



ORIGINAL

Primer reporte de *Escherichia coli* diarreogénica en población pediátrica ambulatoria con diarrea atendida en la ciudad de La Plata, Argentina



Nora Beatriz Molina^{a,*}, Sebastián Oderiz^b, Cecilia Vescina^b, Alejandra Córdoba^a, Juan Ángel Basualdo^a y Mónica Delfina Sparo^a

^a Centro Universitario de Estudios Microbiológicos y Parasitológicos (CUDEMYP)-CIC, Universidad Nacional de La Plata, La Plata, Argentina

^b Sala de Microbiología, Hospital Interzonal de Niños Sor María Ludovica, La Plata, Argentina

Recibido el 19 de diciembre de 2019; aceptado el 12 de febrero de 2021

Disponible en Internet el 17 de abril de 2021

PALABRAS CLAVE

Escherichia coli
diarreogénica;
PCR;
Pediatria;
La Plata;
Argentina

Resumen *Escherichia coli* diarreogénica comprende un grupo heterogéneo de cepas que presentan diversos factores de virulencia y causan diferentes síndromes diarreicos. Los patotipos más estudiados son *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC), *Escherichia coli* enterotoxigénica (ETEC), *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC), *Escherichia coli* enteroinvasiva (EIEC) y *Escherichia coli* productora de toxina Shiga (STEC). El objetivo de este estudio fue estimar la frecuencia de infección de los diversos patotipos de *E. coli* diarreogénica en una población pediátrica ambulatoria con diarrea, atendida en el Hospital Sor María Ludovica de La Plata, Argentina, durante el período mayo-octubre de 2017. Los patotipos fueron detectados mediante la amplificación molecular de ocho genes de virulencia característicos. Se estudiaron las heces de 211 niños (76% menores de 5 años). Se detectó infección con *E. coli* diarreogénica en el 12,3% (n=26/211) de los niños con diarrea. Los patotipos identificados fueron EAEC, ETEC (todos *lt* positivos), EPEC y STEC (*stx2* y *eae* positivos). El patotipo EAEC fue prevalente en todos los grupos etarios, mientras que los patotipos ETEC, EPEC y STEC solamente se observaron en niños menores de 5 años. Este estudio constituye el primer reporte de detección por técnicas de amplificación molecular de *Escherichia coli* diarreogénica en una población pediátrica ambulatoria con diarrea, de la zona de La Plata. Se necesitan estudios más amplios que incluyan la caracterización de los aislamientos abarcando un mayor número de genes, controles asintomáticos, distintas épocas del año y población de diversas áreas geográficas para esclarecer la relevancia de la infección por *E. coli* diarreogénica en niños de Argentina.

© 2021 Asociación Argentina de Microbiología. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Este es un artículo Open Access bajo la licencia CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: nbmolina@med.unlp.edu.ar (N.B. Molina).

KEYWORDS

Diarrheagenic
Escherichia coli;
PCR;
Pediatrics;
La Plata;
Argentina

First report of diarrheagenic *Escherichia coli* in pediatric outpatient population with diarrhea in La Plata, Argentina

Abstract Diarrheagenic *Escherichia coli* is a heterogeneous group of strains that presents various virulence factors and causes different diarrheal syndromes. The most studied pathotypes are enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC), enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC), enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC), enteroinvasive *Escherichia coli* (EIEC) and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC). The objective was to estimate the frequency of infection of diarrheagenic *E. coli* pathotypes in children with diarrhea, attended at the Sor María Ludovica Hospital in La Plata, Argentina, during the period May-October 2017. *E. coli* pathotypes were detected by molecular amplification of eight characteristic virulence genes. The feces of 211 children (76% under 5 years) were studied. Infection with diarrheagenic *E. coli* was detected in 12.3% of the samples. The pathotypes were EAEC (10.43%), ETEC (1.42%, all of them positive for thermolabile toxin), EPEC (0.95%) and STEC (0.47%, positive for Shiga toxin 2). The EAEC pathotype was prevalent in children of all age groups, while ETEC, EPEC and STEC were only observed in children under 5 years of age. This study constitutes the first report of diarrheagenic *Escherichia coli* detection in an outpatient pediatric population with diarrhea from La Plata, using molecular amplification techniques. Broader future studies, including the characterization of the isolates with the largest number of genes, asymptomatic controls, different times of the year and population from different geographic areas will be necessary to clarify the relevance of diarrheagenic *E. coli* infection in children from Argentina.

© 2021 Asociación Argentina de Microbiología. Published by Elsevier España, S.L.U. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Introducción

Escherichia coli diarreogénica (DEC) comprende un grupo heterogéneo de cepas de *E. coli* que causan diferentes síndromes diarreicos y presentan marcadas diferencias en los factores de virulencia, la patogenia y la epidemiología de la infección. A la fecha, se reconocen seis categorías, variantes patogénicas o patotipos: *Escherichia coli* enteropatogénica (EPEC), *Escherichia coli* enterotoxigénica (ETEC), *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC), *Escherichia coli* enteroinvasiva (EIEC), *Escherichia coli* productora de toxina Shiga (STEC) y *Escherichia coli* de adherencia difusa (DAEC). La capacidad patogénica y el alcance epidemiológico de la última categoría, sin embargo, no se hallan completamente esclarecidos^{4,11,21}.

Las frecuencias de infección humana con DEC presentaron amplias variaciones según la región geográfica, con valores que oscilaron entre el 1 y el 52%^{4,6,9,10,20,23,25,26,32}. Estudios publicados en numerosos países de Latinoamérica señalaron una prevalencia regional diferencial de los diversos patotipos. Por ejemplo, la mayoría de los casos de diarrea reportados en México, Colombia y Nicaragua estaban asociados a ETEC. En la población de Brasil, Paraguay y Perú, el patotipo más frecuente fue EAEC, mientras que, en la República Argentina, Chile, Venezuela y Uruguay, el principal patotipo asociado a diarrea fue EPEC^{1,2,8,16,21,28,30}.

En los reportes oficiales sobre agentes etiológicos de diarreas agudas de nuestro país, *Shigella* spp. y EPEC aparecen como los patógenos bacterianos identificados con mayor frecuencia¹³. Sin embargo, existe información muy limitada sobre la infección por los diversos patotipos diarreogénicas de *E. coli* (a excepción de STEC) en la población pediátrica

con enfermedades diarreicas. El objetivo de este trabajo fue estimar la frecuencia de infección por los patotipos de *Escherichia coli* diarreogénica en la población pediátrica ambulatoria con diarrea atendida en el Hospital Sor María Ludovica de La Plata, Argentina, durante el período comprendido entre mayo y octubre de 2017.

Materiales y métodos

El estudio se realizó con una estrategia cuantitativa, con la aplicación de un diseño observacional, descriptivo, prospectivo y de corte transversal. El período estuvo comprendido entre mayo y octubre de 2017. El estudio incluyó las heces de niños menores de 15 años que presentaron un cuadro diarreico y que se atendieron en forma ambulatoria en el Hospital de Niños Sor María Ludovica de La Plata, Argentina. Se excluyeron del análisis las heces de niños hospitalizados, trasplantados, inmunosuprimidos, con enfermedades oncohematológicas o enfermedad intestinal inflamatoria crónica. La confidencialidad fue observada mediante la asignación de un código alfanumérico interno, que permitió mantener separada en todo momento la identidad de las muestras de heces (descartadas al término del estudio) de cualquier tipo de información personal. La investigación respetó las normas de buenas prácticas clínicas, la declaración de Helsinki, con todas sus enmiendas, y estuvo de conformidad con la normativa vigente aplicable.

Los patotipos de DEC fueron detectados mediante la amplificación molecular de ocho fragmentos de genes de virulencia característicos, con dos PCR múltiples (mPCR1 y mPCR2). Los genes investigados fueron los codificantes de la intimina (*eae*), la toxina termolábil LT (*lt*), las toxinas

termoestables STP (*stp*) y STH (*sth*), el antígeno plasmídico de invasión H (*ipaH*), el activador transcripcional R (*aggR*) y las toxinas Shiga 1 (*stx1*) y Shiga 2 (*stx2*). Los patotipos fueron identificados según los genes de virulencia hallados en las colonias aisladas: EPEC (presencia de *eae*, ausencia de *stx1* y *stx2*), ETEC (presencia de *lt*, *stp* y/o *sth*), EIEC (presencia de *ipaH*), STEC (presencia de *stx1* y/o *stx2*, presencia o ausencia de *eae*) y EAEC (presencia de *aggR*). La detección molecular fue realizada aplicando una estrategia diagnóstica en dos etapas. La primera etapa consistió en la realización de las dos PCR múltiples con ADN proveniente del cultivo confluyente. En caso de que se hubiera observado amplificación de algún gen, la segunda etapa consistió en la identificación de la colonia positiva (con genes de virulencia). Para tal efecto, el ADN de 10 a 20 colonias aisladas se utilizó como molde para las PCR individuales¹⁴. La colonia que presentó amplificación fue identificada por métodos fenotípicos (VITEK®2, Biomerieux) para confirmar la especie bacteriana^{3,14}.

La extracción de ADN y la amplificación molecular se llevaron a cabo según metodologías ya descritas^{3,14}. Brevemente, la materia fecal fue sembrada en agar MacConkey e incubada a 37 °C durante 24 h. Las colonias características que se desarrollaron se resuspendieron en *buffer* TE con Tritón X-100, se lisaron a 100 °C y se centrifugaron a 10.000 rpm. El ADN se conservó a –20 °C hasta su utilización. Las concentraciones en la mezcla de reacción fueron las siguientes: *buffer* 1X y dNTP, 0,1 mM; Taq polimerasa, 0,03 U/μl y ADN, 1-5 μl. La concentración de MgCl₂ fue 1,5 mM para mPCR1 y 0,75 mM en la mPCR2¹⁴. Las concentraciones de *primers* fueron 0,2 pmol/μl (SK1, SK2, STh-f, STh-r, STp-f y STp-r); 0,25 pmol/μl (LT-R, LT-F, IpaH8 e IpaH15); 1 pmol/μl (*aggRks1* y *aggRks2*); 1,6 pmol/μl (*stx1-F* y *stx1-R*); 0,4 pmol/μl (*stx2-F* y *stx2-R*) y 0,125 pmol/μl (16S-f y 16S-r)¹⁴ (tabla S1, material suplementario).

El protocolo de ciclado de mPCR1 consistió en 94 °C durante 5 min, seguido de 30 ciclos de 94 °C 30 s, 56 °C 1 min y 72 °C 1 min. El protocolo de mPCR2 fue 94 °C 5 min, seguido de 30 ciclos de 94 °C 30 s, 57 °C 1 min y 72 °C 30 s. La extensión final para ambos protocolos fue a 72 °C por 2 min^{3,14}. En cada amplificación, se utilizaron cepas control: *E. coli* 2348/69 (*eae*), *E. coli* KNH-172 (*lt*, *stp*), *E. coli* O126-53 (*sth*), *E. coli* C-481 (*ipaH*), *E. coli* 17-2 (*aggR*), *E. coli* EDL933 (*stx1*, *stx2*) y *E. coli* ATCC 25922¹⁴. Los productos de amplificación fueron detectados mediante electroforesis en geles de agarosa al 2,5% y tinción con bromuro de etidio. Los perfiles de bandas fueron documentados con el sistema de adquisición de imágenes UVP Doc-It® LS, LifeScience Software.

Resultados

El grupo de estudio quedó constituido por 211 niños, con un ligero predominio del género masculino (54%). La población menor de 5 años representó el 76% de los casos.

Escherichia coli (*E. coli*) diarreogénica se detectó en el 12,3% (n=26/211) de los niños con diarrea. Los patotipos identificados fueron EAEC, ETEC (todos *lt* positivos), EPEC y STEC (*stx2* y *eae* positivos) (tabla 1 y figs. 1 y 2). Los patotipos ETEC con toxina termoestable (*stp* o *sth*), STEC (*stx1*) y EIEC (*ipaH*) no fueron detectados.

Tabla 1 Frecuencia de patotipos de *E. coli* diarreogénica (DEC) en heces de niños con diarrea. La Plata, Argentina. Mayo-octubre de 2017

Patotipos de <i>E. coli</i> diarreogénica	Niños con diarrea	
	Número	Porcentaje
EAEC	20	77,2
ETEC (LT)	2	7,6
EPEC	1	3,8
STEC (Stx2)	1	3,8
EAEC + EPEC ^a	1	3,8
EAEC + ETEC (LT) ^a	1	3,8
Total de casos positivos con DEC	26	100

DEC: *Escherichia coli* diarreogénica, EAEC: *E. coli* enteroagregativa, ETEC (LT): *E. coli* enterotoxigénica con toxina termolábil, EPEC: *E. coli* enteropatogénica, STEC: *E. coli* productora de toxina Shiga.

^a Coinfección en el mismo paciente.

Las frecuencias de infección de los patotipos EAEC, ETEC, EPEC y STEC fueron 10,43; 1,42; 0,95 y 0,47%, respectivamente. El patotipo EAEC fue prevalente en todos los grupos etarios, mientras que ETEC, EPEC y STEC solamente se observaron en niños menores de 5 años (fig. 3).

Discusión

Los resultados de este estudio permitieron estimar la frecuencia de infección entérica de los patotipos de *Escherichia coli* diarreogénica en una población pediátrica ambulatoria con diarrea, atendida en el Hospital Sor María Ludovica de La Plata, Argentina, durante el período comprendido entre mayo y octubre de 2017.

Las cepas diarreogénicas y comensales de *E. coli* poseen características fenotípicas similares, que dificultan su identificación en el laboratorio de diagnóstico y por lo cual es importante el uso de métodos moleculares¹¹. En las últimas décadas, se han hecho grandes avances en el diagnóstico molecular de los agentes productores de diarrea. La estrategia diagnóstica utilizada en esta investigación permitió verificar la viabilidad del patógeno mediante el estudio secuencial de cultivo *in vitro* y la posterior amplificación del ADN bacteriano. Asimismo, para descartar los resultados falsos negativos por la presencia de inhibidores de reacción, todas las reacciones moleculares incluyeron un control de amplificación interno¹⁴.

La presencia de *E. coli* diarreogénica fue observada en el 12,3% de los niños estudiados. Dicho valor fue comparable con los documentados en estudios realizados en Chile y Paraguay^{30,31}. Otros informes reportan valores de infección más elevados^{4,11,20,23,25}. Las diferencias en la frecuencia de infección podrían deberse a diversos factores, como el diseño del estudio, la época del año, la región estudiada, la duración de la diarrea, la población seleccionada o los métodos de diagnóstico etiológico utilizados^{4,21}. Por ejemplo, una investigación realizada en India por Rajendran et al.²⁰ informó que la infección estuvo presente en más del 50% de la población. Sin embargo, dichos autores caracterizaron los patógenos en niños menores de 5 años con diarrea aguda

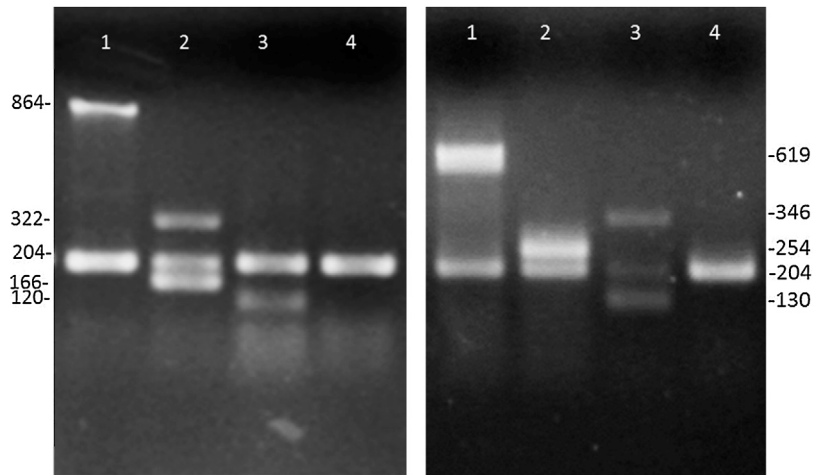


Figura 1 Productos de amplificación de factores de virulencia de cepas control de *Escherichia coli*. Izquierda: PCR múltiple 1. Calle 1: *E. coli* 2348/69 (*eae*, 864 pb), calle 2: *E. coli* KNH-172 (*lt*, 322 pb) y (*stp*, 166 pb), calle 3: *E. coli* O126-53 (*sth*, 120 pb), calle 4: *E. coli* ATCC 25922 (16S rRNA, 204 pb). Derecha: PCR múltiple 2. Calle 1: *E. coli* C-481 (*ipaH*, 619 pb), calle 2: *E. coli* 17-2 (*aggR*, 254 pb), calle 3: *E. coli* EDL933 (*stx1*, 130 pb) y (*stx2*, 346 pb), calle 4: *E. coli* ATCC 25922 (16S rRNA, 204 pb).

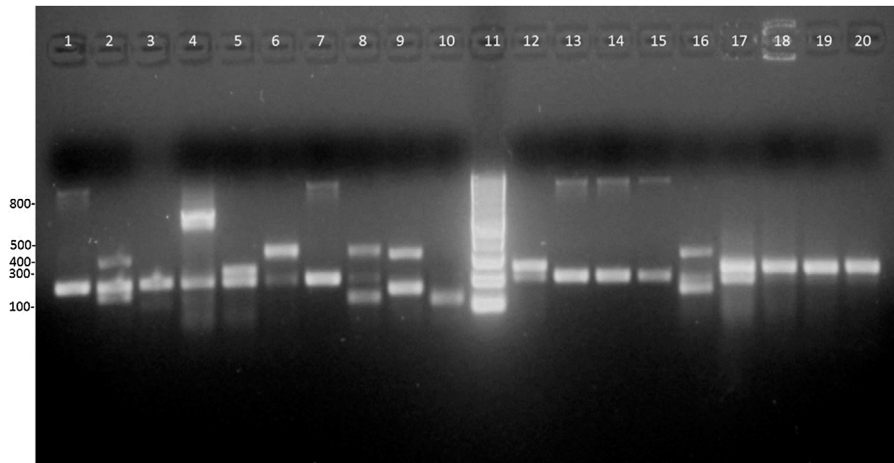


Figura 2 Productos de amplificación de factores de virulencia de *Escherichia coli* provenientes de aislamientos de pacientes y de cepas control. Calles 1, 13 y 14: *E. coli* 2348/69 (*eae*), calles 2, 9 y 16: *E. coli* KNH-172 (*lt* y *stp*), calles 3, 18 y 19: ausencia de factores de virulencia (pacientes), calle 4: *E. coli* C-481 (*ipaH*), calles 5 y 12: aislamientos de pacientes (*aggR*), calle 6: aislamiento de paciente (*stx2*), calles 7 y 15: aislamientos de pacientes (*eae*), línea 8: *E. coli* EDL933 (*stx1* y *stx2*), calle 10: *E. coli* O126-53 (*sth*), calle 17: *E. coli* 17-2 (*aggR*), calle 20: *E. coli* ATCC 25922 (16S rRNA). Calle 11: marcador de PM (100 pb).

grave y que habían sido hospitalizados por el cuadro entérico. De igual modo, publicaciones referidas a dos provincias de la Argentina señalaron frecuencias de infección por DEC mayores que las reportadas en el presente estudio. Una de esas investigaciones fue realizada en Corrientes por Esquivel et al.⁵, quienes señalaron la presencia de patotipos DEC en el 31% de los casos. Sin embargo, dichos autores seleccionaron pacientes pediátricos y adultos con diarrea aguda de cuyas heces no se hubieran aislado otros patógenos bacterianos. El segundo estudio fue realizado en Misiones por Quiroga et al.¹⁹, quienes reportaron la presencia de DEC en el 33% de los casos. No obstante, dicho estudio aplicó un diseño longitudinal, incluyó solamente niños menores de 20 meses y utilizó una metodología de laboratorio diferente. Los estudios citados fueron heterogéneos en cuanto

a diseños metodológicos, técnicas de detección y criterios de inclusión, lo que dificulta la comparación.

El patotipo EAEC fue prevalente y presentó una frecuencia cercana al 10%, mientras que los patotipos ETEC, EPEC y STEC fueron hallados en menor proporción. El predominio de EAEC está en concordancia con lo que informan diversos trabajos realizados en Argentina, Bolivia, Brasil, India, México, Paraguay y Perú^{4,5,9,12,20,21,27}.

La frecuencia de ETEC fue menor del 2% y todos los aislamientos presentaron la toxina termolábil. La presencia de aislamientos de ETEC con dicha toxina fue coincidente con lo que señalan otros estudios de Argentina^{12,19,29}. Sin embargo, el porcentaje de niños infectados con el patotipo ETEC fue menor que el informado en otros trabajos del país. Al respecto, un estudio de cohorte realizado en niños menores de

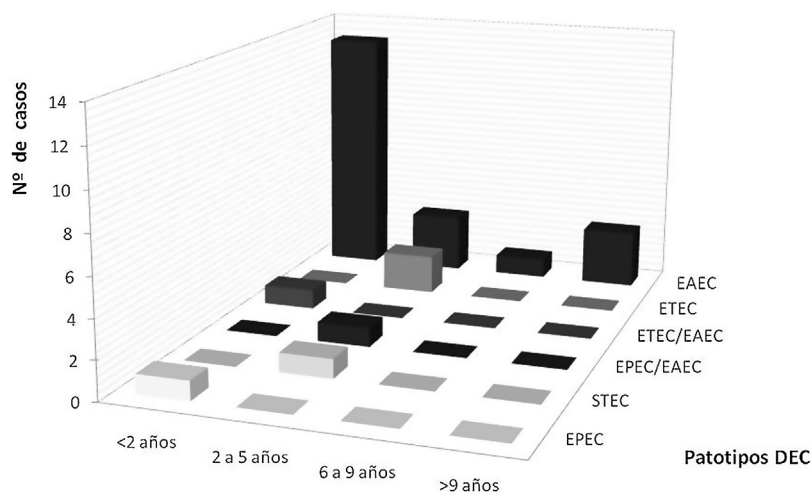


Figura 3 Número de niños con *Escherichia coli* diarreogénica (DEC) según grupo etario y patotipo detectado. EAEC: *E. coli* enteroagregativa, ETEC: *E. coli* enterotoxigénica, STEC: *E. coli* productora de toxina Shiga, EPEC: *E. coli* enteropatogénica, ETEC/EAEC y EPEC/EAEC: coinfección de dos patotipos en el mismo niño con diarrea. La Plata, Argentina. Mayo-octubre de 2017.

dos años de Misiones reportó que ETEC estuvo presente en un 13% de los casos²⁹. Asimismo, otro relevamiento en niños de Corrientes reportó una frecuencia de infección con dicho patotipo del 8%¹². La menor frecuencia de ETEC hallada en el presente estudio podría deberse a diferencias en la edad de los individuos, al período estudiado o al sesgo de selección poblacional. Por ejemplo, el trabajo de Misiones evaluó la presencia de ETEC solamente en lactantes, el grupo etario con mayor prevalencia del patógeno, mientras que el estudio correntino solamente realizó la pesquisa de ETEC en las heces de los niños con diarrea cuyos coprocultivos habían sido negativos para otras bacterias.

La presencia de EPEC en niños con diarrea fue menor del 1%. Este resultado coincide con el reportado en México². Sin embargo, estudios realizados en varias localidades de la Argentina han mostrado valores de infección del 6 al 25%^{5,7,12,15,19}. La menor frecuencia de EPEC en este estudio comparado con los antedichos podría deberse a la aplicación de distintas técnicas de diagnóstico para la búsqueda de EPEC (serotipificación o métodos moleculares), a la selección de otros grupos etarios, a la época del año o a la presencia variable de este patógeno en las distintas regiones del país^{4,11,21}.

En este estudio se detectó un solo aislamiento de STEC, con una frecuencia cercana al 0,5%. Diversos estudios han reportado valores entre el 0,3 y el 13% en la población estudiada^{2,4,5,12,14,17,21,22,24}. Esta amplia variación encontrada en la bibliografía podría deberse a diferencias en los criterios de inclusión, en el método de diagnóstico o a factores socioeconómicos, entre otros. El aislamiento STEC presentó los genes de la toxina Shiga 2 y de la intimina en su genoma. El hallazgo de dichos genes fue coincidente con lo publicado por diversos autores de Argentina^{14,17,21,22}.

La distribución de los patotipos DEC presentó diferencias según la edad de los niños con diarrea; EAEC fue observado en todos los grupos etarios, mientras que ETEC, EPEC y STEC solamente fueron detectados en niños de menor edad. El patotipo EAEC ha sido reconocido como un patógeno emergente, tanto por su reciente descripción como

por su relevancia en cuadros gastrointestinales agudos y persistentes^{9,14,16,20,25}. En esta investigación, la presencia de EAEC en niños de mayor edad podría deberse a sus características patogénicas, ya que dicha bacteria es capaz de adherirse a la pared intestinal, favorecer la producción de moco, liberar enterotoxinas, estimular la respuesta inflamatoria intestinal, evadir el sistema inmunitario y persistir en el intestino por períodos prolongados^{4,14,21}.

El predominio de infecciones con ETEC, EPEC y STEC hallado en niños menores de 5 años coincide con lo reportado en diversos estudios^{18,22,25,29}. La evidencia ha señalado que, en las áreas endémicas, la disminución de las infecciones por dichos patotipos a medida que se incrementa la edad podría deberse al desarrollo de la inmunidad adquirida, a determinantes genéticos individuales o a factores ambientales^{4,18}.

La presente investigación estuvo sujeta a varias limitaciones. En principio, no se contó con información sobre la presentación clínica o la duración del cuadro diarreico que motivó la consulta médica. En segundo lugar, este estudio no incluyó la detección de otras infecciones intestinales. En tercer lugar, no se investigaron las cepas de EAEC atípicas por la alta diversidad de sus genes de virulencia. Por último, este trabajo fue conducido en la población pediátrica de un área urbana durante un período de seis meses y puede no representar exactamente las frecuencias de infección entéricas de la región.

Este estudio constituye el primer reporte de detección de *Escherichia coli* diarreogénica mediante técnicas de amplificación molecular en una población pediátrica ambulatoria con diarrea asistida en La Plata. En las últimas décadas, se han hecho grandes avances en el diagnóstico de los agentes productores de diarrea. Sin embargo, la investigación de todos los patotipos diarreogénicos de *E. coli* por métodos moleculares no se realiza en forma rutinaria en la mayoría de los laboratorios de diagnóstico clínico. Por tal motivo, estos resultados revisten particular interés. De todos modos, sería importante realizar estudios más amplios, que incluyeran la caracterización de los aislamientos a partir de un mayor

número de genes, controles asintomáticos, distintas épocas del año y población de diversas áreas geográficas, para esclarecer la relevancia de la infección por *E. coli* diarreogénica en niños de la Argentina.

Financiación

El presente trabajo ha sido financiado por un subsidio a la investigación clínica de la Fundación Alberto J. Roemmers.

Conflicto de intereses

Los autores declaran que no presentan conflictos de intereses en esta investigación.

Anexo. Material adicional

Se puede consultar material adicional a este artículo en su versión electrónica disponible en doi:10.1016/j.ram.2021.02.006

Bibliografía

- Canata M, Navarro R, Velázquez G, Rivelli S, Rodríguez F, Céspedes A, Espínola C, Canese J, Guillén R. Caracterización molecular de factores de virulencia de aislados *Escherichia coli* obtenidas de heces de niños con gastroenteritis del Hospital Central de Instituto de Previsión Social en 2012. *Pediatr (Asunción)*. 2016;43:13–7.
- Canizalez-Roman A, Flores-Villaseñor HM, Gonzalez-Nuñez E, Velazquez-Roman J, Vidal JE, Muro-Amador S, Alapizco-Castro G, Díaz-Quinonez JA, León-Sicauros N. Surveillance of Diarrheagenic *Escherichia coli* Strains Isolated from Diarrhea Cases from Children, Adults and Elderly at Northwest of Mexico. *Front Microbiol*. 2016;7:1924–35.
- Carbonari CC, Deza N, Flores M, Gasparini A, Manfredi E, Rivas M. First isolation of enteroaggregative *Escherichia coli* O104:H4 from a diarrhea case in Argentina. *Rev Argent Microbiol*. 2014;46:302–6.
- Croxen MA, Law RJ, Scholz R, Keeney KM, Wlodarska M, Finlay BB. Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev*. 2013;26:822–80.
- Esquivel P, Lifschitz V, Losch L, Medina M, Pato A, Cacciamani A, Merino Luis A. Caracterización molecular de asilamientos de *Escherichia coli* productores de diarrea en niños y adultos de la ciudad de Corrientes Argentina. *Rev Panam Infectol*. 2010;12:17–21.
- Franzolin M, Barbosa Alves R, Keller R, Tardelli Gomes T, Beutin L, Lima Barreto M, Milroy C, Strina A, Ribeiro H, Trabulsi L. Prevalence of diarrheagenic *Escherichia coli* in children with diarrhea in Salvador, Bahia, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2005;100:359–63.
- Giugno S, Oderiz S. Etiología bacteriana de la diarrea aguda en pacientes pediátricos. *Acta Bioquím Clín Latinoam*. 2010;44:63–9.
- Gonzales L, Joffre E, Rivera R, Sjoling A, Svennerholm AM, Iniguez V. Prevalence, seasonality and severity of disease caused by pathogenic *Escherichia coli* in children with diarrhoea in Bolivia. *J Med Microbiol*. 2013;62:1697–706.
- Hebbelstrup Jensen B, Poulsen A, Hebbelstrup Rye Rasmussen S, Struve C, Engberg JH, Friis-Møller A, Boisen N, Jønsson R, Petersen RF, Petersen AM, Krogfelt KA. Genetic Virulence Profile of Enteroaggregative *Escherichia coli* Strains Isolated from Danish Children with Either Acute or Persistent Diarrhea. *Front Cell Infect Microbiol*. 2017;7:230–45.
- Kahali S, Sarkar B, Chakraborty S, Macaden R, Deokule JS, Ballal M, Nandy RK, Bhattacharya SK, Takeda Y, Ramamurthy T. Molecular epidemiology of diarrhoeagenic *Escherichia coli* associated with sporadic cases and outbreaks of diarrhoea between 2000 and 2001 in India. *Eur J Epidemiol*. 2004;19:473–9.
- Lopardo HA, Predari SC, Vay C, editores. 2016. Manual de Microbiología Clínica. Bacterias de Importancia Clínica. Volumen I. Asociación Argentina de Microbiología [consultado 4 Jul 2019] Disponible en: <https://www.aam.org.ar/descarga-archivos/Parte21Enterobacterias.pdf>.
- Medina MG, Esquivel P, Lifschitz V, Medina M, Lösch L, Merino LA. Detección de *Escherichia coli* diarreogénicos en niños de barrios humildes de Corrientes, Argentina. *Rev Cubana Med Trop*. 2010;62:42–7.
- Ministerio de Salud de la Nación. Dirección de Epidemiología, Área de Vigilancia. Boletín Integrado de Vigilancia Epidemiológica N.º 129, 2012 [consultado 20 Sep 2018] Disponible en: <http://www.msal.gov.ar/images/stories/boletines/Boletin-Integrado-De-Vigilancia-N329-SE39.pdf>.
- Molina NB. Diarrea persistente en la población infantil. Estudio epidemiológico prospectivo de consultas ambulatorias en un hospital pediátrico de la provincia de Buenos Aires. Tesis de Doctorado en Ciencias Médicas. Argentina: Universidad Nacional de La Plata; 2019.
- Notario R, Borda N, Gambande T, Sutich E. Species and serovars of enteropathogenic agents associated with acute diarrheal disease in Rosario Argentina. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 1996;38:5–7.
- Ochoa TJ, Barletta F, Contreras C, Mercado E. New insights into the epidemiology of enteropathogenic *Escherichia coli* infection. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2008;102:852–6.
- Oderiz S, Leotta GA, Galli L. Detection and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in children treated at an inter-zonal pediatric hospital in the city of La Plata. *Rev Argent Microbiol*. 2018;50:341–50.
- Qadri F, Svennerholm A, Faruque A, Sack R. Enterotoxigenic *Escherichia coli* in developing countries: Epidemiology, microbiology, clinical features, treatment, and prevention. *Clin Microbiol Rev*. 2005;18:465–83.
- Quiroga M, Oviedo P, Chinen I, Pegels E, Husulak E, Binztein N, Rivas M, Schiavoni L, Vergara M. Asymptomatic infections by diarrheagenic *Escherichia coli* in children from Misiones, Argentina, during the first twenty months of their lives. *Rev Inst Med Trop São Paulo*. 2000;42:9–15.
- Rajendran P, Ajjampur SS, Chidambaram D, Chandrabose G, Thangaraj B, Sarkar R, Samuel P, Rajan DP, Kang G. Pathotypes of diarrheagenic *Escherichia coli* in children attending a tertiary care hospital in South India. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2010;68:117–22.
- Torres AG. Pathogenic *Escherichia coli* in Latin America. 1st edition EE. UU.: Bentham Science Publishers Ltd; 2010. Disponible en: <https://doi.org/10.2174/97816080519221100101>
- Rivas M, Sosa-Estani S, Rangel J, Caletti MG, Vallés P, Roldán CD, Balbi L, Marsano de Mollar MC, Amoedo D, Miliwebsky E, Chinen I, Hoekstra RM, Mead P, Griffin PM. Risk factors for sporadic Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections in children Argentina. *Emerg Infect Dis*. 2008;14:763–71.
- Schilling KA, Omere R, Derado G, Ayers T, Ochieng JB, Farag TH, Nasrin D, Panchalingam S, Nataro JP, Kotloff KL, Levine M, Oundo J, Parsons MB, Bopp C, Laserson K, Stauber CE, Rothenberg R, Breiman RF, O'Reilly CE, Mintz ED. Factors Associated with the Duration of Moderate-to-Severe Diarrhea among Children in Rural Western Kenya Enrolled in the Global Enteric Multicenter Study, 2008–2012. *Am J Trop Med Hyg*. 2017;97:248–58.

24. Sharaf EF, Shabana II. Prevalence and molecular characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolates from human and sheep in Al-Madinah Al-Munawarah. *Infectio*. 2016;1:81–7.
25. Shrivastava AK, Kumar S, Mohakud NK, Suar M, Sahu PS. Multiple etiologies of infectious diarrhea and concurrent infections in a pediatric outpatient-based screening study in Odisha, India. *Gut Pathog*. 2017;9:16–28.
26. Tian L, Zhu X, Chen Z, Liu W, Li S, Yu W, Zhang W, Xiang X, Sun Z. Characteristics of bacterial pathogens associated with acute diarrhea in children under 5 years of age: A hospital-based cross-sectional study. *BMC Infect Dis*. 2016;16:253–61.
27. Torres M, Pírez M, Schelotto F, Varela G, Parodi V, Allende F, Falconi E, Dell'Acqua L, Gaione P, Méndez M, Ferrari A, Montano A, Zanetta E, Acuña A, Chiparelli H, Ingold E. Etiology of Children's Diarrhea in Montevideo, Uruguay: Associated Pathogens and Unusual Isolates. *J Clin Microbiol*. 2001;39:2134–9.
28. Varela G, Jasinski C, Gadea P, Tanzi M, Mota M, Arenas C, Pardo L, González S, González G, Sirok A, Schelotto F. *Escherichia coli* enteropatógeno asociado a casos de diarrea en niños usuarios del Hospital Pereira Rossell. Aspectos clínicos y características de las cepas involucradas. *Rev Med Urug*. 2007;23:153–63.
29. Viboud G, Jouve MJ, Binsztein N, Vergara M, Rivas M, Quiroga M, Svennerholm A. Prospective cohort study of enterotoxigenic *Escherichia coli* infections in Argentinean children. *J Clin Microbiol*. 1999;37:2829–33.
30. Vidal M, Kruger E, Durán C, Lagos R, Levine M, Prado V, Toro C, Vidal R. Single multiplex PCR assay to identify simultaneously the six categories of diarrheagenic *Escherichia coli* associated with enteric infections. *J Clin Microbiol*. 2005;43:5362–5.
31. Weiler N, Orrego M, Alvarez M, Huber C. Detección molecular de *Escherichia coli* diarreogénica en pacientes pediátricos con síndrome diarreico agudo en Paraguay. *Mem Inst Investig Cienc Salud*. 2017;15:16–21.
32. Zhang S, Zhou Y, Xu W, Tian LG, Chen JX, Chen S, Dang Z, Gu W, Yin J, Serrano E, Zhou X. Impact of co-infections with enteric pathogens on children suffering from acute diarrhea in southwest China. *Infect Dis Poverty*. 2016;5:64–77.