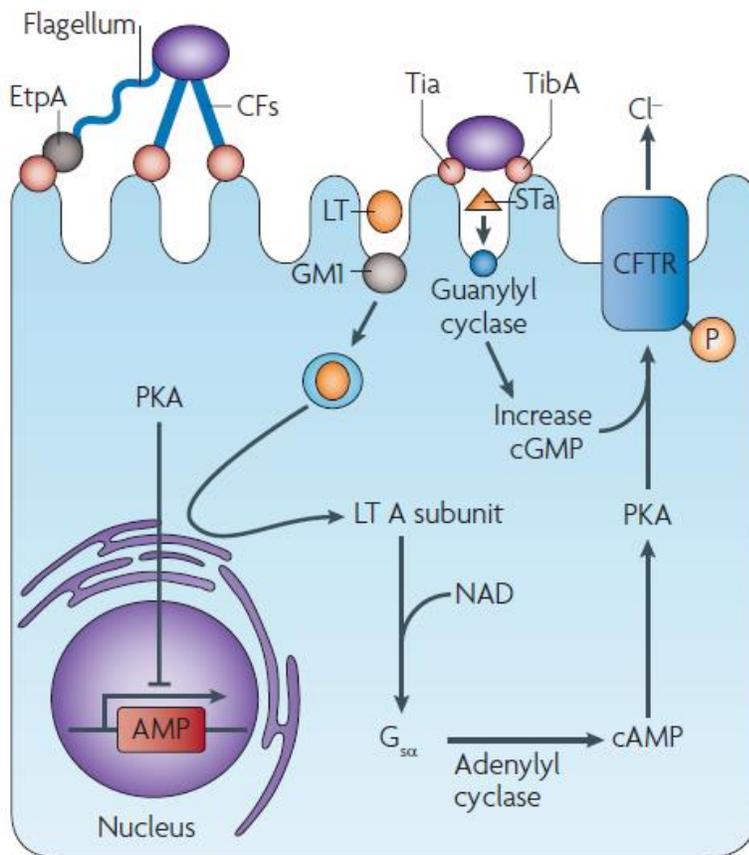


Infecciones sintomáticas por *Escherichia coli* Enterotoxigénica en niños \leq 5 años de León y su correlación con los fenotipos Lewis y secretor



Croxen MA. *Nat Rev Microbiol.* 2010.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE NICARAGUA, LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA
CENTRO DE ENFERMEDADES INFECCIOSAS
MAESTRIA EN CIENCIAS CON MENCIÓN EN MICROBIOLOGÍA MÉDICA



**TESIS PARA OPTAR AL TÍTULO DE MASTER EN CIENCIAS CON MENCIÓN EN
MICROBIOLOGÍA MÉDICA**

**Infecciones sintomáticas por *Escherichia coli* Enterotoxigénica en niños ≤ 5 años de León y
su correlación con los fenotipos Lewis y secretor**

Autor: Lic. Johann René Pérez Poveda

Tutores: Samuel Vilchez, PhD
Profesor Titular
Departamento de Microbiología y Parasitología

Filemon Bucardo, PhD
Profesor Titular
Departamento de Microbiología y Parasitología

Mayo 2019

“A la libertad por la Universidad”

ÍNDICE

RESUMEN	i
DEDICATORIA	ii
AGRADECIMIENTO	iiiv
GLOSARIO	iv
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	3
3. JUSTIFICACIÓN	5
4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	6
5. HIPÓTESIS	7
6. OBJETIVOS	8
7. MARCO TEÓRICO	9
7.2 Serotipos	9
7.3 Epidemiología	10
7.4 Transmisión, reservorio y fuentes	10
7.5 Patogénesis	11
7.5.1 Factores de colonización	11
7.5.2 Toxina termo lábil (LT)	12
7.5.3 Toxina termo estable (ST)	12
7.5.4 Toxina termo-estable enteroagregativa EAST1	13
7.6 Manifestaciones clínicas	13
7.6.1 Complicaciones	13
7.7 Diagnóstico de Laboratorio	14
7.8 Antígenos de histo-grupos sanguíneos: Sistema Lewis	15
7.8.1 Síntesis	15
7.9 Susceptibilidad a infecciones debidas a factores genéticos del huésped	17
7.10 Vacunas en desarrollo contra ETEC	18
7.10.1 Enterotoxinas y CF puros	19
7.10.2 "Nano-micropartículas"	19
7.10.3 Plantas comestibles	19

7.10.4 Bacterias inactivadas	19
7.10.4 Bacterias vivas atenuadas	20
7.10.5 Proteínas fusión o quiméricas	20
8. MATERIAL Y MÉTODO	21
9. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	26
10. CONCLUSIONES	34
11. RECOMENDACIONES	35
12. REFERENCIAS	36

RESUMEN

Infecciones sintomáticas por *Escherichia coli* Enterotoxigénica en niños ≤ 5 años de León y su correlación con los fenotipos Lewis y secretor

Pérez, Johann

La diarrea es la segunda causa de morbilidad y la tercera de mortalidad en niños menores de 5 años a nivel mundial. Recientes estimaciones mundiales atribuyen más de un millón de muertes por año por diarrea en todos los grupos de edad y aproximadamente el 4% del DALYS (años de vida ajustados en función de la discapacidad, por sus siglas en inglés). En Nicaragua, la enfermedad diarreica es la segunda causa infecciosa de mortalidad entre los niños, ETEC continúa siendo un agente causal importante en este contexto. *Amhed et al.*, demostró que niños Bangladesí Lewis A eran más susceptibles a padecer infección sintomática por ETEC ($P < 0,001$). En base a este hallazgo, este estudio investigó si existe asociación entre las infecciones sintomáticas por ETEC y el histo-grupo sanguíneo Lewis y estatus secretor. Se seleccionó al azar un total de 237 muestras de heces y saliva de niños menores de cinco años de edad, provenientes de la ciudad de León. ETEC fue detectada en las heces de los niños mediante un ensayo de PCR convencional. El fenotipo Lewis y el estado de secretor se determinaron mediante ELISA basado en saliva. Paralelamente, se evaluaron los factores de riesgo para la infección por ETEC mediante un modelo de regresión logística multivariado. En el estudio fueron 96 niños sintomáticos y 141 niños asintomáticos. Se detectó un total de 36 (15.2%) muestras positivas para ETEC. El fenotipo Lewis A y ser no secretor indicaron tener mayor riesgo de desarrollar infección (OR =3.942; IC= 0.31-49.84 / OR =4.099; IC= 0.42-40.18). Niños infectados menores de 1 año fueron estadísticamente significativo y son los más propensos a padecer infecciones por ETEC con respecto al modelo de riesgo (OR =4.761; IC=1.77-12.83) ($P=0.002$). Tanto en el grupo sintomáticos y el grupo asintomáticos la mayoría de los participantes resultaron Lewis B y secretores positivos. No se encontró asociación entre el histo-grupo sanguíneo Lewis como el estatus secretor y las infecciones sintomáticas por ETEC ($P=0.289/ P=0.226$).

DEDICATORIA

Para mi Abby, mi primer y único amor...

AGRADECIMIENTO

Agradezco a:

Dios por darme la fortaleza para superar obstáculos y rodearme de personas maravillosas.

Mis padres por su apoyo incondicional durante este periodo.

MSc. Margatita Paniagua, mi madre en León, por paciencia, tolerancia y apoyo durante esta etapa.

De manera muy especial al Dr. Samuel Vílchez por brindarme la oportunidad de pertenecer a este gran equipo de investigación por su motivación, paciencia y sus invaluable asesorías científicas.

Dr. Filemon Bucardo por su apoyo en la realización de este trabajo al igual que sus invaluable asesorías.

MSc. Fredman González por su gran asesoría durante todo el proceso de este trabajo.

Lic. Omar Zepeda y Lic. Lester Gutiérrez por su ayuda en el trabajo de laboratorio y consejos.

Dr. Erick Amaya, MSc. Yahoska Reyes y demás formadores del departamento de Microbiología por sus orientaciones y aportes en formación en esta fase.

MSc. Christian Toval por su ayuda en la metodología del trabajo.

Dr. Byron Flores por paciencia y tiempo en los análisis estadísticos.

A todas las personas y amigos que estuvieron involucradas directa o indirectamente en la realización y culminación de este trabajo de investigación.

Mis más sinceros agradecimientos.

! Por fin terminé!

GLOSARIO

E. coli

Escherichia coli

DEC

Escherichia coli diarreogénica

ETEC

Escherichia coli enterotoxigénica

EHEC

Escherichia coli enterohemorrágica

EAEC

Escherichia coli enterogregativa

EPEC

Escherichia coli enteropatógena

DAEC

Escherichia coli adherente-difusa

LT

Enterotoxina termo-estable

ST

Enterotoxina termo-lábil

CF

Factor de colonización

MLST

Tipificación de secuencia multilocus

ARF

Factores ribosilantes de ADP

CFTR

Regulador transmembrana fibrosis cística

GSP

Vía de secreción general

GR

Glóbulos rojos

EAST1

Toxina termo-estable agregativa

PCR

Reacción en cadena de la polimerasa

SNP

Polimorfismo de un solo nucleótido

DALYS

Años de vida ajustados en función de la discapacidad

LMIC

Países de ingresos bajos y medios

1. INTRODUCCIÓN

La diarrea es la segunda causa de morbilidad y la tercera de mortalidad en niños menores de 5 años a nivel mundial. Recientes estimaciones mundiales atribuyen más de un millón de muertes por año por diarrea en todos los grupos de edad y aproximadamente el 4% del total de años de vida ajustados en función de la discapacidad (DALYS). A pesar de la reducción en la mortalidad, la morbilidad a causa de diarrea sigue siendo una carga importante en los países de ingresos bajos y medios (LMIC) en América Latina, África y Asia, donde la calidad del agua y el saneamiento es inadecuada⁽²⁾⁽²⁾⁽²⁾⁽²⁾.

Escherichia coli enterotoxigénica (ETEC) es una de las causas más comunes de diarrea en infantes en países en vía de desarrollo. La estimación de mortalidad en menores de cinco años debido a ETEC fue de 23,649 en el 2015⁽²⁾. La característica distintiva de ETEC es la expresión de 1 ó 2 enterotoxinas acarreadas por plásmidos, la enterotoxina termo-estable (ST) o enterotoxina termo-lábil (LT). Ambas toxinas intervienen en la desregulación de los canales de iones en las criptas del intestino delgado⁽³⁾. Además, los aislados de ETEC pueden llegar a expresar de 1 a 3 factores de colonización (CF) que están involucrados en la adhesión al epitelio intestinal. Los CF más prevalentes son CFA/I y antígenos de superficie de coli (CS) 1-6 (CS1-CS6)⁽⁴⁾.

Por otro lado, diferentes estudios han demostrado que los antígenos de grupos sanguíneos pueden jugar un rol en las infecciones, puesto que pueden funcionar como correceptores para diferentes microorganismos como *Candida albicans* y *Helicobacter pylori* ^(5, 6). Además, se ha demostrado que los antígenos del histo-grupo Lewis funcionan como receptores para agentes entéricos como Rotavirus y Norovirus, y en dependencia del antígeno presente y la cepa infectante el resultado puede ser un curso clínico de infección con o sin síntomas^(7, 8). Esto es debido a que los antígenos Lewis también son sintetizados en la mucosa intestinal por un grupo de glicosiltransferasas que insertan residuos de fucosa en los precursores oligosacáridos. Dependiendo su síntesis a la presencia de los genes *FUT2* y *FUT3*⁽⁹⁾.

En Nicaragua, se ha investigado anteriormente la presencia de los diferentes tipos de *E. coli* diarreogénica (DEC). Siendo ETEC, EAEC (*E. coli* enteroagregativa) y EPEC (*E. coli* enteropatógena) los patotipos a los que se les atribuyen mayor número de casos asociados a diarrea en niños menores de 5 años^(10, 11). También, se ha logrado estudiar diferentes factores de

colonización de cepas de ETEC en diferentes años de estudio (2005, 2006 y 2010), indicando que CS19 fue el CF más frecuente en las cepas de ETEC asiladas de casos severos a moderados en comparación a casos de diarrea leve, en esos años⁽¹²⁾.

Adicionalmente, estudios recientes sugieren que cepas ETEC que expresa la enterotoxina ST afecta con mayor frecuencia a niños con grupo sanguíneo "A" o "AB" que a niños "O"⁽¹³⁾. Así mismo, otro estudio determinó genéticamente que niños Lewis A⁻, estaban más propensos a presentar una infección sintomática por ETEC que expresaban factores de colonización del grupo CFA/I en comparación a los Lewis B o Lewis negativo. Se cree que esta asociación se da por la capacidad de CFA/I a adherirse glicoesfingolípidos terminales de Lewis A. En contraste, otro estudio en el mismo grupo de niños de Bangladesh encontró que 14 (44%) de estos con los SNP *rs200157007*-TT y *rs601338*-AA se asociaron con infección por ETEC sintomática pero no asintomática, independientemente del estatus del secretor, lo que sugiere que *FUT2*, el regulador de los antígenos de Lewis y ABO (*H*) en la mucosa intestinal, podría ser una característica genotípica del huésped afectando la susceptibilidad a la infección por ETEC⁽¹⁴⁾. Por lo antes mencionado, este estudio pretende investigar si existe asociación entre las infecciones sintomáticas por ETEC y el histo-grupo sanguíneo Lewis y estatus secretor, realizando una detección fenotípica de estos antígenos.

2. ANTECEDENTES

En Nicaragua ETEC ha sido un patógeno de importancia clínica, por tal razón se han hecho diferentes estudios como el realizado por *Vilchez et al.*, publicado en el 2014, caracterizaron diferentes cepas de ETEC asiladas a partir de niños que asistieron a diferentes unidades de salud en León. Se analizaron un total de 58 ETEC, donde la distribución de los factores de colonización (CF) y enterotoxinas variaba. Entre los CF detectados, 91.7% pertenecían a la familia de fimbrias clase 5 (CS19, CFA I, CSI, CS2, CS4, CS14, CS17). Paralelamente, STh se detectó con mayor frecuencia entre las cepas de niños en la comunidad (47.8%) comparado a las cepas provenientes de casos de las unidades de salud (0.0). La combinación de STh y LT fue mayor entre cepas de niños atendidos en unidades de salud (27.3%) comparados con los niños captados en la comunidad⁽¹²⁾.

Becker et al., realizó un estudio de cohorte sobre la etiología de casos de diarrea en niños en la ciudad de León después de la introducción de la vacuna de Rotavirus entre el año 2010-2011. Donde se reportaron un total de 677 episodios de diarrea entre 354 niños, de estos 45.1% tuvieron 1 episodio de diarrea, 34% tuvieron 2 episodios de diarrea y 20.9% reportaron 3 episodios de diarrea. De todos los episodios reportados el 3.4% resultaron en hospitalización. Al menos un enteropatógeno fue detectado entre 61.1% de muestras de niños sintomáticos y 41.5% en muestras de niños sanos. Los enteropatógenos detectados en los niños sintomáticos fueron Norovirus (20.4%), Sapovirus (16.6%), EPEC (11.3%), *E. histolytica/dispar* (8.3%), *Giardia lamblia* (8.0%), ETEC (7.7%) y Rotavirus 5.3%. Cabe resaltar que en este estudio a diferencia del realizado por *Vilchez et al.*, 2014 la enterotoxina termoestable (ST) se detectó solamente en cepas provenientes de niños sintomáticos⁽¹⁵⁾.

Vilchez et al., en el periodo de Marzo 2005 a Septiembre del 2006 analizaron 526 muestras de heces de niños de León entre las edades de 0-60 meses (381 sintomáticos y 145 asintomáticos), encontrando una prevalencia de DEC en un 67.2% en los niños sintomáticos y 63.4% en niños asintomáticos. ETEC se aisló con más frecuencia en niños sintomáticos 20.5% que en niños asintomáticos (8.3%). ETEC se detectó en todos los grupos de edad, pero fue levemente más prevalente en el grupo de edad ≤ 12 meses⁽¹¹⁾.

Paniagua et al., realizaron un estudio en la ciudad de León que incluyó 235 niños en el año 1997, de los cuales se analizaron 808 muestras asociadas a episodios de diarrea, así como 1472 muestras de controles asintomáticos. ETEC se encontró duplicado 38% (310/808) al ser comparado con las muestras de los controles 19% (277/1,472). Según grupo etario, el grupo de 0-6 meses obtuvo la mayor proporción de casos de diarrea y asintomáticos fue de 42% y 20%, respectivamente. Paralelamente, se detectaron la presencia de las toxinas ST y LT de las ETEC aisladas, donde en un 16% se detectaron ambas toxinas, en muestras sintomáticas (131/808), mientras ST se detectó con más frecuencia en pacientes asintomáticos 8% (122/1,472). A la mismas vez, se detectaron 4 factores de colonización, donde CFA I se detectó en un 36% de los aislados ETEC de episodios de diarrea y 23% en las ETEC provenientes de los controles asintomáticos, y PCFO166 (ahora CS14) en los aislados ETEC de diarrea en un 19% y de controles en un 22% ⁽¹⁰⁾.

Datos sobre ETEC y el tipo ABO en infecciones es controversial. *Black et al.*, 1987, infectó voluntarios con diferentes cepas de ETEC, incluyendo las que co-expresaban LT y ST. El 57% de los sujetos desarrollo diarrea con una ligera preferencia por el grupo sanguíneo "O". No hubo correlación entre la infección y el tipo ABO entre los individuos expuestos ⁽¹⁶⁾. Por otro lado *Qadri et al.*, 2007 encontró mayor incidencia de diarrea en niños de tipo sanguíneo "A", "B" y "AB" ($P=0.02-0.03$). El tipo sanguíneo "AB" estaba en mayor riesgo de presentar diarrea (OR=2.5; IC=0.95–6.66)⁽¹³⁾.

Ahmed et al., determinó la expresión de antígenos Lewis en 179 niños de un estudio de cohorte en Dhaka en el año 2009, en el cual ETEC que expresaron CF como CFA/I, CS3, CS5 y CS6 fueron aislados con mayor frecuencia en los dos primeros años de vida. Mostrando que las infecciones sintomáticas por ETEC fueron más frecuentes en niños con el fenotipo Lewis A ($P < 0.001$), mientras que las infecciones sintomáticas y asintomáticas tuvieron igual frecuencia en niños con el fenotipo Lewis B. También demostró que niños con el fenotipo Lewis A tuvo una mayor incidencia en diarrea causada por ETEC que expresaban fimbrias pertenecientes al grupo CFA/I en comparación a niños con el fenotipo Lewis B ($P < 0.001$)⁽¹⁷⁾.

3. JUSTIFICACIÓN

ETEC es un agente de gran importancia clínica en nuestro medio, infecciones repetidas pueden asociarse con secuelas y enfermedades a largo plazo, como desnutrición, retardo en el crecimiento, neumonía y artritis, tanto en los países con LMIC como en los países desarrollados. Las complicaciones son más severas en bebés y en niños de edad escolar, obstaculizando el desarrollo cognitivo. Además, el aumento de la resistencia a los antibióticos como ciprofloxacina, subrayan aún más la persistente necesidad de crear medidas de contingencia eficaces contra este patógeno.

Para poder reducir el número de infecciones por ETEC, se necesitan importantes cambios tales como mejoras en los sistemas de agua, saneamiento, calidad en la preparación y distribución de alimentos. En países en vías de desarrollo como Nicaragua, estos cambios implicarían un alto costo y tomaría tiempo. Por tal razón, la introducción de vacunas podría ayudar al manejo clínico de infecciones por ETEC.

Los hallazgos encontrados en este estudio proporcionan además de estimaciones de la carga de infecciones por ETEC, datos que podrían ayudar a la evaluación del impacto futuro de una vacuna. Estos datos, brindan información relevante para realizar ensayos clínicos y evaluar la eficacia de vacunas en el país. Por lo tanto, es importante comprender todos los posibles escenarios tales como factores genéticos del huésped y limitaciones implicadas que pueden influir en las estimaciones de infecciones por ETEC y la eficacia de una posible vacuna contra esta bacteria.

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

¿Cuál es la relación de las infecciones sintomáticas por *Escherichia coli* Enterotoxigénica relacionadas con el histo-grupo sanguíneo Lewis y secretor en niños Leoneses ≤ 5 años?

5. HIPÓTESIS

El fenotipo Lewis A y no secretor son un factor predisponente para desarrollar infecciones sintomáticas causadas por ETEC.

6. OBJETIVOS

General

- Determinar la asociación de las infecciones sintomáticas por *Escherichia coli* Enterotoxigénica y los histo-grupo sanguíneos Lewis y secretor en niños menores de 5 años con y sin diarrea de la ciudad de León.

Específicos

- Describir características sociodemográficas de la población de estudio.
- Determinar la distribución de histo-grupo sanguíneo Lewis y estatus secretor de niños en estudio.
- Investigar la prevalencia de infecciones sintomáticas y asintomáticas por *E. coli* enterotoxigénica.
- Correlacionar las infecciones por *Escherichia coli* Enterotoxigénica con el Histo-grupo sanguíneo Lewis y estatus secretor.

7. MARCO TEÓRICO

7.1 Generalidades

E. coli normalmente coloniza el tracto gastrointestinal de recién nacidos a pocas horas del nacimiento. Por lo general, *E. coli* y el huésped humano coexisten en beneficio mutuo durante décadas. Estas cepas comensales de *E. coli* rara vez causan enfermedad, excepto en huéspedes inmunocomprometidos⁽¹⁸⁾.

E. coli es un bacilo Gram negativo, lactosa positiva y oxidasa negativo perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae*. Puede crecer tanto en ambiente aerobio y anaerobio, preferiblemente a 37°C, puede ser mótil o no mótil, con flagelo peritrico⁽¹⁹⁾.

E. coli puede causar una amplia gama de enfermedades que abarcan desde el tracto gastrointestinal a otros sitios extraintestinales tales como las vías urinarias, torrente sanguíneo, y el sistema nervioso central. Entre los patógenos intestinales existen 6 categorías: *E. coli* enteropatógena (EPEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC) y *E. coli* de adhesión difusa (DAEC). Las infecciones de vías urinarias son las infecciones más comunes por *E. coli* extraintestinal causada por *E. coli* uropatógena (UPEC)⁽¹⁸⁾.

ETEC es la mayor causa de diarrea del viajero y es endémica en países en subdesarrollados. En estos países, puede ser aislada tanto de portadores sintomáticos como asintomáticos, con alto grado de mortalidad en niños. ETEC es definida por la habilidad de producir ya sea enterotoxina termo-lábil o termo-estable, así como factores de colonización para su adherencia en el epitelio intestinal⁽²⁰⁾. Además de su impacto en los humanos, la industria porcina también tiene efectos adversos, ya que la diarrea por ETEC causa alta morbilidad y mortalidad en cerdos recién nacidos y destetados.

7.2 Serotipos

Existen al menos 78 antígenos "O" detectables y 34 antígenos "H" asociados a ETEC, entre los serotipos más comunes aislados estaban: O6:H16 (LT; Toxina termo-lábil) /ST; Toxina termo-estable), O8:H9 (ST), O25:NM (LT), O78:H12 (ST), O148:H28 (ST), and O153:H45 (ST)⁽²¹⁾.

Sin embargo, la prevalencia y serotipos (toxinas que producen o CF que expresan) pueden variar según el lugar aislado. *Steinsland et al.*, 2010 analizaron 1019 aislados de muestras humanas encontrando que podían ser diferenciarse en 42 grupos clónales distintos, con diferentes perfiles de toxinas y CF dispersos en todas las líneas⁽²²⁾.

7.3 Epidemiología

Las infecciones diarreicas son una de las principales causas de muerte en países subdesarrollados en niños menores de 5 años de edad. Colectivamente, se estima que a los patógenos causantes de diarrea se les atribuye entre 1-2 millones de muertes anualmente⁽²³⁾. ETEC contribuye significativamente a la mortalidad asociada a infecciones diarreicas, sumando cientos de miles de muerte cada año. Además, esta infección aparenta contribuir sustancialmente a la morbilidad y puede estar relacionada con el retraso en el crecimiento en niños infectados.

En países subdesarrollados la detección de ETEC no es parte de los exámenes de rutina en niños que presentan diarrea; por esta razón, la incidencia por infecciones por ETEC no puede ser determinada adecuadamente. A pesar del incremento en casos en Latinoamérica y África de diarrea del viajero relacionados a ETEC, esta sigue siendo el agente causal más detectado y se le atribuye el 30% de los casos⁽²⁴⁾.

Los perfiles de toxinas y adhesinas de los aislados de ETEC son variables y difieren entre distintas áreas geográficas y población. *Isidean et al.*, 2011 realizó una revisión de literatura en 35 países y se encontró un promedio de 45% aislados de ETEC expresaban ST solamente, 27% únicamente LT y 33% expresaron ST/LT. Además, se determinó la prevalencia de CF y demostró que CFA/I, CS6 y CS21 son los CF que más se detectan a nivel mundial en aislados de ETEC⁽²⁵⁾.

7.4 Transmisión, reservorio y fuentes

Las infecciones por ETEC se transmiten a través de la ruta fecal-oral. La exposición usualmente se da por entrar en contacto con alimentos y agua potable contaminados. Algunos ejemplos de alimentos en riesgo de ser contaminados por agentes patógenos son por ejemplo: la comida que se mantiene a temperatura ambiente, salsas caseras, frutas y alimentos distribuidos por vendedores ambulantes en áreas endémicas⁽²⁴⁾. Adicionalmente, aguas superficiales en países subdesarrollados pueden contener este microorganismo y puede servir como una fuente importante de contaminación durante el contacto con este tipo de agua. Los alimentos pueden ser contaminados

por personas infectadas que los manipulan, portadores asintomáticos o cuando los vegetales son irrigados por agua no tratada.

La persistencia y habilidad de ETEC sobrevivir estos ambientes se desconoce. Pero un estudio demostró que ETEC pudo sobrevivir más de 3 meses en agua fresca y pudo formar biopelícula en fuentes de agua potable. La dosis infecciosa comparado a otros patotipos de *E. coli* es relativamente alto 10^6 y 10^8 ; sin embargo, las dosis infecciosas están basadas en cultivos de laboratorio y pueden diferir con la dosis infecciosa de la infección natural⁽²⁶⁾.

7.5 Patogénesis

La patogenia de la infección por ETEC, implica la adherencia a las mucosas y la secreción de líquidos mediada por toxinas. Los genes que codifican las toxinas, y muchos de los genes que codifican las adhesinas, se encuentran codificados exclusivamente en plásmidos. Una vez que ETEC coloniza el intestino delgado a través de la fijación al epitelio del huésped por proteínas de superficie llamadas factores de colonización (CF). Una vez fijada, la bacteria elabora toxinas que causan manifestaciones clínicas típicas de la infección⁽²⁰⁾.

7.5.1 Factores de colonización

Los CF de ETEC son llamados antígenos de superficie de coli (CS), sufijo con un número, excepto por el CFA/I. Son estructuras de superficie que se necesitan para la colonización y causar la enfermedad. Actualmente, se han caracterizado al menos 22 FC, sin embargo, entre el 30%-50% de los aislados de ETEC tienen CF indetectable; esto puede deberse a la ausencia de CF, pérdida de sus propiedades en el reaislamiento de las cepas o a la falta de herramientas adecuadas para su detección⁽²⁰⁾.

Los CF se unen a diferentes receptores en las células huésped. Por ejemplo CS6 se une a fibronectina⁽²⁷⁾ y sulfatida (SO3-3Gal β 1 ceramida), un glicoesfingolípido mayor⁽²⁸⁾. También CFA/I se une a glicoproteínas y glicoesfingolípidos que se encuentran en la superficie de células del huésped del intestino delgado⁽²⁹⁾. Los CF tienen otras funciones además de adhesión a las células del huésped, longus (CS21, una fimbria tipo IV) ha demostrado estar relacionada en los cambios de motilidad y auto-agregación, la cual funciona como protectora contra los antibióticos in vitro⁽³⁰⁾.

Otras proteínas adhesivas que se encuentran en ETEC son codificadas en el locus *tia* y *tib*. Genes del locus *tia* (se encuentran también en cepas de EPEC, EAEC y *Salmonella sonnei*) pueden estar

involucradas en la invasión y adherencia a células epiteliales e interactúan con los proteoglicanos de heparán sulfato; al igual que el locus *tib*⁽³¹⁾. Se ha encontrado que TibA está involucrada en la auto-agregación y en la formación de biopelícula⁽³²⁾. La proteína EtpA contribuye a la adherencia de las células epiteliales y se piensa que actúa transitoriamente siendo expuesta en el extremo del flagelo para mediar la adhesión⁽³⁾.

7.5.2 Toxina termo lábil (LT)

La toxina termo-lábil, está relacionada con la toxina del cólera (CT), es una molécula heterohexamérica compuesta de la sub-unidad B (pentamérica) y una única sub-unidad A. La sub-unidad A consiste en dos dominios unidos por un puente disulfuro: A1, es la toxina activa, y A2 es una porción hélica que se une a la sub-unidad B. La unión de la sub-unidad B al gangliosido GM1 ubicados en las caveolas de la superficie celular del huésped provoca la endocitosis de la holotoxina⁽³⁾.

La porción A1 deber ser traslocada a ADP-ribosilato Gs α , a través de la membrana celular por factores ribosilantes de ADP (ARF). La inhibición de la actividad GTPasa Gs α lleva a la activación constitutiva de adenilato ciclasa. Posteriormente, el aumento de niveles de cAMP activa al canal de cloro, regulador transmembrana fibrosis cística (CFTR) seguido por la secreción neta de electrolitos y agua⁽³⁾.

Tanto CT y LT son secretadas a través de la membrana externa en un proceso de dos etapas. En el primer paso, los péptidos de señal N-terminal de las subunidades son cortadas durante el transporte dependiente de *sec* a través de la membrana interna al periplasma donde los monómeros se ensamblan en holotoxina. La secreción a través de la membrana externa se encarga un aparato de secreción tipo II conocido como vía de secreción general (GSP)⁽³⁾.

7.5.3 Toxina termo estable (ST)

La toxina termo-estable son pequeños péptidos ricos en cistina secretados por ETEC, que se unen al dominio extracelular de guanilil ciclasa C (GC-C) en el borde de cepillo en el epitelio intestinal. Estas interacciones activan el dominio catalítico intracelular de guanilil ciclasa que lleva a la acumulación intracelular de cGMP. El incremento de cGMP en cambio activa la proteína cinasa II dependiente de cGMP llevando a la fosforilación del CFTR, llevando a la secreción de Cl⁻ e inhibición de la absorción de NaCl seguido de pérdida neta, a través de diarrea osmótica⁽³⁾.

Varios péptidos de ST han sido identificados en varias cepas de ETEC aisladas en humanos. Estas incluyen los péptidos STa (ST I) que se unen a GC-C, ST-Ia (ST-P) y ST-Ib (ST-H), ST-Ia (ST-P) esta típicamente relacionada con las cepas porcinas. Sin embargo, STb se une a diferentes receptores, no estimula la producción de nucleótidos cíclicos. Moléculas de ST I comparten un núcleo de aminoácidos que contienen 3 diferentes enlaces disulfídicos que son necesarios para su actividad biológicas⁽³⁾.

7.5.4 Toxina termo-estable enteroagregativa EAST1

La toxina termo-estable enteroagregativa (EAST1, por sus siglas en inglés), comparte estructura similar con los péptidos de TE1⁽³⁾. Se ha identificados en otros patógenos incluyendo ETEC. Aunque se cree que aumenta las concentraciones de cGMP, su mecanismo patogénico no se ha demostrado completamente, un estudio afirma que EAST1 de ETEC no está relacionada con casos de diarrea⁽³³⁾.

7.6 Manifestaciones clínicas

La infección por ETEC causa diarrea líquida que se puede categorizar de moderada a severa (usualmente sin sangre), tiene una presentación clínica similar a diarrea causada por cólera y puede causar rápidamente deshidratación. También se pueden presentar síntomas como dolor de cabeza, fiebre, calambre abdominal, náusea y vómito. El inicio de la diarrea generalmente es rápido, con periodo de incubación que puede ser corto como 5 horas, pero generalmente tiene un promedio de 1-2 días después de la ingestión. La duración de la diarrea puede ser de 3-5 días, pero se puede prolongar por más de 1 semana. Los índices de mortalidad que son bajos cuando son tratados adecuadamente (1%)⁽³⁴⁾.

7.6.1 Complicaciones

La complicación más seria por la diarrea causada por ETEC es la deshidratación particularmente en niños, otro efecto es el retraso en el crecimiento. Casos repetidos de diarrea en la niñez se ha asociado con retraso en el crecimiento de manera significativa. Además, la desnutrición aparenta poner en alto riesgo para el desarrollo de diarrea causa por ETEC. También, la diarrea en los niños con infección por ETEC tiende a ser severa cuando estos están desnutridos⁽³⁵⁾.

Estudios han demostrado que un pequeño porcentaje de personas que han padecido de "diarrea del viajero" desarrollan síntomas crónicos que pueden durar de meses a años. La patogénesis de estas presuntas secuelas post-infección, se refieren al síndrome del intestino irritable post-infección. Sin embargo, cambios inflamatorios de bajo grado característicos en la mucosa podrían sugerir una respuesta adversa en curso de la infección previa⁽³⁶⁾.

7.7 Diagnóstico de Laboratorio

EPEC se define como la presencia de una o ambas de sus enterotoxinas y por ende la identificación se realiza por la detección de las enterotoxinas ST, LT o ambas. Como la mayoría de los patotipos de *E. coli*, EPEC no puede ser distinguida en el medio de cultivo MacConkey de las *E. coli* comensales, y por lo tanto su detección se tiene que realizar a través de técnicas moleculares; desafortunadamente estas técnicas no se realizan en laboratorios de rutina, lo cual no es rentable para laboratorios de países en vías de desarrollo.

Los ensayos funcionales o fisiológicos han sido usados años atrás para identificar las bacterias productoras de toxinas, estas han sido suplantadas por métodos inmunológicos o moleculares. Entre los ensayos fisiológicos, el modelo de asa ileal de conejo para LT⁽³⁷⁾ y el ensayo de ratón infante para ST eran usados como "gold standard"⁽³⁸⁾. En 1974 la acción directa de LT en dos líneas celulares en cultivo celular Y1 células adrenales⁽³⁹⁾ y células de ovario de hámster chino⁽⁴⁰⁾, proporcionaban respuestas fisiológicas que podían ser detectadas por cambios morfológicos en cultivo celular. Estos cambios eran específicos para LT y eran neutralizados por una antitoxina. Estos cultivos celulares eran ampliamente utilizados para la identificación de LT hasta el desarrollo del ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) en 1977⁽⁴¹⁾. Otro ensayos son coagulación estafilocócica, que utiliza la proteína A de estafilococos recubiertos con antisuero específico contra la enterotoxina termo-lábil de *Escherichia coli* ⁽⁴²⁾. La aglutinación pasiva en látex, donde partículas de látex son sensibilizadas con antisueros contra LT o ST⁽⁴³⁾. La prueba Biken, es una inmunoprecipitación *in vitro*, en el centro de la placa de agar se coloca el suero anti-LT con 4 colonias de EPEC alrededor, así como 2 discos de polimixina B, donde se observan líneas de precipitinas entre el centro y las cepas en caso positivo ⁽⁴⁴⁾. Estos ensayos eran específicos, pero no eran usados con propósitos diagnósticos. El ELISA se ha utilizado de manera amplia como método para detectar LT, particularmente usando el método gangliosido GM1.

7.8 Antígenos de histo-grupos sanguíneos: Sistema Lewis

El Histo-grupo sanguíneo Lewis es único debido a que no están de manera intrínseca en los glóbulos rojos (GR), pero se adsorben pasivamente sobre la membrana GR del plasma. Hay una regla general que se aplica a los fenotipos de glóbulos rojos de personas de raza blanca y negra. Los adultos con un gen *Le* son Le (a-b+) o Le (a+b-); si son secretores de ABH, sus glóbulos rojos son Le (a-b+); Si son no secretores son Le (a+b-). Las personas homocigotas con el gen *le* son Le (a-b-). Los glóbulos rojos de los fetos, muestras de cordón y neonatos generalmente son Le (a-b-). Los bebés pueden ser transitorios Le (a+b+) antes de convertirse en Le (a+b-). Las mujeres Lewis positivas pueden ser Le (a-b-) transitoriamente durante el embarazo. El fenotipo en glóbulos rojos Le (a+b+), es muy raro en adultos europeos, pero es común en Asia oriental y sudoriental, y en la región del Pacífico^(45, 46).

Los antígenos de Lewis comienzan a aparecer en los glóbulos rojos poco después del nacimiento. Lewis A se desarrolla primero; Los glóbulos rojos de infantes con un gen *Le* generalmente se convierten en Le(a+) durante los primeros meses de vida. En personas de raza blanca, a los 3 meses de edad, el 80% de los infantes son Le (a +), este número se reduce al nivel de adultos del 20% en 2 años. Durante este período, el fenotipo de glóbulos rojos Le (a+b+) no es infrecuente. A los 6 años de edad, la proporción de Le (b +) alcanza el nivel adulto^(45, 46).

7.8.1 Síntesis

Los carbohidratos de grupo histo-sanguíneo ABO, H, secretor y Lewis no son productos primarios de genes. Se sintetizan mediante glicosiltransferasas específicas codificadas por los genes *ABO*, *FUT1*, *FUT2* y *FUT3*. Estas enzimas incorporan secuencialmente, unidades de monosacáridos a cadenas de precursores oligosacáridos lineales o ramificadas, modificando y creando nuevas especificidades antigénicas^(9, 46).

Seis tipos de monosacáridos se encuentran en los carbohidratos de los grupos histo-sanguíneos ABO, H, Lewis y secretore: β -D-glucosa (Glc), β -D-N-acetilglucosamina (GlcNAc), β -D-galactosa (Gal), β -D-N-acetilgalactosamina (GalNAc), α -fucosa (Fuc) y D-manosa. La L-fucosa es el monosacárido inmunodominante presente en carbohidratos H, Lewis A y Lewis B, mientras que N-acetilgalactosamina (GalNAc) y galactosa (Gal) son los monosacáridos inmunodominantes presentes en carbohidratos "A" y "A Lewis B", y "B" y "B Lewis B", respectivamente.^(9, 46).

Se han caracterizado seis tipos de cadenas de oligosacáridos precursoras. El tipo 1 se encuentra en el epitelio gastrointestinal, respiratorio, genitourinario y secreciones exocrinas. El tipo 2 es predominante en el tejido hematopoyético y en el endotelio vascular. El tipo 3 se puede encontrar vinculado a mucinas o como una extensión del carbohidrato "A" tipo 2 debido a la adición de una galactosa a la terminal N-acetilgalactosamina. El tipo 4 es abundante en el tejido renal. El tipo 5 es sintético y aún no se ha aislado de los tejidos humanos. El tipo 6 se encuentra en las células intestinales humanas⁽⁹⁾.

Las glicosiltransferasas para modificar y crear nuevas estructuras de carbohidratos de histo-grupos sanguíneos ABO, H, Lewis y secretor, compiten por el mismo precursor. Por lo tanto, la presencia, ausencia o combinación de estas glicosiltransferasas determinará la calidad y la cantidad de carbohidratos expresados por individuos. Algunas glicosiltransferasas que actúan sobre la biosíntesis de carbohidratos de los histo-grupo sanguíneos tienen redundancia y degeneración. Se observa redundancia cuando dos enzimas separadas sintetizan el mismo antígeno. Por ejemplo, la fucosiltransferasa definida por el gen *FUT1* y la fucosiltransferasa definida por el gen *FUT2* son capaces de sintetizar el carbohidrato H tipo 2 a partir del mismo oligosacárido precursor (tipo 2). La degeneración ocurre cuando la misma enzima sintetiza diferentes estructuras de carbohidratos. Por ejemplo, la fucosiltransferasa definida por el gen *FUT2* es capaz de sintetizar los carbohidratos H tipo 1 y H tipo 2 a partir de sus precursores oligosacáridos tipo 1 y tipo 2. Adicionalmente, la fucosiltransferasa definida por el gen *FUT3* es capaz de sintetizar al menos cuatro carbohidratos de diferentes grupos histo-sanguíneos (Lewis A, Lewis B, "A Lewis A", y "A Lewis B",) derivados del oligosacárido precursor tipo 1⁽⁴⁶⁾.

Los carbohidratos del grupo histo-sanguíneo sintetizados a partir de los oligosacáridos precursores de tipo 2 son intrínsecos a la membrana de los glóbulos rojos. Sin embargo, aquellos sintetizados a partir del precursor oligosacárido tipo 1 (A, B, H, Lewis A y Lewis B) son extrínsecos ya que se originan en el hígado, páncreas, riñón e intestino delgado, se transportan desde su lugar de síntesis al plasma sanguíneo y luego se adsorben en los glóbulos rojos⁽⁹⁾.

FUTIII crea una nueva especificidad antigénica y diversifica los carbohidratos anteriores mediante la síntesis de Lewis A, Lewis B, "A Lewis A", y "A Lewis B". Incorpora una molécula de fucosa mediante un enlace glicosídico α 1,4 al carbono 4 del Glc-NAc del oligosacárido precursor tipo 1 para formar el Lewis A. Por la misma reacción, FTUIII forma Lewis B del antígeno H tipo 1. El

papel del FUTII funcional es crucial para la acción de otras glicosiltransferasas del grupo histo-sanguíneo en la diversificación de los carbohidratos en secretores.

En resumen, los niveles definidos de glicosilación en oligosacáridos precursores son responsables de la diversidad estructural de los carbohidratos y de los polimorfismos observados en estos sistemas antigénicos. El primer nivel, controlado por FUTIII, da como resultado la síntesis de Lewis A. El segundo nivel, controlado por FUTI y FUTII, da como resultado la expresión de carbohidratos H tipo 2 y H tipo 1, respectivamente. En el tercer nivel, controlado por FUTIII, el antígeno H tipo 1 se convierte en Lewis B⁽⁴⁶⁾.

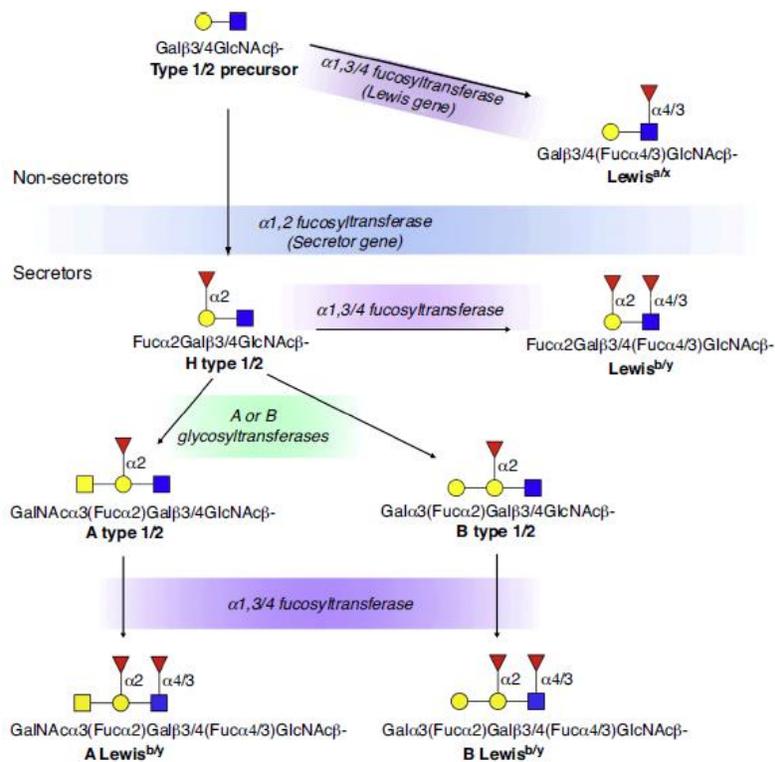


Imagen 1. Síntesis de los histo-grupos sanguíneo Lewis, secretor y ABO⁽⁴⁷⁾.

7.9 Susceptibilidad a infecciones debidas a factores genéticos del huésped

Diversos estudios han demostrado que la expresión de fenotipo Lewis y ABO pueden ser un gran determinante dentro de los posibles factores susceptibilidad del huésped. Niños menores de 5 años tienen una incidencia 4-5 veces mayor a padecer la infección en relación a niños mayores⁽⁴⁸⁾. Una posible hipótesis en la disminución en los casos con la edad es la inmunidad adquirida por infecciones previas. Alternativamente, los cambios desarrollados en la expresión de ABO y Histo-grupo sanguíneo Lewis relacionados por la edad pueden influenciar la susceptibilidad del huésped.

ETEC puede expresar diferentes factores patogénicos, incluyendo fimbria CFA/I, toxinas hLT y ST. Se ha reportado que la fimbria CFA/I reconoce distintos glicoesfingolípidos en el intestino de cerdos, incluyendo lactocil-ceramida (LacCer)⁽⁴⁹⁾. LacCer es un receptor común para bacterias y es altamente expresado en el epitelio intestinal humano.

La toxina LT puede unirse a LeY, sin aparente preferencia por ABO. A pesar de lo mencionado, se ha reportado predilección por ABO en modelos animales. Se demostró que hLT se une a los epítopes ABO, con la producción de diarrea secretoria en un modelo de conejo. El nivel de unión de hLT fue 4 veces mayor al grupo AB fue que en el grupo H (48.7 vs 11.4 fmol/μg proteína) y pudo ser bloqueado por lectinas anti-A y anti-AB. Además, unión de hLT glicoconjugados AB permitió la activación de adenilato ciclasa con secreción de fluidos, independientemente de los receptores GM1⁽⁵⁰⁾.

El fenotipo no secretor ha sido asociado con el incremento de susceptibilidad en infecciones causadas por diferentes patógenos por ejemplo: *E. coli* uropatógena, *Haemophilus influenzae*, *Neisseria meningitidis* and *Candida albicans*⁽⁹⁾. Por otro lado, el estatus secretor Lewis B parece incrementar la susceptibilidad a padecer infecciones por *Helicobacter pylori*, así como algunos genotipos de Norovirus y Rotavirus comparado a los no secretores⁽⁵¹⁻⁵³⁾. Hallazgos de un estudio en la zona urbana de Dhaka ha demostrado niños con el fenotipo Lewis A tuvieron una mayor incidencia en diarrea causada por ETEC que expresaban fimbrias pertenecientes al grupo CFA/I en comparación a niños con el fenotipo Lewis B⁽⁴⁵⁾. En contraste, otro estudio en los mismos niños de Bangladesh encontró que 14 (44%) tenían los SNP *rs200157007-TT* y *rs601338-AA* se asociaron con infección por ETEC sintomática pero no asintomática, independientemente del estatus del secretor, lo que sugiere que FUT2, el regulador de los antígenos de Lewis y ABO (H) en la mucosa intestinal, podría ser una característica genotípica del huésped afectando la susceptibilidad a la infección por ETEC⁽¹⁴⁾.

7.10 Vacunas en desarrollo contra ETEC

Hay muchas vacunas diferentes que se están desarrollando para proteger contra la infección por ETEC principalmente, en varias etapas del desarrollo clínico⁽³¹⁾. Las vacunas se pueden dividir en dos grupos: la primera es una vacuna viva atenuada que contiene cepas de ETEC genéticamente modificadas, no patógenas, o bacterias portadoras alternativas que expresan los importantes antígenos de ETEC, y la segunda vacuna inactivada que contiene células completas muertas, CF

purificada Antígenos o LT inactivados ⁽³²⁾. Para desarrollar una vacuna eficaz con una amplia protección, se ha sugerido que la vacuna debe incluir una combinación de los antígenos fimbriales más prevalentes, como el CFA-I y el CS1-CS.

7.10.1 Enterotoxinas y CF puros

Los candidatos de vacuna para ETEC basados en toxina pueden ser administrados vía oral o parenteral. Sin embargo, la protección solo se puede establecer a través de inmunidad contra CF. La combinación de componentes de toxina con CF puede conferir protección. Una vacuna que consiste en la sub-unidad B de la toxina del cólera, que induce anticuerpos que reconocen la sub-unidad B de LT o inmunizada con la holotoxina LT por parches en la piel, provee protección a corto plazo a viajeros, brindando pocos meses de protección y se limita a cepas de ETEC que expresan la toxina LT⁽⁵⁴⁾.

7.10.2 "Nano-micropartículas"

Los CF no son tan efectivos como inmunógenos orales, son sensibles a degradaciones proteolíticas. Para evitar la degradación de este material en el estómago, la inmunización se realiza encapsulando los CF en microesferas. Estudios sobre el uso oral de polylactide-co-glycolide (PLGA) que contenían CFA/I, CS3 Y CS6, demostraron que las microesferas tenían la habilidad de ser absorbidas y estimular respuesta inmune local y sistema⁽⁵⁵⁾.

7.10.3 Plantas comestibles

LT-B ha sido expresada en especies de plantas transgénicas. Increíblemente, voluntarios expresaron una robusta respuesta en las mucosas al haber ingerido papas⁽⁵⁶⁾ o maíz transgénico⁽⁵⁷⁾. Aunque no está dilucidado el número de otros antígenos expresados que se necesitan para tener una protección amplia.

7.10.4 Bacterias inactivadas

La inactivación se realiza con colchicina E1 o formalina, matan a la bacteria, pero no se pierden las características antigénicas. Moléculas de CF son más estables que moléculas purificadas de CF y retienen su antigenicidad y estructuras de fimbrias. Sin embargo, los intentos en preparar toxoide ST no fueron exitosos por el pequeño tamaño y grandes cantidades de cistina en la molécula.

7.10.4 Bacterias vivas atenuadas

Para la preparación de estas vacunas, han sido utilizadas diferentes estrategias, usando *Shigella*, *Vibrio cholerae* y *Salmonella* atenuada para expresar varios factores de CF individuales o en combinación con el toxoide LT. Otra estrategia, es utilizar ETEC atenuada como transportador y proveedor de antígenos protectores. Se ha obtenido cierto éxito en cepas de *Shigella* atenuadas por ingeniería. Estas cepas son usadas acarreadores vivos expresando antígenos de ETEC. Según la estrategia, vacunas híbridas son hechas en la base de *Shigella*/ETEC vías, las cuales son capaces de producir moléculas de CF o LT⁽⁵⁸⁾.

En un estudio, *Shigella flexneri* 2a, *flexneri* 3a, *flexneri* 6 y *Shigella sonnei* fueron diseñadas para tener una expresión estable de las fimbrias ETEC y subunidad LTB. El modelo clínico demostró, que la vacuna se toleró adecuadamente y que se producen IgG sistémica e IgA a nivel de mucosas contra *Shigella* y ETEC⁽⁵⁸⁾.

7.10.5 Proteínas fusión o quiméricas

Las proteínas quiméricas que contienen subunidades proteicas, enlazadores y secuencias con adyuvantes no solo pueden aumentar inmunogenicidad de las proteínas recombinantes, también proporcionan la posibilidad de inducir amplias respuestas inmunes celulares y humorales. Si la proteína quimérica contiene antígenos de diferentes patógenos o cepas de un patógeno, será posible proporcionar inmunidad simultáneamente contra una variedad de factores con una sola proteína. En un estudio, se diseñaron proteínas quiméricas que contienen factores de colonización CS6 y CFA/I y CfaB, ST toxoide, CssA, CssB, y sub-unidad B de LT, y se demostró que su inmunogenicidad era aceptable⁽⁵⁹⁾.

8. MATERIAL Y MÉTODO

- **Tipo de estudio:** Caso-control.
- **Periodo de estudio:** Septiembre 2014-Febrero 2018.
- **Población de estudio:** Niños menores de 5 años del municipio de León que asistan a los diferentes puestos de salud y Hospital Escuela Oscar Danilo Rosales Argüello de León (H.E.O.D.R.A).
- **Muestreo:** no probabilístico por conveniencia.
- **Muestra:** un total de 237 niños, de los cuales 96 eran casos y 141 controles.
- **Definición de Caso:** niños menores de 5 años con diarrea, caracterizada por la ocurrencia de 3 o más evacuaciones líquidas, o al menos una evacuación sanguinolenta en 24 horas.
- **Control:** niños sin historial de diarrea al menos por 2 meses y sin haber tomado antibiótico 15 días previos a su captación en el estudio.
- **Criterios de inclusión:**
 - Niños atendidos en las unidades de salud del municipio de León.
 - Niños que no hayan recibido antibiótico en los últimos 15 días.
 - Niños que no hayan recibido transfusión de sangre desde el nacimiento.
- **Criterios de exclusión:**
 - Niños que tenga enfermedades crónicas o defectos congénitos.
 - Niños que residan fuera del municipio de León.
- **Recolección de muestras:** se recolectaron muestras de heces y de saliva, en el Hospital Escuela Oscar Danilo Rosales Argüello, centro de salud Félix Pedro Picado de Sutiaba y centro de salud Perla María Nonorí. Las heces fueron colectadas en un frasco estéril. La saliva se colectó en un frasco estéril en el caso de niños que pudieran escupir, en el caso de niños que no pudieran escupir se aplicó un hisopo estéril en la boca y se depositó en crioviales que contenían 500 µl de PBS 1X. Los frascos fueron etiquetados adecuadamente, luego fueron transportadas en termo a temperatura de 4°C al laboratorio de Microbiología de la UNAN, León para su análisis en un lapso menor a dos horas.

○ **Análisis Bacteriológico:**

a) Se realizó una dilución 1/10 de la muestra de heces. Aproximadamente 1 gr de la muestra en un 1 ml de fosfato buffer salina (PBS) 1x.

b) Se inoculó en los medios:

- Agar MacConkey (OXOID, RU), medio diferencial para aislar bacterias Gram negativas.
- Se incubaron en condiciones aerobias a 37° C por 24 horas.

○ **Análisis moleculares**

- **Extracción de ADN:** 5 colonias lactosa positivas características de *E. coli* por cada muestra fueron suspendidas en 1 ml de PBS 1X. La suspensión bacteriana fue hervida por 20 minutos, posteriormente se centrifugó a 14000 RPM por 3 minutos para sedimentar los restos celulares. El sobrenadante se utilizó para realizar PCR.
- **PCR Múltiplex para *E. coli* enterotoxigénica:** Se realizó PCR múltiplex para la detección de los genes que codifican para las diferentes toxinas de ETEC, siguiendo el procedimiento descrito por Nguyen *et al*⁽⁶⁰⁾.

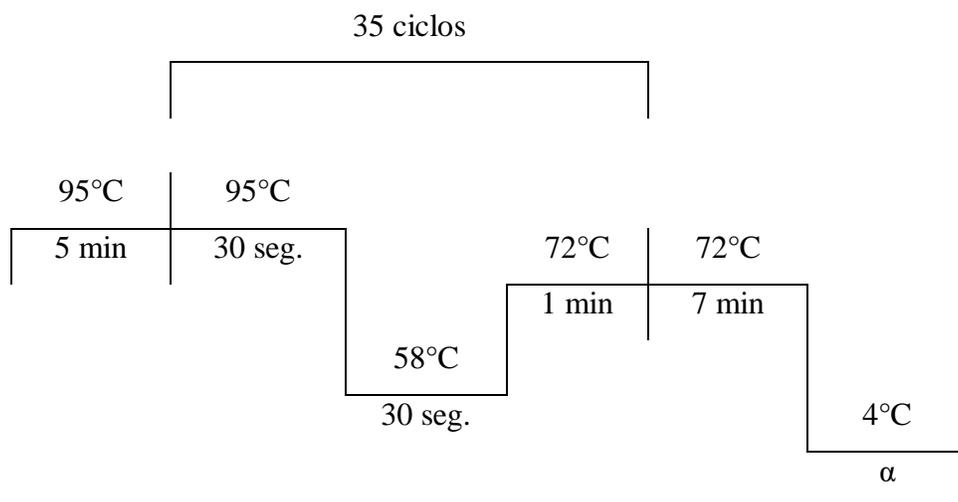
Tabla 1. Secuencia de primers utilizados

Blanco	Genes	Secuencia de primer 5´ - 3´	Pares de bases (PB)
ETEC	LT	F: TCTCTATGTGCATACGGAGC R: CCATACTGATTGCCGCAAT	322
	ST	F: GCTAAACCAGTAGAGGTCTTCAAAA R: CCGGTACAGAGCAGGATTACAACA	147

- Se utilizaron Pure Tag Ready-To-Go PCR Beads® (GE Healthcare UK), la cual contiene Tris/HCl (pH=9) a 10mM, KCl a 50 mM, MgCl₂ a 1.5 Mm, dNTP a 200µM cada uno, DNA Polimerasa 2.5U. Estas beads fueron resuspendidas hasta un volumen final de 25µl

agregándoseles agua miliQ®, 2µL de cada cebador (tabla 1) y 2µL del extracto de ADN de controles positivos de ETEC en una sola reacción.

Figura 1. Programa de amplificación para *E. coli* diarreogénica:



Los productos amplificados fueron visualizados en un gel de agarosa al 1.3% empleando un marcador de 100 pb (New England Biolab), teñido con bromuro de Etidio, expuesto a luz ultravioleta y fotografiado.

- **Detección de histo-grupos sanguíneos Lewis en saliva:** se determinó el fenotipo Lewis y secretor mediante la realización del ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) descrito por *Nordgren et al*⁽⁸⁾:
- **Fenotipo Lewis:** Se sensibilizaron las placas de ELISA (NUNC 96F Maxisorp; Thermo Fisher Scientific, Roskilde, Denmark) con saliva, diluida 1:500 en buffer carbonato (0.1 M buffer carbonato–bicarbonato, pH 9.6), la placa fue incubada a 4°C en cámara húmeda durante la noche. Al día siguiente se lavó 4 veces la placa con PBS – Tween20 al 0.05%, se agregó 100µL de anticuerpo anti-Lewis A (α-Lewis A seraclone Cypress Diagnosis), diluido 1:5000 con PBS y serán incubados por 90 minutos a 37°C. Transcurrido el tiempo se lavó 4 veces con PBS – Tween20 al 0.05%, luego se agregaron 100µL de conjugado anti-Lewis (Goat anti-horse MTC BIORR)

diluido 1:1000 con PBS y se incubó durante 90 minutos a 37°C. Seguidamente se lavó nuevamente 4 veces e inmediatamente después se agregó 100µl del sustrato TMB y se incubó por 20 minutos a temperatura ambiente en cámara oscura. Una vez transcurrido el tiempo, se detuvo la reacción enzimática con ácido sulfúrico 2N. Finalmente, se obtuvieron las lecturas de absorbancias a una longitud de onda de 450nm con un filtro diferencial de 630nm. Se consideraron como fenotipo Lewis A, si la densidad óptica ≥ 0.100 . En cada placa se utilizó saliva Lewis A, Lewis B y Lewis-Negativo previamente identificados como controles y además PBS para controlar el fondo. El procedimiento aquí descrito se utilizó para determinar Lewis B, con la excepción que se utilizó el monoclonal anti-Lewis B (α -Lewis B seraclone Cypress Diagnosis).

- **Fenotipo Secreter:** Las placas de ELISA se sensibilizaron con 100µl de saliva diluida 1:500 en PBS y se incubaron a 4°C durante la noche, en cámara húmeda. Al día siguiente se lavaron dos veces con PBS-Tween20 al 0.05% y se bloqueó con PBS-BSA al 3% durante 60 minutos a 37°C, en cámara húmeda. Transcurrido el tiempo se lavó 2 veces con PBS-Tween20 al 0.5%, se agregaron 100µl de lectinperoxidasa SIGMA-28146-IMG diluido 1:400 con PBS y se incubó durante 90 minutos a 37°C. Posteriormente se realizaron 4 lavados y se agregaron 100µl del sustrato TMB y se incubaron por 10 minutos a temperatura ambiente en cámara oscura. Una vez terminado el tiempo se detuvo la reacción enzimática con ácido sulfúrico 2N. Finalmente se obtuvieron las lecturas de absorbancias a una longitud de onda de 450nm con un filtro diferencial de 630nm. Se utilizó PBS para controlar el fondo y se agregaron los controles positivos y negativos respectivos. Las muestras fueron consideradas positivas si la densidad óptica ≥ 0.100 .
- **Análisis Estadísticos:** se creó una base de datos utilizando el programa IBM SPSS® 20. Las frecuencias y porcentajes de cada una de las variables estudiadas fueron calculadas de forma separada para casos y controles. El grado de asociación entre el histo-grupo sanguíneo Lewis, estatus secreter y las infecciones sintomáticas por ETEC y la

significancia estadística fue determinada con la prueba exacta Fisher y un valor de $P < 0.05$ fue considerado significativo.

Para evaluar los factores de riesgo para la infección por ETEC en la población se realizó el cálculo de *Odds Ratio* (OR). Inicialmente se realizó un análisis bivariado. Cuando la variable no fue dicotómica se hizo el OR utilizando como referencia aquel dato cuyos valores de n eran mayores. Seguidamente se efectuó un modelo de regresión logística multivariado para mitigar el efecto de las variables entre sí. Se estableció como variable dependiente las infecciones por ETEC y como variables independientes incluyendo: edad, género, procedencia, histo-grupos sanguíneos Lewis y secretor.

Aspectos éticos: la presente investigación fue realizada a través de la obtención de consentimiento informado de los padres o responsable de los niños involucrados en el estudio. Este estudio fue aprobado por el comité de ética de la Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua, León (Acta. N°64, 2014). Ver en anexo formatos de Consentimiento y Cuestionario epidemiológico.

9. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

9.1) Características sociodemográficas de la población de estudio: El estudio incluyó un total de 237 niños menores de 5 años, de los cuales 40.5% ($n=96$) fueron sintomáticos y 59.4% ($n=96$) asintomáticos. Hubo una diferencia en la distribución por género entre sintomáticos y asintomáticos, con el género masculino levemente sobre representado en los sintomáticos (63.% vs 51%, OR=0.60; IC=0.35-1.01). Según la procedencia, hubo diferencia significativa del área urbana y rural con un predominio de sintomáticos en el área rural en comparación con el grupo asintomáticos (OR=4.18; IC=1.10-19.82). Se observaron diferencias entre grupos de edades, con un predominio de niños de 13-24 (OR=0.52; IC=0.26-1.04) meses en los sintomáticos y un predominio de niños de 0-12 en los asintomáticos (OR=1.40; IC=0.77-2.56), en comparación con el grupo de 25-60 meses. En el grupo de sintomáticos se observó una mayor proporción de la presencia de letrinas en comparación con el grupo asintomáticos (OR=1.52 IC=0.79-2.94). Y en relación a las fuentes de agua se observó una mayor presencia de pozos en los sintomáticos OR=3.82 IC=0.73-20.10). En síntesis, se puede decir que hay una mayor proporción en variables como procedencia, grupo de edad y género, las cuales son características comunes asociadas en diarrea infantil observadas en otros estudios. Los análisis de ETEC en ambos grupos nos permitiran establecer si estas variables tienen un grado de relación con esta etiología específica.(Ver tabla 2)

Tabla 2. Características sociodemográficas de la población en estudio.

Indicador	Grupo sintomáticos (n=96)	Grupo asintomáticos (n=141)	OR (IC 95%)	<i>P</i>
Género (%)				
Masculino	61 (63.5)	72 (51.0)	0.60 (0.35-1.02)	0.057
Femenino	35 (36.5)	69 (49.0)		
Procedencia (%)				
Urbano	88 (91.6)	138 (97.8)	4.18 (1.10-19.82)	0.026
Rural	8 (8.4)	3 (2.2)		
Edad en meses (%)				
25-60	40 (41.6)	60 (44.0)	Ref.	
13-24	28 (29.2)	22 (14.2)	0.52 (0.26-1.04)	0.063
0-12	28 (29.2)	59(41.8)	1.40 (0.77-2.56)	0.268
Disposición de escretas (%)				
Inodoro	74 (77.1)	118 (83.6)	Ref.	
Letrina	21 (21.9)	22 (15.5)	1.52 (0.79-2.94)	0.213
Otros	1 (1.0)	1 (0.9)	0.63 (0.04-1.18)	0.741
Fuente de agua (%)				
Agua potable	91 (94.7)	139 (98.5)	3.82 (0.73-20.10)	0.090
Pozo	5 (5.3)	2 (1.5)		

9.2) Distribución de histo-grupos sanguíneo Lewis y secretor: Del total de niños estudiados encontramos que el 73.0% ($n=173$) fue Lewis B, el 11.0% ($n=26$) Lewis A y el 16.0% ($n=38$) Lewis negativo. Mientras que el 84.0% ($n=198$) eran secretores positivos. La distribución de los histo-grupos sanguíneos son similares a los reportados por *Bucardo et al.*, 2009, en controles poblacionales⁽⁷⁾. Después de estratificar entre estatus clínico encontramos que Lewis A(OR=0.62 ;IC=0.26-1.51) y los no secretores (OR=0.69;IC=0.34-1.43) se encontraba en mayor proporción en los asintomáticos, pero las diferencias no fueron significativas. Sin embargo, *Colston et al*, 2019, demostró que hay relación entre la distribución de histo-grupos sanguíneos y diarrea por cualquier causa en un estudio de cohorte multicéntrico. Dicho estudio demostró que los niños con el fenotipo Lewis B y secretor positivos tenían un riesgo menor a desarrollar diarrea por cualquier causa (29%) en comparación con los Lewis A y no secretores⁽⁶¹⁾. (Ver tabla 3)

Tabla 3. Distribución de histo-grupos sanguíneo Lewis y secretor de la población en estudio.

Histo-grupo sanguíneo	Total ($n=237$)	Grupo Sintomáticos ($n=96$)	Grupo Asintomáticos ($n=141$)	OR (IC 95%)	<i>P</i>
Fenotipo Lewis (%)					
Le ^{a-b+}	173 (73.0)	72 (75.0)	101 (71.6)	Ref.	
Le ^{a+b-}	26 (11.0)	8 (8.3)	18 (12.8)	0.62 (0.26-1.51)	0.293
Le ^{a-b-}	38 (16.0)	16 (16.7)	22 (15.6)	1.02 (0.50-2.08)	0.956
Fenotipo secretor (%)					
Secretor	198 (83.5)	83 (86.5)	115 (81.5)	0.69 (0.34-1.43)	0.258
No secretor	39 (16.5)	13 (13.5)	26 (18.5)		

9.3) Distribución general de ETEC según edad: Para investigar si la distribución de los histogrupos sanguíneo esta relacionada específicamente con la infección por ETEC se determinó la presencia de ETEC y la presencia de las toxinas LT-ST en estas, tanto en niños sintomáticos como asintomáticos. ETEC se detectó en 15 niños sintomáticos de los 96 estudiados y 21 de los 141 en el grupo asintomático (16% vs 15%). Esto difiere al estudio de *Vilchez et al.*, 2009, donde se reporta que ETEC se encontró significativamente en mayor proporción en niños sintomáticos (20.5% vs 8.3%) que en niños asintomáticos⁽¹¹⁾. Otro estudio realizado por *Becker-Dreps et al.*, 2014, reportó 7.7% en niños sintomáticos y 6.6% en niños asintomáticos⁽¹⁵⁾. Las diferencias en la prevalencia en niños sintomáticos como asintomáticos de ETEC pueden deberse al diseño de los estudios, i.e., el estudio realizado por *Vilchez et al.* es un estudio prospectivo de diarrea infantil con vigilancia pasiva mientras que el estudio de *Becker-Dreps et al.* es un estudio de cohorte abierto con vigilancia activa y en comparación con este estudio las muestras fueron recolectadas en momentos puntuales a lo largo del periodo. La selección del grupo control y la temporalidad son dos factores que pueden influenciar las prevalencias de ETEC en diferentes estudios.(Ver tabla 4)

A pesar de las diferencias, estos hallazgos indican que ETEC sigue siendo uno de las principales causas de diarrea en la población, y que la población de niños asintomáticos representa un reservorio importante del agente.

En relación a los grupos de edad e infecciones por ETEC, se encontró que niños menores de 12 meses tienen el doble de riesgo a infectarse por ETEC (OR=2.16; IC= 0.76-6.12), mientras que los grupos de 13-24 y 25-60 el riesgo es menor. Este hallazgo respalda los datos de estudios previos que han mostrado una mayor incidencia de infecciones sintomáticas por ETEC durante el primer año de vida y que los niños mayores tienen más probabilidades de convertirse en portadores asintomáticos^(10, 11). Esta tendencia indica que las primeras infecciones inducen una fuerte respuesta inmunológica, la cual brinda cierto grado de protección a infecciones por el agente, lo que puede estar relacionado al tipo de toxina.

Tabla 4. Prevalencia de infecciones por ETEC según edades.

Edad en meses (%)	Grupo		OR (IC 95%)	P
	Sintomáticos (n=96)	Asintomáticos (n=141)		
25-60 [n=100]	2/40 (5.0)	5/60 (8.3)	Ref.	
13-24 [n=50]	4/28 (14.3)	6/22 (27.3)	0.40 (0.10-1.65)	0.197
0-12 [n=87]	9/28(32.1)	10/59 (16.9)	2.16 (0.76-6.12)	0.142
Total [n=237]	15 (15.6%)	21 (14.9%)	1.06 (0.52-2.17)	0.878

Con el objetivo de determinar cual es la toxina que se encuentra con mayor frecuencia , se demostró que la mayoría de las cepas de ETEC identificadas en este estudio tiene el gen que codifica para la toxina LT, pero con mayor presencia en niños asintomáticos que sintomáticos (73.4%, 11/15 vs 95.2%, 20/21) , mientras que ST se detectó en menor proporción en los sintomáticos (13.3%, 2/15) y no se observó en asintomáticos (0%). En un grupo de cepas aislados de niños sintomáticos (13.3%, 2/15) y asintomáticos (4.8%, 1/21) se observó la presencia de LT en combinación con ST. Este hallazgo se relaciona al estudio realizado por *Vilchez et al.*, 2009 en el cual la LT fue significativamente mayor en niños asintomáticos, en comparación con niños sintomáticos (100% vs 81.8%). Y difiere en el estudio realizado por *Paniagua et al.*, 1997 donde LT-ST fueron las toxinas que se detectaron con mayor frecuencia en niños sintomáticos que asintomáticos (42.2% vs 24.5%). Los perfiles de toxinas y adhesinas de los aislados de ETEC son variables y difieren entre áreas geográficas y población. Por ejemplo, *Isidean et al.*, 2011 en una revisión de literatura de 35 países encontró que el 45% de los aislados de ETEC expresaban ST solamente ⁽²⁵⁾. Otro aspecto importante, es el patrón de cambio de las enterotoxinas LT/ST en los aislamientos de ETEC analizados a través de los años. Así mismo, *Begum et al.*, 2014 notaron este patrón, señalando un cambio en las cepas que circulan de ETEC en términos de propiedades antigénicas (como enterotoxinas) asociadas con la diarrea en Bangladesh entre 2007 y 2012⁽⁶²⁾.

9.4) Correlación entre el Histo-grupo sanguíneo Lewis y estatus secretor con las infecciones por ETEC: La proporción del fenotipo de Lewis A fue mayor en niños con infección sintomática con ETEC en comparación con niños con infección asintomática (25% vs 17%). Dicha observación fue similar en el fenotipo Lewis negativo (25% vs 14%). Es importante enfatizar, que el fenotipo Lewis A (OR= 2.3) y Lewis negativo (OR= 2.3) presentaron mayor riesgo de infección por ETEC que Lewis B en el grupo de sintomáticos y dicha observación no fue replicada en los niños con infección asintomática. Estos resultados son similares al estudio realizado por *Ahmed et al.*, 2009 que reporta que niños con el fenotipo Lewis A están más propensos a padecer infecciones sintomáticas que asintomáticas por ETEC ($P < 0.001$)⁽¹⁷⁾.

En cuanto al fenotipo secretor, se puede observar una mayor proporción de no secretores infectados por ETEC en comparación con secretores del grupo sintomáticos (23% vs 15%, OR=1.8), mientras que en el grupo de asintomáticos dicha observación es invertida (12% vs 16%, OR=0.70). A diferencia del estudio realizado por *Colston et al.*, 2019, en el presente estudio no se encontró asociación estadística entre los histo-grupos sanguíneos Lewis y secretor; sin embargo este estudio muestra una tendencia interesante en los no secretores a desarrollar la infección clínica con ETEC como reportan otros investigadores⁽¹⁷⁾ (61). Es muy probable que las ETEC que infectan niños no secretores expresan el CFA/1, pues dicho factor de colonización aparentemente requiere la presencia del antígeno H para realizar una infección efectiva.

Además de estos factores genéticos, se ha reportado posible susceptibilidad por el sistema ABO, aunque existe información contradictoria en relación a la importancia de este, *Quadri et al.*, 2007 encontró que el tipo sanguíneo "A" y "AB" estaba en mayor riesgo de presentar diarrea (OR=2.5;IC=0.95–6.66)⁽¹³⁾. Sin embargo, en este estudio no se logró determinar el tipo sanguíneo de los participantes. Notablemente, es posible que los cambios por la edad podrían estar relacionados con la expresión de los sistemas ABO y Lewis, por lo tanto también podría influir en la susceptibilidad del huésped. (Ver tabla 5)

Tabla 5. Distribución de Histo-grupo sanguíneo Lewis y estatus secretor entre los niños infectados y los no infectados por ETEC.

Histo-grupo sanguíneo	Grupo Sintomáticos (n=96)		Grupo Asintomáticos (n=141)	
	ETEC positivos	OR (IC 95%)	ETEC positivos	OR (IC 95%)
Fenotipo Lewis (%)				
Le ^{a-b+}	13 (9/72)	Ref.	15 (15/101)	Ref.
Le ^{a+b-}	25 (2/8)	2.3 (0.28-12.92)	17 (3/18)	1.14 (0.23-4.22)
Le ^{a-b-}	25 (4/16)	2.3 (0.54-8.751)	14 (3/22)	1.14 (0.23-4.22)
Fenotipo secretor (%)				
Secretor	15 (12/83)	1.8 (0.3465, 7.171)	16 (18/115)	0.70 (0.154-2.42)
No secretor	23 (3/13)		12 (3/26)	

9.5) Análisis multivariado de factores de riesgo para la infección por ETEC en la población:

Del total (237) niños que participaron en el estudio, 15 (15.6%) niños experimentaron al menos una infección sintomática por ETEC. El modelo demostró que de los niños infectados menores de 1 año en comparación a niños infectados de 13-24 meses tienen riesgo similar a padecer la infección (OR =4.761; IC=1.77-12.83 / OR =4.749; IC=1.60-14.11), respectivamente. Sin embargo, el grupo etareo menor de 12 meses tiene mayor significancia estadística ($P=0.002$) en comparación con el otro grupo. Paralelamente, secretor y Lewis no demostró significancia estadística a pesar de que el fenotipo Lewis A y no secretor indican tener mayor riesgo desarrollar infección (OR =3.942; IC= 0.31-49.84 / OR =4.099; IC= 0.42-40.18). Esto nuevamente respalda los datos de estudios previos que han mostrado una mayor incidencia de infecciones sintomáticas por ETEC durante el primer año de vida, y que además existe un riesgo aumentado a padecerlas si son del fenotipo Lewis A y no secretor^(10, 11). (Ver tabla 6)

Tabla 6. Análisis de regresión logística multivariante de los factores de riesgo para la infección por ETEC en la población.

	Total	Niños ETEC positivos (%)	OR	I.C. 95%	<i>P</i>
Procedencia					
Urbano	226	15(6.6)	0.548	0.06-4.78	0.586
Rural	11	0			
Género					
Femenino	104	3 (2.9)	1.696	0.78-3.67	0.180
Masculino	133	12 (9.0)			
Fenotipo Lewis					
Le ^{a-b+}	176	9 (5.1)		Ref.	
Le ^{a+b-}	26	2 (7.7)	3.942	0.31-49.84	0.289
Le ^{a-b-}	38	4 (10.5)	2.038	0.70-5.89	0.189
Fenotipo Secretor					
Secretor	198	12 (6.0)	4.099	0.42-40.18	0.226
No Secretor	39	3 (7.7)			
Grupo Etario					
25-60	100	2 (2)		Ref.	
13-24	50	4 (8.0)	4.749	1.60-14.11	0.005
0-12	87	9 (10.3)	4.761	1.77-12.83	0.002

Los hallazgos obtenidos brindan una pequeña imagen de factores genéticos del huésped. Siendo estos datos importantes para ser tomados en cuenta en la elaboración de las vacunas. Con el fin obtener resultados significativos, se necesita aumentar el número de muestras de la población de estudio y que esta sea homogénea, además de investigar los factores de colonización de las cepas de ETEC circulantes; esto podría ayudar en el desarrollo de una vacuna que reduzca eficazmente los casos de diarrea por ETEC, así como reducir el uso de antibióticos y, por lo tanto, el aumento de la resistencia bacteriana.

10. CONCLUSIONES

- El estudio incluyó un total de 237 niños menores de 5 años, de los cuales 40.5% fueron sintomáticos. El 56.1% pertenecían al género masculino mayoritariamente. Según la procedencia, hubo un predominio significativo del área urbana (95.4%).
- Tanto en el grupo sintomáticos y el grupo asintomáticos la mayoría de los participantes resultaron Le^{a-b+} y secretores positivos.
- Se detectaron un total de 36 (15.2%) muestras positivas para ETEC; 15.6% en el grupo sintomático y 14.9% asintomático. La enterotoxina que se detectó con mayor frecuencia en aislados de ETEC fue LT con 73.4% (11) y LT-ST o solamente ST (26.6%) en el grupo sintomático.
- Niños infectados menores de 1 año fueron estadísticamente significativo y estaban más propensos a padecer infecciones por ETEC con respecto al modelo de riesgo (OR =4.761; IC=1.77-12.83) ($P=0.002$).
- No se encontró asociación estadística significativa entre el Histo-grupo sanguíneo Lewis como el estatus Secretor y las infecciones sintomáticas por ETEC ($P=0.289/ P=0.226$). Sin embargo, niños con el fenotipo Le^{a+b-} y ser no Secretor tienden a tener mayor riesgo de desarrollar infección clínica por ETEC (OR =3.942; IC= 0.31-49.84 / OR =4.099; IC= 0.42-40.18).

11. RECOMENDACIONES

- Replicar el estudio con mayor número de individuos, para tener una muestra más representativa.
- Incluir otros factores genéticos como ABO que pudiesen brindar mayor información sobre la susceptibilidad genética a infecciones por ETEC.
- Incluir en el análisis de correlación entre Lewis y Secretor con la infección por ETEC, los factores de colonización de las cepas circulantes.
- Realizar un análisis genotípico de niños ETEC positivos sintomáticos como asintomáticos, para identificar polimorfismos que favorezcan o protejan contra estas infecciones por ETEC.
- Independientemente si ETEC causa infección clínica o no, investigar el impacto de las infecciones en el microbioma intestinal y su impacto en el desarrollo de los infantes.

12. REFERENCIAS

1. Liu L, Johnson HL, Cousens S, Perin J, Scott S, Lawn JE, et al. Global, regional, and national causes of child mortality: an updated systematic analysis for 2010 with time trends since 2000. *Lancet*. 2012;379(9832):2151-61.
2. Mortality GBD, Causes of Death C. Global, regional, and national life expectancy, all-cause mortality, and cause-specific mortality for 249 causes of death, 1980-2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *Lancet*. 2016;388(10053):1459-544.
3. Fleckenstein JM, Hardwidge PR, Munson GP, Rasko DA, Sommerfelt H, Steinsland H. Molecular mechanisms of enterotoxigenic *Escherichia coli* infection. *Microbes and infection / Institut Pasteur*. 2010;12(2):89-98.
4. von Mentzer A, Connor TR, Wieler LH, Semmler T, Iguchi A, Thomson NR, et al. Identification of enterotoxigenic *Escherichia coli* (EPEC) clades with long-term global distribution. *Nature genetics*. 2014;46(12):1321-6.
5. Shin ES, Chung SC, Kim YK, Lee SW, Kho HS. The relationship between oral *Candida* carriage and the secretor status of blood group antigens in saliva. *Oral surgery, oral pathology, oral radiology, and endodontics*. 2003;96(1):48-53.
6. Moran AP. Relevance of fucosylation and Lewis antigen expression in the bacterial gastroduodenal pathogen *Helicobacter pylori*. *Carbohydrate research*. 2008;343(12):1952-65.
7. Bucardo F, Kindberg E, Paniagua M, Grahn A, Larson G, Vildevall M, et al. Genetic susceptibility to symptomatic norovirus infection in Nicaragua. *Journal of medical virology*. 2009;81(4):728-35.
8. Nordgren J, Sharma S, Bucardo F, Nasir W, Gunaydin G, Ouermi D, et al. Both Lewis and secretor status mediate susceptibility to rotavirus infections in a rotavirus genotype-dependent manner. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2014;59(11):1567-73.
9. Cooling L. Blood Groups in Infection and Host Susceptibility. *Clinical microbiology reviews*. 2015;28(3):801-70.
10. Paniagua M, Espinoza F, Ringman M, Reizenstein E, Svennerholm AM, Hallander H. Analysis of incidence of infection with enterotoxigenic *Escherichia coli* in a prospective cohort study of infant diarrhea in Nicaragua. *Journal of clinical microbiology*. 1997;35(6):1404-10.
11. Vilchez S, Reyes D, Paniagua M, Bucardo F, Mollby R, Weintraub A. Prevalence of diarrhoeagenic *Escherichia coli* in children from Leon, Nicaragua. *Journal of medical microbiology*. 2009;58(Pt 5):630-7.
12. Vilchez S, Becker-Dreps S, Amaya E, Perez C, Paniagua M, Reyes D, et al. Characterization of enterotoxigenic *Escherichia coli* strains isolated from Nicaraguan children in hospital, primary care and community settings. *Journal of medical microbiology*. 2014;63(Pt 5):729-34.
13. Qadri F, Saha A, Ahmed T, Al Tarique A, Begum YA, Svennerholm AM. Disease burden due to enterotoxigenic *Escherichia coli* in the first 2 years of life in an urban community in Bangladesh. *Infect Immun*. 2007;75(8):3961-8.
14. Mottram L, Wiklund G, Larson G, Qadri F, Svennerholm A-M. FUT2 non-secretor status is associated with altered susceptibility to symptomatic enterotoxigenic *Escherichia coli* infection in Bangladeshis. *Scientific Reports*. 2017;7(1):10649.

15. Becker-Dreps S, Bucardo F, Vilchez S, Zambrana LE, Liu L, Weber DJ, et al. Etiology of childhood diarrhea after rotavirus vaccine introduction: a prospective, population-based study in Nicaragua. *The Pediatric infectious disease journal*. 2014;33(11):1156-63.
16. Black RE, Levine MM, Clements ML, Hughes T, O'Donnell S. Association between O blood group and occurrence and severity of diarrhoea due to *Escherichia coli*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 1987;81(1):120-3.
17. Ahmed T, Lundgren A, Arifuzzaman M, Qadri F, Teneberg S, Svennerholm AM. Children with the Le(a+b-) blood group have increased susceptibility to diarrhea caused by enterotoxigenic *Escherichia coli* expressing colonization factor I group fimbriae. *Infect Immun*. 2009;77(5):2059-64.
18. Kaper JB, Nataro JP, Mobley HL. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature reviews Microbiology*. 2004;2(2):123-40.
19. Donnenberg MS. 220 - Enterobacteriaceae A2 - Bennett, John E. In: Dolin R, Blaser MJ, editors. *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases (Eighth Edition)*. Philadelphia: Content Repository Only!; 2015. p. 2503-17.e5.
20. Qadri F, Svennerholm AM, Faruque AS, Sack RB. Enterotoxigenic *Escherichia coli* in developing countries: epidemiology, microbiology, clinical features, treatment, and prevention. *Clinical microbiology reviews*. 2005;18(3):465-83.
21. Wolf MK. Occurrence, distribution, and associations of O and H serogroups, colonization factor antigens, and toxins of enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Clinical microbiology reviews*. 1997;10(4):569-84.
22. Steinsland H, Lacher DW, Sommerfelt H, Whittam TS. Ancestral lineages of human enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Journal of clinical microbiology*. 2010;48(8):2916-24.
23. Boschi-Pinto C, Velebit L, Shibuya K. Estimating child mortality due to diarrhoea in developing countries. *Bulletin of the World Health Organization*. 2008;86(9):710-7.
24. Zaidi D, Wine E. An update on travelers' diarrhea. *Current opinion in gastroenterology*. 2015;31(1):7-13.
25. Isidean SD, Riddle MS, Savarino SJ, Porter CK. A systematic review of ETEC epidemiology focusing on colonization factor and toxin expression. *Vaccine*. 2011;29(37):6167-78.
26. Hara-Kudo Y, Takatori K. Contamination level and ingestion dose of foodborne pathogens associated with infections. *Epidemiology and infection*. 2011;139(10):1505-10.
27. Ghosal A, Bhowmick R, Banerjee R, Ganguly S, Yamasaki S, Ramamurthy T, et al. Characterization and studies of the cellular interaction of native colonization factor CS6 purified from a clinical isolate of enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Infection and immunity*. 2009;77(5):2125-35.
28. Jansson L, Tobias J, Jarefjall C, Lebens M, Svennerholm AM, Teneberg S. Sulfatide recognition by colonization factor antigen CS6 from enterotoxigenic *Escherichia coli*. *PLoS One*. 2009;4(2):e4487.
29. Jansson L, Tobias J, Lebens M, Svennerholm AM, Teneberg S. The major subunit, CfaB, of colonization factor antigen i from enterotoxigenic *Escherichia coli* is a glycosphingolipid binding protein. *Infection and immunity*. 2006;74(6):3488-97.
30. Mazariego-Espinosa K, Cruz A, Ledesma MA, Ochoa SA, Xicohtencatl-Cortes J. Longus, a type IV pilus of enterotoxigenic *Escherichia coli*, is involved in adherence to intestinal epithelial cells. *Journal of bacteriology*. 2010;192(11):2791-800.

31. Fleckenstein JM, Holland JT, Hasty DL. Interaction of an outer membrane protein of enterotoxigenic *Escherichia coli* with cell surface heparan sulfate proteoglycans. *Infection and immunity*. 2002;70(3):1530-7.
32. Cote JP, Mourez M. Structure-function analysis of the TibA self-associating autotransporter reveals a modular organization. *Infection and immunity*. 2011;79(5):1826-32.
33. Ruan X, Crupper SS, Schultz BD, Robertson DC, Zhang W. *Escherichia coli* expressing EAST1 toxin did not cause an increase of cAMP or cGMP levels in cells, and no diarrhea in 5-day old gnotobiotic pigs. *PloS one*. 2012;7(8):e43203.
34. Fleckenstein JM. Chapter 6 - Enterotoxigenic *Escherichia coli* A2 - Donnenberg, Michael S. *Escherichia coli* (Second Edition). Boston: Academic Press; 2013. p. 183-213.
35. Mondal D, Minak J, Alam M, Liu Y, Dai J, Korpe P, et al. Contribution of enteric infection, altered intestinal barrier function, and maternal malnutrition to infant malnutrition in Bangladesh. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2012;54(2):185-92.
36. Connor BA. Sequelae of traveler's diarrhea: focus on postinfectious irritable bowel syndrome. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2005;41 Suppl 8:S577-86.
37. De SN, Bhattacharya K, Sarkar JK. A study of the pathogenicity of strains of *Bacterium coli* from acute and chronic enteritis. *The Journal of pathology and bacteriology*. 1956;71(1):201-9.
38. Dean AG, Ching YC, Williams RG, Harden LB. Test for *Escherichia coli* enterotoxin using infant mice: application in a study of diarrhea in children in Honolulu. *The Journal of infectious diseases*. 1972;125(4):407-11.
39. Donta ST, Smith DM. Stimulation of steroidogenesis in tissue culture by enterotoxigenic *Escherichia coli* and its neutralization by specific antiserum. *Infection and immunity*. 1974;9(3):500-5.
40. Guerrant RL, Brunton LL, Schnaitman TC, Rebhun LI, Gilman AG. Cyclic adenosine monophosphate and alteration of Chinese hamster ovary cell morphology: a rapid, sensitive in vitro assay for the enterotoxins of *Vibrio cholerae* and *Escherichia coli*. *Infection and immunity*. 1974;10(2):320-7.
41. Yolken RH, Greenberg HB, Merson MH, Sack RB, Kapikian AZ. Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. *Journal of clinical microbiology*. 1977;6(5):439-44.
42. Chapman PA, Daly CM. Evaluation of non-radioactive trivalent DNA probe (LT, ST1a, ST1b) for detecting enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Journal of clinical pathology*. 1993;46(4):309-12.
43. Scotland SM, Flomen RH, Rowe B. Evaluation of a reversed passive latex agglutination test for detection of *Escherichia coli* heat-labile toxin in culture supernatants. *Journal of clinical microbiology*. 1989;27(2):339-40.
44. Honda T, Akhtar Q, Glass RI, Kibriya AK. A simple assay to detect *Escherichia coli* producing heat labile enterotoxin: results of a field study of the Biken tests in Bangladesh. *Lancet*. 1981;2(8247):609-10.
45. DM H. *Modern Blood Banking and Transfusion Practices*. 6th ed. Philadelphia,US: Davis Company; 2012.

46. de Mattos LC. Structural diversity and biological importance of ABO, H, Lewis and secretor histo-blood group carbohydrates. *Revista brasileira de hematologia e hemoterapia*. 2016;38(4):331-40.
47. Heggelund JE, Varrot A, Imberty A, Krenzel U. Histo-blood group antigens as mediators of infections. *Current opinion in structural biology*. 2017;44:190-200.
48. Croxen MA, Law RJ, Scholz R, Keeney KM, Wlodarska M, Finlay BB. Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli*. *Clinical microbiology reviews*. 2013;26(4):822-80.
49. Jansson L, Tobias J, Lebens M, Svennerholm A-M, Teneberg S. The Major Subunit, CfaB, of Colonization Factor Antigen I from Enterotoxigenic *Escherichia coli* Is a Glycosphingolipid Binding Protein. *Infection and immunity*. 2006;74(6):3488-97.
50. Galvan EM, Roth GA, Monferran CG. Participation of ABH glycoconjugates in the secretory response to *Escherichia coli* heat-labile toxin in rabbit intestine. *The Journal of infectious diseases*. 1999;180(2):419-25.
51. Ikehara Y, Nishihara S, Yasutomi H, Kitamura T, Matsuo K, Shimizu N, et al. Polymorphisms of two fucosyltransferase genes (Lewis and Secretor genes) involving type I Lewis antigens are associated with the presence of anti-*Helicobacter pylori* IgG antibody. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*. 2001;10(9):971-7.
52. Thorven M, Grahn A, Hedlund KO, Johansson H, Wahlfrid C, Larson G, et al. A homozygous nonsense mutation (428G-->A) in the human secretor (FUT2) gene provides resistance to symptomatic norovirus (GGII) infections. *Journal of virology*. 2005;79(24):15351-5.
53. Marionneau S, Ruvoen N, Le Moullac-Vaidye B, Clement M, Cailleau-Thomas A, Ruiz-Palacois G, et al. Norwalk virus binds to histo-blood group antigens present on gastroduodenal epithelial cells of secretor individuals. *Gastroenterology*. 2002;122(7):1967-77.
54. Mirhoseini A, Amani J, Nazarian S. Review on pathogenicity mechanism of enterotoxigenic *Escherichia coli* and vaccines against it. *Microbial pathogenesis*. 2018;117:162-9.
55. Nazarian S, Gargari SL, Rasooli I, Hasannia S, Pirooznia N. A PLGA-encapsulated chimeric protein protects against adherence and toxicity of enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Microbiological research*. 2014;169(2-3):205-12.
56. Mason HS, Haq TA, Clements JD, Arntzen CJ. Edible vaccine protects mice against *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin (LT): potatoes expressing a synthetic LT-B gene. *Vaccine*. 1998;16(13):1336-43.
57. Tacket CO, Pasetti MF, Edelman R, Howard JA, Streatfield S. Immunogenicity of recombinant LT-B delivered orally to humans in transgenic corn. *Vaccine*. 2004;22(31-32):4385-9.
58. Osorio M, Bray MD, Walker RI. Vaccine potential for inactivated shigellae. *Vaccine*. 2007;25(9):1581-92.
59. Zeinalzadeh N, Salmanian AH, Ahangari G, Sadeghi M, Amani J, Bathaie SZ, et al. Design and characterization of a chimeric multiepitope construct containing CfaB, heat-stable toxoid, CsaA, CsaB, and heat-labile toxin subunit B of enterotoxigenic *Escherichia coli*: a bioinformatic approach. *Biotechnology and applied biochemistry*. 2014;61(5):517-27.
60. Nguyen TV, Le Van P, Le Huy C, Gia KN, Weintraub A. Detection and characterization of diarrheagenic *Escherichia coli* from young children in Hanoi, Vietnam. *Journal of clinical microbiology*. 2005;43(2):755-60.

61. Colston JM, Francois R, Pisanic N, Yori PP, McCormick BJJ, Olortegui MP, et al. Effects of child and maternal Histo Blood Group Antigen status on symptomatic and asymptomatic enteric infections in early childhood. *The Journal of infectious diseases*. 2019.
62. Begum YA, Baby NI, Faruque AS, Jahan N, Cravioto A, Svennerholm AM, et al. Shift in phenotypic characteristics of enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) isolated from diarrheal patients in Bangladesh. *PLoS neglected tropical diseases*. 2014;8(7):e3031.