2 fenotipos; sin embargo en América Latina ocurre que el principal fenotipo es LT o LT/ST (16). Finalmente, un estudio realizado en 928 estudiantes de Estados Unidos que viajaron a Guadalajara, México entre 1992 a 1997, ETEC representó el principal patógeno aislado con el 19%, LT fue el principal fenotipo en 4 de los 5 años y LT/ST durante 1996. El estudio empleó sondas marcadas para detectar los genes de las toxinas. (26). Esto apoya los datos presentados por Qadri en 2005 para las región de América Latina.

### 1.4.2. Patogenia de ETEC

Como otras bacterias patógenas, la estrategia general de ETEC consiste en adherirse a los enterocitos, multiplicarse, evadir la respuesta del hospedador, y causar daño para poder transmitirse a otros hospedadores. La transmisión de las cepas de ETEC está determinado por tres factores: 1) la dosis infecciosa es relativamente grande; 2) los individuos expuestos desarrollan inmunidad de mucosa; y 3) en las heces de pacientes afectados se pueden aislar una gran cantidad de esta bacteria, inclusive en sujetos asintomáticos portadores (37).

La colonización está mediada por una o varias estructuras proteicas fibrilares (fimbrias) conocidas como Factores de Colonización (CFs), los cuales son designados como CFA (colonization factor antigen), CS (coli surface antigen) o PCF (putative colonization factor) que son seguidos por un número. Se han definido más de 20 CFs antigénicamente diversos; sin embargo, el 75% de las cepas ETEC humanos corresponden a CFA/I, CFA/II o CFA/IV51 (38). Los CFAs son imprescindibles para que ETEC pueda colonizar el intestino (39). En tanto que, los genes *tia* y *tib*, que se ubican en el cromosoma, permiten la unión íntima y la interacción bacteria-bacteria para generar biofilm, lo que juega un papel preponderante en la patogénesis (40).

En los animales, sobretodo en bovinos, los factores de colonización corresponden a los antígenos K88, K99 en terneros, corderos y lechones (41), y F41 y 987P en cerdos, los cuales no han sido relacionados con cepas ETEC humanas (11). Una vez adheridos al epitelio intestinal pueden liberar sus enterotoxinas para inducir diarrea como se describe a continuación.

### 1.4.3. Enterotoxinas de ETEC

ETEC puede producir dos tipos de enterotoxinas proteicas: termolábiles (LT) y termoestables (ST). ETEC-ST fue descrita por primera vez en 1967 por Smith y Halls (42), y ETEC-LT descrita en 1971 por Sack, et al. (43).

Las toxinas termolábiles (LTs) se desnaturalizan a 60°C durante 30 minutos (44) y las termoestables (STs) pueden tolerar 100°C durante 30 minutos sin perder su actividad (45). En la Tabla 2 se muestra un resumen de las características de estas enterotoxinas.

Las toxinas LTs son de dos tipos LT-I y LT-II. La toxina LT-II es codificada en el cromosoma y no en plásmidos (46). Los dos tipos son codificados en un operón que contiene los genes *eltA* y *eltB*, anteriormente *toxA* y *toxB* (47). Este grupo de toxinas representan el principal factor de virulencia de ETEC (48), y están estrechamente relacionados con la enterotoxina de *Vibrio cholerae* (CT) con la cual tiene alta homología (45). Además, al igual que CT, LT es pentamérica y dispone de una subunidad A y 5 subunidades B (49). Las 5 subunidades B permiten la adhesión a los gangliósidos GM1 y GD1 expresados en la superficie de los enterocitos, esto genera un cambio en la conformación de la toxina y permite la translocación de la subunidad A al interior de los enterocitos. La subunidad A tiene la actividad enzimática de ADP-ribosil transferasa que le permite transferir una molécula de ADP-ribosil del NAD a la subunidad  $\alpha$  de una proteína G estimuladora ( $G_s$ ). Esta modificación alostérica de la proteína genera una sobreactivación de la misma, lo que genera una hiperestimulación de la adenilato ciclasa. Esto permite aumentar la concentración intracelular de AMPc, y de esta forma activar a una proteincinasa dependiente de AMPc, la cual activa al canal del cloro CTFR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator). Este canal al ser fosforilado permite la secreción de cloro desde las células de las criptas, y esto induce la pérdida de agua y sodio desde el enterocito (50). Además, LT puede estimular la síntesis de prostaglandinas, lo cual estimula el sistema nervioso entérico aumentando la secreción y reduciendo la absorción. LT-I es la forma predominante en las cepas humanas; en tanto que, LT-II se la encuentra en las cepas animales (11).

Las enterotoxinas termoestables, STs, son pequeños péptidos ácidos monoméricos que incluyen dos tipos no relacionados: STa y STb, que difieren en cuanto a su estructura y mecanismo de acción. Los genes que codifican estas toxinas se denominan *estA* y *estB*. STa es soluble en metanol

y resistente a proteasas, y STb es insoluble en metanol y sensible a proteasas (45). Los receptores son diferentes así como sus dosis, pero tienen efectos sinérgicos (38). Sólo la toxina STa ha sido asociada a enfermedad humana. STa es un péptido de aproximadamente 2-kDa que está formado por 18 a 19 aminoácidos (18 aa STp o STIa de porcinos, bovinos y humanos, y 19 aa STh o STIb sólo humanos), 6 de los cuales son cisteínas y forman tres puentes disulfuro. El receptor es una proteína de membrana que lo une a la enzima celular guanilato ciclasa. Esta enzima se hiperactiva y genera cGMP que activa a proteincinasas que incrementan la secreción intestinal de agua y electrolitos (11). STa simula al ligando endógeno guanilina que se une a la guanilato ciclasa intestinal; por lo que, se cree que STa representa un caso de mimetismo molecular (51). La toxina STb se asocia con enfermedad en animales y corresponde a un péptido de 48 aminoácidos con 2 puentes disulfuro. STb puede elevar las concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, lo que libera prostaglandina E2 y segrega serotonina. Esto podría dirigir hacia un incremento en la secreción de iones (11). Pitari *et al.* reportaron que la toxina STa suprimía la proliferación de células tumorales de cáncer de colon mediante una señalización de cascada dependiente de la enzima guanilato ciclasa C. Esto sugiere que la alta prevalencia de ETEC en los países en desarrollo podría ser un factor de protección contra el cáncer de colon (52).

### **1.5. Justificación y objetivos del estudio**

Este estudio se enmarca dentro de una investigación de 5 años de duración que trata de valorar el impacto de una nueva carretera en la epidemiología de las enfermedades diarreicas en la zona. Además, en el Ecuador no existen estudios que valoren en detalle la presencia de ETEC en comunidades rurales ni urbanas mediante el empleo de técnicas moleculares. Tampoco existen investigaciones de genotipificación de los aislados de ETEC. Actualmente, el análisis de los agentes infecciosos mediante herramientas de epidemiología molecular pueden ayudar a

entender la forma en cómo circulan dentro de una población humana, y esto puede servir para generar medidas de prevención. Los objetivos que se trazaron en este estudio son tres. Primero, determinar las características epidemiológicas de los aislados de ETEC, EIEC, Shigellae, y EPEC en las comunidades del estudio. Segundo, determinar las características epidemiológicas de los aislados de ETEC y sus 3 tipos de enterotoxinas en las comunidades del estudio. Y tercero, realizar un análisis de genotipificación de los aislados ETEC mediante electroforesis de campo pulsado PFGE.

## **2. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **2.1. Origen de la muestras**

El presente trabajo se enmarcó dentro del estudio del proyecto ECODESS de la Universidad de Michigan en colaboración con la Universidad San Francisco de Quito, y cuyo objetivo general es

estudiar el impacto que tiene una nueva carretera en las infecciones intestinales humanas. Brevemente, el estudio se llevó a cabo en 22 comunidades localizadas en el noroeste de la provincia de Esmeraldas pertenecientes al Cantón Eloy Alfaro. Las comunidades se encuentran a lo largo del sistema de drenaje de tres ríos: Cayapas, Santiago y Onzole. La localidad de Borbón es la principal comunidad con aproximadamente 5000 habitantes y se sitúa en la confluencia de los tres ríos. En esta comunidad se realizó un muestreo al azar de 200 hogares, los cuales fueron seleccionados y enrolados en el estudio luego de que dieron su consentimiento. En el resto de las 21 comunidades, todos los hogares fueron elegidos y se enrolaron el 98% de estos hogares luego de que las familias otorgaron su consentimiento. Cuatro de estas comunidades se encuentran localizadas a lo largo de la nueva carretera. El resto de las comunidades tienen acceso mediante vías fluviales: dos están corriente abajo de Borbón, y quince se ubican corriente arriba de Borbón. Otros detalles de la región y del estudio inicial se pueden encontrar en las publicaciones de Eisenberg, *et al.* 2006 (53) y de Bates, *et al.* 2007 (54). Se anexan un mapa de la región y el listado de las comunidades participantes en la Figura 2 y en la Tabla 3.

## **2.2. Diseño del estudio**

El equipo de campo del proyecto ECODESS realizó visitas periódicas a las comunidades para buscar individuos con diarrea. Un caso de diarrea se definió como un individuo que tubo 3 o más heces sueltas en un período de 24 horas, y un control como un individuo sin síntomas de diarrea en la última semana. El presente estudio se realizó con las muestras colectadas entre marzo de 2006 a julio de 2007.

## **2.3. Muestras de heces y aislados**

En cada salida el equipo recolectó muestras de heces de individuos casos y por cada caso se recogieron muestras de tres controles, uno proveniente de la misma casa del individuo caso y dos de la misma comunidad pero que no cohabiten con el individuo caso. Las muestras fueron

procesadas en el laboratorio de ECODESS en Borbón para obtener aislados de enterobacterias fermentadoras de lactosa (Lac+) y no fermentadoras de lactosa (Lac-). El aislamiento se realizó en agar McConkey Lactosa (Merck). En el caso de los aislados Lac+, se comprobó que eran *E. coli* al sembrarlos en agar Chromocult® (Merk, 2002). En el caso de los aislados Lac-, oxidasa negativos, se procedió a identificarlos mediante sistema API 20E® (BioMérieux, Inc.), y se seleccionó a los que correspondían a *E. coli* o Shigellae. Por cada muestra se colectaron cinco aislados de *E. coli* Lac+ y cualquier aislado Lac- que se identifique como Shigellae o *E. coli*. No todas las muestras tuvieron aislados Lac-. En el caso de los aislados de *E. coli* Lac+ se rotularon con un número y un literal, el número para denotar la muestra y el literal para nominar el aislado (1A, 1B, 1C, 1D, 1E), y en el caso de los aislados de Shigellae o *E. coli* Lac- se rotularon con el número correspondiente de la muestra.

#### **2.4. Detección de patotipos diarreogénicos de *E. coli* mediante PCR**

Se colocaron 300 µl de agua destilada estéril en microtubos y con la ayuda de un palillo de madera estéril se colocó en cada microtubo una pequeña cantidad de cada una de los cinco aislados *E. coli* Lac+ (24 horas de cultivo) obtenidas de cada muestra. Similarmente se procesaron las colonias Lac-. Para liberar el DNA de las bacterias, los microtubos se colocaron en agua hirviendo por 10 minutos. Finalmente, los microtubos se guardaron a -20°C hasta su uso en la amplificación por PCR.

Para realizar la amplificación, se tomaron 2,5 µl del sobrenadante de los microtubos que fueron sometidos a ebullición (descongelados previamente), este sobrenadante podía contener el DNA molde para realizar la amplificación. La concentración de reactivos utilizada para la amplificación se muestra en la Tabla 4.

Los primers utilizados fueron los siguientes: para el gen *bfpA* (bundle-forming pilus) de EPEC EP1: 5'CAATGGTGCTTGCGCTTGCT3', EP2: 5'GCCGCTTTATCCAACCTGGT3' con un amplificado de 324 bp;

para el gen *eltA* (heat-labile toxin gene) de ETEC LT1: 5'GCGACAAATTATACCGTGCT3', LT2: 5'CCGAATTCTGTTATATATGT3' con un amplificado de 708 bp; para el gen *estA* (heat-stable toxin gene) de ETEC ST1: 5'CTGTATTGTCTTTTTACCT3', ST2: 5'GCACCCGGTACAAGCAGGAT3' con un amplificado de 108 bp; y para el gen *ipaH* de Shigellae y EIEC EI-1: 5'GCTGGAAAACTCAGTGCCT3', EI-2: 5'CCAGTCCGTAAATTCATTCT3' con un amplificado de 424 bp (55, 56). La preparación de las reacciones se hicieron en ambiente estéril utilizando cámara de flujo laminar.

La rutina de amplificación consistió en 30 ciclos: denaturación 94°C por 1 minuto, alineamiento de primers 56°C por 2 minutos, y extensión a 72°C por 1 minuto para los genes *eltA*, *bfpA* e *ipaH*. Para la amplificación de *estA* la temperatura de alineamiento cambió a 58°C por igual tiempo para aumentar la especificidad de la reacción. Como controles negativos se utilizaron agua de PCR y DNA de *E. coli* K12.

Los productos amplificados se sometieron a electroforesis en gel de agarosa al 1,6%, teñidos con bromuro de etidio, visualizados y fotodocumentados mediante sistema de transiluminación con UV.

## **2.5. Recuperación y preservación de los aislados positivos**

Luego de detectar un resultado positivo, se procedió a realizar una amplificación de cada uno de los cinco aislados Lac+, por que inicialmente se realizó un pool con los cinco aislados de cada muestra. De esta manera se podía discriminar cual de los cinco aislados Lac+ correspondía a un patotipo, si de los cinco aislados todos eran positivos se seleccionaron tres de cada muestra. A continuación los aislados positivos se sembraron en agar nutritivo, se los preservó en caldo de infusión de corazón cerebro (BHI) con glicerol al 10%, y se los conservó a -80°C. Para

identificarlos cada aislado se nominó con un número y una letra. El número para la muestra y la letra para el aislado.

## **2.6. Susceptibilidad a los antibióticos**

Se utilizó el método estándar de difusión en disco de Kirby-Bauer (57). Los antibióticos (BD BBL™ Sensi Disc™) utilizados fueron ampicilina (10 µg), cefazolina (30 µg), cloramfenicol (30 µg), trimetoprim-sulfamethoxazol (1.25 µg/23.7 µg), gentamicina (10 µg), tetraciclina (30 µg), y ciprofloxacina (5 µg).

## **2.7. Genotipificación mediante electroforesis de campo pulsado (PFGE)**

La relación clonal de los diferentes aislados positivos se valoró mediante electroforesis de campo pulsado (PFGE). Esta técnica permite generar patrones de macro-restricción a partir del DNA genómico con una alta reproducibilidad de los resultados (58-60,65). Para analizar los patrones generados se utilizaron los criterios de Tenover (67).

Se sembraron las bacterias en agar BHI (Brain-Heart Infusion, Merck), en forma confluyente y se incubó a 37°C por 14 a 18 horas. En un tubo de ensayo se dispensó 2 ml de solución de suspensión celular estéril (15 ml 5M NaCl, pH 8.0, 50 ml 0.5M EDTA, pH 8.0, aforado a 1 litro). Se realizó una suspensión celular de cada una de los aislados positivos. La concentración de la suspensión correspondió a un estándar de MacFarland 5. Se transfirió 200 µl de la suspensión celular a un microtubo y se añadió 10 µl de Proteinasa K [20 mg/ml] (New England BioLabs® Inc.). Inmediatamente, a cada microtubo de la suspensión celular se añadió solución de agarosa estéril para bloques (0.5 g Agarosa BioRAD® PFGE Certified, 2,5 ml SDS 20%, 47 ml TE). En seguida, se pipeteó 100 µl de la mezcla de la solución celular con la agarosa en los moldes para generar bloques de agarosa y se permitió la gelificación por un lapso de entre 15 a 20 minutos. Una vez gelificados los bloques, se procedió a la lisis de las bacterias embebidas en el agar. Cada bloque fue removido a un microtubo que contenía buffer de lisis estéril (1,5 ml de buffer de lisis celular

(5 ml 1M Tris, pH 8.0 10 ml 0.5M EDTA, pH 8.0 10 ml 10% Sarcosil) + 40  $\mu$ l de Proteinasa K [20 mg/ml] (New England BioLabs® Inc.). Para permitir la lisis se colocaron los microtubos en baño de agua a 54°C con agitación constante entre 150 a 200 rpm por 12 a 16 horas. Luego, se realizaron seis lavados de los bloques dos con agua estéril y cuatro con TE estéril precalentados a 50°C. Durante cada lavado se dejó cada bloque en un tubo estéril en baño de agua a 50°C con agitación entre 150 a 200 rpm por 15 minutos. Una vez lavados los bloques, se realizó el corte con la enzima de restricción *Xba*I (Invitrogen™) con las siguientes condiciones: 72  $\mu$ l de agua estéril grado biología molecular (Gibco®), 20  $\mu$ l de Buffer 2 10X (Invitrogen™), 2  $\mu$ l de BSA 100X (New England BioLabs, Inc.) y 6  $\mu$ l de Enzima *Xba*I (concentración 60 U/muestra), y se dejó en incubación a 37°C durante 12 a 18 horas.

Luego de la digestión con la enzima, los bloques fueron sometidos a la electroforesis de campo pulsado. El equipo utilizado fue el Sistema CHEF II (DR II BioRAD®). Se preparó el gel con Agarosa certificada para PFGE (BioRAD®), este gel tenía capacidad para 15 pocillos. El marcador de peso molecular se deriva de concatémeros del fago Lambda (New England BioLabs, Inc.), rango es de 50 a 1000 Kb. Se insertaron los bloques de agarosa y el marcador de peso molecular y se sellaron los pocillos con agarosa. Las condiciones de la migración fueron las siguientes: en la cámara de migración se utilizaron 3 litros de TBE 0,5 X con 3 ml de Thiourea, Voltaje = 6 V/cm, Pulso inicial de 2.2 s, Pulso final de 54.2 s, Tiempo = 20 horas de corrida. Finalizada la corrida se retiró el gel y se lo sumergió en la solución de tinción (400 ml de agua destilada + 40  $\mu$ l de bromuro de etidio) durante 25 a 30 minutos en agitación constante. Luego se destiñó el gel en 400 ml de agua destilada durante 6 a 24 horas dejando en agitación constante. Finalmente se documentó mediante fotografía en el transiluminador (Kodak 290) y el software anexo (Kodak 290).

## **2.8. Secuenciamiento del gen *eltA***

Se realizó el secuenciamiento del gen *eltA* de los aislados 28A y 28C ETEC positivos de mayo 2007. Para el secuenciamiento, primero se realizó una amplificación del gen mediante PCR específico como ya se describió en la sección 2.4. Luego, los amplificados fueron liofilizados y enviados al Departamento de Biología Integrativa de la Universidad de Berkeley para el secuenciamiento. Se recibieron 2 secuencias forward y dos secuencias reverse de cada aislado. Solo se pudieron emplear las secuencias forward porque las secuencias reverse tenían mucho ruido y no pudieron ser limpiadas. Las secuencias forward fueron alineadas y limpiadas en el programa MEGA versión 3 (MEGA © 1993-2008). Una vez listas, las secuencias fueron comparadas con otras secuencias del mismo gen mediante la base de datos BLAST de PubMed, y se generó un árbol utilizando como outgroup la secuencia del gen *ctxA* que corresponde a *Vibrio cholerae*.

## **2.9. Cepas de referencia**

Las cepas de referencia fueron provistas gentilmente por el Laboratorio del Dr. Lee Riley de la Universidad de California, Berkeley. Estas cepas incluyeron: ETEC EDL-899 y EDL-1493 con los genes *eltA* (heat-labile enterotoxin) y *estA* (heat-stable enterotoxin), EPEC O111:NM 623-60 y O111:NM 1176-83 con el gen *bfpA* (bundle forming pilus), y EIEC E11 NT con el gen *ipaH* (invasion plasmid antigen). Como control negativo se utilizó la cepa de laboratorio no patogénica *E. coli* K12 provista por el Laboratorio de Microbiología de la Universidad San Francisco de Quito.

## **2.10. Análisis Estadístico y Software empleado**

Se utilizaron los programas StatView 4.0 y Epidat 3.0 para el análisis estadístico. Para generar los dendrogramas se utilizó el programa NTSYSpc-SinQual.

### **3. RESULTADOS**

### 3.1 Análisis epidemiológico de *Escherichia coli* diarreogénicas y *Shigellae*

En la zona de estudio, entre marzo 2006 a julio 2007, se identificaron 312 individuos con diarrea (casos, D+), y se seleccionaron 808 individuos asintomáticos (controles, D-), en total 1125 individuos. De cada individuo se tomó una muestra de heces para aislar enterobacterias, y en total se obtuvieron 1125 muestras. De cada una de las muestras se obtuvo 5 aislados de *E. coli* fermentadoras de lactosa (Lac+); en tanto que, solo se obtuvieron 397 aislados entre *E. coli* no fermentadoras de lactosa (Lac-) y *Shigellae*, del total de 1125 muestras. Todos los aislados se sometieron a una prueba de PCR específica para identificar los patotipos diarreogénicos. Antes de proceder con las pruebas de PCR de los aislados, se realizaron pruebas de PCR con las cepas controles positivos para validar la prueba y comprobar que los primers utilizados amplificaban las secuencias deseadas (ver Figura 3).

De las 1125 muestras recogidas se detectó que el 14,4% (162 muestras) fueron positivas para alguna *E. coli* diarreogénica o *Shigellae*. El principal patotipo diarreogénico detectado fue EIEC con 4,71% (53), en segundo lugar ETEC con 4,53% (51), seguido de *Shigellae* con 4% (45 muestras), y EPEC con el 1,16% (13 muestras), los datos se muestran en la Figura 4.

Del total de aislados de *E. coli* Lac+, el 6,84% (77 aislados) correspondió a algún patotipo diarreogénico de *E. coli*. ETEC representó el 66.23% (51 aislados de los 77 aislados en total); en tanto que, EIEC y EPEC representaron cada uno el 16.88% (13 aislados de los 77). Los datos totales se muestran en la Figura 5 y en la Tabla 5. De los 397 aislados Lac-, EIEC representó el 10.08% (40 aislados); en tanto que *Shigellae* representó el 11.34% (45 aislados). Los datos se muestran en la Figura 6 y en la Tabla 6.

Se determinó que EIEC fue el patotipo más frecuente en el grupo de controles con 39 aislados (4.83%), seguido de ETEC con 23 aislados (2.85%); en tanto que, ETEC fue el principal en el grupo de casos con 27 aislados (8.65%), seguido de *Shigellae* con 25 aislados (8.01%) (ver Tabla 7). En

relación a la edad, se observó que conforme aumentó la edad disminuyó la frecuencia de aislados positivos para todos los patotipos. Sin embargo, EIEC se aisló principalmente en el grupo de los mayores de 20 años siendo la mayoría controles. En cambio, ETEC resultó ser el patotipo más aislado en los grupos de menores de 5 años y de 5 a 20 años. Se observó que en el grupo de menores de 5 años existió una asociación entre la presencia de ETEC y el riesgo de sufrir diarrea (OR = 2,52; 95% CI [0,83-7,63]) pero esta asociación no fue estadísticamente significativa. Igualmente en el grupo de 5 a 20 años existió esta asociación (OR = 2,96; 95% CI [1,09-8,05]) con la diferencia de que el resultado muestra significancia estadística. En la Tabla 8 se muestran los datos para todos los patotipos estratificados por edad y el riesgo de desarrollar diarrea por los diferentes patotipos. Finalmente, se encontraron 9 coinfecciones (0,8%), tanto en casos como en controles, así como en los 3 grupos de edad (Tabla 9).

### **3.2. Análisis epidemiológico de *E. coli* enterotoxigénica (ETEC)**

En el análisis de los 51 aislados positivos para ETEC, 28 (54.9%) correspondieron a casos y 23 (45.1%) correspondieron a controles. En cuanto al tipo de toxina, la mayoría correspondió al tipo LT con 32 aislados (62.7%), seguido de ST con 10 (19.6%) y LT/ST con 9 (17.6%). En cuanto a su distribución por casos y controles tenemos que LT se aisló en 16 casos (57%) y en 16 controles (70%), ST se aisló de 8 casos (29%) y en 2 controles (9%), LT/ST se aisló en 4 casos (14%) y en 5 controles (22%). La toxina LT fue la más común entre los aislados ETEC, y que en total representó el 63%, entre casos y controles (ver Figura 7). Igualmente, LT fue el tipo de toxina más frecuente en los tres grupos de edad, y además, el principal riesgo para desarrollar diarrea en el grupo de menos de 5 años (OR=5,5; 95% CI [1,2-24,81]) en comparación con los otros dos tipos de toxinas (ST y LT/ST). En el grupo de mayores de 20 años se recuperaron únicamente aislados con la toxina LT y todos fueron controles (ver Tabla 10). El promedio de edad en el grupo de casos de los aislados ETEC positivos fue de 3 años 6 meses (rango de 11 meses a 12 años), mientras que en el grupo control fue de 16 años (rango de 2 a 90 años). El grupo de menos de 5 años, tanto en casos

y controles, resultó ser el principal con 47% de los aislados para ETEC. Finalmente, la frecuencia total de ETEC fue de 8.21 casos/100 habitantes en el grupo de menos de 5 años y fue decreciendo en los siguientes grupos etarios. En el grupo de mayores de 20 años se detectaron solo sujetos controles (ver Tabla 11).

### **3.3. Genotificación de los aislados ETEC mediante PFGE**

Se recuperaron los aislados ETEC positivos del periodo comprendido entre enero a julio de 2007 para realizar la genotipificación mediante electroforesis de campo pulsado (PFGE). Durante el mes de marzo 2007 no se detectaron aislados de ETEC. Luego de recuperar los aislados en agar nutritivo se volvió a amplificar por PCR los cinco aislados de cada muestra por separado para determinar cuál de los 5 aislados correspondía a ETEC. Los geles se muestran en las Figuras 8 a 11. Para aumentar la información fenotípica de los aislados se realizó una prueba de sensibilidad a los antibióticos (antibiograma) en la que se identificaron 5 tipos de resistencia, y los resultados se muestran en la Tabla 12.

Entre los aislados de enero 2007 se identificaron dos grupos de patrones de bandas diferentes que correspondieron a los aislados 1A y 1B, que se nominó como grupo a, y los aislados 2E 32C, 46B, 46C, 57B, 8A y 8C, que se nominó como grupo b (ver Figuras 12 y 13). Estos aislados pertenecen a dos comunidades que tienen acceso a una vía transitable, pero comparten el mismo río (Estero María). Entre los aislados de febrero, abril, mayo, junio y julio 2007 se mostraron cinco grupos de patrones de bandas que correspondieron a los aislados 3 A, y 28A (grupo c), 29D (grupo d), 2B, 2E, 26D, 26E, 10A y 10C (grupo e), 28C (grupo f), 15D y 15E (grupo g), y 12A, 12C (grupo h), ver figuras 14 a 19. Estos aislados pertenecen a comunidades que no comparten el mismo río, a excepción de los aislados 2, 26 y 29 que provienen de Borbón. Además, solo los aislados provenientes de Borbón (2, 26 y 29) y de Timbire (3A) tienen acceso a la carretera. En la tabla 13

se muestran las características epidemiológicas, fenotípicas y genotípicas de los aislados estudiados en el periodo de enero a julio 2007.

Interesantemente entre los aislados 28A y 28C de mayo 2007 se observó que presentaron un patrón de bandas diferente sugiriendo que no se trata de clones a pesar de que provienen de la misma muestra (ver Figura 15). Para confirmar el hallazgo, se repitió el PFGE y se evidenció el mismo resultado (ver Figura 17). Entonces, se decidió hacer un secuenciamiento del gen *eltA*, el cual codifica para la toxina LT y se encuentra ubicado en un plásmido, para apoyar la idea de que se trate de un evento de transferencia horizontal de genes.

### **3.4. Secuenciamiento del gen *eltA* de los aislados 28A y 28C ETEC**

Debido a que los aislados 28A y 28C de mayo 2007 mostraron un patrón de bandas distinto confirmado en dos diferentes PFGE, se procedió a secuenciar el gen *eltA* para determinar el grado de similitud. Primero, se amplificó el gen por triplicado (ver Figura 20) para proceder con el secuenciamiento. Luego, al recibir las secuencias, estas fueron limpiadas y se generó un dendrograma para evaluar su relación genotípica, el cual determinó que son secuencias idénticas. El dendrograma se muestra en la Figura 21.

## **4. DISCUSIÓN**

La enfermedad diarreica es la segunda causa de morbi-mortalidad en el Ecuador con más de 500.000 casos y una tasa de 3796,76 x 100.000 habitantes, siendo las zonas más afectadas la costa y el oriente según los datos del Ministerio de Salud Pública del Ecuador para el año 2007 (61). Sin embargo, no existen datos oficiales sobre los agentes causales, su prevalencia ni estudios de epidemiología molecular a nivel nacional ni regional. Actualmente el estudio de enfermedades transmisibles a nivel nosocomial o comunitario mediante técnicas de epidemiología molecular permite conocer la dinámica de los agentes microbiológicos y desarrollar posibles estrategias de control. El presente estudio representa una continuación del que fue llevado a cabo por Vieira *et al.* entre 2003 a 2005 (32), pero además es el primero en el Ecuador que analiza en detalle la prevalencia de ETEC, los tipos de ETEC presentes, así como un análisis de genotipificación, en comunidades remotas mediante técnicas moleculares.

#### **4.1. Patotipos de *E. coli* y *Shigellae* de marzo 2006 a julio 2007**

El análisis de los aislados de *E. coli* diarreogénicas demostró que el patotipo más frecuente fue EIEC con el 4,71%, en segundo lugar se ubicó ETEC con el 4,53%, seguido de *Shigellae* con el 4%, y EPEC el 1,16% (ver Tabla 7). Estos datos concuerdan con el estudio de Vieira *et al.* 2007 (32), además EIEC se aisló principalmente de controles (4,58% con 39 aislados), en tanto que ETEC se aisló mayormente en casos (8,65% con 27 aislados) (ver Tabla 7). Este dato de la alta prevalencia de EIEC sigue siendo inédito en los estudios de prevalencia de *E. coli* diarreogénicas, debido a que en diferentes publicaciones recientes en las que se analizan poblaciones similares de países no industrializados, los agentes más prevalentes son ETEC, *Shigellae*, EPEC, EAEC (*E. coli* enteroagregativa), y EIEC no consta entre las causas principales (62,64,73-77). Este podría deberse a que, tanto en el estudio de Vieira *et al.* como en el presente, se identificaron EIEC en los grupos de enterobacterias Lac+ y Lac-, cuando lo común suele ser tratar de identificar EIEC solo en

los aislados Lac+. De hecho EIEC se recuperó principalmente del grupo Lac- con 40 aislados, y del grupo Lac+ solo se obtuvieron 13 aislados (ver Tablas 5 y 6). Otra posibilidad podría ser que no se investigó EIEC en estos estudios debido a que a menudo se le considera una causa infrecuente de diarrea al compararlo con otros patotipos de *E. coli* o con otros patógenos intestinales (32).

En el análisis global, ETEC, Shigellae y EPEC tuvieron una asociación estadísticamente significativa con el riesgo de causar diarrea. En el caso de ETEC el OR= 3.23 (CI 95%= 1.8-5.7), Shigellae el OR= 3.58 (CI 95%=1.9-6.5) y EPEC OR= 3.68 (CI 95%= 1.1-1.17), lo que indica una fuerte asociación entre la presencia de estos patógenos y el riesgo de causar diarrea. Sin embargo, en el caso EIEC el OR= 0.9 (CI 95%= 0.4-1.72), se podría interpretar como un factor de protección, pero esto se debe a que existe una cantidad mayor de controles (portadores sanos) que de casos (Casos = 14, Controles = 19), además de que el valor de OR no tiene significancia estadística (ver Tabla 8). En el análisis por edad, los cuatro patotipos mostraron tener una asociación entre el riesgo de diarrea y los menores de 5 años, pero en ningún caso se comprobó que esa asociación sea estadísticamente significativa. Este dato llama la atención, debido a que en los menores de 5 años las principales causas de diarrea bacteriana son los patotipos de *E. coli* (3, 29, 70, 72), y aunque se muestra esa asociación, no tiene una significancia estadística. Existen dos posibles explicaciones para este hallazgo. La primera causa se debe a la presencia de una alta cantidad de portadores sanos, lo cual resulta ser común en países no industrializados (71), y la segunda es que la muestra probablemente resultó ser pequeña para demostrar la asociación (ver Tabla 8). Los patotipos de ETEC y Shigellae estuvieron asociados con riesgo de diarrea en el grupo etario de 5 a 20 años, y sólo Shigellae demostró estar asociado a riesgo de diarrea en el grupo de mayores de 20 años (ver Tabla 8). Finalmente, se encontraron 9 coinfecciones repartidas en todos los grupos etarios, en casos y controles, destacándose la presencia de Shigellae en 6 de los 9 casos. Cabe mencionar

que en las coinfecciones de EIEC/Shigellae, EIEC fue aislado en el grupo de *E. coli* Lac+ (ver Tabla 9). Estos hallazgos de coinfecciones han sido reportados en otros estudios (33, 34, 62, 77).

#### **4.2. Aislados de ETEC de marzo 2006 a julio 2007**

En los 51 aislados de ETEC, el 54.9% correspondió a casos y la toxina LT fue la más común con 63%. De igual forma, el riesgo de desarrollar diarrea en los menores de 5 años se asoció con el tipo de toxina LT (OR = 5,5; 95% CI [1,2-24,81]), con los otros tipos de toxinas y grupos etarios no existió asociación (ver tabla 10 y Figura 7). Esto datos se correlaciona con los resultados obtenidos en otros países del continente americano en los que la principal toxina reportada es LT (16,26), y además, con el hecho de que los niños menores de 5 años son los más afectados por esta bacteria intestinal (16,31). En el grupo de 5 a 20 años y mayores de 20 años, ETEC se aisló más en el grupo de controles (Tabla 10 y Figura 7). Este dato se podría asociar a que los sujetos expuestos en áreas endémicas desarrollan inmunidad de mucosa contra la bacteria conforme siguen expuestos a ella (32,63), pero además podrían servir como reservorios o portadores asintomáticos. La alta prevalencia de individuos asintomáticos portadores de ETEC podría explicar la alta incidencia de diarrea del viajero en países como el Ecuador (32); sin embargo, esto se ve limitado porque no representa una muestra nacional.

Interesantemente, se destaca que ST estuvo presente en 8 casos y sólo en 2 controles de los 10 aislados; en tanto que, LT y LT/ST estuvieron por igual en casos y controles (ver Tabla 10). Esto se explica porque la toxina ST tiende a ser responsable de un mayor número de casos de diarrea, sobretodo en niños, lo que ha sido descrito en el estudio sistemático de Gupta *et al.* 2008 (31). Finalmente, los datos del tipo de enterotoxina de ETEC y su análisis epidemiológico son los primeros en el Ecuador debido a que los dos estudios previos (32, 78) sobre ETEC no reportan estos hallazgos.

#### **4.3. Genotipificación por electroforesis de campo pulsado (PFGE) de ETEC**

En el análisis de genotipificación mediante PFGE de las 24 aislados de ETEC de enero a julio 2007 se pudieron identificar los siguientes grupos: uno de 7 aislados (grupo b), otro de 6 aislados (grupo e), y el resto de uno o dos aislados (grupos a, c, d, f, g y h) (Figuras 13, 15, 17, 19, y Tabla 13). El grupo b estuvo compuesto por 7 aislados que provinieron de las comunidades Colón Eloy y San Agustín, que comparten el río Estero María. El grupo e estuvo compuesto por seis aislados de las comunidades de Borbón y La Loma. En este caso, el río Borbón es compartido por estas comunidades. El compartir los ríos podría ser el motivo por el cual los aislados son clones, es decir, porque tienen el mismo patrón de macrorrestricción en el PFGE (grupo b y grupo e, respectivamente). El resto de 11 aislados no estuvieron relacionados con estos dos grupos ni entre ellos, sugiriendo que la presencia de ETEC se debe probablemente a la presencia de múltiples clones. En relación con el acceso a una vía transitable y la clonalidad, los aislados del grupo b (San Agustín y Colon Eloy), los aislados 2, 26 y 29 (Borbón) del grupo e y el aislado 3 A (Timbire) del grupo c están relacionados con una comunidad que tiene acceso a una vía transitable. El resto de aislados provienen de comunidades que solo disponen de acceso fluvial.

La presencia de varios clones de ETEC concuerda con otros estudios realizados en la misma zona con los patotipos EIEC (32), y EPEC (Schreckinger, *et al.* datos no publicados). De igual manera, el estudio de Al-Gallas, *et al.* 2007 (33), demostró que en los aislados de ETEC existe diversidad clonal y que esto se puede deber a la capacidad de transferencia horizontal de genes que posee *E. coli* (11,12). Otra evidencia se muestra en el estudio de Turner, *et al.* 2006 (68) en el que la cepas de ETEC no son clonales en su mayoría y que aparentemente tienen un origen polifilético. Sin embargo, en el estudio de Pacheco *et al.* 2001 en el que se analizaron 29 aislados de ETEC provenientes de América Latina y España mediante PFGE y RAPD, y encontraron que compartían su huella digital

molecular. Esto se podría deber a que en este estudio emplearon una solo tipo de cepa de ETEC muy bien caracterizado: O153:H45 CFA/I ST, y no una variedad de aislados (66).

Finalmente, dos aislados de ETEC (28A y 28C), que provinieron de un mismo individuo, tuvieron distintos patrones de PFGE (Figuras 14 y 16), lo cual sugiere una co-infección o transferencia horizontal de genes. La homología de las secuencias de los genes LT de ambos aislados (Figuras 20 y 21) indica que estos genes podrían haber sido transferidos horizontalmente entre estos dos aislados. La posibilidad de que transferencia horizontal de estos genes este ocurriendo en estas comunidades, podría también contribuir a la gran diversidad de ETECs encontradas en esta zona, como ha sido reportado en otros áreas remotas (33,34).

## **5. Conclusiones**

El patotipo diarreogénico de *E. coli* dominante en las 22 comunidades entre marzo 2006 a julio 2007 fue EIEC, que se recuperó principalmente de las *E. coli* Lac- y de sujetos controles. ETEC representó el segundo patotipo en frecuencia, por arriba de Shigellae y EPEC, y a diferencia de EIEC, fue aislado principalmente en casos. Estos tres últimos patotipos son los que estuvieron asociados a la probabilidad de desarrollar diarrea. En el grupo de las ETECs, el tipo de toxina predominante fue LT y estuvo asociada con el riesgo de desarrollar diarrea en los menores de 5 años.

Al realizar el estudio de genotipificación con las ETECs del periodo enero a julio 2007, se evidenció que presentaron diversidad clonal, a excepción de los aislados que provienen de comunidades que comparten el mismo río (grupos b y e). En los aislados 28A y 28C de mayo 2007 se evidenció mediante PFGE que no eran clones, a pesar de provenir de la misma muestra, y al secuenciar el gen *eltA* se encontró que era idéntico. Esto podría sugerir que se trata de un evento de transferencia horizontal de genes.

## **6. Recomendaciones**

Se podría utilizar una prueba de PCR multiplex para poder detectar los aislados en una misma reacción de PCR, debido a que se consume mucho tiempo haciéndolo en forma individual. Igualmente, esto permitiría incluir otros patotipos diarreogénicos de *E. coli*, como enteroagregativa (EAEC), adherencia difusa (DAEC), y enterohemorrágica (EHEC); lo que serviría para determinar la prevalencia de todos los patotipos diarreogénicos que puedan estar circulando en la zona.

Se debería proseguir con el estudio para determinar si entre los aislados 28 A y 28 C existió un evento de transferencia horizontal de genes.

Finalmente, se debería hacer un análisis global con los datos del estudio ECODESS, que abarcan 5 años, para valorar la asociación entre diarrea y patotipos de *E. coli*; así como, la prevalencia de los patotipos de *E. coli*.

## 7. REFERENCIAS

- (1) World Health Statistics, 2008. Organización Mundial de la Salud (WHO): <http://www.who.int/en/>
- (2) Kosek M, et al. 2003 The global burden of diarrhoeal disease, as estimated from studies published between 1992 and 2000. *Bull World Health Organ.* 81(3):197-204
- (3) Marcos LA, DuPont HL. 2007 Advances in defining etiology and new therapeutic approaches in acute diarrhea. *J Infect.* 2007 55(5):385-93
- (4) Mackell S. 2005 Traveler's Diarrhea in the Pediatric Population: Etiology and Impact. *Clin Inf Dis* 41:S547-52
- (5) Diemert DJ. 2006 Prevention and self-treatment of traveler's diarrhea. *Clin Microbiol Rev* 19(3):583-94
- (6) Yates J. 2005 Traveler's diarrhea. *Am Fam Physician.* 71(11):2095-100
- (7) Leung AK, et al. 2006 Traveler's diarrhea. *Adv Ther* 23(4):519-27
- (8) Riddle M, et al. 2006 Incidence, etiology, and impact of diarrhea among long-term travelers (US military and similar populations): a systematic review. *Am J Trop Med Hyg* 74(5):891-900
- (9) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=511145> NCBI Taxonomy Browser
- (10) Wirth T, et al. 2006 Sex and Virulence in *Escherichia coli*: an evolutionary perspective. *Mol Microbiol* 60(5):1136-1151
- (11) Kaper J, et al. 2004 Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol.* 2:123-140
- (12) Blattner F, et al. 1997 The Complete Genome Sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* 277:1453-1462
- (13) Schaechter M, et al. 2001 *Escherichia coli* and *Salmonella* 2000: the View from Here *Microbiol Mol Bio Rev* 65(1):119-130
- (14) Groisman EA, et al. 1996 Pathogenicity islands: bacterial evolution in quantum leaps. *Cell* 87:791-794
- (15) Nataro J y Kaper J. 1998 Diarrheogenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev* 11(1):142-201

- (16) Qadri F, et al. 2005 Enterotoxigenic *Escherichia coli* in Developing Countries: Epidemiology, Microbiology, Clinical Features, Treatment, and Prevention. *Clin Microbiol Rev* 18(3):465–483
- (17) Smith HW, et al. 1971 The transmissible nature of enterotoxin production in a human enteropathogenic strain of *E. coli*. *J Med Microbiol* 4:301-305
- (18) Skerman FJ, et al. 1972 Plasmid-Associated Enterotoxin Production in a Strain of *Escherichia coli* Isolated from Humans. *Infect Imm* 5(4):622-624
- (19) McConnell M, et al. 1980 Plasmids Coding for Heat-Labile Enterotoxin Production Isolated from *Escherichia coli* O78: Comparison of Properties. *J Bacteriol* 143(1):158-167
- (20) Willshaw G, et al. 1982 Genetic and Molecular Studies of Plasmids Coding for Colonization Factor Antigen I and Heat-Stable Enterotoxin in Several *Escherichia coli* Serotypes. *Inf Imm* 37(3):858-868
- (21) Smith HR, et al. 1982 Mapping of a Plasmid, Coding for Colonization Factor Antigen I and Heat-Stable Enterotoxin Production, Isolated from an Enterotoxigenic Strain of *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 149(1):264-275
- (22) Peñaranda ME, et al. 1983 Plasmids in Enterotoxigenic *Escherichia coli* Belonging to Serogroups O6, O8, O80, O85, and O139. *J Bacteriol* 154(2):980-983
- (23) Echeverría P, et al. 1986 Plasmids for Colonization Factor Antigens I and II, Heat-Labile Enterotoxin, Heat-Stable Enterotoxin A2 in *Escherichia coli*. *Inf Imm* 51;2: 626-630
- (24) Moseley SL. 1983 Isolation and nucleotide sequence determination of a gene encoding for a heat-stable enterotoxin of *E. coli*. *Infect Immun* 39:1167-1174
- (25) Yamamoto T y Takeshi Y. 1983 Plasmids of Enterotoxigenic *Escherichia coli* H10407: Evidence for Two Heat-Stable Enterotoxin Genes and a Conjugal Transfer System. *J Bacteriol* 153(3):1352-1360
- (26) Jiang, et al. 2000 Characterization of Enterotoxigenic *Escherichia coli* Strains in Patients with Travelers' Diarrhea Acquired in Guadalajara, Mexico, 1992–1997. *J Inf Dis* 2000;181:779–82
- (27) Yamamoto T, y Yokota T. 1981 *Escherichia coli* Heat-Labile Enterotoxin Genes Are Flanked by Repeated Deoxyribonucleic Acid Sequences. *J Bacteriol* 145(2):850-860
- (28) So M y McCarthy BJ. 1980 Nucleotide sequence of transposon Tn 1681 encoding a heat-stable toxin (ST) and its identification in enterotoxigenic *Escherichia coli* strains. *PNAS* 77:4011–401
- (29) Gaastra W y Svennerholm AM 1996 Colonization factors of human enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC). *Trends Microbiol* 4:444–452

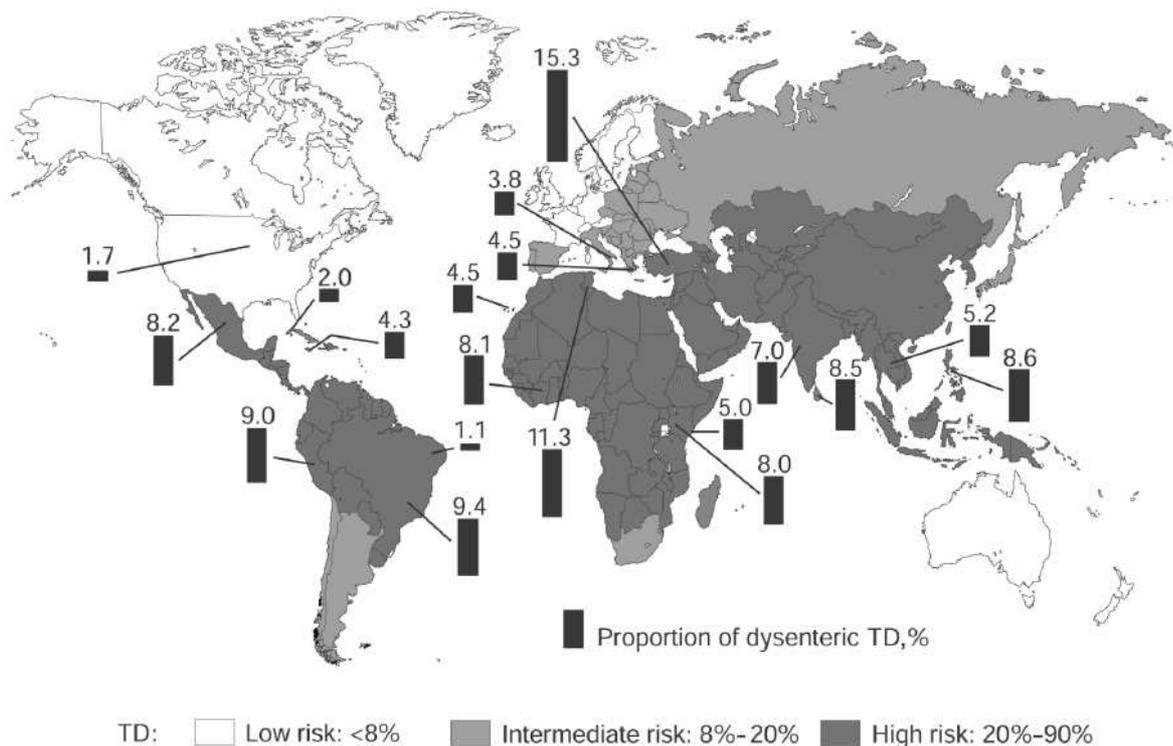
- (30) Nagy B. y Fekete PZ. 1999 Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) in farm animals. *Vet Res* 30: 259–284
- (31) Gupta SK, et al. 2008 Part III. Analysis of data gaps pertaining to enterotoxigenic *Escherichia coli* infections in low and medium human development index countries, 1984-2005. *Epidemiol Infect* 136(6):721-38
- (32) Vieira N, et al 2007 High Prevalence of Enteroinvasive *Escherichia coli* isolated in a Remote Region of Northern Coastal Ecuador. *Am J Trop Med Hyg* 76(3):528-533
- (33) Al-Gallas N, et al. 2007 Etiology of Acute Diarrhea in Children and Adults in Tunis, Tunisia, with Emphasis on Diarrheagenic *E. coli*: Prevalence, Phenotyping, and Molecular Epidemiology. *Am J Trop Med Hyg* 77(3):571-582
- (34) Peruski L, et al. 1999 Phenotypic Diversity of Enterotoxigenic *E. coli* Strains from a Community-Based Study of Pediatric Diarrhea in Periurban Egypt *J Clin Microbiol* 37(9):2974-2978
- (35) Oyoyo, B et al. 2001 Toxins and Colonization Factor Antigens of Enterotoxigenic *E. coli* Among Residents of Jakarta, Indonesia. *Am J Trop Med Hyg* 65(2):120-124
- (36) Qadri F, et al. 2007 Disease burden due to enterotoxigenic *Escherichia coli* in the first 2 years of life in an urban community in Bangladesh. *Infect Immun* 75(8):3961-3968
- (37) DuPont HL, et al. 1971. Pathogenesis of *Escherichia coli* diarrhea. *N. Engl. J. Med.* 285:1–9
- (38) Turner S, et al. 2006 Weapons of mass destruction: virulence factors of the global killer Enterotoxigenic *Escherichia coli* *FEMS Microbiol Lett* 263:10–20
- (39) Evans d, et al. 1975 Plasmid-controlled colonization factor associated with virulence in *Escherichia coli* enterotoxigenic for humans. *Infection and Immunity* 12(3):656-66
- (40) Parsek MR y Singh PK. 2003 Bacterial biofilms: an emerging link to disease pathogenesis. *Annu Rev Microbiol* 57: 677–701
- (41) Smith HW. 1976 Neonatal *Escherichia coli* infections in domestic mammals: transmissibility of pathogenic characteristics. *Ciba Found Symp* (42):45-72
- (42) Smith HW, Halls S. 1967 Observations by the ligated intestinal segment and oral inoculation methods on *E. coli* infections in pigs, calves, lambs and rabbits. *J Pathol Bacteriol* 93:499-531
- (43) Sack RB, et al. 1971 Enterotoxigenic *E. coli* isolated from patients with severe cholera-like disease. *J Infect Dis* 123:378-385
- (44) Dallas W, et al. 1979 The molecular nature of the heat-labile enterotoxin (LT) of *E. coli*. *Nature* 277:406-407

- (45)Blanco J, et al. 1993 *Escherichia coli* enterotoxigénicos, necrotoxigénicos y verotoxigénicos de origen humano y bovino. Capítulo 2, pp 15-17
- (46)Green BA, et al. 1983 Evidence that a new enterotoxin of *Escherichia coli* which activates adenylate cyclase in eucaryotic target cells is not plasmid mediated. *Infect Immun* 41(1):383-90
- (47)Dallas W, et al. 1979 Cistrons Encoding *Escherichia coli* Heat-Labile Toxin. *J Bacteriology* 139(3):850-858
- (48)Evans DG, et al. 1997 Virulence factors of enterotoxigenic *Escherichia coli*. *J Infect Dis* 136 (Suppl.):118–123
- (49)Sixma TK, et al. 1991 Crystal structure of a cholera toxin related heat labile enterotoxin from *E. coli*. *Nature* 351:371–377
- (50)Spangler, B. D. 1992 Structure and function of cholera toxin and the related *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. *Microbiol Rev* 56:622–647
- (51)Currie M, et al. 1992 Guanylin: An endogenous activator of intestinal guanylate cyclase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89:947-951
- (52)Pitari GM, et al. 2003 Bacterial enterotoxins are associated with resistance to colon cancer. *PNAS* 100(5):2695–2699
- (53)Eisenberg JN, et al. 2006 Environmental change and infectious disease: How new roads affect the transmission of diarrheal pathogens in rural Ecuador. *PNAS* 103;51: 19460–19465
- (54)Bates S, et al. 2007 Relating Diarrheal Disease to Social Networks and the Geographic Configuration of Communities in Rural Ecuador. *Am J Epidemiol* 166(9): 1088–1095
- (55)Tornieporth NG, et al. 1995 Differentiation of pathogenic *Escherichia coli* strains in Brazilian children by PCR. *J Clin Microbiol* 33;5:1371–1374
- (56)Gunzburg ST, et al. 1995 Identification of enteropathogenic *Escherichia coli* by PCR-based detection of the Bundle-Forming Pilus Gene. *J Clin Microbiol* 33;5:1375-1377
- (57)Coyle M, et al. 2005 Manual de Pruebas de Susceptibilidad Antimicrobiana. Organización Panamericana de la Salud y American Society for Microbiology. Capítulo 4 Páginas 39-52
- (58)Schwartz DC, y Cantor CR 1984. Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. *Cell* 37(1):67-75
- (59)Smith CL, et al. 1987 A physical map of the *Escherichia coli* K12 genome. *Science* 12;236(4807):1448-53
- (60)Chu G, et al. 1986 Separation of Large DNA Molecules by Contour-Clamped Homogeneous Electric Fields. *Science* 234:1582-1585

- (61) Ministerio de Salud Pública del Ecuador <http://www.msp.gov.ec/>
- (62) Nguyen T, et al. 2005 Detection and Characterization of Diarrheagenic *Escherichia coli* from Young Children in Hanoi, Vietnam. *J Clin Microbiol* 43(2):755–760
- (63) Qadri F, et al. 2007 Mucosal and Systemic Immune Responses in Patients with Diarrhea Due to CS6-Expressing Enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Inf Imm* 75(5):2269–2274
- (64) Presterl E, et al. 2003 Frequency and Virulence Properties of Diarrheagenic *E. coli* in Children with Diarrhea in Gabon. *Am J Trop Med Hyg* 69:406-410
- (65) Arbeit RD, et al. 1990 Resolution of Recent Evolutionary Divergence among *E. coli* from Related Lineages: The Application of PFGE to Molecular Epidemiology. *J Inf Dis* 161:230-235
- (66) Pacheco A, et al. 2001 Beyond Serotypes and Virulence-Associated Factors: detection of Genetic Diversity among O153:H45 CFA/I Heat-Stable Enterotoxigenic *Escherichia coli* Strains. *J Clin Microbiol* 39(12):4500-4505
- (67) Tenover, *et al.* 1996 Interpreting Chromosomal DNA Restriction Patterns Produced by PFGE: Criteria for Bacterial Strain Typing. *J Clin Microbiol* 33(9):2233-2239
- (68) Turner S, et al. 2006 Phylogenetic Comparisons Reveal Multiple Acquisitions of the Toxin Genes by Enterotoxigenic *Escherichia coli* Strains of Different Evolutionary Lineages. *J Clin Microbiol* 44(12):4528-4536
- (69) Steffen R. 2005 Epidemiology of Traveler's Diarrhea. *Clin Inf Dis* 41:S536–540
- (70) Niyogi SK, Saha MR, De SP. 1994 Enteropathogens associated with acute diarrhoeal diseases. *Indian J Public Health* 38(2):29-32.
- (71) Taylor DN, Echeverria P. 1993 Diarrhoeal disease: current concepts and future challenges. Molecular biological approaches to the epidemiology of diarrhoeal diseases in developing countries. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 87 Suppl 3:3-5
- (72) O'Ryan M, Prado V, Pickering LK. 2005 A millennium update on pediatric diarrheal illness in the developing world. *Semin Pediatr Infect Dis* 16(2):125-36.
- (73) Alizadeh AH, et al. 2007 *Escherichia coli*, Shigella and Salmonella species in acute diarrhoea in Hamedan, Islamic Republic of Iran. *East Mediterr Health J* 13(2):243-9.
- (74) Gambandé T, Damiano M, Borda N, Notario R, Aita J. 2006 Prevalence of the bacteria causing diarrhea in a Rosario Hospital, Argentina. *Rev Fac Cien Med Univ Nac Cordoba* 63(3):36-8.
- (75) Vargas M, Gascon J, Casals C, et al. 2004 Etiology of diarrhea in children less than five years of age in Ifakara, Tanzania. *Am J Trop Med Hyg*. May;70(5):536-9.

- (76)Orlandi PP, Magalhães GF, Matos NB, et al. 2006 Etiology of diarrheal infections in children of Porto Velho (Rondonia, Western Amazon region, Brazil). *Braz J Med Biol Res* 39(4):507-17.
- (77)Paniagua GL, Monroy E, García-González O, et al. 2007 Two or more enteropathogens are associated with diarrhoea in Mexican children. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 28;6:17.
- (78)Brüssow H, Sidoti J, Link H, et al. 1990 Age-specific prevalence of antibody to enterotoxigenic *Escherichia coli* in Ecuadorian and German children. *J Infect Dis* 162(4):974-7.

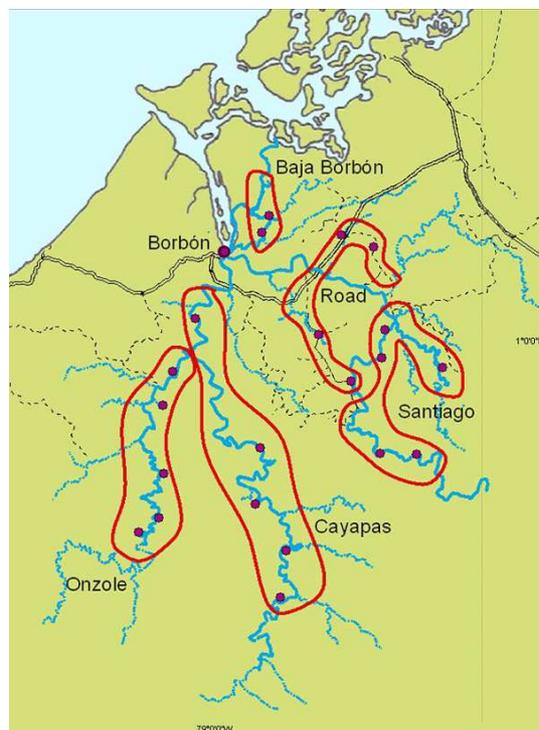
**Figura 1. Zonas de riesgo para diarrea del viajero a nivel mundial**



**Figure 1.** Worldwide risk zones for travelers' diarrhea (TD) and proportion of cases of dysenteric TD (i.e., TD resulting in fever and/or accompanied by blood admixed to the stools) associated with a stay of 2 weeks abroad [6].

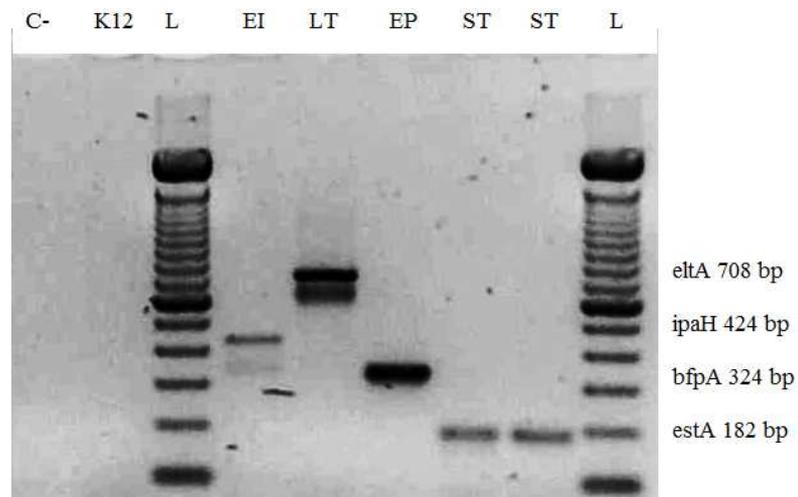
Se muestran las zonas clasificadas según el riesgo. Ecuador está ubicado en una zona de alto riesgo.  
 Tomado de: Steffen R. (2005) Epidemiology of Traveler's Diarrhea. Clin Inf Dis 41:S536-40

Figura 2. Mapa de la zona del estudio en el noroeste de la provincia de Esmeraldas



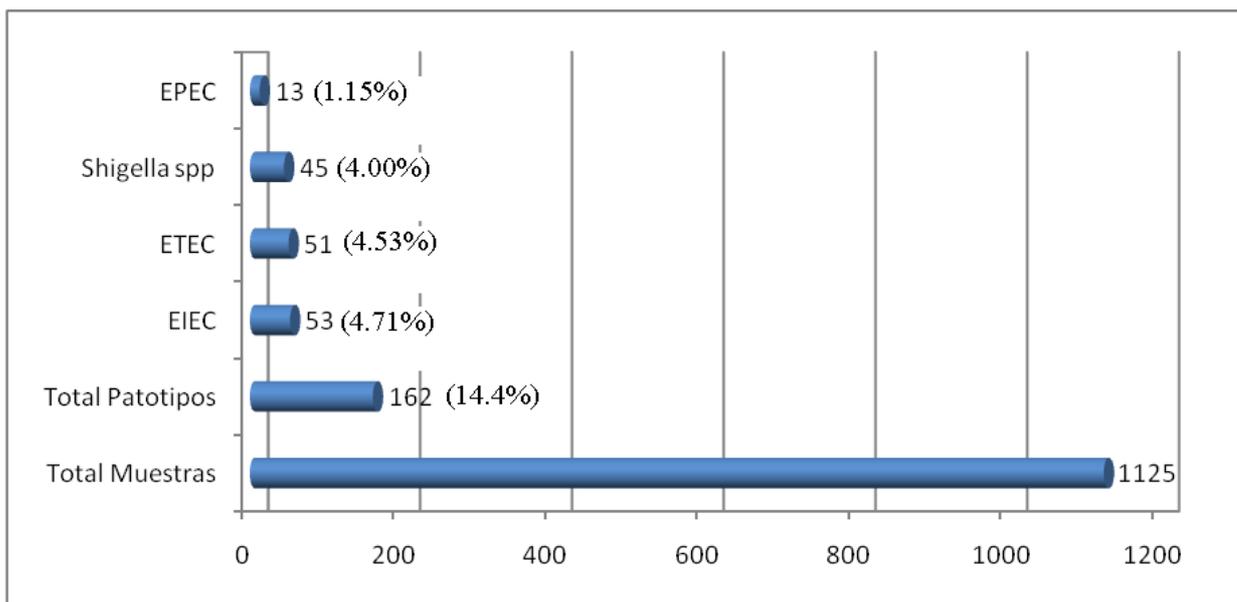
Los puntos lilas representan las comunidades del estudio. Las líneas azules representan los 3 sistemas fluviales de la región. La doble línea negra continua representa la carretera. Las líneas simples punteadas representan los caminos de segundo y tercer orden.

**Figura 3. Validación de la prueba de PCR con cepas controles para detectar *Escherichia coli* diarreogénicas y *Shigellae***



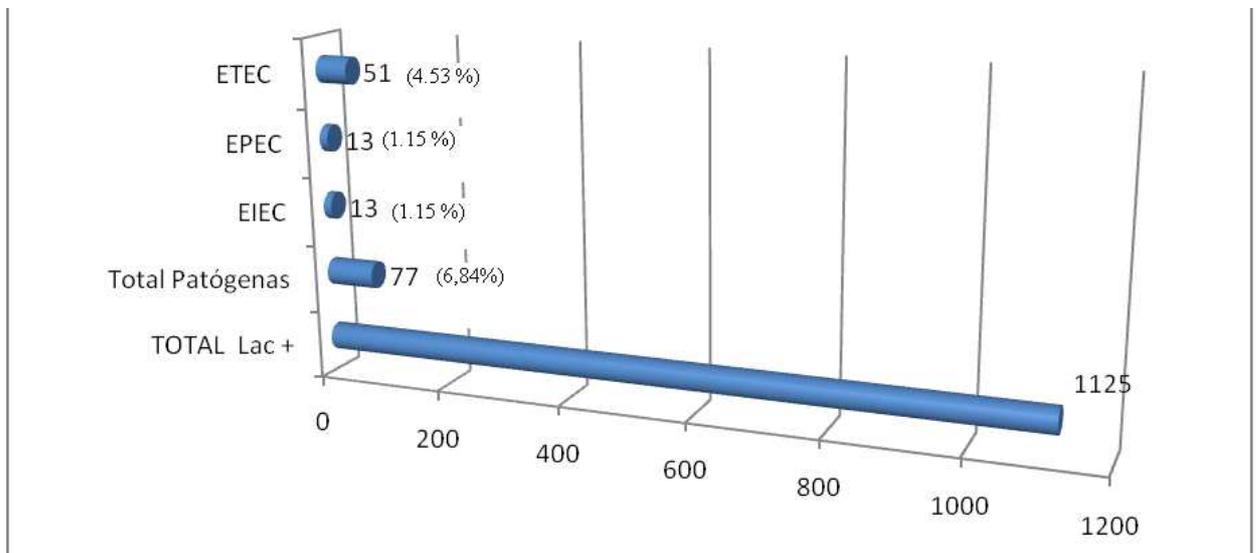
Cada gen amplificado es específico para cada patotipo. Los productos de PCR fueron corridos en un gel de agarosa al 1,6% con TBE 1X. C- = control negativo (agua de PCR en la reacción), K12 = control de *E. coli* K12, L = ladder de 100 bp, EI = cepa EI NT E11, LT = cepa ETEC-LT/ST EDL 899, EP = cepa EPEC O111:NM623-80, ST = cepa ETEC-LT/ST EDL 899.

**Figura 4. Número total y porcentual de aislados positivos para patotipos diarreogénicos detectados mediante PCR en las 1125 muestras provenientes de las 22 comunidades entre marzo 2006 a julio 2007**



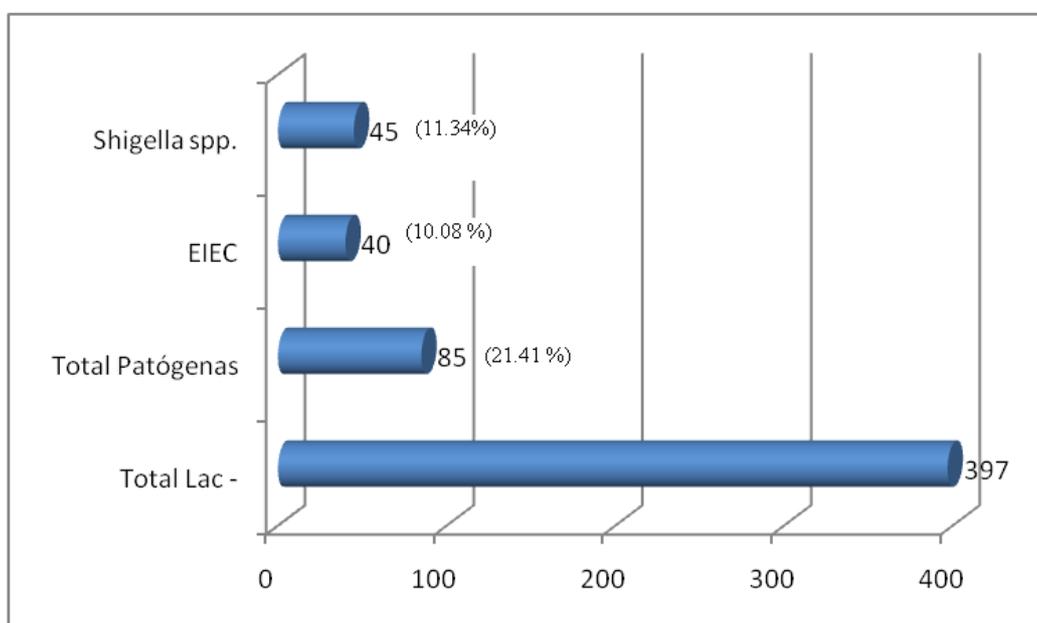
EPEC: *E. coli* enteropatógena, ETEC: *E. coli* enterotoxigénica, EIEC: *E. coli* enteroinvasiva.

**Figura 5. Número total y porcentual de aislados positivos para patotipos diarreogénicos detectados por PCR en el grupo *E. coli* lactosa positivas (Lac+) entre marzo 2006 a julio 2007**



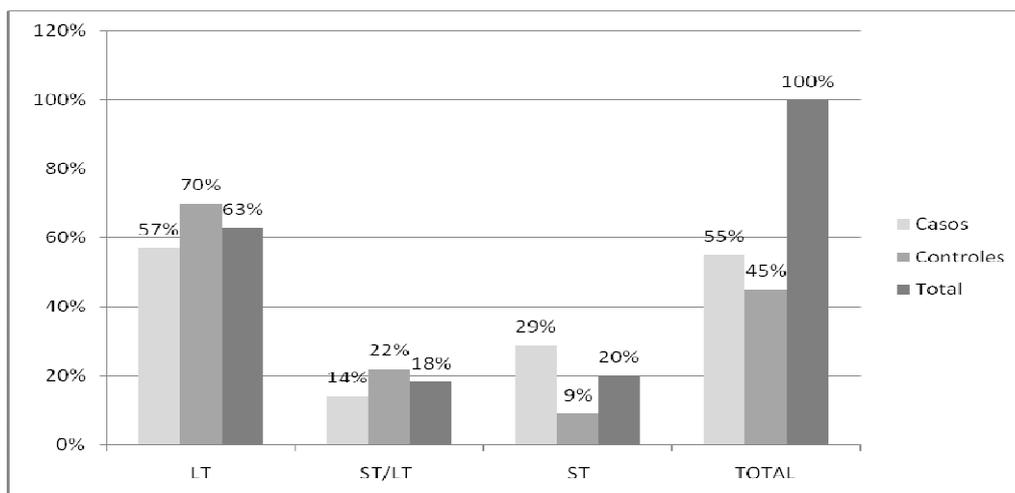
ETEC: *E. coli* enterotoxigénica, EPEC: *E. coli* enteropatógena, EIEC: *E. coli* enteroinvasiva.

Figura 6. Número total y porcentual de aislados positivos para patotipos diarreogénicos detectados por PCR en el grupo *E. coli* lactosa negativas (Lac -) y *Shigellae* entre marzo 2006 a julio 2007.



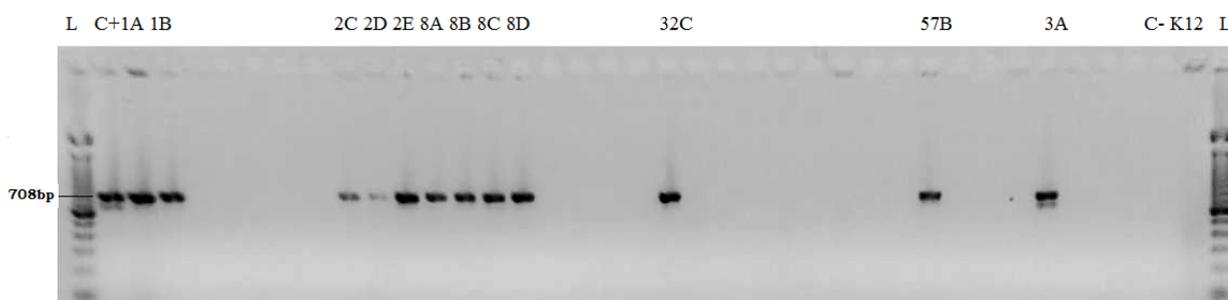
EIEC: *E. coli* enteroinvasiva

**Figura 7. Frecuencia de los Aislados ETEC Positivos Estratificados por tipos de enterotoxina, y por Casos y Controles (Total de Aislados ETEC positivos = 51)**



LT = enterotoxina termolábil, ST = enterotoxina termoestable. LT/ST representan aislados que disponen de los tipos de enterotoxina.

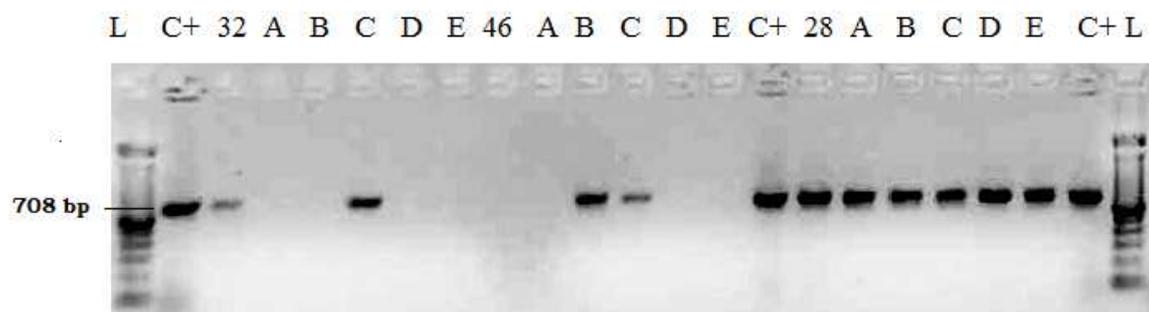
**Figura 8. Aislados positivos para ETEC-LT detectados por PCR de enero y febrero 2007**



El número representa la muestra y el literal al aislado. Sólo están rotuladas los aislados positivos. Enero 2007: aislados 1A, 1B, 2C, 2D, 2E, 8A, 8B, 8C, 32C y 57B; febrero 2007: aislado 3A. No se pudo observar la amplificación para los aislados de la muestra 46, que en el screening inicial resultó positiva, por lo que se repitió el PCR y se muestra en la Figura 10. L = ladder 100bp, C+ = cepa control ETEC EDL 899, K12 = cepa control *E. coli* K12, y C - = control negativo.

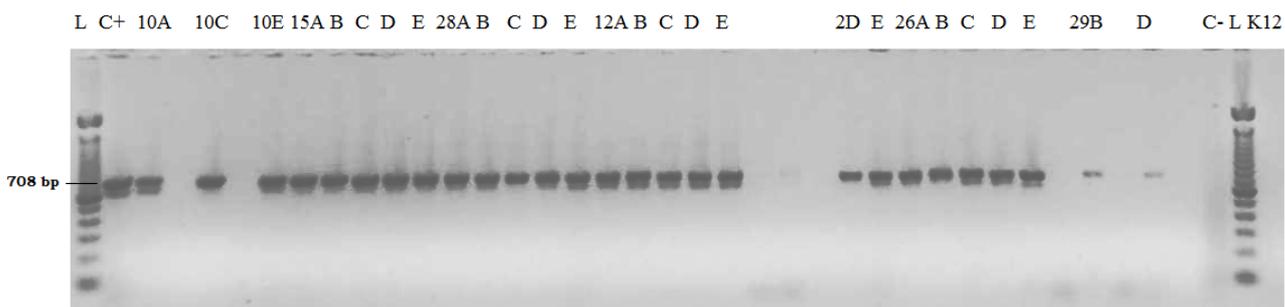


**Figura 9. Aislados positivos para ETEC-LT detectados por PCR de enero 2007 de las muestras 32 y 46, y mayo 2007**



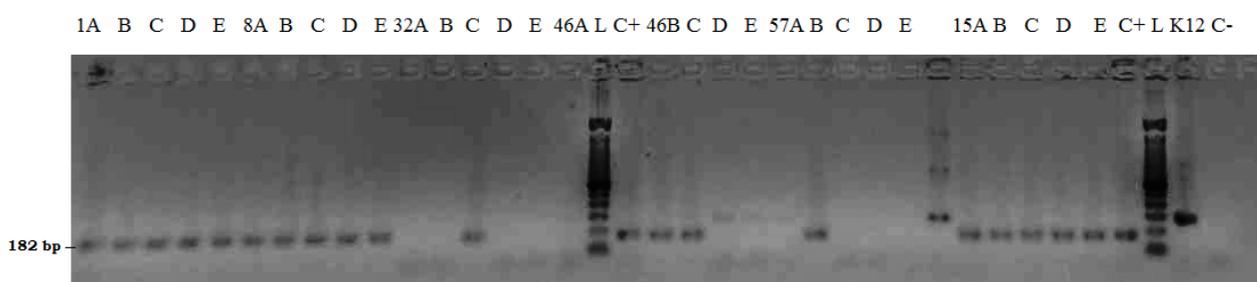
El número representa la muestra y el literal al aislado. Enero 2007: aislados 32A-E y 46A-E; Mayo 2007: aislados 28A-E. L = ladder 100 bp, C+ = cepa control ETEC EDL 899.

**Figura 10. Aislados positivos para ETEC-LT detectados por PCR de abril, mayo, junio y julio 2007**



El número representa la muestra y el literal el aislado. Sólo están rotuladas los aislados positivos. Abril: aislados 10A, 10C, 10E. Mayo: aislados 15A-E y 28A-E, junio: aislado 12A-E, julio: aislados 2D, 2E, 26 A-E y 29B, 29D. L = ladder 100 bp, C+ = cepa control ETEC EDL 899, K12 = cepa control *E. coli* K12, y C- = control negativo.

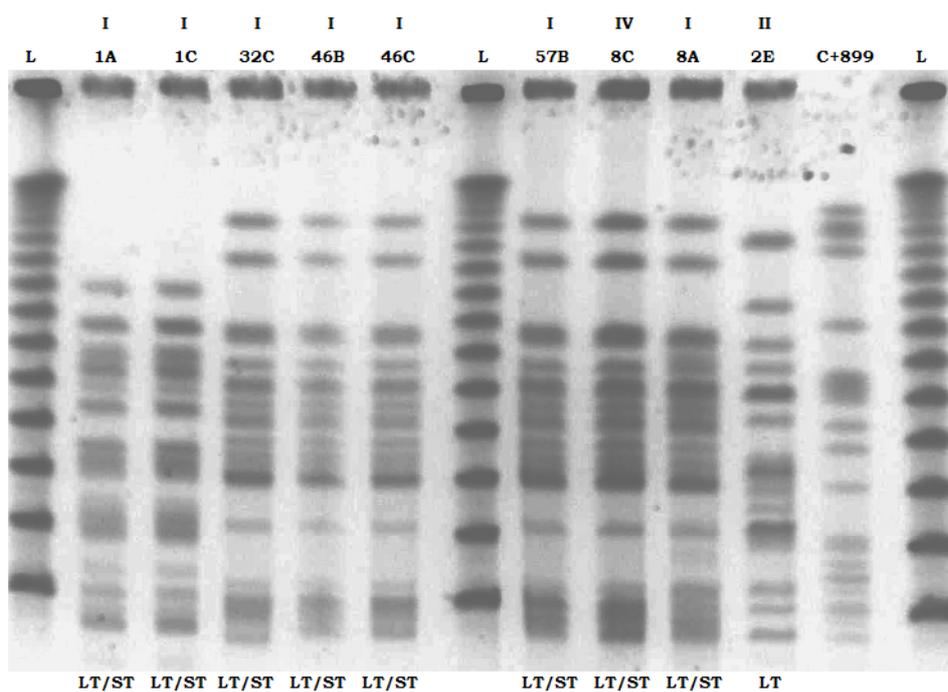
**Figura 11. Aislados positivos para ETEC-ST detectados por PCR de enero y mayo 2007**



El número representa la muestra y el literal el aislado. Sólo están rotuladas los aislados positivos. Enero: aislados 1A-E, 8A-E, 32C, 46B, 46C, 57B; Mayo: aislado 15A-E. L = ladder 100 bp, C+ = cepa control ETEC EDL 899, K12 = cepa control *E. coli* K12, y C - = control negativo.

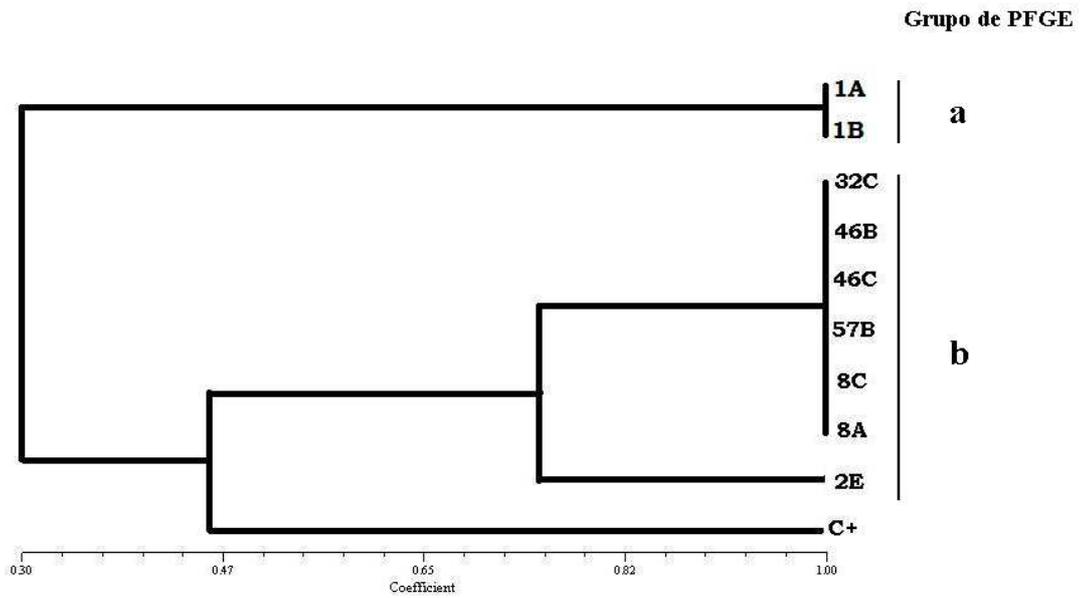


**Figura 12. Gel de PFGE de los aislados de ETEC obtenidos de enero 2007**



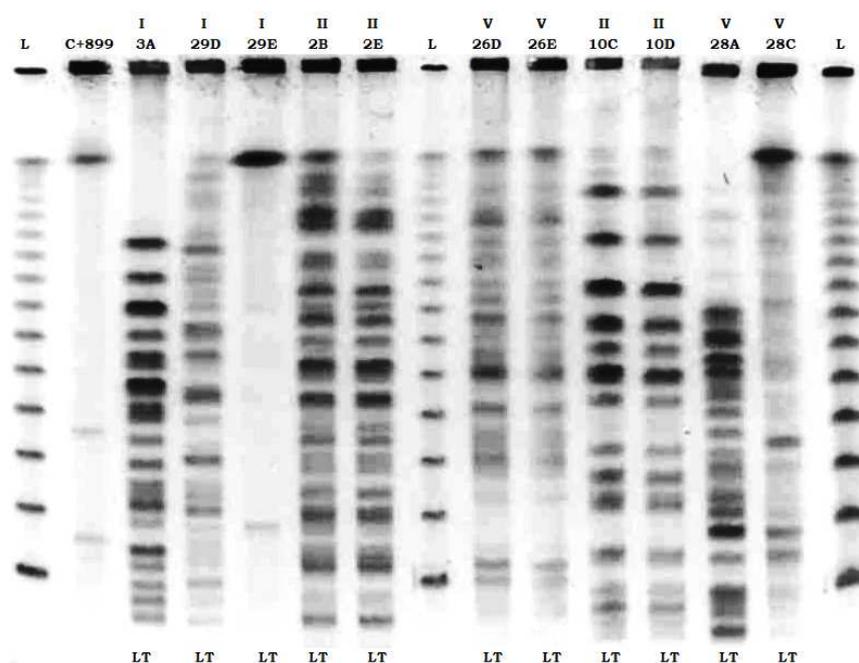
Se nota un patrón similar de bandas de los aislados 32C, 46B, 46C, 57B, 8A y 8C. Los aislados 1A, 1C y 2E muestran un patrón de bandas distinto. I, II, IV = tipo de resistencia a los antibióticos. L = ladder, y 899 = C+ (ETEC EDL 899). LT/ST, LT = tipo de enterotoxinas.

**Figura 13. Dendrograma de ETECs aislados durante enero 2007 en base al patrón de bandas generado por PFGE de la figura 12**



Se muestra la relación clonal entre los aislados 32C a 8A. Los aislados 1A, 1B y 2E no comparte esa relación clonal. El dendrograma fue generado mediante coeficiente de DICE y agrupamiento SAHN con método de UPGMA en el programa NTSYSpc-SinQual.

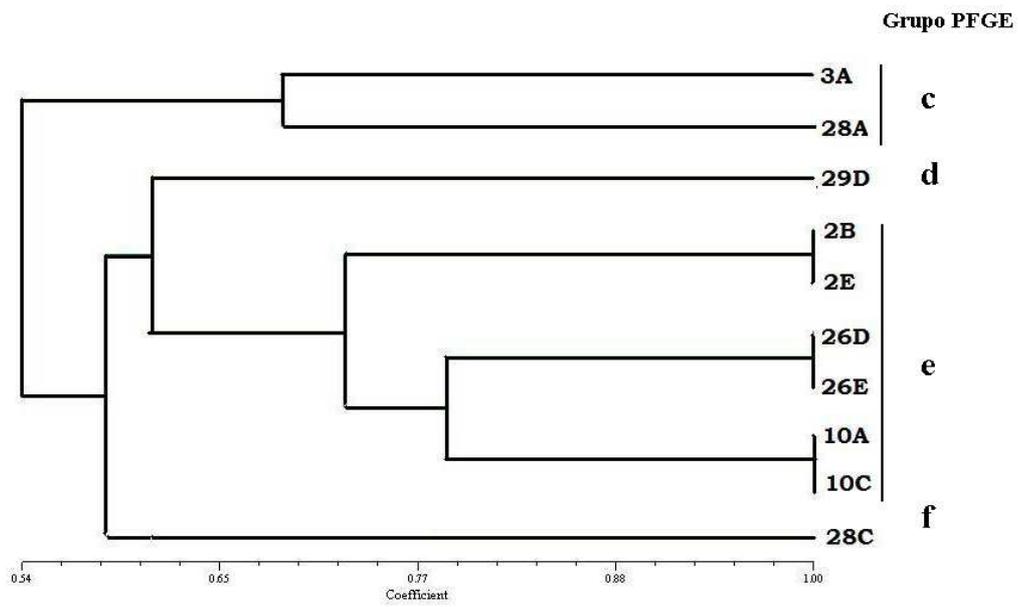
**Figura 14. Gel de PFGE de los aislados de ETEC obtenidos de febrero, abril, mayo y julio 2007**



Los aislados presentan el mismo patrón de bandas cuando provienen de la misma muestra, lo que sugiere que son clones. Sin embargo, los aislados 28A y 28C presentan un patrón distinto, sugiriendo que no tienen una relación clonal a pesar de que provienen de la misma muestra. Febrero: aislado 3A, Abril: aislados 10A y 10C, Mayo: aislados 28A y 28C, Julio: aislados 2B, 2E, 26D, 26E, 29D y 29E. En la muestras 899 (ETEC EDL

899) y el aislado 29E el DNA no se cortó adecuadamente con la enzima de restricción por lo que no se visualizan muchas bandas. I, II, V = tipo de resistencia a los antibióticos. L = ladder, y 899 = C+ (ETEC EDL 899). LT = tipo de enterotoxina de ETEC.

**Figura 15. Dendrograma de ETECs aislados durante febrero, abril, mayo y julio 2007 en base al patrón de bandas generado por PFGE de la figura 14**



Se nota que todos los aislados tienen relación clonal cuando provienen de la misma muestra. Sin embargo, los aislados 28A y 28C no comparten esa relación. El dendrograma fue generado mediante coeficiente de DICE y agrupamiento SAHN con método de UPGMA en el programa NTSYSpc-SinQual.

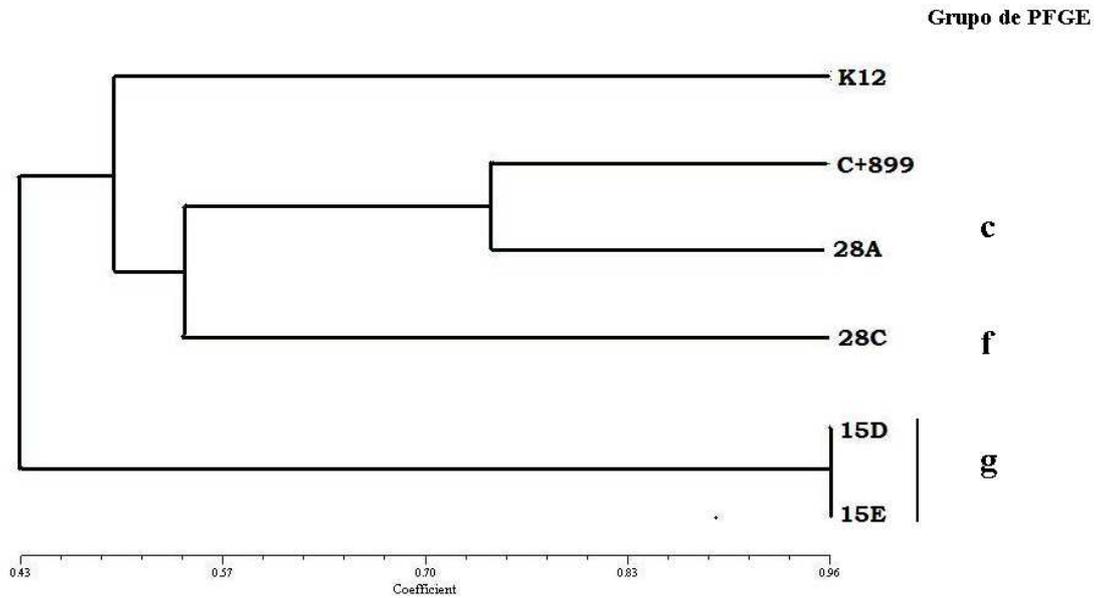
Figura 16. Gel de PFGE de los aislados de ETEC obtenidos de mayo 2007



Patrón de bandas obtenidas en PFGE de los aislados 15D, 15E, 28A y 28C. Para los aislados 15D y 15E el patrón es idéntico, lo que sugiere que son clones. En cambio, para los aislados 28A y 28C el patrón es diferente, lo que indica que no tienen relación clonal. II, III y V = tipo de resistencia a los antibióticos. L = ladder, K12 = *E. coli* K12, 899 = C+ (ETEC EDL 899). LT/ST, LT = tipo de enterotoxina de ETEC.



**Figura 17. Dendrograma de ETECs aislados durante mayo 2007 en base al patrón de bandas generado por PFGE de la figura 16**



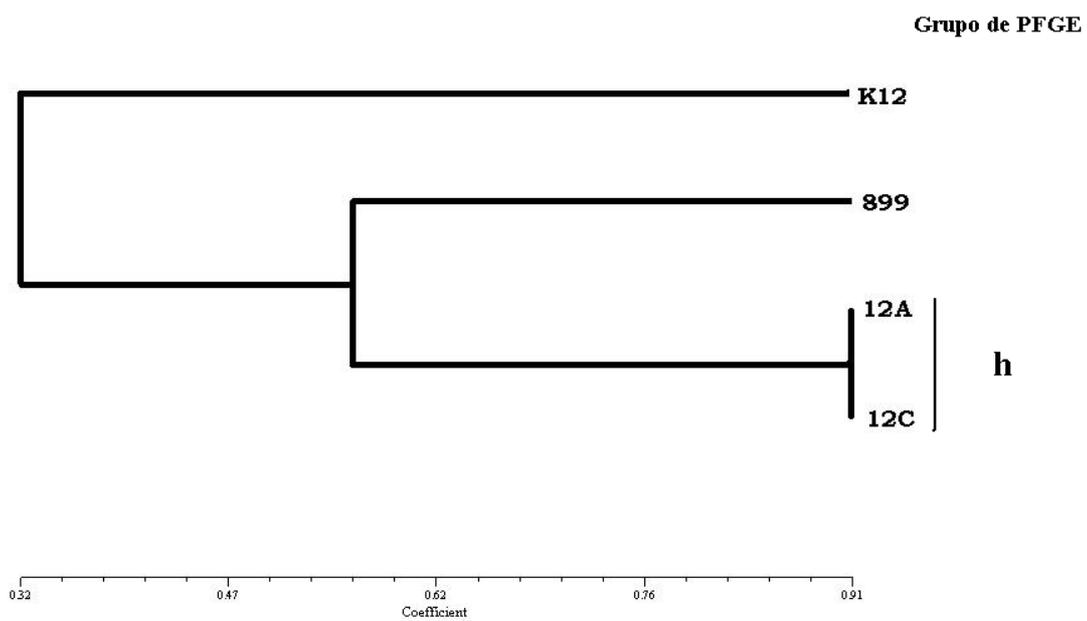
Se nota que los aislados 28 A y 28C no tienen una relación clonal, mientras que los aislados 15D y 15E son clones. El dendrograma fue generado mediante coeficiente de DICE y agrupamiento SAHN con método de UPGMA en el programa NTSYSpc-SinQual

**Figura 18. Gel de PFGE de los aislados de ETEC obtenidos de junio 2007**



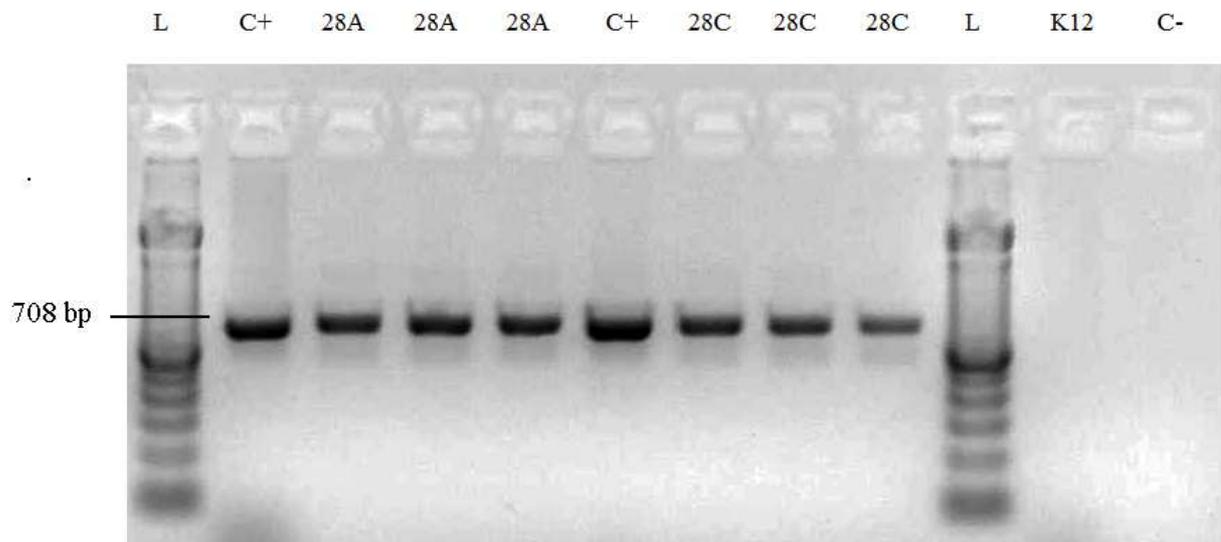
Se muestra el patrón de bandas para los aislados 12A y 12C, se evidencia que es idéntico. IV = tipo de resistencia a los antibióticos. L = ladder, K12 = *E. coli* K12 899 = C+ (ETEC EDL 899). LT = tipo de enterotoxina

Figura 19. Dendrograma de ETECs aislados durante junio 2007 en base al patrón de bandas generado por PFGE de la figura 18



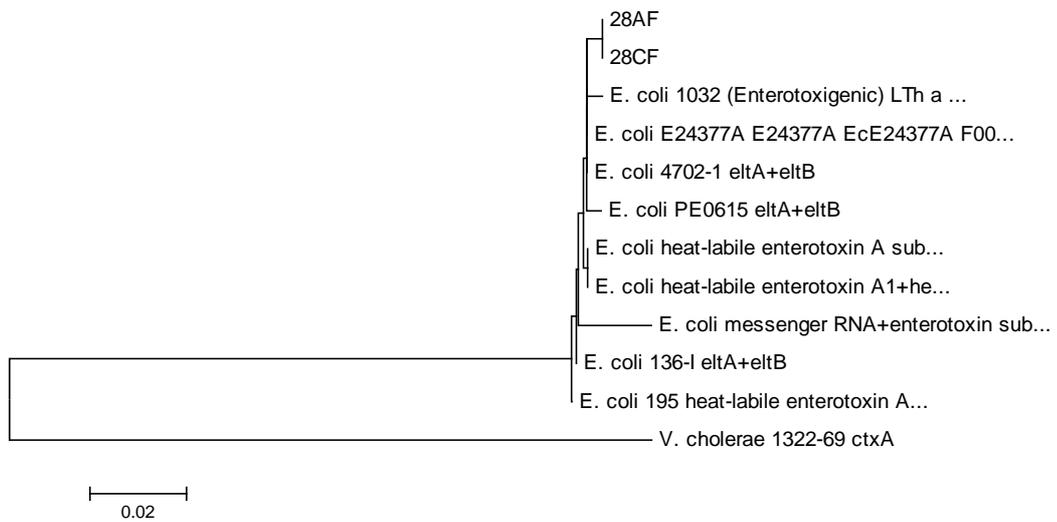
Se muestra la clonalidad de los aislados 12A y 12C. El dendrograma fue generado mediante coeficiente de DICE y agrupamiento SAHN con método de UPGMA en el programa NTSYSpc-SinQual

**Figura 20. Amplificación de gen *eltA* de los aislado 28A y 28C de mayo 2007**



Se muestra el producto de la amplificación del gen *eltA* por triplicado de los aislados 28A y 28C. Estos amplificados fueron utilizados para realizar la secuenciación de este gen. L = ladder 100bp, C+ = cepa control ETEC EDL 899, K12 = cepa control *E. coli* K12, y C- = control negativo.

**Figura 21. Dendrograma generado con las secuencias del gen *eltA* de los aislados 28A y 28C y otras secuencias obtenidos del GenBank**



Se muestra la relación clonal del gen *eltA* entre los aislados 28A y 28C. El dendrograma está basado en Neighbor Joining/Kimura. Las secuencias fueron revisadas directamente de los cromatogramas de secuenciamiento y limpiadas previamente mediante el programa Mega 3.1. Las secuencias de los otros genes se obtuvieron mediante la base de datos BLAST de PubMed, y corresponden a varias secuencias de genes *eltA* de ETEC, como outgroup se utilizó la secuencia del gen *ctxA* de la toxina de *V. cholerae*.

**Tabla 1. Características del genoma de *E. coli* E24377A ETEC y de sus plásmidos**

ETEC*	Características del Genoma	Codificación	
<b><i>E. coli</i> E24377A</b>	Circular	% Codificación: 85%	Esta bacteria y sus plásmidos fueron secuenciados por el J. Craig Venter Institute Microbial Sequencing Center <a href="http://msc.jcvi.org/e_coli_and_shigella/escherichia_coli_e24377a/index.shtml">http://msc.jcvi.org/e_coli_and_shigella/escherichia_coli_e24377a/index.shtml</a>
<b>GenBank: CP000800</b>	4'979.619 nt	Genes: 4981	
	G+C: 50%	Proteínas: 4749	
		RNAs estructurales: 114 Pseudogenes: 121	

Plásmidos°	Características del Plásmido	Codificación	Ejemplo de genes codificados
<b>pETEC_80</b>	Circular	% Codificación: 53%	<i>eltA</i>
<b>GenBank: CP000795</b>	79.237 nt	Genes: 89	IS1, IS2, transposasa <i>orfA</i> , transposasa <i>orfB</i> , resolvasa
	G+C: 57%	Proteínas: 68 pseudogenes: 19	sistema de transferencia conjugativo tipo F acetilasa de pili TraX proteína de inicio de replicación RepA proteína de segregación plasmídica ParM chaperona de pilus periplásmica CS3-1
<b>pETEC_35</b>	Circular	% Codificación: 61%	<i>stbB</i>
<b>GenBank: CP000796</b>	34.367 nt	Genes: 29	sistema de transferencia conjugativo tipo F acetilasa de pili TraX
	G+C: 51%	proteínas: 29	sistema de transferencia conjugativo tipo IV proteína TraD proteína antirestricción proteína del sistema de estabilización de plásmido RelE/ParE proteína de inicio de replicación RepA proteína de la familia de DNA metilasa
<b>pETEC_73</b>	Circular	% Codificación: 63%	IS2, transposasa <i>orfB</i>
<b>GenBank: CP000797</b>	70.609 nt	Genes: 76	Proteína fimbrial, proteína PilL
	G+C: 50%	Proteínas: 68 Pseudogenes: 8	Proteína putative con dominio relaxasa/nucleasa de movilización proteína antirestricción proteína de union a ssDNA proteína de la familia de ushers fimbriales
<b>pETEC_6</b>	Circular	% Codificación: 40%	Proteína de Resistencia a estreptomicina StrA
<b>GenBank: CP000798</b>	6.199 nt	Genes: 5	Dihidropteroato sintasa StrB
	G+C: 52%	Proteínas: 5	
<b>pETEC_74</b>	Circular	% Codificación: 66%	IS1, IS91, IS66 <i>orf2</i> , transposasa <i>orfB</i>
<b>GenBank: CP000799</b>	74.224 nt	Genes: 77	proteína A de partición de plásmido
	G+C: 49%	Proteínas: 69 Pseudogenes: 8	sistema de transferencia conjugativo tipo F acetilasa de pili TraX sistema de transferencia conjugativo tipo IV proteína TraL peptidase de serina secretable EatA
<b>pETEC_5</b>	Circular	% Codificación: 37%	Proteína de movilización MobA

---

<b>GenBank:</b>	5.033 nt	Genes: 3
<b>CP000801</b>	G+C: 49%	Proteínas: 3

---

Fuente: NCBI Microbial Genomes

\*Cepa fuente de los plásmidos analizados:

[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=genome&cmd=Retrieve&dopt=Overview&list\\_uids=21359](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=genome&cmd=Retrieve&dopt=Overview&list_uids=21359)

°Información de los Plásmidos:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=genome&Cmd=ShowDetailView&TermToSearch=21344>

**Tabla 2. Características de las enterotoxinas producidas por ETEC**

---

Características	<u>Termolábiles</u>		<u>Termoestables</u>	
	LT-I	LT-II	STa	STb
<b>Naturaleza bioquímica</b>	Proteína	Proteína	Proteína	Proteína
	Multimérica	Multimérica	Monomérica	Monomérica
<b>Subunidades</b>	1A:5B	1A:5B	No	No

---

<b>Peso molecular total Kilodaltons</b>	85-90	87	1,9	5
<b>Peso molecular de cada subunidad Kilodaltons</b>	A = 25 B = 11,5	A = 28 B = 11,8		
<b>Receptores</b>	Gangliósidos GM1	Gangliósidos GM1	Desconocido	Desconocido
<b>Patogenia</b>	ADP-ribosilación de Gs	ADP- ribosilación de Gs		
<b>Estimulación</b>	Adenilato ciclasa	Adenilato ciclasa	Guanilato ciclasa	Desconocido
<b>Alteración</b>	Canales de Cloro con secreción de iones	Canales de Cloro con secreción de iones	Aumento en la secreción de iones	Incremento intracelular del calcio
<b>Codificación</b>	Plásmidos conjugativos	Cromosoma	Plásmidos conjugativos	Plásmidos conjugativos

Fuente: Modificado de “*Escherichia coli* Enterotoxigénicos, Necrotoxigénicos y Verotoxigénicos de origen humano y bovino”. J. Blanco y M. Blanco 1993, y “Pathogenic *Escherichia coli*” Kaper J, et al. Nature Microbiology Reviews 2004

**Tabla 3. Características de las 22 Comunidades participantes en el estudio pertenecientes al cantón Eloy Alfaro, ubicadas en el noroeste de la provincia de Esmeraldas**

<b>Zona</b>	<b>Código de la Comunidad</b>	<b>Nombre de la Comunidad</b>	<b>Río de Acceso</b>	<b>Acceso a una vía terrestre</b>
<b>Bajo Borbón</b>	1	Ranchito	Bajo Borbón	No
	2	La Loma	Bajo Borbón	No
<b>Bajo Santiago</b>	3	San Agustín	Estero María	Sí
	4	Timbire	Santiago	Sí
	5	Colón Eloy	Estero María	Sí
	6	Quinto Piso	Santiago	Sí
	7	La Peña	Santiago	No
	8	Rocafuerte	Santiago	No
<b>Alto Santiago</b>	9	Wimbí	Wimbí	Sí
	10	Guayabal	Santiago	No
	11	Playa de Oro	Santiago	Sí
	12	Naranjal	Cayapas	No
<b>Onzole</b>	13	Las Cruces	Onzole	No

---

	14	Vaquerita	Onzole	No
	15	Tangare	Onzole	No
	16	Arenales	Onzole	No
	17	Santo Domingo	Onzole	No
<b>Cayapas</b>	18	El Rosario	Cayapas	No
	19	Telembi	Cayapas	No
	20	Trinidad	Cayapas	No
	21	San Miguel	Cayapas	No
<b>Borbón</b>	22	Borbón	Borbón	Sí

---

**Tabla 4. Concentraciones de reactivos para PCR de patotipos diarreogénicos de *E. coli***

<b>REACTIVO</b>	<b>CANTIDAD <math>\mu</math>l</b>	<b>Concentración</b>
Agua para PCR libre de Nucleasas (Gibco® EEUU)	14.5	-
<i>Taq</i> DNApol (New England Biolabs®, EEUU e Invitrogen™, Brasil)	0.5	2.5 U
dNTPs mix (New England Biolabs®, EEUU)	0.5	200 $\mu$ M
MgCl <sub>2</sub> (Invitrogen™, Brasil)	0.5	1 $\mu$ M
Buffer de Reacción 10x (New England Biolabs®, EEUU e Invitrogen™, Brasil)	2.5	1x
Primer 1 (Sigma-Genosys, EEUU)	2	0.08 $\mu$ M
Primer 2 (Sigma-Genosys, EEUU)	2	0.08 $\mu$ M
Sobrenadante del hervido de bacterias	2.5	-
<b>Volumen Total</b>	<b>25</b>	-

**Tabla 5. Caracterización de los aislados de *Escherichia coli* fermentadores de lactosa (Lac+) obtenidos entre marzo 2006 a julio 2007. EIEC: *E. coli* enteroinvasiva, ETEC: *E. coli* enterotoxigénica, EPEC: *E. coli* enteropatógena.**

<b>Año</b>	<b>Número de aislados</b>	<b>EIEC</b>	<b>%</b>	<b>EPEC</b>	<b>%</b>	<b>ETEC</b>	<b>%</b>	<b>Total Patógenas</b>	<b>%</b>
<b>Mes</b>									
<b>2006</b>									
<b>Marzo</b>	135	0	0,00%	0	0,00%	4	2,96%	4	2,96%
<b>Mayo</b>	152	3	1,97%	1	0,66%	9	5,92%	13	8,55%

<b>Junio</b>	118	7	5,93%	0	0,00%	3	2,54%	10	8,47%
<b>Julio</b>	78	0	0,00%	1	1,28%	4	5,13%	5	6,41%
<b>Agosto</b>	28	1	3,57%	0	0,00%	0	0,00%	1	3,57%
<b>Septiembre</b>	29	0	0,00%	1	3,45%	1	3,45%	2	6,90%
<b>Octubre</b>	38	0	0,00%	0	0,00%	7	18,42%	7	18,42%
<b>Noviembre</b>	102	0	0,00%	3	2,94%	2	1,96%	5	4,90%
<b>Diciembre</b>	121	1	0,83%	3	2,48%	7	5,79%	11	9,09%
<b>2007</b>									
<b>Enero</b>	91	0	0,00%	3	3,30%	6	6,59%	9	9,89%
<b>Febrero</b>	53	0	0,00%	0	0,00%	1	1,89%	1	1,89%
<b>Marzo</b>	34	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%
<b>Abril</b>	15	0	0,00%	0	0,00%	1	6,67%	1	6,67%
<b>Mayo</b>	35	0	0,00%	0	0,00%	2	5,71%	2	5,71%
<b>Junio</b>	22	0	0,00%	0	0,00%	1	4,55%	1	4,55%
<b>Julio</b>	74	1	1,35%	1	1,35%	3	4,05%	5	6,76%
<b>TOTAL</b>	<b>1125</b>	<b>13</b>	<b>1,16%</b>	<b>13</b>	<b>1,16%</b>	<b>51</b>	<b>4,53%</b>	<b>77</b>	<b>6,84%</b>

**Tabla 6. Caracterización de los aislados de *Escherichia coli* no fermentadores de lactosa (Lac-) y *Shigellae* obtenidos entre marzo 2006 a julio 2007. EIEC: *E. coli* enteroinvasiva**

<b>Año</b>	<b>Número de aislados</b>	<b>EIEC</b>	<b>%</b>	<b>Shigellae</b>	<b>%</b>	<b>Total Patógenas</b>
<b>Mes</b>						
<b>2006</b>						
<b>Marzo</b>	47	19	40,43%	4	8,51%	23
<b>Mayo</b>	58	4	6,90%	8	13,79%	12
<b>Junio</b>	46	3	6,52%	4	8,70%	7
<b>Julio</b>	25	0	0,00%	3	12,00%	3
<b>Agosto</b>	8	0	0,00%	1	12,50%	1
<b>Septiembre</b>	8	0	0,00%	2	25,00%	2
<b>Octubre</b>	12	0	0,00%	0	0,00%	0
<b>Noviembre</b>	36	0	0,00%	6	16,67%	6
<b>Diciembre</b>	45	5	11,11%	6	13,33%	11
<b>2007</b>						
<b>Enero</b>	18	6	33,33%	6	33,33%	12
<b>Febrero</b>	22	0	0,00%	2	9,09%	2
<b>Marzo</b>	14	0	0,00%	1	7,14%	1
<b>Abril</b>	5	0	0,00%	0	0,00%	0
<b>Mayo</b>	13	1	7,69%	1	7,69%	2
<b>Junio</b>	7	1	14,29%	0	0,00%	1
<b>Julio</b>	33	1	3,03%	1	3,03%	2

<b>TOTAL</b>	<b>397</b>	<b>40</b>	<b>10,08%</b>	<b>45</b>	<b>11,34%</b>	<b>85</b>
--------------	------------	-----------	---------------	-----------	---------------	-----------

**Tabla 7. Patotipos diarreogénicos de *E. coli* y *Shigellae* estratificados por casos y controles entre marzo 2006 a julio 2007**

	<b>Evaluados (N)</b>	<b>EIEC</b>	<b>%</b>	<b>ETEC</b>	<b>%</b>	<b>Shigellae</b>	<b>%</b>	<b>EPEC</b>	<b>%</b>
<b>Casos (D+)</b>	312	14	4.49	27	8.65	25	8.01	8	2.56
<b>Controles(D-)</b>	808	39	4.83	23	2.85	20	2.48	5	0.62
<b>Desconocidos</b>	5	0	-	1	-	1	-	0	-
<b>Total</b>	1125	53	4.71	51	4.53	46	4.00	13	1.16

EIEC: *E. coli* enteroinvasiva, ETEC: *E. coli* enterotoxigénica, EPEC: *E. coli* enteropatógena. Casos (D+): individuos con diarrea, Controles (D-): individuos sin diarrea. Desconocidos: no se tiene registrado en la base de datos si fueron casos o controles.



**Tabla 8. Patotipos de *E. coli* y *Shigellae* estratificados por edad, y por casos (D+) y controles (D-) entre marzo 2006 a julio 2007**

Edad	Evaluados (N)	EIEC (D+,D-)	OR [95% CI]	p	ETEC (D+,D-)	OR [95% CI]	p
< 5 años	292	10 (7,3)	1.17 [0.2-4.6]	0.82	23 (19,4)	2.52 [0.8-7.6]	0.09
5-20 años	382	17 (3,14)	1.5 [0.4-5.3]	0.54	21 (6,15)	2.96 [1.09-8.05]	0.02
> 20 años	370	18 (1,17)	0.5 [0.06-3.9]	0.51	4 (0,4)	NA	-
Desconocido	81	8 (3,5)	NA	-	2 (2,0)	NA	-
<b>Total</b>	<b>1125</b>	<b>53 (14,39)</b>	<b>0.9 [0.4-1.72]</b>	<b>0.76</b>	<b>51 (28,23)</b>	<b>3,23 [1.8-5.7]</b>	<b>&lt;0.0001</b>

Edad	Evaluados (N)	Shigellae (D+,D-)	OR [95% CI]	p	EPEC (D+,D-)	OR [95% CI]	p
< 5 años	292	16 (13,3)	2.25 [0.62-8]	0.20	8 (6,2)	1.51 [0.3-7.65]	0.61
5-20 años	382	15 (5,10)	3.68 [1.2-11.2]	0.05	2 (0,2)	NA	-
> 20 años	370	9 (4,5)	7,83 [2-30.5]	0.0006	0	NA	-
Desconocido	81	5 (3,2)	NA	-	3 (2,1)	NA	-

<b>Total</b>	1125	45	3.58		13	3.68	
		(25,20)	[1.9-6.5]	<0.0001	(8,5)	[1.1-11.7]	0.01

EIEC: *E. coli* enteroinvasiva, ETEC: *E. coli* enterotoxigénica, EPEC: *E. coli* enteropatogénica. Desconocidos: no se tiene registrado en la base de datos si fueron casos o controles. OR: odds ratio, CI: intervalo de confianza, p: valor de p, NA: no se puede calcular porque hay valores de 0

**Tabla 9. Coinfecciones distribuidas por grupo de edad, y entre casos y controles**

	< 5 años	5 a 20 años	> 20 años	Desconocido
<b>Casos</b>	EIEC/ETEC	EIEC/ETEC	EIEC/Shigellae	EPEC/Shigellae
	EIEC/ETEC	EIEC/Shigellae	EIEC/Shigellae	EIEC/Shigellae
<b>Controles</b>	EIEC/ETEC	EIEC/Shigellae	EIEC/Shigellae	EIEC/Shigellae

---

---

En las coinfecciones EIEC/Shigella, EIEC se recuperó en aislados Lac+

**Tabla 10. Distribución del tipo de toxina de ETEC en relación a la edad, y el riesgo de desarrollar diarrea entre marzo 2006 a julio 2007 [casos (D+) y controles (D-)]**

<b>Tipo</b>	<b>Total</b>	<b>OR</b>	<b>&lt; 5 años</b>	<b>OR</b>	<b>5-20 años</b>	<b>OR</b>	<b>&gt; 20 años</b>	<b>OR</b>
<b>Toxina</b>	<b>(D+, D-)</b>	<b>[95% CI]</b>	<b>(D+, D-)</b>	<b>[95% CI]</b>	<b>(D+, D-)</b>	<b>[95% CI]</b>	<b>(D+, D-)</b>	<b>[95% CI]</b>
<b>LT</b>	32	1	13	5.5	15	0.5	4	NA
	(16, 16)	[0.50-1.99]	(11, 2)	[1.2-24.81]	(5, 10)	[0.17-1.46]	(0, 4)	
<b>LT/ST</b>	9	0.8	5	4	4	NA	0	NA
	(4, 5)	[0.21-2.97]	(4, 1)	[0.4-35.78]	(0, 4)			
<b>ST</b>	10	4	4	NA	6	2	0	NA
	(8, 2)	[0.84-18.83]	(4, 0)		(4, 2)	[0.36-10.9]		
<b>Total</b>	51	3.23	22	6.3	25	0.56	4	NA
	(28, 23)	[1.82-5.73]	(19, 3)	[1.87-21.4]	(9, 16)	[0.24-1.27]	(0, 4)	

OR: odds ratio, CI: intervalo de confianza, p: valor de p, NA: no se puede calcular porque hay valores de 0.

**Tabla 11. Prevalencia total de ETEC por edades en la población evaluada durante marzo 2006 a julio 2007 (N= población evaluada)**

<b>Edad</b>	<b>Evaluados (N)</b>	<b>Casos ETEC</b>	<b>Controles ETEC</b>	<b>Prevalencia</b>
<b>&lt; 5 años</b>	292	20	4	8.21/100
<b>5-20 años</b>	382	6	15	5.49/100
<b>&gt;20 años</b>	370	0	4	1.08/100
<b>Desconocido</b>	81	2	0	2.46/100

<b>Total</b>	1125	28	23	4.53/100
--------------	------	----	----	----------

**Tabla 12. Tipo de resistencia a los antibióticos de los aislados ETECs de enero a julio 2007**

<b>2007</b>	<b>Tipo I</b>	<b>Tipo II</b>	<b>Tipo III</b>	<b>Tipo IV</b>	<b>Tipo V</b>
<b>Meses</b>	<b>R: SXT, Amp</b>	<b>R: SXT, Amp, Te</b>	<b>R: SXT, Amp, Te, C</b>	<b>R: Amp</b>	<b>R: 0</b>
<b>Enero</b>	7	1		1	1
<b>Febrero</b>	1				
<b>Abril</b>		2			
<b>Mayo</b>		1	1		2
<b>Junio</b>				2	
<b>Julio</b>	2	2			2

Se muestran el número de aislados en cada tipo de resistencia. Se utilizaron 7 antibióticos para la prueba (ampicilina, cefazolina, gentamicina, trimetoprim/sulfametoxazol, ciprofloxacina, tetraciclina, cloramfenicol) R: resistente, 0: sensible a todos los antibióticos utilizados. SXT: trimetoprim/sulfametoxazol, Amp: ampicilina, Te: tetraciclina, C: cloramfenicol.

**Tabla 13. Resumen de los aislados ETEC positivos estudiados mediante PFGE de enero a julio 2007**

2007 Meses	Aislado	Caso o Control	Comunidad	Río	Enterotoxina	Tipo de Resistencia a antibióticos	Grupo de Patrón de Bandas PFGE
Enero	1A	Caso	Colón	Estero María	LT/ST		a
	1B		Eloy		LT/ST		a

	2E	Caso	San Agustín	Estero María	LT	II	b
	8A	Caso	Colón	Estero María	LT/ST	IV	b
	8C		Eloy		LT/ST	I	b
	32C	Control	San Agustín	Estero María	LT/ST	I	b
	46B	Control	Colón	Estero María	LT/ST	I	b
	46C		Eloy		LT/ST	I	b
	57B	Control	Colón Eloy	Estero María	LT/ST	I	b
<b>Febrero</b>	3A	Caso	Timbire	Santiago	LT	I	c
<b>Abril</b>	10A	Caso	La Loma	Bajo Borbón	LT	II	e
	10C				LT	II	e
<b>Mayo</b>	15D	Control	Trinidad	Cayapas	LT/ST	III	g
	15E				LT/ST	II	g
	28A	Control	Telembi	Cayapas	LT	V	c
	28C				LT	V	f
<b>Junio</b>	12A	Control	Santo Domingo	Onzole	LT	IV	h
	12C				LT	IV	h
<b>Julio</b>	2B	Caso	Borbón	Borbón	LT	II	e
	2E				LT	II	e
	26D	Control	Borbón	Borbón	LT	V	e
	26E				LT	V	e
	29D	Caso	Borbón	Borbón	LT	I	d
	29E				LT	I	d

La tabla muestra las características de los aislados. La mayoría de los aislados tienen un mismo patrón de bandas cuando provienen de la misma muestra. Sin embargo, llama la atención dos hechos: 1) se nota que los aislados de 8A, 8C, 32C, 46B, 46C, 57B comparten un mismo patrón de bandas, a pesar de que

proviene de diferentes muestras, lo que sugiere que podrían ser clones. En cambio los aislados 28A y 28C presentan un patrón diferente, a pesar de provenir de la misma muestra.