

## ESCHERICHIA COLI ENTEROTOXIGENICA EN NIÑOS HOSPITALIZADOS EN COSTA RICA

Liliana Reyes, Doyle J. Evans<sup>3</sup> Jorge A  
Ramírez <sup>1,2</sup> y Leonardo Metal <sup>.2</sup>

### INTRODUCCIÓN

Inicialmente la *Escherichia coli* fue considerada como uno de los componentes normales de la flora Intestinal, sin que se le atribuyera papel patógeno alguno. No es sino hasta el año de 1940 que se le asocia a brotes de diarrea en diversas partes del mundo (18). Tales cepas fueron clasificadas —según sus antígenos de superficie— como enteropatógenas, aunque los mecanismos de virulencia involucrados permanecieron por cierto tiempo desconocidos. La investigación de la *E. coli* enteropatógena y de otros agentes causales ya conocidos (incluyendo virus, parásitos y otras bacterias) llegó a explicar del 20 al 40 por ciento de los casos de diarrea, denominándose al resto "diarreas no específicas" o "no bacterianas" (17).

Fue en 1967 que Smith & Halls (26) informaron de la existencia de cepas enterotoxigénicas de *E. coli* en animales con cuadros diarreicos. Posteriormente, Smith & Gyles (25) demostraron que tales bacterias producían dos tipos diferentes de enterotoxinas: una termoestable, no antigénica, de bajo peso molecular; otra termolábil, inmunogénica y de alto peso molecular. La producción de toxinas es regulada por plásmidos transmisibles (27).

Fueron Gorbach et al. (9) quienes aislaron cepas de *E. coli* "no enteropatógena" capaces de colonizar el intestino delgado de niños con diarrea severa. Estos autores postularon que tales cepas debían producir enterotoxinas lo que fue posteriormente comprobado por Sack et al. (22).

Hasta la fecha se han publicado dos informes sobre la existencia de diarrea por *Escherichia coli* enterotoxigénica (ECET) en Costa Rica (13,16). El presente trabajo es una adición a dichas publicaciones y describe un estudio sobre ECET productora de toxina lábil y/o estable en niños hospitalizados con o sin diarrea.

---

1. Instituto de Investigaciones en Salud (INISA), Universidad de Costa Rica.

2. Ministerio de Salud, San Jose, Costa Rica.

3. Universidad de Texas, Escuela de Medicina, Houston, EE.UU.

### Pacientes

Se estudiaron 127 pacientes admitidos a los Servicios "Lactantes 2" y "Lactantes B' del Hospital Nacional de Niños, entre enero y diciembre de 1976. Del total, 76 presentaban diarrea aguda y 51 eran niños sin diarrea equiparables por edad y servicio, que presentaban cuadros predominantemente respiratorios. Los pacientes de ambos grupos tenían menos de tres días de hospitalización.

De todos los niños estudiados se recolectaron hisopos rectales, que fueron cultivados en medios de Agar tergitol 7 con cloruro de trifenil tetrazolio, Salmonella-Shigella y Mac Conkey para incubación durante 18 horas a 37°C. Las cepas sospechosas de ser *E. coli* se analizaron por sus antígenos de superficie con antisueros comerciales Difco. Aquellas que aglutinaron en sueros específicos no fueron utilizadas en la investigación de enterotoxinas.

### Toxina Lábil

Se prepararon cultivos inoculando 10 colonias de *E. coli* en 5 ml de medio de "casamino-ácidos" con extracto de levadura (8), y se incubaron durante 18 horas a 37°C bajo agitación continua (135-140 ciclos por minuto). Al cabo de la incubación, se adicionó al cultivo 5 ml de solución amortiguadora de fosfatos 0,08 M a pH 6,7 con 0,9% NaCl y 0,25 mg/ml de sulfato de polimixina B (SAF-P). La mezcla se incubó de nuevo a 37°C durante 15 minutos, paso que tuvo como fin el rompimiento de la pared bacteriana y liberación de la enterotoxina. Los restos bacterianos fueron separados por centrifugación a 16.000 x G durante 20 minutos a 4°C. El sobrenadante se congeló a -70°C para su posterior ensayo.

La investigación de la toxina lábil fue realizada según la técnica de inmunolisiva pasiva de Evans & Evans (7), como se anota a continuación: en tubos de 10 X 75 mm se colocaron (por duplicado) 25 ul de extracto, 25 ul de amortiguador de fosfatos 0,08 M a pH 6,7 con 0,9% NaCl (SAF) y 50 ul de glóbulos rojos de carnero al 1 %. La mezcla fue incubada a 37°C durante 30 minutos. Concluida la incubación, se agregaron 50 ul de antisuero (anti-toxina lábil) diluido 1:60 en PBS y se incubó a 37°C durante 60 minutos. Luego, se adicionaron 50 ul de complemento diluido 1:10 en PBS y se incubó a 37°C durante 60 minutos. Concluida la incubación se adicionaron 1,8 ml de PBS a cada uno de los tubos. La mezcla resultante fue centrifugada a 1200 rpm (2000 x G) durante 10 minutos; la hemoglobina liberada se determinó espectrofotométricamente a 240 nm utilizando PBS como blanco.

### Toxina estable

Se prepararon cultivos inoculando 10 colonias de *E. coli*, en medio de infusión de cerebro y corazón a 37°C durante 24 horas bajo agitación continua. Concluida la incubación, los cultivos se centrifugaron a 3000 rpm (2500 x G) durante 30 minutos. El sobrenadante fue centrifugado durante 15 minutos a igual velocidad. El líquido sobrenadante se filtró a través de filtros Millipore de 0,25 um de diámetro de poro.

La toxina estable se estudió de acuerdo a la técnica de Dean et al. (2). Por cada muestra se inocularon intragástricamente tres ratones lactantes de uno a tres días de nacidos. Después de la inoculación, los ratones permanecieron a 28-30°C durante cuatro horas. Posteriormente fueron decapitados para remover todo el intestino cuyo peso fue dividido entre el peso del resto del carca. Se consideró positiva una razón igual o mayor de 0,083.

## RESULTADOS

Se encontró *Escherichia coli* enterotoxigénica (ECET) en 23 (30%) de los niños con diarrea y en 10 (20 %) de los testigos, Cuadro 1.

### CUADRO 1

*Escherichia coli* enterotoxigénica (ECET), en niños con y sin diarrea, Hospital Nacional de Niños, enero-diciembre, 1976

Trimestre	Con diarrea	Sin diarrea	Con ECET		Total (%)
			Con diarrea	Sin diarrea	
I	33	22	8(24)*	5(23)	13(24)
II	13	8	5(38)	1(12)	6(28)
III	17	11	7(41)	2(18)	9(32)
IV	13	10	3(23)	2(20)	5(22)
<b>Total</b>	<b>76</b>	<b>51</b>	<b>23(30)</b>	<b>10(20)</b>	<b>33(26)</b>

\*Casos (porcentaje positivo)

Las cepas de ECET produjeron toxina lábil, toxina estable o ambas, Cuadro 2. El mayor porcentaje de las cepas (17%) liberó únicamente toxina estable; un 8% produjo toxina lábil; sólo una cepa (niño testigo) sintetizó ambas toxinas.

### CUADRO 2

Distribución de ECET según tipo de toxina

Toxina	Con diarrea N=76	Sin diarrea N=51	Total N=127
Estable	16(21)*	6(12)	22(17)
Lábil	7(9)	3(6)	10(8)
Ambas	0	1(2)	1(1)
<b>Total</b>	<b>23(30)</b>	<b>10(20)</b>	<b>33(26)</b>

N= número de casos

\* número de casos (porcentaje)

La distribución de la ECET según la edad demostró una prevalencia semejante en los diferentes grupos etarios, tanto en niños con diarrea como en niños testigos, Cuadro 3.

### CUADRO 3

Distribución de ECET en niños con y sin diarrea, por edad, 1976

Edad, meses	Casos	Testigos	Con ECET		Total (%)
			Casos (%)	Testigos (%)	
≤1	5	3	0	0	0
1-5	18	10	4(22)*	3(30)	7(25)*
6-11	44	31	16(36)	6(19)	22(29)
12-17	9	7	3(33)	1(14)	4(25)
<b>Total</b>	<b>76</b>	<b>51</b>	<b>23(30)</b>	<b>10(20)</b>	<b>33(26)</b>

\*Numero de casos (porcentaje)

No se encontró ninguna asociación significativa entre ECET y los otros agentes etiológicos (Shigella, Salmonella y Giardia) investigados.

La frecuencia relativa de ECET en Costa Rica demostró ser mayor en los meses de abril a setiembre, aunque ocurrieron casos durante todo el año (Fig. 1). En el primero y cuarto trimestre la prevalencia no sólo fue más baja sino semejante en niños diarreicos y sin diarrea lo que hace pensar en la ocurrencia frecuente de portadores.

### DISCUSION

Las cepas de Escherichia coli (y de otras especies bacterianas que habitan en el intestino) se clasifican en enteropatógenas, enterotoxigénicas y enteroinvasoras (1,18,19,22). El presente estudio concierne específicamente a las cepas de E. coli enterotoxigénicas (ECET), que recientemente se han demostrado como muy importantes en la etiología de la diarrea "no específica".

Los estudios más conocidos sobre prevalencia de ECET en seres humanos se resumen en los Cuadros 4 y 5. Los primeros informes correspondieron al estudio de 600 cepas de E. coli aisladas de 29 niños con diarrea en la ciudad de Chicago por Gorbach & Khurana(10). Tal análisis reveló un 83 por ciento de portadores de ECET. Aparte de ese exhaustivo estudio, y de un trabajo en Dallas (121) no verificado en que se describe una altísima prevalencia de E. coli productora de toxina estable, la mayoría de los informes de sociedades industriales revelan una baja frecuencia de esas bacterias, Cuadro 4 (2,4,12,14). La única cifra alta, (16 %) correspondió a una población de indígenas Apaches (23) que en todo caso corresponde más al patrón cultural y social observado en países pre-industrializados, Cuadro 5.

## CUADRO 4

*Escherichia coli* enterotoxigénica en niños  
con diarreas, países industrializados

Lugar	Edad	Número de casos	Tipo de toxina*	Prevalencia %	Referencia
Chicago, EE.UU.	1m-4a	29	TE, TL	83	Gorbach y Khurana, 1972 (10)
Honolulu, EE.UU.	1m-6a	37	TE	0	Dean <i>et al.</i> , 1972 (2)
Dallas, EE.UU.	0-5+a	36	TE	86	Rudoy y Nelson, 1972 (21)
Arizona, EE.UU.	4a	59	TL	16	Sack <i>et al.</i> , 1975 (23)
Boston, EE.UU.	0-5a	61	TL	0	Echeverría <i>et al.</i> , 1975 (4)
Washintong, D.C.	1-27m	32	TL	0	Kapikian <i>et al.</i> , 1976 (14)
Manitoba, Canadá	0-3+a	276	TE,TL	1	Gurwith y Williams, 1977 (12)

\*TE= Toxina estable; TL= Toxina Lábil.

Con respecto a los países en vías de desarrollo, la mayoría de los autores informan prevalancias relativamente altas que oscilan entre un 16 por ciento en México y Taiwan (3,5) hasta 50 por ciento en el estudio clásico de Guerrant et al. en Brasil (11). Los demás estudios revelan una prevalencia de ECET de 30 a 40 por ciento (13,16, 28). Finalmente, un estudio reciente de pacientes diarreicos en Dacca, Bangladesh, reveló una alta frecuencia de adultos con *E. coli* enterotoxigénica (51 %) en contraste con sólo 9 por ciento de niños lactantes (24),

Los resultados del estudio en Costa Rica sugieren que la ECET es un agente etiológico importante en las diarreas de niños menores de dos años. Un 17 por ciento de las cepas fueron productoras de sólo toxina estable, hecho ya descrito por otros investigadores (6). Su papel en la etiología de la diarrea ha sido confirmado en un estudio en adultos jóvenes a quienes se administró *E. coli* 214-4 sintetizadora de sólo toxina estable por vía oral (15).

Portadores asintomáticos de ECET han sido descritos (20); su papel en la epidemiología de la diarrea no ha sido aún aclarado.

Queda por estudiar la prevalencia de ECET en aguas, alimentos y el papel de portadores asintomáticos, para así comprender mejor la epidemiología de la diarrea y diseñar medidas adecuadas para su control y prevención.

## CUADRO 5

*Escherichia coli* enterotoxigénica en niños con diarrea  
Países en vías de desarrollo

Lugar	Edad	Número de casos	Tipo de Toxina*	Prevalencia %	Referencia
Brasil	0-10a	40	TE, TL	50	Guerrant <i>et al.</i> , 1975 (11)
Etiopía	0-4+a	354	TE, TL	38	Wadstrom <i>et al.</i> , 1976 (28)
México	1m-12a	50	TE, TL	16	Donta <i>et al.</i> , 1977 (3)
México		71	TE, TL	40	Evans & Evans 1977 (7)
Taiwan	0-4a	57	TE, TL	16	Echeverría <i>et al.</i> ; 1977 (5)
Dacca	12m	11	TE, TL	9	Sack, <i>et al.</i> , 1977 (24)
Costa Rica	4-17m	50	TE	30	Mata, <i>et al.</i> , 1977 (16)
Costa Rica	0-17m	76	TE, TL	30	Presente estudio

\* TE= toxina estable; TL= toxina lábil

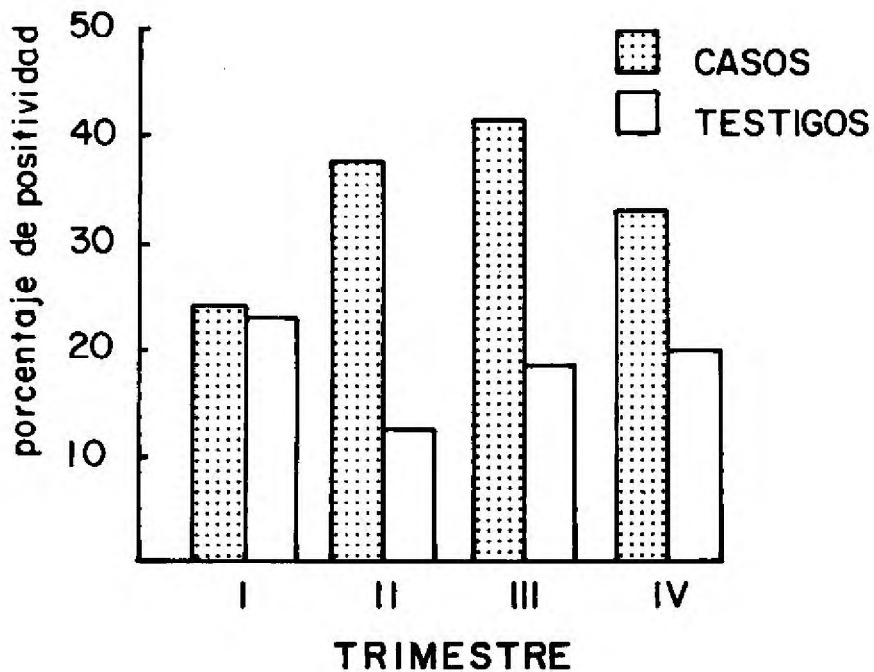
## RESUMEN

Se estudió la prevalencia de *Escherichia coli* enterotoxigénica (ECET) productora de toxina lábil y/ o estable en niños con y sin diarrea aguda, internados en el Hospital Nacional de Niños entre enero y diciembre de 1976. Se encontró ECET en 23 (30 %) de 76 niños con diarrea y en 10 (20 %) de 51 niños testigo. El 17 por ciento de las cepas produjeron sólo toxina estable y el 8 por ciento sólo toxina lábil, una cepa de un niño sin diarrea produjo ambas toxinas. La mayor prevalencia de ECET se observó en los meses de abril a setiembre.

## SUMMARY

The prevalence of enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) producing labile and/or stable toxin was investigated in hospitalized diarrheic and non-diarrheic children.

Between January and December of 1976, 23(30 %) of 76 diarrheic children and 10(20 %) of 51 controls were found with *E7EC*. Seventeen percent of the strains were producers of stable toxin only, and 8 percent of labile toxin only. One strain isolated from a child with diarrhea produced both toxins. A greater prevalence of *E7EC* was observed during April and September.



**FIGURA 1**

Porcentaje de positividad de *Escherichia coli* enterotoxigénica en niños con y sin diarrea, por trimestres, Hospital Nacional de Niños, 1976.

**AGRADECIMIENTO**

Los autores agradecen a la Dra. Dolores G.Evans de la Escuela de Medicina, Universidad de Texas, el envío de cultivos de referencia, y a los Sres. Francisco Gamboa, Victor Hugo Villalobos, Guillermo Vargas y Julieta León la colaboración técnica.

Los fondos para esta investigación fueron aportados en parte por la Vicerrectoría de Investigación de la Universidad de Costa Rica, el Hospital Nacional de Niños y el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICIT) de Costa Rica.

BIBLIOGRAFIA

1. Cantey, J.R. & R.K. Blake  
Diarrhea due to *Escherichia coli* in the rabbit: a novel mechanism.  
J Infect. Dis., 135: 454,1977.
2. Dean, A.G., Y.C. Ching, R.G. Williams & L.B. Harden  
Test for *Escherichia coli* enterotoxin using infant mice: application  
in a study of diarrhea in children in Honolulu. J. Infect. Dis., 125:  
407,1972.
3. Donta, S.T., R.B. Wallace, S.C. Whipp & J. Olarte  
Enterotoxigenic *Escherichia coli* and diarrheal disease in Mexican chil-  
dren, J. Infect. Dis., 135: 482,1977.
4. Echeverría, P., N.R. Blacklow & D.H. Smith.  
Role of heat-labile toxigenic *Escherichia coli* and reovirus-like agent in  
diarrhoea in Boston children. Lancet, 2: 1113,1975.
5. Echeverría, P., M.T. Ho, N.R. Blacklow, G. Quinnen, B.  
Portnoy, J.G. Olson, R. Conklin, H.L. DuPont & J.H. Cross  
Relative importance of viruses and bacteria in the etiology of  
pediatric diarrhea in Taiwan. J. Infect. Dis., 136; 383,1977
6. Evans, D.G., D.J. Evans & H.L. DuPont  
Virulence factors of enterotoxigenic *Escherichia coli*. J. Infect. Dis.  
136: s 118,1977.
7. Evans, D.J. & D.G. Evans  
Direct serological assay for the heat-labile enterotoxin of *Escherchia  
coli* using passive immune hemolysis. Infect. Immun., 16: 604, 1977.
8. Evans, D.J., D G. Evans, S.H. Richarrsdson & S.L. Gorbach  
Purification of the ply myxin-released, heat labile enterotoxin of *Esche-  
richia colt* J. Infect. Dis., 133:s97, 1976.
9. Gorbach, S.L., J.G. Banwell, B.D. Chatterjee, B. Jacobs & R.B.  
Sack.  
Acute undifferentiated human diarrhea in the tropics. Alterations in  
intestinal microflora. J. Clin. Invest., 123:378,1971.
10. Gorbach, S.L. & C.M. Khurana  
Toxigenic *Escherichia coli*. A cause of infantile diarrhea in Chicago.  
New Eng. J. Med., 287: 791,1972.
11. Guerrant, R.L., R.A. Moore, P.M. Dirschenfeld, & M.A. Sande  
Role of toxigenic and invasive bacteria in acute diarrhea of childhood.



12. Gurwith, M.J. & T.W. Williams  
Gastroenteritis in children: a two-year review in Manitoba. *J. Infect. Dis.* 136: 239,1977.
13. Herrero, L., L.J. Mata, C. Lizano, E. Capparelli & F. Gamboa  
Prevalencia de *Escherichia coli* toxigénica (toxina estable) en niños hospitalizados. *Rev. Med. Hosp. Nat. Niños.*, 12: 1,1977.  
  
14. Kapikian, AZ., H.W. Kim, R.G. Wyatt, W.L. Cline, J.O. Arrobio, C. D. Brandt, W.J. Rodriguez, D.A. Sack, R.M. Chanock & R.H. Parrot  
Human reovirus-like agent as the major pathogen associated with "winter" gastroenteritis in hospitalized infants and young children. *New Eng. J.Med.*, 294:965,1976.  
  
15. Levine, M.M., E.S. Caplan, D. Waterman, RA. Cash, R.B. Hornick & M.J. Snyder.  
Diarrhea caused by *Escherichia coli* that produce only heat-stable enterotoxin. *Infect. I m mun.*, 17-78,1977.  
  
16. Mata, L.J., C. Lizano, F. Hernández, E. Mohs, L. Herrero, M.E. Peñaranda. F. Gamboa & J. León  
Agentes infecciosos en la diarrea del niño hospitalizado en Costa Rica. *Bol. Mad. Hosp. Infant. (Mix.)*, 34: 955,1977.  
  
17. Mata, L.J., J.J. Urrutia & J.E. Gordon  
Diarrhoeal disease in a cohort of Guatemalan village children observed from birth to age two years. *Trop. Geogr. Med.*, 19: 247, 1967.
18. Neter, E.  
Enteritis due to enteropathogenic *Escherichia coli*. *J. Pediat.*, 55: 223,1959.
19. Ogawa, H., A. Nakamura & R. Sakazaki  
Pathogenic properties of "enteropathogenic" *Escherichia coli* from diarrheal children and adults. *Japan J. Med. Sci. Biol.*, 21: 333,1968.
20. Plickerning, L.K., H.L. DuPont, D.G. Evans, D.J. Evans & J. Olarte  
Isolation of enteric pathogens from asymptomatic students from the United States and Latin America. *J. Infect. Dis.*, 135: 1003,1977.
21. Rudoy, R.C. & J.D. Nelson  
Enteroinvasive and enterotoxigenic *Escherichia coll*. *Amer. J. Dis Child.*, 129:668,1975.
22. Sack, R.B., S.L. Gorbach, J.G. Bannwell, B. Jacobs, B.D. Chaterjee & R.C. Mitra .  
Enterotoxigenic *Escherichia coll* isolated from patients with severe cholera-like disease. *J. Infect. Dis.*, 123: 378,1971.

23. Sack, R.B., N. Hirschhorn, I. Brownlee, R.A. Cash, W.E. Woodward & DA. Sack.  
**Enterotoxigenic Escherichia coli/i-associated diarrhea" disease in Apache children. New Eng. J.Med., 292:1041,1975.**
24. Sack, D.A., J.C. McLaughlin, R.B. Sack, F. O rskov & O rskov.  
**Enterotoxigenic Escherichia coli isolated from patients at a hospital in Dacca. J. Infect. Dis., 135: 275,1977.**
25. Smith, H.W. & C.L. Gyles  
**The relationship between two apparently different enterotoxins produced by enteropathogenic strains of Escherichia coli of porcine origin. J. Med. Microbiol., 3: 387,1970.**
26. Smith, H.W. & S. Halls  
**Studies on Escherichia coli enterotoxin. J. Path. Bact., 93: 531,1967.**
27. Smith, H.W. & S. Halls  
**The trasmissible nature of the genetic factor in Escherichia coli that controls the enterotoxin production. J, Gen. Microbiol., 52: 319,1968.**
28. Wadstróm, T., A. Aust-Kettis, D. Habte, J. Holmgren, G. Meeuwisse, R. Mólby & O. Siderlind  
**Enterotoxin-producing bacteria and parasites in stools of Ethiophian children with diarrhoea) disease. Arch. Dis. Child., 51: 865,1976.**