

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA
SISTEMA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

**PERFIL EPIDEMIOLÓGICO Y FILOGENÉTICO DE
ESCHERICHIA COLI ENTEROPATÓGENA ASOCIADAS A
GASTROENTERITIS EN PACIENTES PEDIÁTRICOS DEL
HOSPITAL NACIONAL DE NIÑOS “DR. CARLOS SÁENZ
HERRERA”, ENERO 2015 A SETIEMBRE 2019.**

Trabajo Final de Investigación Aplicada sometido a la consideración de la Comisión del Programa de Estudios de Posgrado de Especialidades en Microbiología para optar al grado y título de Especialista en Bacteriología Médica

CHRISTOPHER MAIRENA ACUÑA

Ciudad Universitaria Rodrigo Facio, Costa Rica

2020

AGRADECIMIENTOS

*A muchas personas les agradezco el apoyo y la ayuda brindada
para poder finalizar este proceso.*

*En especial a Diana por su apoyo incondicional,
a mi tutor y amigo, Cristian, por el conocimiento y las palabras de aliento,
a mi familia, y mis jefes por los permisos para poder realizar la especialidad.*



SISTEMA DE ESTUDIOS EN POSGRADO
PROGRAMA DE POSGRADO EN ESPECIALIDADES EN MICROBIOLOGÍA

ACTA-34-2019

Acta presentación de Requisito Final de Graduación Trabajo Final de Investigación

Sesión del Tribunal Examinador celebrada el día miércoles 8 de enero del 2020 con el objeto de recibir el informe oral del estudiante Christopher Mairena Acuña carné #A93568, quien se acoge al Reglamento General del Sistema de Estudios de Posgrado para presentar el Trabajo Final de Investigación, para optar por el grado académico de Especialista en Bacteriología Médica.

ARTICULO 1

Quien preside solicita al postulante realizar la presentación oral de su Trabajo Final de Investigación titulado: "Perfil epidemiológico y filogenético de Escherichia coli enteropatógena asociadas a gastroenteritis en pacientes pediátricos del Hospital Nacional de Niños "Dr. Carlos Sáenz Herrera", Enero 2015- Setiembre 2019".

ARTICULO 2

Terminada la disertación, los miembros del Tribunal Examinador interrogan al Postulante durante el tiempo reglamentario y, una vez concluido el interrogatorio, el Tribunal se retira a deliberar.

ARTICULO 3

El tribunal considera el trabajo final de graduación satisfactorio y le confiere la calificación de:

Aprobado

ARTICULO 4

Se da lectura al acta que firman los miembros del Tribunal Examinador y el Postulante, a las 16:33 horas.

Table with 3 columns: Nombre, Firma, No. Cédula. Rows include Norman Rojas Campos (Quien preside), Cristian Pérez Corrales, Carlos Chacón Díaz, and Christopher Mairena A. (Estudiante).

Observaciones:

Nota: Solamente firmarán el acta los responsables de la actividad descrita

Tabla de contenidos

Resumen	v
Índice de cuadros y figuras.....	vi
Índice de abreviaturas.....	vii
1. Justificación	1
2. Hipótesis:.....	1
3. Objetivos:	2
3.1. Objetivo General:	2
3.2. Objetivos Específicos:.....	2
4. Antecedentes	3
4.1. Generalidades	3
4.2. Diagnóstico y tipificación de <i>E. coli</i>	4
4.3. Definición de EPEC.....	6
4.4. Fisiopatología de EPEC	7
4.5. Consideraciones clínicas y tratamiento de EPEC	8
4.6. <i>Escherichia coli</i> enteropatógena típica y atípica	9
4.7. Epidemiología de EPEC	10
5. Metodología.....	14
6. Resultados	18
7. Discusión	23
7.1. Prevalencia de EPEC	23
7.2. Edad y origen de los pacientes afectados por EPEC.....	26
7.3. Distribución de Filogrupos.....	27
7.4. Resistencia a antibióticos	29
8. Conclusiones	31
9. Referencias.....	32

Resumen

Las enfermedades gastrointestinales son una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en países en vías de desarrollo. Las infecciones causadas por los diversos patotipos de *E. coli* diarreogénicas tienen alta prevalencia en dichos países, principalmente en la población pediátrica menor de 5 años. Uno de los principales patotipos es *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC), cuya identificación de laboratorio se realiza demostrando la presencia de los genes *eae* y/o *bfp*.

Actualmente, EPEC es dividido en dos subcategorías, las cepas denominadas típicas (tEPEC) que se diferencian por presentar los genes *eae* y *bfp*; y las cepas atípicas (aEPEC) que no presentan el gen *bfp*; estas últimas causan infecciones en humanos y algunas especies de animales, además, pueden estar presente como flora normal del tracto gastrointestinal.

La epidemiología de este patotipo es variable, y depende de cada región y población estudiada. El presente estudio determinó la prevalencia de EPEC en muestras diarreicas provenientes de pacientes pediátricos con gastroenteritis que se han procesado en el periodo comprendido entre enero de 2015 y setiembre de 2019; así como el perfil filogenético de estas cepas y las principales características demográficas de los pacientes afectados.

Se obtuvo la presencia de EPEC en 5% de las muestras analizadas, donde el 100% correspondió a cepas aEPEC distribuidas principalmente en los filogrupos B1 (54%) y B2 (36%). Así mismo, los pacientes de 0-2 años fueron los más afectados (49%), y la resistencia encontrada hacia ampicilina (27.5%) y TMP-SMX (19.6%) es baja en comparación a otros países.

Este trabajo permite evaluar la epidemiología de EPEC y su distribución en diversos grupos filogenéticos, con el fin de generar información que contribuya a la mejor comprensión del comportamiento de este patógeno.

Índice de cuadros y figuras

Cuadro 1. Marcadores moleculares utilizados para el diagnóstico de DEC.....	6
Cuadro 2. Cebadores utilizados para las reacciones de PCR utilizadas en el estudio....	17
Cuadro 3. Distribución de aislamientos de EPEC por periodo.....	20
Cuadro 4. Distribución de grupos filogenéticos y resistencia a antibióticos de EPEC encontrados en el periodo de estudio.....	22
Figura 1. Algoritmo para la determinación de grupos filogenéticos de E. coli.....	16
Figura 2. Análisis de EPEC en muestras de heces diarreicas en pacientes pediátricos durante el periodo de estudio.....	18
Figura 3. Distribución de muestras positivas por EPEC según edad del paciente.....	20
Figura 4. Frecuencia de muestras positivas por EPEC según origen de aislamiento y sexo del paciente.....	21
Figura 5. Aislamientos de EPEC y otros patógenos en heces durante el periodo de estudio.....	24

Índice de abreviaturas

BLEE: betalactamasa de espectro extendido

Caldo BHI: Caldo Infusión Cerebro-Corazón

CLSI: Instituto de Estándares de Laboratorios Clínicos.

DAEC: *Escherichia coli* adherente difusa

DEC: *Escherichia coli* diarreogénicas

EAEC: *Escherichia coli* enteroagregativa

EHEC: *Escherichia coli* enterohemorrágica

EIEC: *Escherichia coli* enteroinvasiva

EPEC: *Escherichia coli* enteropatógena

aEPEC: *Escherichia coli* enteropatógena atípica

tEPEC: *Escherichia coli* enteropatógena típica

ETEC: *Escherichia coli* enterotoxigénica

LEE: locus de efecto en enterocito

MLST: multilocus sequence typing

NGS: secuenciación de nueva generación

OMS: Organización Mundial de la Salud

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

SIL: sistema informático de laboratorio

Tir: Receptor translocado de intimina

TMP-SMX: Trimetoprim-Sulfametoxazol

1. Justificación

Las enfermedades diarreicas están catalogadas por la OMS como un problema de salud pública debido a la malnutrición, morbilidad y mortalidad que generan año con año (OMS 2012). *Escherichia coli* es uno de los patógenos que más están asociados a estas infecciones, especialmente en pediatría. De manera particular, *Escherichia coli* enteropatógena, se ha reportado como uno de los principales patotipos DEC que más se aíslan y asocian con cuadros diarreicos en los pacientes pediátricos atendidos en el Hospital Nacional de Niños (Pérez 2010; Pérez 2019). Así mismo, datos mundiales han establecido que su epidemiología es variable y la caracterización de las cepas circulantes son dependientes de la localización geográfica y temporal (Croxen, 2013).

En Costa Rica se tiene conocimiento acerca de la circulación de este patógeno en la población pediátrica; la alta prevalencia y la variabilidad, que ha sido descrita a nivel mundial, estimula y conlleva a profundizar en los aspectos epidemiológicos de este patotipo. Los datos existentes hasta el momento sobre este patotipo describen la frecuencia general; sin embargo, con este trabajo se pretende conocer las principales características demográficas de la población afectada, establecer los perfiles de susceptibilidad a antibióticos y conocer el perfil filogenético que pueda existir entre las cepas circulantes, con el fin de brindar datos que generen un mayor conocimiento a los médicos tratantes y la comunidad científica en general.

2. Hipótesis:

Existen diferentes perfiles epidemiológicos y filogenéticos en las infecciones por EPEC en pacientes pediátricos atendidos en el Hospital Nacional de Niños en los periodos entre enero de 2015 y setiembre de 2019.

3. Objetivos:

3.1. Objetivo General:

Determinar el perfil epidemiológico y filogenético de las infecciones producidas por EPEC en la población en estudio.

3.2. Objetivos Específicos:

- Obtener la frecuencia de aislamientos de EPEC en pacientes pediátricos con gastroenteritis en los periodos comprendidos entre enero 2015 y setiembre 2019.
- Determinar las características demográficas en cuanto a edad, sexo y origen de infección de los pacientes pediátricos atendidos en el Hospital Nacional de Niños que sufrieron infección por EPEC en el periodo de estudio.
- Determinar los filogrupos de EPEC asociados a gastroenteritis en la población en estudio.
- Determinar el perfil de resistencia a antimicrobianos de los aislamientos de EPEC en la población en estudio.

4. Antecedentes

4.1. Generalidades

Las infecciones en tracto gastrointestinal son un problema severo de salud pública que genera consecuencias como malnutrición, morbilidad y mortalidad en infantes y niños jóvenes, de acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), sobre todo en países de bajo y mediano ingreso en Latinoamérica, África y Asia (WHO, 2012). A pesar de que existen muchos agentes microbianos causantes de diarrea, *Escherichia coli* es uno de los agentes etiológicos más importantes productores de diarrea en niños y adultos alrededor del mundo (Croxen, 2013).

La primera descripción de *Escherichia coli* fue realizada por Theodor Escherich en el año 1885, que realizó el aislamiento a partir de una muestra de heces de un niño, al cual en ese momento nombró como *Bacterium coli commune* (Escherich & Bettelheim, 1988). Posterior a varios cambios en la nomenclatura, fue hasta 1954 que se reconoció con el nombre de *Escherichia coli*; y fue reconocida como una bacteria que se encuentra ampliamente distribuida alrededor del mundo como parte de flora comensal normal en el tracto gastrointestinal de humanos y otros animales de sangre caliente (Cowan, 1954; Conway, 1995).

Sin embargo, debido a su plasticidad genética, esta bacteria comienza a sufrir gran cantidad de procesos de ganancia y pérdida de genes que le han permitido a algunos linajes convertirse en un patógeno muy diverso y con gran capacidad de adaptación, de tal manera que las cepas patógenas de *E. coli* pueden causar un amplio rango de enfermedades en el ser humano, desde infecciones en tracto gastrointestinal, hasta enfermedades extraintestinales como infecciones en tracto urinario, sistema nervioso central, torrente sanguíneo y otras (Kaper, Nataro & Mobley, 2004; Croxen & Finlay, 2010).

Existen diferentes patotipos de *Escherichia coli* causantes de infecciones gastrointestinales, llamadas en general *E. coli* diarrogénicas (DEC), que se han clasificado de acuerdo con diferentes características de virulencia y grupos genes que han adquirido

a través del tiempo (Nataro, 1998). Estos patotipos son: *E. coli* enteropatógena (EPEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* enteroinvasiva/*Shigella* (EIEC/*Shigella*) y *E. coli* adherente-difusa (DAEC).

Cada uno de estos patotipos representan grupos de clones que comparten factores de virulencia específicos, con los cuales se pueden diferenciar a nivel de laboratorio, sin embargo, es importante destacar que debido a la gran plasticidad genética de *E. coli*, algunos aislamientos combinan diferentes características principales de virulencia, generando patotipos mixtos, y que por tanto son consideradas cepas híbridas con mayor capacidad de virulencia (Croxen, 2013).

4.2. Diagnóstico y tipificación de *E. coli*

Escherichia coli es un bacilo gram negativo, oxidasa negativo, perteneciente a la familia Enterobacteriaceae. Es capaz de crecer en atmósfera aeróbica y anaeróbica, preferiblemente a 37°C, y puede ser móvil con flagelos peritricos, o no móvil. Debido a su presencia como comensal intestinal, realizar el diagnóstico de alguna cepa DEC en una gastroenteritis puede ser complicado, sobretodo, porque la microbiología convencional no puede distinguir aquellas *E. coli* patógenas de las no patogénicas (Croxen, 2013).

Se pueden utilizar características bioquímicas para distinguir, en algún grado, las colonias de *E. coli* a partir de una muestra clínica. El agar MacConkey es un ejemplo de lo mencionado, ya que la coloración que adoptan las colonias bacterianas debido al cambio de pH por la fermentación de lactosa (colonias rosadas) o la incapacidad de utilizar este azúcar (colonias incoloras) permite diferenciar *E. coli* (fermentadora de lactosa) de otras especies. Sin embargo, no todas las cepas de *E. coli* tienen la capacidad de fermentar lactosa, y si fermentan lactosa, no se puede asegurar de que se trate de una cepa DEC o una comensal, por lo que se debe tener cuidado al utilizar este método para realizar un diagnóstico (Croxen, 2013). Es por esto, que se necesitan realizar pruebas fenotípicas, genotípicas y/o morfológicas adicionales para identificar los patotipos DEC.

Tradicionalmente se ha utilizado la técnica de cultivo celular para determinar las *E. coli* diarrogénicas, en la que dependiendo de su patrón de adhesión e invasividad en células se pueden clasificar en diferentes patotipos de *E. coli*, sin embargo, es una prueba muy laboriosa y que consume mucho tiempo (Croxen, 2013).

Otro método que ha sido utilizado es la serotipificación con la clasificación de Kauffman, en donde se determinan los antígenos O (somáticos) polisacáridos y el H (flagelar) de superficie (Nataro, 1998), actualmente existen más de 180 diferentes serogrupos para O y más de 60 antígenos H, por lo que esta técnica también requiere de mucho tiempo y reactivos, y usualmente en los laboratorios de diagnóstico se vuelve poco costo-efectivo realizarlo. Además, se evidenció que puede ser un método confuso y poco informativo, porque la serotipificación no describe todos los patotipos DEC, o un patotipo DEC puede tener dos o más serotipos diferentes, así como un mismo serotipo puede pertenecer a uno o varios patotipos DEC (Trabulsi, 2002).

Con el gran avance y la disminución de costos que ha tenido la era genómica, se ha extendido el uso de la biología molecular para generar resultados de una manera más rápida y eficaz la detección de diversos patógenos, y las DEC no son la excepción, donde se han usado como marcadores los genes de virulencia de cada patotipo de *E. coli* en particular (Cuadro 1), de esta manera lograr una identificación de una forma rápida y precisa (Robins-Browne, 2016).

Así mismo, ha tenido un impacto positivo en las técnicas de tipificación para *E. coli* en general, permitiendo el desarrollo de técnicas enfocadas en realizar una identificación rápida y universal de clones, complejos clonales o filogrupos, lo que ha permitido analizar a mayor profundidad la epidemiología y las relaciones genéticas entre los diferentes aislamientos de bacterias (Clermont, 2015).

Cuadro 1. Marcadores moleculares utilizados para el diagnóstico de DEC (Robbins-Browne, 2016)

Patotipo	Marcador que lo define	Localización del determinante de virulencia	Principal(es) gen(es) para diagnóstico
EPEC	LEE	Isla patogenicidad	<i>eae, bfpA</i>
EIEC/ <i>Shigella</i>	pINV	Plásmido	<i>ipaH</i>
ETEC	ST / LT	Plásmido / trasposón	<i>st, lt</i>
EHEC	Toxina shiga	Profagos	<i>stx1, stx2</i>
EAEC	pAA	Plásmido (problable)	<i>aggR, astA, aaiC</i>
DAEC	Adhesinas afa/Dr	No conocido	<i>daaE</i>

LEE, locus de efecto en enterocito; pINV, plásmido de virulencia de EIEC y *Shigella*; ST, enterotoxina estable; LT, enterotoxina lábil; pAA, plásmido de virulencia de EAEC.

Los análisis filogenéticos han mostrado que los aislamientos de *E. coli* pueden agruparse en varios grupos filogenéticos, los principales son el A, B1, B2 y D; estos son utilizados como una primera herramienta para analizar de manera general las relaciones que puedan existir entre aislamientos de *E. coli*. Estos se basan en la combinación de la presencia/ausencia de tres genes usados como marcadores grupales filogenéticos: *chuA*, *yjaA* y TSPE4.C2 (Clermont, 2000; Doumith, 2012; Clermont, 2015). Esta tipificación ha sido ampliamente utilizada, y se ha encontrado que los grupos A y B1 están más asociados a cepas comensales de *E. coli*, mientras que las cepas extraintestinales son agrupadas en B2 y D (Clermont, 2015). En cuanto a los aislamientos DEC, se ha visto variabilidad en la distribución de los filogrupos (Mosquito, 2015). Otras técnicas se han desarrollado para establecer la relación y clonalidad entre cepas de *E. coli* con mayor resolución, sin embargo, son laboriosas e implican mayor especialización en equipos y reactivos, como el MLST (Multi-locus sequence typing) (Wirth, 2006; Yu, 2017)

4.3. Definición de EPEC

Escherichia coli enteropatógena (EPEC) fue el primer patotipo de DEC descubierto en el año 1955, y asociado como una causa importante de diarrea en niños, especialmente en países en vías de desarrollo (Neter, 1995; Robins-Browne, 1987). Originalmente, este patotipo era identificado por serotipos (O26, O55, O86, O103, O111, O114, O119, O125,

O126, O127, O128, O142 y O158), sin embargo, ahora su identificación se debe a la habilidad de producir un daño histopatológico en el epitelio intestinal conocido como adhesión y efecto, la inhabilidad para producir toxina Shiga y enterotoxinas termolábiles y termoestables (Nataro, 1998; Gomes 2016).

La lesión de adhesión y efecto (A/E) es una característica propia de EPEC, en la que se da una unión estrecha de la bacteria a las células epiteliales del hospedero, causando una disrupción de la superficie celular y ocasionando un efecto claro sobre las microvellosidades intestinales (Hu & Torres, 2015). La adhesión al epitelio intestinal es mediada por diferentes factores de virulencia de la bacteria, que genera un sistema de secreción tipo III para inyectar proteínas efectoras directamente en las células del epitelio intestinal (Ochoa, 2012).

La mayoría de factores de virulencia que van a producir la lesión A/E van a estar codificadas en el genoma por medio de una isla de patogenicidad denominada locus de efecto en enterocito (LEE, por sus siglas en inglés “Locus of Enterocyte Effacement”). Este elemento genético contiene una gran diversidad proteínas efectoras, translocadores y proteínas reguladoras; entre las que está el gen *eae*, que codifica por una intimina (adhesina de membrana externa), genes que codifican por las proteínas necesarias para ensamblar el sistema de secreción tipo III, y el receptor translocado de intimina (Tir, por sus siglas en inglés) (Dean, 2005; Dean, 2009).

4.4. Fisiopatología de EPEC

La fisiopatología de la infección por EPEC está dada por un primer reconocimiento por la bacteria del epitelio intestinal que ocasiona la expresión de LEE, lo cual conlleva a: (i) expresión de la intimina sobre la superficie bacteriana por activación del gen *eae*, (ii) ensamblaje del sistema de secreción tipo III e (iii) inyección de diferentes proteínas y efectores en la célula blanco. Por este medio, el Tir es inyectado y translocado en la superficie de la célula del hospedero, que ocasiona (iv) una unión a través de la interacción Tir-Intimina (Kenny, 2002; Dean, 2005).

La unión específica Tir-Intimina genera que se activen señales en cascada para que se dé la modificación del citoesqueleto a través de la polimerización de actina en la célula epitelial intestinal, produciendo la estructura en “pedestal” característica de la infección por EPEC. Toda la reestructuración de la célula blanco va a conllevar a cambios de forma, motilidad y señalización, pérdida de funcionalidad de los microvellos intestinales y disrupción de la barrera epitelial (Nataro, 1998; Ochoa, 2012; Pearson, 2016).

Es importante destacar que EPEC no es el único patotipo que posee la capacidad de generar la lesión A/E, sino que EHEC también puede contener la isla de patogenicidad LEE, y es por lo que en la definición de EPEC se añade la inhabilidad de producir toxina Shiga y enterotoxinas termolábiles y termoestables (Pearson, 2016).

Otro elemento genético importante, que además es utilizado como marcador para realizar diagnóstico molecular de este patotipo, es el plásmido de factor de adherencia de EPEC (pEAF), que contiene al gen que codifica por una fimbria tipo IV denominada pili formador de microagregados (BFP, por sus siglas en inglés) (Trabulsi, 2002). Este factor de virulencia participa en el reconocimiento inicial del epitelio intestinal, y además complementa la agregación de más EPEC (20 a 500 bacterias) en el sitio de la lesión, característica denominada adherencia localizada (LA), generando una mayor concentración de bacterias y daño (Gomes, 2016).

4.5. Consideraciones clínicas y tratamiento de EPEC

La transmisión de EPEC se da vía fecal-oral por contacto directo, agua o alimentos contaminados, incluso se tienen reportes de brotes en ambientes hospitalarios. Las manifestaciones clínicas comienzan posterior de tres horas de haber ingerido cantidades de 10^6 - 10^8 UFC/mL de EPEC, ocasionando cuadros de diarrea aguda acompañados en algunas ocasiones de fiebre, vómito y deshidratación (Nataro, 1998; Kaper, 2004). En la mayoría de casos, la diarrea es autolimitada y efectivamente tratada con rehidratación oral (Croxen, 2013).

La terapia antimicrobiana es necesaria en casos donde hay un cuadro clínico muy exacerbado o en aquellos donde se presenta una diarrea crónica. El tratamiento antibiótico oral debe ser con penicilinas, cefalosporinas o ciprofloxacina. Sin embargo, el perfil de resistencia de antibióticos de la cepa causante del cuadro va a ser importante, esto porque se ha visto una cantidad importante de cepas que poseen alto grado de resistencia a dichos antibióticos (Subramanian, 2009; Manning, 2010), desde un 4% a un 30% de aislamientos de EPEC con diversa resistencia a antibióticos en diferentes estudios en el Reino Unido, Brazil, Irán y Singapore (Mitra, 2011; Scaletsky, 2010; Croxen, 2013).

4.6. *Escherichia coli* enteropatógena típica y atípica

El patotipo EPEC se puede subdividir en EPEC típica (tEPEC) y EPEC atípica (aEPEC). Esta clasificación está basada en la presencia del plásmido EAF que contiene el gen *bfp*, de manera que las cepas que lo presentan son catalogadas como tEPEC, son consideradas como serotipos clásicos O:H y pueden producir adherencia localizada (LA) (Trabulsi, 2002; Schmidt, 2010); mientras que aquellas que no poseen *bfp* se denominan aEPEC, la mayoría no pertenecen a serotipos clásicos y algunos son no tipificables, y no pueden producir LA sino que tienen patrones más difusos de agregación (Schmidt, 2010).

La diarrea causada por tEPEC es secretoria, con mucus y con gran pérdida de agua y electrolitos en las heces. Por otro lado, el papel patógeno de aEPEC se ha comentado mucho, algunos estudios señalan que debido a la falta de producir adhesión localizada (LA), la lesión A/E es menor, retrasada o inexistente (Bueris, 2015), por lo que la probabilidad de que esas cepas causen daño o enfermedad es poca, lo que explica que esta bacteria se pueda encontrar como comensal en algunos individuos (portadores asintomáticos de EPEC) (Platenkam, 2018).

Sin embargo, en otras investigaciones se ha aislado aEPEC de individuos con gastroenteritis, y se ha determinado por cultivo celular que posee capacidad para generar la lesión A/E; además, debido a la interrupción extensa del microvello intestinal, genera

disminución en la superficie de absorción que contribuye a la diarrea. Por lo tanto, algunas cepas aEPEC pueden causar diarrea aguda y otras se han asociado con diarreas persistentes crónicas, asumiendo que su virulencia es menor, por lo tanto, la capacidad para permanecer y causar infecciones más prolongadas es mayor (Hu& Torres, 2015).

Por ejemplo, en un estudio llevado a cabo en Australia (Nguyen, 2004), se comparó pacientes infectados con aEPEC contra pacientes infectados con otros agentes productores de diarrea, y encontraron que aquellos infectados con aEPEC experimentaron una diarrea moderada, no inflamatoria, sin vómito, fiebre o dolor abdominal; sin embargo, el periodo de diarrea fue mayor (en días). En otros estudios, se encontraron cepas de aEPEC en niños con diarrea persistente mayor de 14 días en Australia (43%) y Noruega (22%) (Ochoa, 2008). Incluso en algunos aislamientos de un estudio alemán (Bielaszewska, 2007) se encontró que aEPEC estaba asociado con pacientes con diarrea sanguinolenta (18 de 118 pacientes con diarrea sanguinolenta: 15.3%).

Por otro lado, los humanos son el único reservorio conocido de tEPEC, en contraste con aEPEC que se ha aislado tanto de humanos como otros animales, incluyendo perros, conejos, monos y ovejas. En algunos estudios se ha encontrado que muchas cepas aEPEC de humanos y animales están clonalmente relacionados y compartiendo factores de virulencia (Croxen, 2013).

4.7. Epidemiología de EPEC

La epidemiología de las infecciones gastrointestinales se ven afectados por diferentes condiciones, entre estas destaca que la mayoría de las infecciones gastrointestinales resuelven espontáneamente, por lo que no todos los enfermos consultan. Además, es considerada una enfermedad que afecta más a países menos desarrollados, por lo que en muchas ocasiones las técnicas moleculares para realizar la detección y tipificación de DEC son poco realistas y representan un mayor gasto que el impacto clínico a corto plazo que puedan tener en el contexto de países de bajos ingresos, donde los sistemas de salud en

algunas ocasiones son inexistentes, o poseen poca cobertura y escaso presupuesto (Ochoa, 2012).

La diarrea causada por EPEC generalmente es una diarrea aguda (tEPEC y aEPEC), aunque también se ha asociado con diarreas crónicas persistentes (aEPEC). Las características clínicas de la infección por EPEC no están claramente descritas, se conoce que afectan mayoritariamente a población pediátrica, siendo los niños menores de 5 años los más afectados (Croxen, 2013).

Por muchos años se consideró que tEPEC estaba más asociado a países desarrollados, mientras que aEPEC se encontraba endémicamente en países en vías de desarrollo, sin embargo, ese comportamiento ha cambiado (Nataro, 1998). En 2008, se encontraba que tEPEC era el principal agente causante de diarrea en niños menores de 1 año en países latinoamericanos y africanos, sin embargo, esto ha disminuido con el tiempo y la diferencia de infecciones entre tEPEC y aEPEC es variada (Ochoa, 2008). Actualmente, se estima que EPEC, en general, es responsable de alrededor del 5-10% de los casos de diarrea en pacientes pediátricos en países como Brazil, Chile y Perú (Ochoa, 2011; Hu & Torres, 2015).

Las DEC han sido recientemente estudiadas por un proyecto, denominado Estudio Multicéntrico Global Entérico (GEMS, por sus siglas en inglés), el cual es uno de los estudios de casos-control más grandes en el mundo que se enfocan en analizar el impacto de la enfermedad diarreica en países de bajo recursos de África, Asia y Latinoamérica. Entre los resultados que han generado, ilustran que *Shigella* y ETEC se encuentran entre los cuatro principales agentes causantes de diarrea moderada a severa en niños en algunas regiones (África y Asia), y que existen tasas incrementadas de mortalidad en infantes de hasta 2.8 veces mayor, asociados con la presencia de EPEC y EHEC, resaltando la importancia que aún mantiene *E. coli* en estas regiones (Levine, 2012; Kotloff, 2013).

Así mismo, el proyecto GEMS también realizó un estudio genómico profundo en 70 cepas de tEPEC aisladas a lo largo de 5 años provenientes de diferentes países latinoamericanos

y africanos. En este, obtienen que la mayoría de las cepas tEPEC corresponden a grupos filogenéticos B1 (55%) y B2 (34%), sin embargo encontraron gran variabilidad genómica y múltiples secuenciotipos asociados (Hazen, 2016).

En otro estudio realizado en niños con gastroenteritis en Tennessee, Estados Unidos, encontraron que la mayoría correspondían a aEPEC con un 62% de resistencia a ampicilina, y estaban contenidas dentro de los grupos filogenéticos A y B1. Además, alrededor de un 40% de los aislamientos correspondían al secuenciotipo ST10, con la limitación que apenas lograron recuperar 11 muestras positivas por este patotipo (Foster, 2016).

Estos datos respaldan, como se ha mencionado, una gran variabilidad tanto geográfica como temporal con respecto a la epidemiología de *Escherichia coli* enteropatógena, incluso, para aEPEC existen muchas fuentes de origen y dudas en cuanto a su papel patogénico, lo que hace necesario estudiar localmente el comportamiento de estas cepas para comprender mejor su distribución y la manera en que puede afectar a la población.

En Costa Rica, se conoce que en un periodo comprendido entre los años 2005 a 2007, EPEC fue el patotipo más comúnmente encontrado en pacientes pediátricos con diarrea (11 de 40 casos) (Pérez, 2010). En un estudio más reciente, donde se identifica la prevalencia de DEC en un periodo comprendido entre los años 2008 a 2016, se obtiene que EPEC es el segundo patotipo en importancia (24%, n=145) por detrás de EAEC (Pérez-Corrales, 2019), demostrando que la incidencia ha disminuido conforme han pasado los años, pero sigue manteniéndose como uno de los patotipos de DEC más importantes en nuestra población.

No obstante, en nuestro país no se conoce la filogenie de estas cepas de EPEC causantes de infecciones gastrointestinales. Por lo que, con este trabajo, se pretende determinar las características filogenéticas y epidemiológicas de las cepas de *Escherichia coli* enteropatógena que se encuentran causando enfermedad gastrointestinal en la población pediátrica atendida en el Hospital Nacional de Niños, mediante el análisis de los grupos

filogenéticos y el perfil de los pacientes en los que se han dado aislamientos de EPEC, para generar un mayor conocimiento y proveer información valiosa sobre la diversidad de estas cepas que circulan en nuestra población.

5. Metodología

5.1. Población de estudio

Se incluyeron todas las muestras de heces recibidas en el laboratorio, provenientes de pacientes menores de 15 años con enfermedad diarreica, en las que se solicitó pruebas para determinar la presencia de microorganismos causantes de gastroenteritis, atendidos en cualquier servicio del Hospital Nacional de Niños en el periodo comprendido entre enero de 2015 a setiembre de 2019.

Se excluyeron los casos en los que las muestras provenían de otros centros hospitalarios, las pertenecientes a un mismo paciente en un periodo menor de 14 días, y las muestras de un mismo paciente que fueron procesadas por dos o más metodologías diagnósticas utilizadas en el laboratorio para determinar la presencia *Escherichia coli* enteropatógena, con el fin de evitar duplicaciones de aislamientos para un mismo paciente.

5.2. Aislamiento e identificación de EPEC

Las muestras clínicas incluidas en el estudio fueron analizadas en el momento del muestreo por dos metodologías diferentes, PCR (reacción en cadena de la polimerasa) convencional y/o el panel FilmArray® GI (Gastrointestinal).

- i. Las muestras procesadas por PCR convencional fueron aquellas con sospecha de gastroenteritis en pacientes estables no graves, sometidas al proceso estándar de las muestras de heces en el laboratorio clínico siguiendo las indicaciones descritas en los procedimientos operativos: *PT-P-001 Análisis de muestras fecales*, *PT-P-007 Tinción de Giemsa*, *IT-M-008 Revisión de Coprocultivos*, y *PT-DM-005 Reacción en cadena de la polimerasa para Escherichia coli productoras de diarrea*.

A manera de resumen, las muestras de heces diarreicas, negativas por Rotavirus y Adenovirus, con o sin leucocitos/eritrocitos, fueron sometidas a cultivo. Se utilizó Agar Tergitol-7 (Oxoid™) para identificar las colonias

predominantes amarillentas (fermentadoras de lactosa) o azuladas (no fermentadoras) que son sospechosas de *Escherichia coli* diarrogénicas. La extracción de ADN de estas cepas se llevó a cabo utilizando el equipo MagNAPure (Roche®) siguiendo las especificaciones del fabricante. La confirmación del patotipo se realizó a través de PCR multiplex de punto final, mediante la comprobación de la amplificación de los genes *eae* y/o *bfp*, según el protocolo descrito por Pérez-*et al* (2010) y el procedimiento operativo mencionado anteriormente. Para la visualización de los productos de PCR se utilizó el equipo QIAxcel (QIAGEN™). Los cebadores utilizados para la reacción de PCR para la determinación de EPEC se describen en el cuadro 2.

Posteriormente, se realizó la identificación bioquímica y pruebas de susceptibilidad antimicrobiana mediante la plataforma Vitek2® (BioMérieux), utilizando los puntos de corte establecidos por el CLSI (*Clinical Laboratory Standards Institute*). Los aislamientos bacterianos de EPEC fueron almacenados a -80°C en Caldo BHI (Infusión Cerebro Corazón) Oxoid™ para realizar los estudios posteriores.

- ii. Las muestras clínicas de pacientes críticos, o no estables, determinadas y solicitadas por el médico a cargo para estudio por FilmArray® GI, fueron procesadas por esta metodología de acuerdo con las especificaciones del fabricante, y reportadas en el Sistema Informático de Laboratorio (SIL) de donde se obtuvieron los datos para realizar este estudio. Los genes para la determinación de EPEC que esta tecnología utiliza son *eae* y *bfp*. Las cepas de EPEC determinadas por esta metodología no fueron recuperadas para estudios posteriores.

5.3. Características demográficas de la población afectada por EPEC

Los datos demográficos de los pacientes: edad, sexo, lugar de procedencia del paciente, origen de la infección y fecha de atención, fueron obtenidos mediante la revisión del Sistema Informático del Laboratorio (SIL) y revisión electrónica del expediente clínico.

5.4. Análisis y condiciones para la determinación de los Filogrupos de EPEC

El estudio de los grupos filogenéticos fue realizado a los aislamientos bacterianos conservadas en caldo BHI a -80°C . Para ello, se reanimaron las cepas mediante la estría de estas en Agar MacConkey (BioMérieux). Luego de dos pasajes, se realizó la extracción utilizando el equipo MagNAPure (Roche®) siguiendo las especificaciones del fabricante. La concentración y pureza del ADN extraído fue verificada utilizando espectrofotometría mediante el equipo Nanodrop™lite (Thermo Scientific™) a 260 nm y 260/280 nm respectivamente.

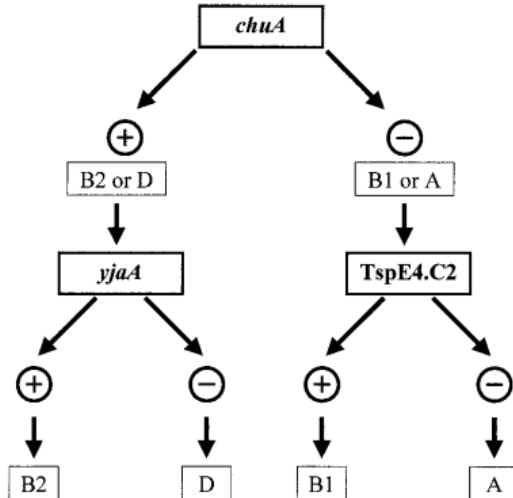


Figura 1. Algoritmo para la determinación de grupos filogenéticos de *E. coli*.

Las condiciones de PCR se desarrollaron según los protocolos descritos por Doumith-*et al* (2012) y Clermont (2015); donde se agrega 2.5 μL de ADN de la cepa bacteriana en cuestión (aproximadamente 50 ng/ μL), a una mezcla de 22.5 μL compuesta por 12.5 μL PCR MasterMix 2X TopTaq™ MasterMix (QIAGEN™) y cada uno de los cebadores a una concentración final de 1 mM

(cuadro 2). La detección de los productos de PCR se realizó con el equipo QIAxcel (QIAGEN™).

En este protocolo, se utilizó gen *gadA* (glutamato alfa-decarboxilasa) como control interno de amplificación dada su presencia en todas las cepas de *E. coli*; y la amplificación y/o ausencia de alguna de las otras regiones, *chuA*, *yjaA* y TSPE4.C2 se utilizó para determinar la presencia de los filogrupos A, B1, B2 y D, como se observa en la figura 1 (Doumith, *et al*, 2014; Clermont, 2015).

Cuadro 2. Cebadores utilizados para las reacciones de PCR utilizadas en el estudio

Gen / Cebadores	Secuencia de oligonucleótidos (5'-3')	Tamaño esperado (pb)	Referencia
<i>eae-F</i>	GACCCGGCACAAGCATAAGC	384	Paton, <i>et al</i> (1998)
<i>eae-R</i>	CCACCTGCAGCAACAAGAGG		
<i>bfp-F</i>	AATGGTGCTTGCGCTTGCTGC	324	Gunzburg, <i>et al</i> (1995)
<i>bfp-R</i>	GCCGCTTTATCCAACCTGGTA		
<i>gadA-F</i>	GATGAAATGGCGTTGGCGCAAG	373	Doumith, <i>et al</i> (2012)
<i>gadA-R</i>	GCGGAAGTCCCAGACGATATCC		
<i>chuA-F</i>	ATGATCATCGCGGCGTGCTG	281	Doumith, <i>et al</i> (2012)
<i>chuA-R</i>	AAACGCGCTCGCGCCTAAT		
<i>yjaA-F</i>	TGTTCGCGATCTTGAAAGCAAACGT	216	Doumith, <i>et al</i> (2012)
<i>yjaA-R</i>	ACCTGTGACAAACCGCCCTCA		
TSPE4.C2-F	GCGGGTGAGACAGAAACGCG	152	Doumith, <i>et al</i> (2012)
TSPE4.C2-R	TTGTCGTGAGTTGCGAACCCG		

5.5. Resistencia a antibióticos

Los antibióticos evaluados en el estudio fueron Ampicilina, Cefotaxima, Ciprofloxacina y Trimetoprim-Sulfametoxazol (TMP-SMX). Las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana fueron realizadas mediante la plataforma Vitek2® (BioMérieux), utilizando los puntos de corte establecidos por el CLSI.

6. Resultados

6.1. Frecuencia de aislamientos de EPEC

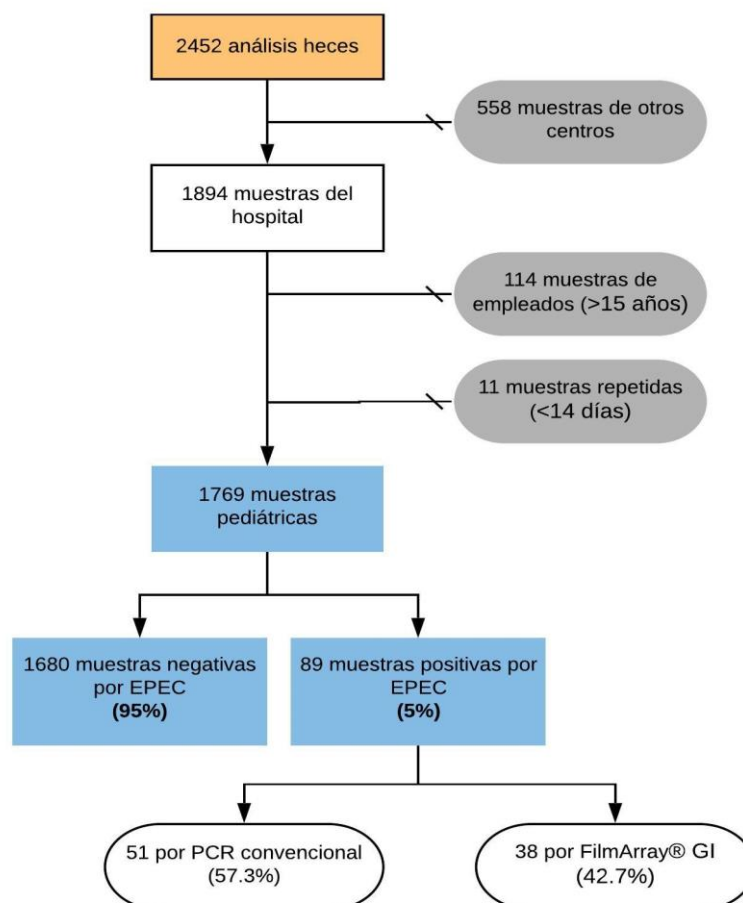


Figura 2. Análisis de EPEC en muestras de heces diarreicas en pacientes pediátricos durante el periodo de estudio.

En el periodo comprendido entre enero 2015 a setiembre 2019 se recibieron 2452 muestras de heces (Figura 1) para realizar el diagnóstico de microorganismos causantes de gastroenteritis. El procesamiento de estas muestras se realizó por métodos moleculares de PCR convencional y métodos rápidos de diagnóstico con el panel sindrómico gastrointestinal (GI) FilmArray® de BioFire® a partir de marzo de 2017 a aquellas

muestras provenientes de pacientes con infección severa o estado crítico determinado por el médico.

De la totalidad de muestras recibidas, 114 correspondían a muestras de empleados de la Institución, y 558 provenían de otros centros de salud, por lo que fueron excluidas del estudio. Además, 11 muestras pertenecían a pacientes con resultado ya emitido en un periodo menor de 14 días, por lo que tampoco fueron contabilizadas.

Por lo tanto, el total de muestras contempladas en el estudio fue de 1769, de las cuales 1680 (95%) resultaron negativas para *Escherichia coli* enteropatógena y 5% resultaron positivas para esta bacteria (Figura 1).

La mayoría de estas muestras positivas fueron diagnosticadas por PCR convencional (n=51, 57.3%), y las restantes fueron determinadas por FilmArray® GI (n=38, 42.7%), como se observa en el cuadro 3. Además, se aprecia un aumento de muestras positivas por EPEC en los periodos 2018 y 2019 (este último periodo abarca de enero a setiembre) con 6.9% y 7.8% de positividad, respecto a los periodos de 2015, 2016 y 2017 (2.8%, 3.9% y 3.2%, respectivamente).

Cabe destacar que todas las muestras positivas por EPEC correspondieron a cepas de EPEC atípicas (aEPEC), y no se obtuvieron muestras positivas por EPEC típicas (cuadro 3).

Cuadro 3. Distribución de aislamientos de EPEC por periodo.

Periodo	Total n (%)	2015 n (%)	2016 n (%)	2017 n (%)	2018 n (%)	2019* n (%)
Muestras positivas por EPEC	89 (5)	9 (2.8)	11 (3.9)	13 (3.2)	28 (6.9)	28 (7.8)
FilmArray® GI	38 (42.7)	-	-	7	18	13
PCR convencional	51 (57.3)	9	11	6	10	15
tEPEC	0 (0)	-	-	-	-	-
aEPEC	89 (100)	9	11	13	28	28
Muestras negativas	1680 (95)	316 (97.2)	269 (96.1)	385 (96.8)	378 (93.1)	332 (92.2)
Muestras procesadas	1769 (100)	325 (100)	280 (100)	398 (100)	406 (100)	360 (100)

* Periodo de enero a setiembre

tEPEC: EPEC típica; aEPEC: EPEC atípica

Así mismo, solamente en dos pacientes fue posible diagnosticar la presencia de EPEC en muestras de heces con más de 14 días de diferencia, uno con 4 meses y el otro paciente con 9 meses de diferencia. Ambos presentaron muestras de heces diarreicas y con presencia de pocos leucocitos en heces.

6.2. Características de la población afectada por EPEC

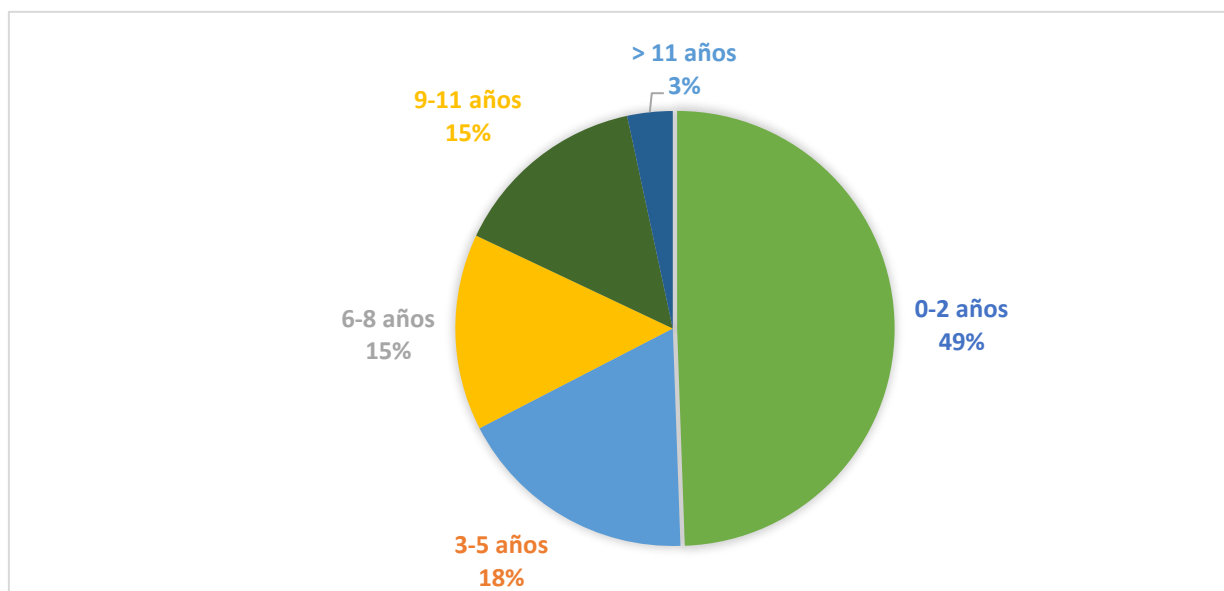


Figura 3. Distribución de muestras positivas por EPEC según edad del paciente.

La mayoría de las muestras positivas por EPEC correspondieron a pacientes con gastroenteritis entre 0-2 años de edad (44/89, 49%), disminuyendo su presencia conforme aumenta la edad de los pacientes, como se observa en la figura 2. La positividad en pacientes menores de 5 años es considerablemente más alta que en cualquier otro grupo de edad (70/89, 67%).

De igual manera, se observa en la figura 3, que la mayoría de las muestras positivas por EPEC correspondían a pacientes masculinos (62.9%), en contraposición con pacientes femeninas (37.1%); así como la mayoría de los resultados positivos provenían del ámbito comunitario (78.7%). No obstante, es importante destacar que se obtuvieron aislamientos relacionados con el ámbito hospitalario en un 21.3% de los casos.

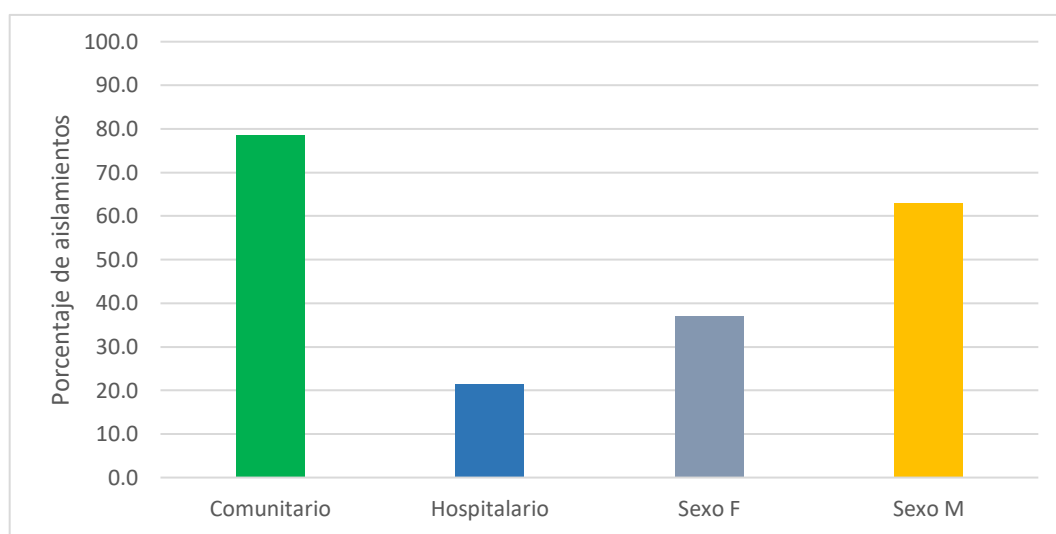


Figura 4. Frecuencia de muestras positivas por EPEC según origen de aislamiento y sexo del paciente.

6.3. Filogrupos de EPEC

Se lograron obtener 28 cepas de EPEC viables para realizar el análisis de grupos filogenéticos. La mayoría de estas correspondieron a los filogrupos B1 y B2 (54% y 36%, respectivamente), y no se obtuvieron aislamientos del filogrupo A. Así mismo, hubo una

cepa de EPEC a la cual no fue posible determinar el grupo filogenético. La distribución de los filogrupos se presenta en el cuadro 4.

6.4. Resistencia a antibióticos

La resistencia a antibióticos se realizó a todas aquellas muestras positivas por PCR convencional, dado que se logró obtener aislamiento puro para su identificación. De esta manera, de las 51 cepas de EPEC, 27.5% mostró resistencia a ampicilina y un 19.6% a TMP-SMX. En menor medida, se evidenció resistencia a cefotaxime y ciprofloxacina, como se observa en el cuadro 4. Además, solamente en 3 cepas (5.9%) se encontró una betalactamasa de espectro extendido (BLEE).

Cuadro 4. Distribución de grupos filogenéticos y resistencia a antibióticos de EPEC encontrados en el periodo de estudio.

Determinante	Número de aislamientos	Porcentaje (%)
Grupos filogenéticos		
A	0	0
B1	15	54
B2	10	36
D	2	7
No determinado	1	4
Total de cepas	28	100
Resistencia a antibióticos		
Ampicilina	14	27.5
Cefotaxime	4	7.8
Ciprofloxacina	1	2.0
TMP-SMX	10	19.6
Total de cepas	51	100

7. Discusión

Las enfermedades diarreicas son una de las principales causas de consulta médica a nivel mundial, generando más de 1.7 billones de consultas anuales solamente en población pediátrica. Además, son causantes de más de dos millones de muertes alrededor del mundo, siendo la población infantil menor de 5 años los principales afectados con más de medio millón de muertes (OMS, 2017).

Una de las principales causas de diarrea en pediatría y países en vías de desarrollo son las ocasionadas por los diferentes patotipos de *Escherichia coli*, sobretodo en niños menores de 5 años, donde se ha visto que la incidencia de estos patógenos es mucho mayor (Gomes, T, et al, 2016). En el presente trabajo se evaluó la presencia de EPEC en 1769 muestras de heces de pacientes pediátricos con gastroenteritis, así como la epidemiología de estas infecciones y los perfiles filogenéticos y de resistencia a antibióticos de este patógeno.

7.1. Prevalencia de EPEC

Escherichia coli enteropatógena se caracteriza por la lesión A/E que provoca las características clínicas de su infección en el epitelio intestinal. Esta lesión se desarrolla, en gran parte, por dos principales factores de virulencia que a su vez sirven para realizar el diagnóstico de este patotipo, el gen *eae* y la región *bfp* (Ochoa, T., 2011). En la figura 1 podemos observar que la prevalencia de EPEC en nuestra población de estudio fue de un 5%.

Por otro lado, se observa en el cuadro 3, que el diagnóstico de las infecciones gastrointestinales se ha visto favorecida con el advenimiento de metodologías rápidas de diagnóstico, con la implementación de la tecnología FilmArray® GI de BioFire® se duplican en los dos últimos periodos la cantidad de muestras positivas por EPEC, lo cual permite un diagnóstico certero y un abordaje clínico más rápido para el paciente.

El proyecto GEMS (Levine *et al*, 2012) muestra que, en muchos países en vías de desarrollo de África, Asia y Latinoamérica, este patógeno se encuentra entre las cinco

principales causas de gastroenteritis. A partir de datos recopilados en el laboratorio que muestran el comportamiento de otros patógenos (figura 4), se observa la importancia de EPEC en la población pediátrica es alta, encontrándose efectivamente, entre los primeros 4 patógenos más frecuentemente aislados en muestras de heces de pacientes pediátricos con diarrea, solamente por debajo de *Shigella*/EIEC, EAEC y *Campylobacter* sp.

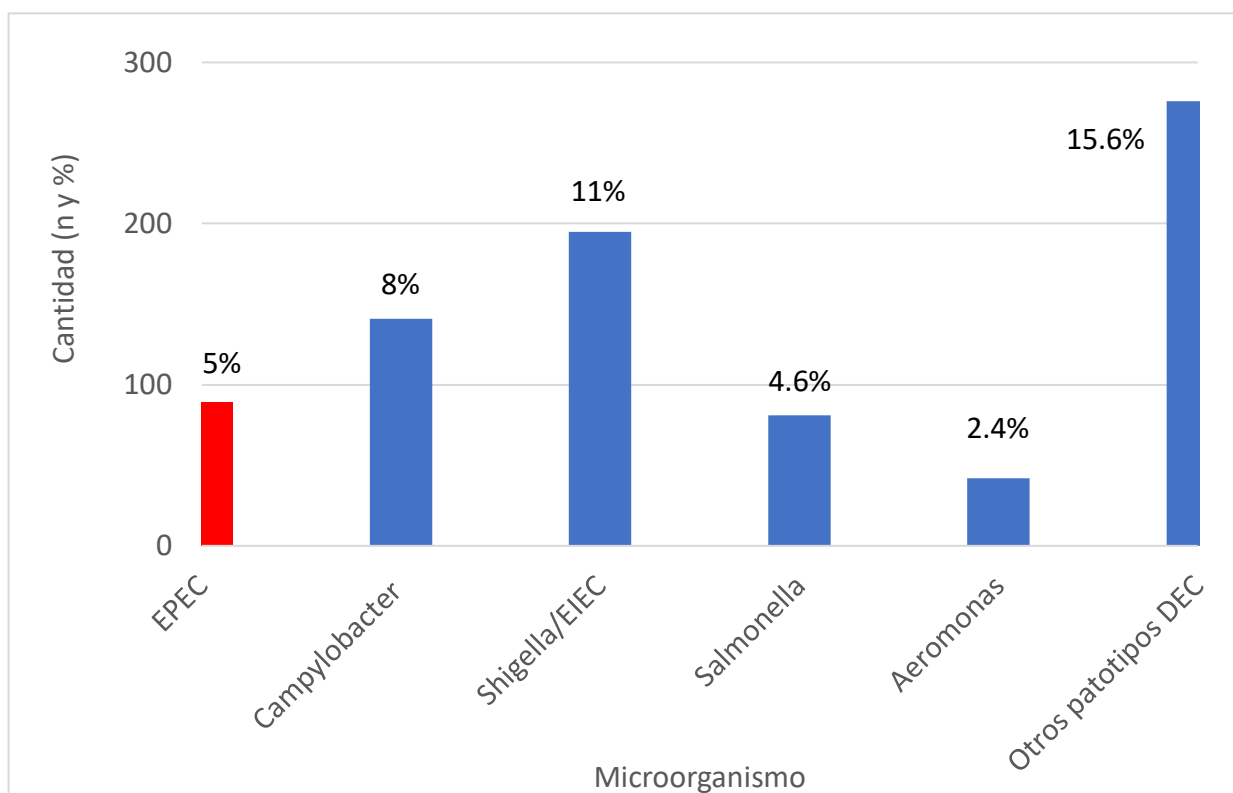


Figura 5. Aislamientos de EPEC y otros patógenos en heces durante el periodo de estudio.

De igual manera, estudios anteriores de nuestro país en pacientes pediátricos con diarrea, muestran que en los años de 2005 a 2007, EPEC fue el patotipo de *E. coli* diarrogénicas más importante (n=11/52 cepas, 21%), seguido de EIEC y EAEC (10/52 y 9/52) (Perez, et al, 2010). En un trabajo más reciente, con muestras estudiadas del 2008 al 2016, se observa que, aunque este patotipo disminuye en importancia, sigue estando presente dentro de los principales causantes de gastroenteritis, donde el primero en prevalencia

corresponde a EAEC (31%), y segundo es EPEC (24%) (Pérez & Leandro, 2019). Con los datos obtenidos en este trabajo, se actualiza esta información, y se reitera la importancia que tiene este patógeno dentro de la población infantil en nuestro país.

Del mismo modo, la epidemiología y prevalencia de EPEC es catalogada como variable temporal y geográficamente; sin embargo, el 5% de aislamientos de EPEC obtenidos en el presente estudio, se encuentra en un número similar a lo observado en países de la región latinoamericana y de América. En México, recientemente se publicó que la prevalencia de EPEC es de un 5.1% (n=53/242) (Canizales-Roman, A, et al, 2016); Perú cuenta con reportes de EPEC que se sitúan en 5.8% (Contreras et al 2011) y EE.UU tiene reportes que van de 3.9% a 4.3% de aislamientos de EPEC (Nataro et al 2006; Foster et al 2015).

Por otro lado, la subcategorización de EPEC está basada en la presencia (tEPEC) del plásmido EAF con el gen *bfp*, mientras que aquellas que no lo poseen son catalogadas como aEPEC, y se cree que su infección y virulencia es menor, permitiendo que se desarrollen infecciones de tipo crónico y con menores de tasas de diarrea (Hu & Torres, 2015). En muchos estudios realizados durante los últimos 20 años, se ha demostrado una disminución de la frecuencia de aislamientos de tEPEC y un incremento de aEPEC en países en vías de desarrollo (Ochoa, et al, 2008; Hernandez, 2009; HU & Torres, 2015).

Este cambio ha sido observado, inicialmente, en países desarrollados (Trabulsi et al. 2002), sin embargo, en áreas con menos desarrollo, se menciona que tEPEC todavía se mantiene como uno de los principales enteropatógenos (Hu & Torres, 2015). El estudio mexicano (5.1% prevalencia de EPEC), mostró que 65.1% de las cepas correspondían a tEPEC, mientras que el 34.9% fueron aEPEC (Canízales-Roman, A., et al, 2016). En estudios realizados en Uruguay se demostró que, aunque la mayoría de cepas fueron aEPEC, las cepas tEPEC se encuentran circulando en su población (Peirano V., et al, 2018). Así mismo, en Ecuador se encontró que la mayoría de cepas de EPEC causantes de diarreas corresponden a aEPEC (89.36%) mientras que las tEPEC fueron menos

prevalentes (10.64%) (Mora, F, et al, 2016). En EE.UU (Tennessee), se encontró que el 62% de aislamientos de EPEC correspondían a aEPEC (Foster, et al, 2015). En el presente estudio, todas las cepas de EPEC encontradas (89/89) correspondieron a cepas aEPEC (cuadro 3), demostrando así la diseminación que estas han tenido nuestra población de estudio, sin circulación de cepas tEPEC como se ha visto en otros países incluso de la región, al menos en la población estudiada.

Aun así, existen países como Brazil, donde la circulación de EPEC, y sobretodo aEPEC es aún mayor. Estudios demuestran que en este país aEPEC es francamente predominante, y el porcentaje de aislamientos en pacientes con gastroenteritis se encuentra entre 11 y 14% de los pacientes (Nunes, 2012; Lozer, 2013, Días, 2016), por lo que la vigilancia de este patógeno puede ser importante para evaluar su comportamiento en el futuro, dado la gran variabilidad que presenta en la región y la gran variación que existe en las regiones aledañas.

También es importante destacar los aislamientos de EPEC que se obtuvieron de pacientes que presentaron una diferencia de meses entre los episodios diarreicos. Es conocido que aEPEC tiende a estar presente como organismo comensal (asintomático) o como productor de gastroenteritis persistentes o crónicas (Hu & Torres, 2015), debido a su menor virulencia producto de la pérdida del plásmido EAF. Aunque es interesante este hecho, no fue posible distinguir si estos episodios correspondían con una gastroenteritis crónica, o episodios agudos diferentes, debido a la falta de información clínica al respecto.

7.2. Edad y origen de los pacientes afectados por EPEC

EPEC es de los principales agentes causantes de gastroenteritis en niños menores de 5 años en países en vías de desarrollo (Canizales-Roman, et al 2016; Nakhjavani, et al 2013). En el presente estudio, la mayoría de las muestras de heces positivas por EPEC correspondieron, en efecto, a niños menores de 5 años (67%, Figura 2), lo cual apoya y respalda esta teoría. No obstante, en algunas publicaciones se ha visto que existe una menor prevalencia de EPEC en niños menores de 2 años, atribuida a la alimentación

exclusiva por leche materna (dado el componente fecal-oral de estas infecciones) y la protección inmune transitoria que esta provee (Gomes, 2016);, no obstante, este hecho no se considera en nuestra población, dado que la mayor cantidad de aislamientos de EPEC se dieron en dicho intervalo de edad (0-2 años: 49%, figura 2).

Así mismo, existen varias publicaciones donde se ha observado que EPEC se encuentra en una mayor prevalencia en niños de sexo masculino que de femenino (Zhou, et al 2018; Hernandez, 2009) como el encontrado en este trabajo (figura 3), sin embargo, no existe una asociación fuerte ni razón de peso para este comportamiento.

Es interesante observar que existe bastante cantidad de pacientes con gastroenteritis y aislamiento de EPEC que provienen de origen hospitalario 21.3%, (figura 3). Es bien conocido que las gastroenteritis son producidas por organismos comúnmente adquiridos en la comunidad; vía fecal-oral, por agua o productos alimenticios contaminados (Croxen, 2013), por lo cual, obtener este patógeno de pacientes hospitalizados no es lo usual. Algunos brotes de EPEC se han visto en ámbitos hospitalarios (Nataro, 1998), pero no existe evidencia que este sea el caso. En otros estudios (Ochoa, 2008; Nair et al, 2010) han observado que los casos provocados en el ámbito hospitalario tienden a ser más severos y asociados a mayor mortalidad, posiblemente producto de la razón de internamiento, no obstante, este hecho va más allá del objetivo de este trabajo y no se cuentan con los datos suficientes para apoyar esta idea.

7.3. Distribución de Filogrupos

De acuerdo con Clermont & *et al* (2000; 2015), la agrupación de las cepas de *E. coli* en grupos filogenéticos, ayuda a estudiar la filogenie de estas cepas de manera fácil y rápida, en comparación con otras tecnologías más caras y laboriosas como el MLST y NGS (secuenciación de nueva generación), a expensas de una menor resolución del comportamiento clonal de las cepas. Diversas publicaciones mencionan que la mayoría de las cepas de *E. coli* comensales se encuentran distribuidas en los filogrupos A y B1 (Dobrindt, 2005; Kaper, 2005, Clermont, 2000; Singh, 2017), sin embargo, no existen

reportes consistentes acerca de la distribución de las cepas diarrogénicas de *E. coli* (Mosquito, 2015).

En este trabajo se obtuvo que la mayoría de los aislamientos obtenidos pertenecen al filogrupo B1 (54%, cuadro 4), el cual se ha relacionado a las cepas de *E. coli* comensales de acuerdo con la literatura. Este hecho es interesante, dado que aEPEC (100% encontrada en el presente estudio) es considerado un microorganismo que puede encontrarse como patógeno en humanos y animales, y también como comensal (Hu & Torres, 2015), por lo que la distribución obtenida podría sugerir el origen de estos aislamientos en nuestra población. Sin embargo, todas las muestras obtenidas en el presente estudio provenían de pacientes con episodios diarreicos, por lo cual, la presencia de EPEC en estas muestras están relacionadas con la participación de esta bacteria como patógeno, aunque estudios posteriores pueden esclarecer este hecho.

En este mismo sentido, el GEMS en el 2016 (Hazen *et al*, 2016), realiza una publicación donde encuentran en 70 cepas de tEPEC -subtipo causante de gastroenteritis únicamente en humanos, que no está asociado a flora normal o comensal del tracto gastrointestinal (Gomes, 2016)- en países en vías de desarrollo de Asia, África y Latinoamérica, una distribución de filogrupos similar a la encontrada en el presente estudio: filogrupo B1 en 55% de los casos y B2 en 34% de estos; por lo que el hallazgo mayoritario de cepas de EPEC del filogrupo B1 en este estudio, no necesariamente implica una relación u origen de comensalismo.

Por otro lado, en EE.UU, el estudio desarrollado en Tennessee (Foster, 2015) en pacientes pediátricos, se encontró que 62% cepas aEPEC se encontraban distribuidas en los filogrupos A y B1. En India (Singh *et al*, 2017), encuentran que la mayoría de EPEC están distribuidos en los filogrupos B2 (39%), B1 (18.7%) y A (17.1%). En Brazil (Vieira, M *et al*, 2016), la mayoría de los aislamientos aEPEC correspondieron a filogrupos B1 (48.8%) y B2 (24.4%), similar a lo encontrado en el presente trabajo. Por lo tanto, el comportamiento de la filogenie de EPEC, y específicamente las cepas atípicas, es variable

y determinado geográficamente. Además, la distribución de EPEC en el presente trabajo muestra que existen diferentes perfiles filogenéticos y no provienen de un mismo grupo clonal, dado que se encontró representación de los diferentes filogrupos excepto el A.

7.4. Resistencia a antibióticos

La resistencia a antibióticos de las cepas de EPEC presentes en la población estudiada es baja en comparación con la reportada en otros países. La mayor resistencia se encontró a Ampicilina, en un 27.5%. Este dato se encuentra por debajo de lo reportado en población mexicana, 83% para ampicilina (Canizales-Roman, 2016). La resistencia a TMP-SMX también es menor, en nuestra población el porcentaje de resistencia fue de 19.6%, sin embargo, en México se reporta en 83% (similar a ampicilina), con altos porcentajes de co-resistencia a otros antimicrobianos (Canizales-Roman, 2016).

De la misma forma, alta resistencia a antibióticos se ha reportado en otros países; en China (Zhou et al, 2018) la resistencia a ampicilina es de 77.8% y a TMP-SMX de 64.8%; en Irán (Alikhani, et al 2013) la co-resistencia a 3 antibióticos (ampicilina, TMP-SMX y tetraciclina) es de 67%; y en EE.UU (Tennessee) (Foster, 2015) la resistencia a ampicilina es de 62%.

La alta resistencia antimicrobiana en la población mexicana ha sido asociada al alto uso de antibióticos para tratamiento de infecciones entéricas (Canizales-Roman, 2016), que hasta el momento, no sucede en nuestra población pediátrica ya que el manejo se realiza de manera sintomática. Además, los autores mexicanos mencionan que el uso indiscriminado de antibióticos en agricultura y ganadería en su región puede ser otra de las razones por las que observan este gran porcentaje de resistencia (Canizales- Roman, 2016; Hawkey & Jones, 2009). Como se ha mencionado, aEPEC puede estar como comensal y generar infecciones en animales (Hu & Torres, 2015), por lo que esta podría ser otra vía para adquirir resistencia a antibióticos y aumentar este porcentaje en las cepas circulantes en la población humana. La vigilancia prospectiva de la resistencia antibiótica

de las infecciones gastrointestinales producidas por EPEC es clave para alertar en el momento que se alcancen porcentajes críticos como sucede en otras regiones.

Los resultados encontrados en el presente trabajo demuestran que existe variabilidad filogenética en los aislamientos de EPEC en nuestra población, estudios posteriores podrían determinar la clonalidad de estas cepas, con el fin de esclarecer diferencias que puedan existir en este patógeno. Así mismo, la evaluación de otras características clínicas, como sintomatología y cronicidad de las infecciones, pueden generar información valiosa para evaluar el origen y la importancia de las infecciones asociadas a este microorganismo. De igual manera, el monitoreo de la resistencia a antibióticos debe continuar para alertar los aumentos en la resistencia a antibióticos, como las vistas en otras latitudes.

8. Conclusiones

- La totalidad de cepas de EPEC (5%) asociadas a infecciones gastrointestinales en la población de estudio, correspondieron al subtipo aEPEC. Esto demuestra el cambio epidemiológico que ha tenido este patotipo, pasando de ser mayoría tEPEC a aEPEC como se menciona ampliamente en la literatura.
- La mayor cantidad de aislamientos de EPEC se distribuyeron en los filogrupos B1 y B2.
- No se obtuvieron aislamientos de aEPEC pertenecientes al filogrupo A.
- La mayor prevalencia de EPEC en la población estudiada se dio en los pacientes con edades entre 0-2 años, mayoritariamente del sexo masculino y provenientes de la comunidad. Sin embargo, la presencia de este patotipo en todo grupo etario, sexo y origen, no permite que se establezca un claro perfil epidemiológico en la población estudiada.
- La mayor resistencia a antibióticos se encontró hacia ampicilina (27.5%) y TMP-SMX (19.6%). Estos datos demuestran que la resistencia a antibióticos en la población pediátrica es baja en comparación con datos de otros países.

9. Referencias

1. Alikhani, M., Hashemi, S., Aslani, M., & Farajnia, S. 2013. Prevalence and antibiotic resistance patterns of diarrheagenic *Escherichia coli* isolated from adolescents and adults in Hamedan, Western Iran. *Iran J Microbiol.* 5: 42–47.
2. Bielaszewska, M., Prager, R., Kock, R., Mellmann, A., Zhang, W., *et al.* 2007. Shiga toxin gene loss and transfer in vitro and in vivo during enterohemorrhagic *Escherichia coli* O26 infection in humans. *Appl Environ Microbiol.* 73: 3144–50.
3. Bueris, V., Huerta-Cantillo, J., Navarro-Garcia, F., Ruiz, R., Cianciarullo, A, *et al.* 2015. Late establishment of the attaching and effacing lesion caused by atypical enteropathogenic *Escherichia coli* depends on protein expression regulated by Per. *Infect Immun.* 83(1): 379–388
4. Canízales-Roman, A., Flores-Villaseñor, H., González Núñez, E., Velazquez-Román, G., Vidal, J., *et al.* 2016. Surveillance of Diarrheagenic *Escherichia coli* Strains Isolated From Diarrhea Cases from Children, Adults and Elderly at Northwest of Mexico. *Front Microbiol.* 7: 1924.
5. Contreras, C., Ochoa, T., Lacher, D., *et al.* 2010. Allelic variability of critical virulence genes (*eae*, *bfpA* and *perA*) in typical and atypical enteropathogenic *Escherichia coli* in Peruvian children. *J Med Microbiol.* 59:25–31
6. Conway, P. 1995. Microbial ecology of the human large intestine. *Human Colonic Bacteria: Role in Nutrition, Physiology and Pathology.* USA, Florida: CRC Press. pp 1–24.
7. Cowan, S. 1954. A review of names for coliform organisms. *Int Bull Bacteriol Nomencl Taxon.* 4:119–124.
8. Clermont, O., Gordon, D., Denamur, E. 2015. Guide to the various phylogenetic classification schemes for *Escherichia coli* and the correspondence among schemes. *Microbiology.* 161: 980-988.
9. Croxen, M., Law, R., Scholz, R., Keeney, K., Wlodarska, M., Finlay, B. 2013. Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev.* 26(4):822–880.

10. Croxen, M. & Finlay, B. 2010. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. *Nat Rev Microbiol.* 8:26–38.
11. Dias, RCB., Santos, B., Santos, L., *et al.* 2016. Diarrheagenic *Escherichia coli* pathotypes investigation revealed atypical enteropathogenic *E. coli* as putative emerging diarrheal agents in children living in Botucatu, São Paulo State, Brazil. *APMIS.* 124: 299–308.
12. Dobrindt, U. 2005. Patho-genomics of *Escherichia coli*. *Int J Med Microbiol.* 295: 357–371.
13. Doumith, M., Day, M., Hope, R., Wain, J & Woodford, N. 2012. Improved Multiplex PCR Strategy for Rapid Assignment of the Four Major *Escherichia coli* Phylogenetic Groups. *J Clin Microbiol.* 50 (9): 3108-3111.
14. Escherich, T & Bettelheim, K. 1988. The intestinal bacteria of the neonate and breast-fed infant. *Rev Infect Dis.* 10:1220–1225.
15. Gomes, T., Elias, W., Scaletsky, I., Guth, B., Rodrigues, J., *et al.* 2016. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Brazilian J Microbiol.* 475: 3-30.
16. Hawkey, P & Jones, A. 2009. The changing epidemiology of resistance. *J Antimicrob Chemother.* 64 (Suppl. 1): i3–i10.
17. Hazen, T., Donnenberg, M., Panchalingam, S., Antonio, M., Hossain, A., *et al.* 2016. Genomic diversity of EPEC associated with clinical presentations of differing severity. *Nat Microbiol.* 1: 15014.doi:10.1038/nmicrobiol.2015.14.
18. Foster, M., Iqbal, J., Zhang, C., McHenry, R., Cleveland, B., *et al.* 2015. Enteropathogenic and enteroaggregative *E. coli* in stools of children with acute gastroenteritis in Davidson County, Tennessee. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 83 (3): 319-324.
19. Gunzburg, S., Tornieporth, N. & Riley, L. 1995. Identification of enteropathogenic *Escherichia coli* by PCR-based detection of the bundle-forming pilus gene. *J Clin Microbiol* 33: 1375–1377.
20. Hernandez, T., Elias, W., Viera, M & Gomes, T. 2009. An overview of atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett.* 297: 137-149.

21. Hu, J & Torres, G. 2015. Enteropathogenic *Escherichia coli*: foe or innocent bystander? Clin Microbiol Infect. 21 (8): 729-734.
22. Kaper, J. 2005. Pathogenic *Escherichia coli*. Int J Med Microbiol. 295: 355–356.
23. Kaper, J., Nataro, J. & Mobley, H. 2004. Pathogenic *Escherichia coli*. Nat Rev Microbiol. 2:123–140.
24. Kotloff, K., Nataro, J., Blackwelder, W., Nasrin, D. & Farag T. 2013. Burden and aetiology of diarrhoeal disease in infants and young children in developing countries (the Global Enteric Multicentre Study, GEMS): a prospective, case-control study. Lancet. 382 (9888): 209–222
25. Levine, M., Kotloff, K., Nataro, J. & Muhsen, K. 2012. The Global Enteric Multicenter Study (GEMS): impetus, rationale, and genesis. Clin Infect Dis. 55(Suppl 4): S215–S224.
26. Lozer, D & Souza, T. 2013. Genotypic and phenotypic analysis of diarrheagenic *Escherichia coli* strains isolated from Brazilian children living in low socioeconomic level communities. BMC Infect Dis. 13: 418-423.
27. Manning S. 2010. *Escherichia coli* infections. (2nd ed). New York: Infobase Publishing. pp 72– 84.
28. Mitra, M., Ahmad, P., Mehdi, R., Hosein, A. & Ahmad, K. 2011. Multiple drug resistance of enteropathogenic *Escherichia coli* isolated from children with diarrhea in Kashan, Iran. Afr J Microbiol. Res 5: 3305–3309.
29. Mosquito, S., Pons, M., Riveros, M., Ruiz, J., Ochoa, T. 2015. Diarrheagenic *Escherichia coli* phylogroups are associated with antibiotic resistance and duration of diarrheal episode. Scient W Journal. Doi: 10.1155/2015/610403.
30. Nair G., Ramamurthy, T., Bhattacharya, M., Krishnan, T., Ganguly, S., Saha, D., *et al.* 2010. Emerging trends in the etiology of enteric pathogens as evidenced from an active surveillance of hospitalized diarrhoeal patients in Kolkata, India. Gut Pathog. 2 (4): 22-26.

31. Nakhjavani, F., Emaneini, M., Hosseini, H., Iman-Eini, H., Aligholi, M., *et al.* 2013. Molecular analysis of typical and atypical enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) isolated from children with diarrhoea. *J Med Microbiol.* 62:191–5
32. Nataro, J. & Kaper, J. 1998. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev.* 11(1):142–201.
33. Nataro, J., Mai, V., Johnson, J., *et al.* 2006. Diarrheagenic *Escherichia coli* infection in Baltimore, Maryland, and New Haven, Connecticut. *Clin Infect Dis.* 43:402–407
34. Neter, E., Westphal, O., Luderitz, O., Gino, R., Gorzynski, E. 1995. Demonstration of antibodies against enteropathogenic *Escherichia coli* in sera of children of various ages. *Pediatrics.* 16: 801–807.
35. Nguyen, R., Taylor, L., Tauschek, M. & Robins-Browne, R. Atypical enteropathogenic *Escherichia coli* infection and prolonged diarrhea in children. *Emerg Infect Dis* 2006; 12: 597–603.
36. Nunes, M., Magalhães, P., Macêdo, A., *et al.* 2012. Attaching and effacing *Escherichia coli* and Shiga toxin-producing *E. coli* in children with acute diarrhoea and controls in Teresina/PI, Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 106:43–47.
37. Ochoa, T., Barletta, F., Contreras, C. & Mercado, E. 2008. New insights into the epidemiology of enteropathogenic *Escherichia coli* infection. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 102: 852–6.
38. Paton A. & Paton, J. 1998. Detection and characterization of shiga toxigenic *Escherichia coli* by using multiplex PCR assays for *stx1*, *stx2*, *eaeA*, enterohemorrhagic *E. coli hlyA*, *rfb0111*, and *rfb0157*. *J Clin Microbiol* 36: 598-602.
39. Pearson, J., Giogha, C., Wong, T & Hartland, E. 2016. The genetics of enteropathogenic *Escherichia coli* virulence. *Annu. Rev. Genet.* 50: 493-513.
40. Platenkamp, A & Mellies, J. 2018. Environment controls LEE regulation in enteropathogenic *Escherichia coli*. *Front Microbiol.* 9: 1694.

41. Pérez, C., Gómez-Duarte, O & Arias, M. 2010. Diarrheagenic *Escherichia coli* in Children from Costa Rica. *Am J Trop Med Hyg.* 83 (2): 292-297.
42. Pérez-Corrales, C & Leandro-Sandí, K. 2019. Diarrheagenic *Escherichia coli* in Costa Rican children: a 9-year retrospective study. *BMC Research Notes.* 12: 297.
43. Robins-Browne, R., Holt, K., Ingle, D., Hocking, D., Yang, J & Tauschek, M. 2016. Are *Escherichia coli* pathotypes still relevant in the era of whole-genome sequencing? *Front Cel Inf Microb.* 141 (6): 1-9.
44. Robins-Browne, R. 1987. Traditional enteropathogenic *Escherichia coli* of infantile diarrhea. *Rev Infect Dis.* 9: 28–53.
45. Schmidt, M. 2010. LEEways: tales of EPEC, ATEC, and EHEC. *Cell Microbiol.* 12 (11): 1544-1552.
46. Scaletsky, I., Souza, T., Aranda, K. & Okeke, I. 2010. Genetic elements associated with antimicrobial resistance in enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) from Brazil. *BMC Microbiol.* 10: 25-27.
47. Singh, T., Das, S., Ramachandran, V., Wani, S., Shah, D., *et al.* 2017. Distribution of Integrins and Phylogenetic Groups among Enteropathogenic *Escherichia coli* Isolates from Children <5 Years of Age in Delhi, India. *Front Microbiol.* 8:561.
48. Subramanian, K., Selvakkumar, C., Vinaykumar, K., Goswami, N., Meenakshisundaram, S., *et al.* 2009. Tackling multiple antibiotic resistance in enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) clinical isolates: a diarylheptanoid from *Alpinia officina* rumshows promising antibacterial and immunomodulatory activity against EPEC and its lipopolysaccharide-induced inflammation. *Int J Antimicrob Agents.* 33: 244–250.
49. Trabulsi, L., Keller, R., Gomes, TAT. 2002. Typical and atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. *Emer Infect Dis.* 8: 508-513
50. Vieira, M., dos Santos, L., Días, R., Camargo, C., Pinheiro, S., *et al.* 2016. Atypical enteropathogenic *Escherichia coli* as aetiologic agents of sporadic and outbreak associated diarrhoea in Brazil. *J med Microbiol.* 65: 998-1006

51. Wirth, T., Falush, D., Lan, R., Colles, F., Mensa, P., Wieler, L., *et al.* 2006. Sex and virulence in *Escherichia coli*: an evolutionary perspective. *Mol Microbiol.* 60: 1136–51.
52. World Health Organization. 2012. World Health Statistics. WHO Press; 2012. https://www.who.int/gho/publications/world_health_statistics/EN_WHS2012_Full.pdf. Accesado el 18 de octubre de 2019.
53. World Health Organization. Diarrhoeal disease. WHO. 2017. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/diarrhoeal-disease>. Accesado el 20 de Noviembre de 2019.
54. Yu, F., Chen, X., Zheng, S., Han, D., Wan, Y., *et al.* 2018. Prevalence and genetic diversity of human diarrheagenic *Escherichia coli* isolates by multilocus sequence typing. *Intl J Infec Dis.* 67: 7-13.
55. Zhou, Y., Xuhui, Z., Hou, H., Lu, Y., *et al.* 2018. Characteristics of diarrheagenic *Escherichia coli* among children under 5 years of age. *BMC Inf Dis.* 18: 63.



UNIVERSIDAD DE
COSTA RICA

SEP Sistema de
Estudios de Posgrado

Autorización para digitalización y comunicación pública de Trabajos Finales de Graduación del Sistema de Estudios de Posgrado en el Repositorio Institucional de la Universidad de Costa Rica.

Yo, Christopher Mirena Acuña, con cédula de identidad 503790728, en mi condición de autor del TFG titulado Perfil epidemiológico y filogenético de Escherichia coli enteropatógena asociada a gastroenteritis en pacientes pediátricos del Hospital Nacional de Niños "Dr. Carlos Sáenz Herrera".

Autorizo a la Universidad de Costa Rica para digitalizar y hacer divulgación pública de forma gratuita de dicho TFG a través del Repositorio Institucional u otro medio electrónico, para ser puesto a disposición del público según lo que establezca el Sistema de Estudios de Posgrado. SI NO *

*En caso de la negativa favor indicar el tiempo de restricción: _____ año (s).

Este Trabajo Final de Graduación será publicado en formato PDF, o en el formato que en el momento se establezca, de tal forma que el acceso al mismo sea libre, con el fin de permitir la consulta e impresión, pero no su modificación.

Manifiesto que mi Trabajo Final de Graduación fue debidamente subido al sistema digital Kerwá y su contenido corresponde al documento original que sirvió para la obtención de mi título, y que su información no infringe ni violenta ningún derecho a terceros. El TFG además cuenta con el visto bueno de mi Director (a) de Tesis o Tutor (a) y cumplió con lo establecido en la revisión del Formato por parte del Sistema de Estudios de Posgrado.

INFORMACIÓN DEL ESTUDIANTE:


Nombre Completo: Christopher Mirena Acuña

Número de Carné: A93568 Número de cédula: 503790728

Correo Electrónico: acunamch@hotmail.com

Fecha: 25 de enero de 2020 Número de teléfono: 8873-5679

Nombre del Director (a) de Tesis o Tutor (a): Cristian Pérez Corales


FIRMA ESTUDIANTE

Nota: El presente documento constituye una declaración jurada, cuyos alcances aseguran a la Universidad, que su contenido sea tomado como cierto. Su importancia radica en que permite abreviar procedimientos administrativos, y al mismo tiempo genera una responsabilidad legal para que quien declare contrario a la verdad de lo que manifiesta, puede como consecuencia, enfrentar un proceso penal por delito de perjurio, tipificado en el artículo 318 de nuestro Código Penal. Lo anterior implica que el estudiante se vea forzado a realizar su mayor esfuerzo para que no sólo incluya información veraz en la Licencia de Publicación, sino que también realice diligentemente la gestión de subir el documento correcto en la plataforma digital Kerwá.