



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN DE LA SALUD ANIMAL
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**

IDENTIFICACIÓN DE GENES DE VIRULENCIA EN AISLADOS DE *Escherichia coli* DE ORIGEN CAPRINO

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS

PRESENTA

ROSA ISELA MARTÍNEZ FLORES

TUTOR PRINCIPAL

DR. FRANCISCO AGUILAR ROMERO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA.

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

RIGOBERTO HERNÁNDEZ CASTRO
MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN DE LA SALUD ANIMAL

EFRÉN DÍAZ APARICIO
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

MÉXICO, D.F. MAYO, 2014



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

DEDICATORIA

A dios por darme el entendimiento, paciencia y sabiduría para salir adelante en todas las metas que me fijado.

A mi mamita por ser una excelente madre, por confiar siempre en mí y nunca desampararme en lo bueno y en lo malo de mis decisiones.

A mis hermanas Sandra, Paola y Arely, por estar siempre conmigo, comprenderme y por brindarme siempre su apoyo cuando más lo he necesitado.

A mis sobrinos Cesar, Diego e Iván por ser siempre mi motivación.

A Roberto por ser una excelente persona que siempre he ha apoyado y con su gran cariño, amor y paciencia me ha motivado para seguirme superando.

A todos mis maestros por su valioso tiempo y conocimientos brindados en la maestría.

AGRADECIMIENTOS

Al comité tutorial por su apoyo a lo largo del desarrollo de este proyecto.

Al Dr. Francisco Aguilar Romero por haber confiado en mí sin conocerme, por brindarme la oportunidad para tener un proyecto de tesis y estar siempre dispuesto ayudarme con este trabajo.

Al Dr. Rigoberto Hernández Castro por haber depositado su confianza para la realización de este trabajo donde siempre recibí su apoyo incondicional y sobre todo por su enseñanza al igual que por su paciencia que me permitió concluir con este trabajo.

Al Dr. Efrén Díaz Aparicio por haber depositado en mí su confianza y que con su buen humor siempre hizo olvidarme de tanto estrés.

A los miembros del jurado por sus valiosas aportaciones realizadas para el mejoramiento de esta tesis.

A la Dra. Beatriz Arrellano, por permitirme realizar una estancia de preparación antes de entrar a la maestría, al igual que sus enseñanzas.

Al Dr. Armando Navarro por permitirme realizar en su laboratorio la serología de las muestras.

A la M.C. Erika Margarita, a la M.C. Lucía Favila y a la Dra. Gabriela Palomares por apoyarme en explicarme algunas técnicas en el laboratorio y a entregar el 100% a este trabajo.

A mis amigas de laboratorio Almita, Erika, Imelda, Rosario, Monse e Isabel que siempre me brindaron ayuda cuando más lo necesitaba.

Al proyecto SAGARPA CONACyT 48599 “Estudio epidemiológico de enfermedades que afectan la producción caprina en México” que financió este estudio, así como al CONACyT por él apoyo de una beca durante el desarrollo de la maestría.

RESUMEN

Escherichia coli es considerada parte de la microbiota normal de mamíferos terrestres, acuáticos y aves. Con base en su mecanismo de patogenicidad y cuadro clínico, las cepas de *E. coli* diarreogénicas se clasifican en 6 grupos: enteropatogénica (EPEC), enterotoxigénica (ETEC), productora de la toxina shiga (STEC), enteroinvasiva (EIEC), enteroagregativa (EAEC) y adherente difusa (DAEC). En México no existen estudios en Medicina Veterinaria sobre la caracterización de patotipos y genes de virulencia de *E. coli* de origen caprino. El objetivo del presente estudio fue caracterizar aislamientos de *E. coli* obtenidos a partir de diarreas de cabritos de algunas regiones caprinas de México, a través de la determinación de los grupos filogenéticos, genes de virulencia, serotipos y el establecimiento de susceptibilidad a antibióticos. Los aislamientos fueron identificados bioquímicamente por medio del sistema automatizado MicroScan plus, y se les determinó la concentración mínima inhibitoria (MIC). La serotipificación se realizó por medio de la técnica de microaglutinación en placa. Los grupos filogenéticos y factores de virulencia se identificaron mediante PCR punto final. Se estudiaron 33 cepas de *E. coli*, 30 de éstas (91%) mostraron ser sensibles a los 21 quimioterapéuticos empleados en el ensayo de MIC, solo 3 cepas (9%) mostraron resistencia; a ampicilina/sulbactam, ampicilina, gentamicina, piperacilina, tobramicina, trimetoprim/sulfametoxazol, amikacina y piperacilina. Los grupos filogenéticos encontrados fueron 14 en el grupo B1, 9 en el B2, 5 en el A y 5 en el D. Con respecto a los factores de virulencia se identificaron los genes *st* (28/33), *stx2* (26/33), *lt* (3/33), *fliC_{H7}* (1/33), *stx1* (1/33), *eae* (1/33); el 100% de las muestras fueron negativas para los genes *bfpA*, *ipaH* y *rfbE_{O157}*. Se identificaron 28 serotipos distintos, los más frecuentes fueron el O25:H8 y O39:H49. El presente estudio representa el primer trabajo de caracterización de cepas de *E. coli* diarreogénicas en cabritos, realizado en México.

Palabras clave: *Escherichia coli* diarreogénicas, concentración mínima inhibitoria, grupos filogenéticos y factores de virulencia.

ABSTRACT

Escherichia coli is considered part of the normal microbiota of terrestrial and aquatic mammals, and birds. Based on its mechanism of pathogenicity and clinical aspects, strains of diarrhoeagenic *E. coli* are classified into 6 groups: enteropathogenic (EPEC), enterotoxigenic (ETEC), Shiga toxin-producing (STEC), enteroinvasiva (EIEC), enteroaggregative (EAEC) and diffusely adherent (DAEC). In Mexico there are no studies in Veterinary Medicine about characterization of pathotypes and virulence genes of *E. coli* strains from goats. The objective of this work was to characterize *E. coli* strains obtained from diarrhea of goat kids from some regions of Mexico, through the determination of phylogenetic groups, virulence genes, serotypes and antibiotic susceptibility profile. The isolates were identified biochemically using the automated system MicroScan plus, and the same time determined the minimum inhibitory concentration (MIC). Serotyping was performed by the microscopic agglutination plate. Phylogenetic groups and virulence factors were identified by polymerase chain reaction (PCR). 33 *E. coli* strains were analyzed, 30 strains were sensible to 21 chemotherapeutics employed in the MIC test, only 3 strains (9%) were resistant to ampicillin/sulbactam, ampicillin, gentamicin, piperacillin, tobramycin, trimethoprim/sulfamethoxazole, amikacin and piperacillin. The phylogenetic groups were 14 to B1 group, 9/B2, 5/A and 5/D. The virulence factors genes profile were *st* (28/33), *stx2* (26/33), *lt* (3/33), *fliC_{H7}* (1/33), *stx1* (1/33), *eae* (1/33); 100% of the samples were negative for *bfpA*, *ipaH* and *rfaE_{O157}* genes. 28 different serotypes were identified, the most common were O25:H8 and O39:H49. This study represents the first study to characterize *Escherichia coli* strains from diarrhea samples of goat kids in Mexico.

Key words: Diarrhoeagenic *Escherichia coli*, minimum inhibitory concentration, phylogenetic groups and virulence factors

ÍNDICE

	PAGÍNA
1. INTRODUCCIÓN	
1.1 Situación actual de la caprinocultura	11
1.2 <i>Escherichia coli</i>	11
1.2.1 Colibacilosis	11
1.2.2 Características	12
1.3 Clasificación	12
1.3.1 <i>E. coli</i> comensal	12
1.3.2 <i>E. coli</i> extraintestinal (ExPEC)	13
1.3.3 <i>E. coli</i> intestinal	14
1.4 Patotipos de <i>E. coli</i> patógenas intestinales	14
1.4.1 <i>Escherichia coli</i> enteropatógena (EPEC)	14
1.4.2 <i>Escherichia coli</i> Enterotoxigénica (ETEC)	15
1.4.3 <i>Escherichia coli</i> productora de la toxina shiga (STEC) o <i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica (EHEC)	16
1.4.4 <i>Escherichia coli</i> enteroinvasiva (EIEC)	17
1.4.5 <i>Escherichia coli</i> enteroagregativa (EAEC)	18
1.4.6 <i>Escherichia coli</i> adherente difusa (DAEC)	19
1.5 Filogrupos de <i>Escherichia coli</i>	19
1.6 Factores de virulencia	21
1.6.1 Toxina Shiga (Stx)	22
1.6.2 Intimina	22

1.6.3	<i>rfb</i>_{E0157} y <i>fliC</i>_{H7}	23
1.6.4	<i>bfp</i>	23
1.6.5	<i>ipaH</i>	23
1.6.6	Toxina termolábil (LT)	24
1.6.7	La toxina termoestable (ST)	24
2.	JUSTIFICACIÓN	26
3.	HIPÓTESIS	27
4.	OBJETIVO GENERAL	27
4.1	Objetivos específicos	27
5.	MATERIALES Y MÉTODOS	
5.1	Muestras	28
5.2	Concentración mínima inhibitoria	28
5.3	Serotipificación	28
5.4	Determinación de grupos filogenéticos	30
5.5	Identificación de factores de virulencia	32
6.	RESULTADOS	
6.1.	Identificación y resistencia	35

6.2. Grupos Filogenéticos	37
6.3. Factores de virulencia	38
6.4. Serotipificación	41
6.5 Resultados generales de grupos filogenéticos, factores de virulencia, serotipificación y MIC.	44
7. DISCUSIÓN	46
8. CONCLUSIONES	54
9. REFERENCIAS	55

ÍNDICE DE FIGURAS

	PAGÍNA
Figura 1. Árbol dicotómico interpretativo de los diferentes grupos filogenéticos de <i>E. coli</i>	20
Figura 2. Interpretación de la microaglutinación.	30
Figura 3. Fotografía que muestra la amplificación de los genes <i>chuA</i> y fragmento TspE4.C2	37
Figura. 4. Fotografía que muestra la amplificación de los genes <i>chuA</i> e <i>yjaA</i>.	38
Figura 5. Fotografía que muestra la amplificación del gen <i>stx2</i>.	39
Figura 6. Fotografía que muestra la amplificación de los genes <i>lt</i> y <i>st</i>.	39
Figura 7. Fotografía que muestra la amplificación de los genes <i>rfbE</i>_{O157} y <i>fliC</i>_{H7}.	40
Figura 8. Fotografía que muestra la amplificación de los genes <i>eae</i> y <i>stx1</i>.	40

ÍNDICE DE CUADROS

	PAGÍNA
Cuadro 1. Iniciadores y secuencias de nucleótidos de los genes para la clasificación de grupos filogenéticos.	31
Cuadro 2. Combinación de genes para la determinación de los Grupos Filogenéticos.	32
Cuadro 3. Iniciadores y genes de virulencia para la clasificación de los patotipos.	33
Cuadro 4. MIC de 33 aislamientos de <i>Escherichia coli</i> aislada a partir de cabritos con diarrea.	36
Cuadro 5. Resultados globales del análisis sobre grupos filogenéticos, factores de virulencia y serotipificación de los 33 aislados de <i>E. coli</i> en diarreas de cabritos.	42
Cuadro 6. Relación de resultados en genes de virulencia, grupos filogenéticos y resistencia a quimioterapéuticos.	45

INTRODUCCIÓN

1.1 Situación actual de la caprinocultura

En 2008 el ganado caprino en México produjo 165,196 mil litros de leche (1) y alrededor de 43,128 mil toneladas de carne (2). Esta actividad que sostiene a más 400 mil familias, es decir, alrededor de 1 millón y medio de mexicanos tienen como actividad productiva primaria o complementaria a la caprinocultura, ubicada principalmente en zona con bajos índice de desarrollo humano. Dentro de las limitaciones que se presentan en los sistemas de producción caprina, se encuentran el bajo ingreso económico dado por el precio de la leche y del cabrito, así como la falta de atención sanitaria, al no contar con campañas contra enfermedades que ocasionan pérdidas económicas relacionadas con la disminución de la producción láctea y al retraso en la ganancia de peso. Los estados de mayor producción de carne son Coahuila, Oaxaca, Puebla, San Luis Potosí y Guerrero, que aportan el 45% de la producción nacional. En el caso de la leche, el 74% de la producción del país se concentra en Coahuila, Durango y Guanajuato (3).

1.2 *Escherichia coli*

1.2.1 Colibacilosis

Las diarreas son una de las principales causas de enfermedad y mortalidad en la mayoría de las especies animales durante las primeras semanas de vida; la causa de éstas suele ser multifactorial, y puede estar asociada a factores ambientales, nutricionales y agentes infecciosos; en corderos y cabritos y *Cryptosporidium parvum*, se consideran los microorganismos más prevalecientes asociados con diarrea rotavirus, *Escherichia coli* y *Clostridium perfringens*, también se han mencionado otros agentes como la *Salmonella* sp, enterovirus y coronavirus (4).

La colibacilosis enfermedad causada por *E. coli*, ocasiona importantes pérdidas económicas en las explotaciones de ganado bovino, porcino, caprino y ovino; así como en la cría intensiva de aves y conejos. Mientras que en terneros, lechones, corderos, cabritos y gazapos *E. coli* suele producir diarrea, en aves provoca fundamentalmente infecciones respiratorias (aerosaculitis) y septicemia. Además *E. coli* puede causar infecciones urinarias, mastitis en rumiantes y septicemias en neonatos, porcinos, perros y gatos (5).

1.2.2 Características

E. coli es una bacteria Gram negativa que pertenece a la familia *Enterobacteriaceae* (6), móvil o inmóvil, de 2 a 3 μ de longitud por 0.6 μ de ancho, aerobio o anaerobio facultativo (7), no esporulado que forma ácido y gas a partir de lactosa, es indol positivo, fermenta glucosa y manitol. Crece a temperaturas entre 15 y 45 °C, con un pH óptimo de 7.0 y en agar MacConckey (McC) produce colonias brillantes, circulares y rosadas (5, 8).

1.3 Clasificación

Las cepas de *E. coli* de importancia biológica se clasifican en tres grupos: cepas comensales, cepas patógenas extraintestinales (ExPEC) y patógenas intestinales (entéricas o diarreogénicas) (9-12).

1.3.1 *E. coli* comensal

El tracto intestinal se encuentra estéril en un animal recién nacido, *E. coli* coloniza el tracto gastrointestinal de los recién nacidos dentro de sus primeras horas y permanece ahí durante toda la vida en simbiosis con su hospedero. La concentración en el intestino delgado es baja pero esta se incrementa

progresivamente en el intestino grueso, principalmente ciego y colón; dicha concentración está determinada por diferentes factores como son: tamaño corporal, morfología intestinal, dieta, tiempo de retención de la ingesta y microbiota, todos estos factores están determinados por el tipo de hospedero (5).

Aunque la generalidad de las cepas *de E. coli* son comensales, ha surgido algunos tipos capaces de alterar la fisiología normal del intestino, produciendo enfermedades que van desde diarrea acuosa a colitis hemorrágica mortal. La signología es causada por una variedad de mecanismos complejos, algunos de los cuales se conocen por completo. Estos incluyen la adhesión, la producción de toxinas, la invasión de la mucosa intestinal, y el transporte de proteínas bacterianas en las células del hospedero (10, 13).

1.3.2 *E. coli* extraintestinal (ExPEC)

Se denominan ExPEC aquellas cepas que pueden presentarse en individuos de cualquier edad, involucrando diferentes órganos o sitios anatómicos; están relacionadas con infecciones de tracto urinario (ITU), meningitis, infecciones intrabdominales, neumonía, infección intravascular, osteomielitis y colibacilosis en aves (14). Los patotipos de origen extraintestinal se clasifican en: *E. coli* asociada a meningitis neonatal (NMEC), *E. coli* patógena aviar (APEC) y *E. coli* uropatógena (UPEC) (15, 16). Es importante mencionar que cada uno de estos grupos patógenos presenta afinidad por especies animales incluido el humano, grupos etarios, variedades antigénicas específicas (serogrupos o serotipos), características epidemiológicas y factores de virulencia particulares entre los que se incluyen capacidad de adherencia, Invasividad o producción de toxinas, entre otros (10).

1.3.3 *E. coli* intestinal

Las cepas de *E. coli* patógena intestinal son las principales causas de morbilidad y mortalidad en humanos y animales a nivel mundial. Con base en su mecanismo de patogenicidad y cuadro clínico, las cepas de *E. coli* diarreogénicas se clasifican en 6 grupos: enteropatógena (EPEC), enterotoxigénica (ETEC), productora de la toxina shiga o enterohemorrágica (STEC, EHEC), enteroinvasiva (EIEC), enteroagregativa (EAEC) y adherente difusa (DAEC) (8, 17-19).

1.4 Patotipos de *E. coli* patógenas intestinales

1.4.1 *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC)

EPEC es el agente etiológico más común de diarrea aguda en niños menores de 2 años (20, 21). En bovinos, la infección por EPEC se asocia con diarrea en animales jóvenes (1 a 8 semana de edad) (22). No es una enfermedad mortal, pero la diarrea puede llegar a ser crónica, con mortalidad baja, causando pérdidas económicas. Afecta a perros, gatos, conejos, cerdos, cabras y ovejas (23). En los conejos, recién nacidos y recién destetados causan diarrea leve o grave (24, 25). EPEC coloniza las células epiteliales del intestino delgado, principalmente la porción del yeyuno. Los signos y síntomas de una infección por este patógeno incluyen diarrea acuosa aguda, vomito, fiebre y malestar general. Además, en las biopsias de pacientes infectados se puede observar una lesión histopatológica característica ocasionada por este patógeno: la lesión A/E que está caracterizada por adherencia y esfacelamiento (attaching and effacing). Este fenotipo se caracteriza por la eliminación de las microvellosidades del intestino y la adherencia íntima entre la bacteria y la célula hospedera, también se observan marcados cambios en el citoesqueleto del enterocito, incluyendo la acumulación de filamentos de actina bajo el sitio de adherencia de la bacteria y la formación de una estructura en forma de pedestal sobre la cual se posa la bacteria (8, 26).

Su dosis infectante es de 10^9 UFC y tiene un periodo de incubación de 3 a 24 h (17, 27). *E. coli* enteropatógena se divide en dos subgrupos: típicas y atípicas. EPEC atípica carece del plásmido EAF que codifica un factor adherente y *bfp* (*bundle-forming pilus*); mientras que EPEC típica presenta EAF y *bfp*; por lo que las cepas de EPEC atípicas son menos virulentas (28-32). EPEC presentan también la isla de patogenicidad LEE (*locus of enterocyte effacement*) (21, 25) con los genes: *eae* y *tir*. El gen *eae* codifica para una proteína de la membrana externa denominada intimina que es responsable de la adhesión íntima de la bacteria al enterocito (30, 33). El gen *tir* (*translocated intimin receptor*) codifica para el receptor celular al que se une la intimina. La bacteria después de unirse a distancia al enterocito mediante las fimbria Bfp excreta el receptor Tir que se fijan al enterocito y a continuación la bacteria se une íntimamente al enterocito al fijarse la intimina al receptor Tir (25, 34).

1.4.2 *Escherichia coli* Enterotoxigénica (ETEC)

ETEC es una causa importante de diarrea infantil en los países en desarrollo y de las principales de las diarreas del viajero con un estimado de 11 millones de personas afectadas cada año (35). Su mecanismo de transmisión ocurre por la ingesta de agua y alimentos contaminados. Los signos por lo general duran de 1-5 días, pero pueden persistir hasta por 2 semanas o más en los individuos afectados (35, 36). En algunos pacientes, los síntomas entéricos duran meses o años, y un 2% produce diarrea crónica (35). Las cepas de ETEC se reconocieron por primera vez como una causa de la enfermedad diarreica en animales, especialmente en lechones y rumiantes, en los cuales provocan una infección letal en los recién nacidos (37, 38) y en lechones se pueden ver afectados durante los primeros días de vida, la primera semana de su nacimiento hasta el destete incluso los destetados (39). En perros jóvenes se han asociado hasta 31% de los casos de diarrea es

causada por ETEC. En terneros las infecciones por ETEC, está generalmente asociada con infecciones virales por rotavirus (5).

Los mecanismos de virulencia implicados en la patogenicidad de ETEC son: factores de colonización fimbriales, que permiten que se adhiera al intestino delgado proximal y resista la acción del peristaltismo y producción de una o dos toxinas denominadas enterotoxinas LT (termolábil) y ST (termoestable) (39-42); resultando en una disminución de la absorción de fluidos y electrolitos desde el lumen intestinal y causando una diarrea acuosa similar a la producida por *Vibrio cholerae* (8, 11, 37).

1.4.3 *Escherichia coli* productora de la toxina shiga (STEC) o *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC)

Es el conjunto de *E. coli* patógenas que puede causar diarrea o colitis hemorrágica en humanos, en ocasiones la colitis deriva en síndrome urémico hemolítico (SUH) púrpura trombótica trombocitopénica (43-45). Estas enfermedades gastrointestinales son a menudo complicada por secuelas sistémicas potencialmente mortales como el daño neurológico (46). Los serogrupos más comúnmente involucrados en la inducción de los padecimientos antes referidos son: particularmente O157:H7 y O157: NM y otros tales como O26, O103, O111, O121, O145, O91, O104, O113, O117, O118, O121, O128, etc (STEC no-O157). (28, 44, 47, 48). El serotipo de *E. coli* O157:H7 es uno de los más estudiados, ya que ha sido reconocido como la causa de este síndrome desde la década de 1980. Los reservorios naturales de la O157:H7 son los rumiantes (49); existen evidencias que implican a otros animales como reservorios de STEC; perros, gatos, jabalíes, cerdos, gallinas, gaviotas así como animales de zoológico búfalos, yaks, alpacas, antílopes y llamas (19, 50-53). Las especies animales más importantes en términos de infección humana son los bovinos y cerdos (19, 54) ya que se han encontrado altas tasas de colonización de las cepas STEC en los rebaños de bovinos en varios

países (55). Las cepas de STEC son generalmente aisladas de animales sanos, pero pueden estar asociadas con episodios iniciales de diarreas en animales jóvenes, seguida de la colonización asintomática (54). La mayoría de los brotes por STEC se asociaron con el consumo de pescados, mariscos crudos, carne de res molida, productos lácteos, leche no pasteurizada y agua contaminada con heces; comida rápida, vegetales y por último los alimentos crudos o poco cocinados (6, 28, 56). Las dosis infectante son de 10 a 100 bacterias. Los Centros para el Control y Prevención de Enfermedades estiman que *E. coli* O157:H7 causa más de 70,000 infecciones y 60 muertes cada año en los EE.UU (45). STEC expresa los genes de las toxinas Shiga (*stx1* y *stx2*) que se encuentran codificadas en el genoma de bacteriófagos; además poseen otros factores de virulencia adicionales como la intimina que es responsable de la adhesión de las bacterias al epitelio intestinal y el esfacelamiento. Otro factor de virulencia es la hemolisina (*hlyA*) que se encuentra codificada en un plásmido (28, 57, 58).

1.4.4 *Escherichia coli* enteroinvasiva (EIEC)

E. coli enteroinvasiva (EIEC) produce diarrea disenteriforme similar a la producida por *Shigella*, ya que es genética, bioquímica y clínicamente muy cercana a este patotipo (59, 60). Estudios de brotes y casos esporádicos de infección por EIEC mostraron que el espectro de manifestaciones clínicas incluye infección asintomática, diarrea líquida, diarrea con sangre y complicaciones graves con colitis hemorrágica (59). La transmisión frecuentemente es de persona a persona, pero en los animales, especialmente los bovinos, son considerados el reservorio más importante, y son el origen habitual de los brotes en el mundo (52). Su mecanismo de transmisión es por la ingesta de alimentos contaminados, como carne mal cocida, agua o leche son los vehículos de transmisión al ser humano más frecuente. El periodo de la incubación en los brotes es 2 a 48 horas. El inóculo requerido para causar infección es de 10^6 - 10^{11} UFC (8, 11). El principal mecanismo de

patogenicidad es la invasividad (gen *ipaH*) que se inicia con la adherencia de la bacteria a las microvellosidades de la mucosa del intestino grueso, seguida por la entrada a la célula en donde se multiplica e invade células vecinas. La destrucción celular desencadena el proceso de inflamación y la aparición de diarrea con moco y sangre (disentería) (11, 59).

1.4.5 *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC)

E. coli enteroagregativa es un patógeno asociado a diarrea persistente y aguda en niños menores de dos años en países desarrollados y en desarrollo (57, 61, 62), donde la infección se ha asociado con la malnutrición y retraso del crecimiento (29, 61). Su periodo de incubación reportado ha sido de 1-2 días y se han ligado al síndrome de diarrea persistente acuosa, mucoide e incluso sanguinolenta, de más de 14 días duración (63, 64).

Varios estudios sugieren a EAEC como la causa principal de la diarrea humanos en países desarrollados y sólo son superadas por *Campylobacter* spp., como causa de diarrea bacteriana (29). Presentan un tipo de fimbrias que les permiten adherirse de un modo agregativo (57, 65) a la mucosa del intestino grueso y delgado; produciendo un aumento de la secreción de mucosidad que atrapa a las bacterias y que permite su autoaglutinación en una fina película en el epitelio intestinal (11, 65, 66). Presentan un plásmido (pAA) que codifica para una adhesina fimbrial que es responsable del patrón de adherencia enteroagregativa a células HEp-2 y al epitelio intestinal (8, 11, 62, 65). En diferentes estudios el gen *aggR* (activador transcripcional) es utilizado principalmente para identificar cepas patógenas (típicas) que son positivas a este y las no patógenas (atípicas) que son negativas (28, 30, 61, 66). EAEC rara vez se han identificado en los animales, el reservorio son únicamente los seres humanos (63, 67).

1.4.6 *Escherichia coli* adherente difusa (DAEC)

Coloniza el intestino delgado y causa un síndrome de diarrea acuosa en niños y adultos. El nombre proviene del tipo característico de adherencia de estas bacterias a las células HEP-2 en cultivo de tejidos. Su mecanismo de patogenicidad se caracteriza por una fimbria de superficie, conocida como F1845, involucrada en el fenómeno de adherencia difusa (11, 68). Es un grupo heterogéneo que caracteriza por generar un patrón de adherencia difusa (DAF). Este patrón está mediado por proteínas codificadas por una familia de operones que codifica una fimbria de superficie Dr y F1845 las que confieren el fenotipo (11, 68, 69).

1.5 Filogrupos de *Escherichia coli*

Las cepas de *E. coli* se encuentran comúnmente en la microbiota normal del tracto intestinal de mamíferos y pueden ser asignadas a uno de los cuatro grupos filogenéticos principales, A, B1, B2 y D (70-73), algunos autores incluyen dos grupos accesorios E y F (7, 9, 73, 74).

El análisis de grupos filogenéticos es una herramienta que es utilizada para diferenciar cepas comensales de cepas patógenas (71).

Clermont y colaboradores (2000) desarrollaron una técnica para la detección de los grupos filogenéticos de *E. coli*, basada en la presencia o ausencia de los genes, *chuA* (necesario para el transporte del grupo hemo en *E. coli* O157:H7 enterohemorrágica) y *yjaA* (identificado en el genoma de *E. coli* K-12, con función desconocida) y un fragmento de DNA llamado TSPE.C2 que codifica parte de una estearasa lipasa. Los genes utilizados para determinar los grupos filogenéticos tienen una relación dicotómica que se utiliza para distinguir los cuatro grupos filogenéticos a partir de la identificación de las regiones génicas mencionadas, mediante la amplificación de DNA por la reacción en cadena de la polimerasa (**Figura 1**) (71, 72).

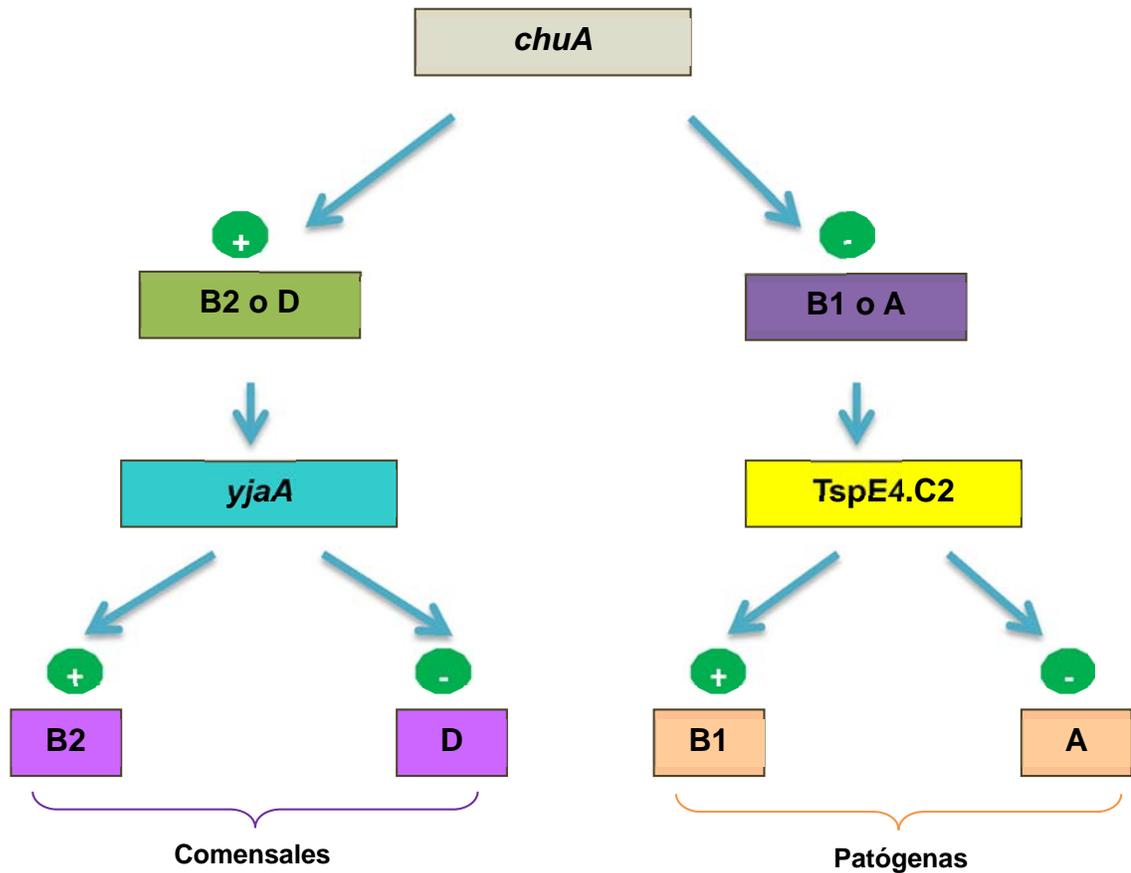


Figura 1. Árbol dicotómico interpretativo de los diferentes grupos filogenéticos de *E. coli* en función de la presencia o ausencia de los genes *chuA*, *yjaA* y del fragmento TSPE4.C2. Tomado de Clermont *et al.*, 2000. Modificado con base a cepas patógenas intestinales (70) .

Para la identificación de patógenos extraintestinales, el filo-grupo que frecuentemente se observa es el B2 y en menor medida en el grupo D (75); para el filo-grupo B1 tienden asociarse a patógenas intestinales seguida del grupo A (15, 75, 76). La mayoría de los clones de *E. coli* comensales, aisladas de las heces de humanos sanos, pertenecen a los grupos A y B1; en animales domésticos los grupos presentes son A o B1 (7, 77). Los aislamientos capaces de causar enfermedades extra-intestinales, tales como pielonefritis o meningitis neonatal, y aquellas enfermedades intestinales que ocasione colitis hemorrágica; los aislados procedentes de pacientes con enfermedad extra-intestinal están frecuentemente

representados entre el grupo B2. Sin embargo, se ha estimado que las cepas B2 representan sólo alrededor del 5% de las cepas aisladas de heces en humanos sanos; cepas aisladas de heces de personas asintomáticas se clasifican también en el filo-grupo D (77).

Estudios realizados indican que cepas STEC normalmente pertenecen a grupos filogenéticos D, B1 y en menor grado al A. La mayoría de STEC O157 pertenecen al grupo D, mientras que otros serotipos de STEC pertenecen a grupos B1 y A (57, 78).

1.6 Factores de virulencia

La gran diversidad de clonas patógenas de *E. coli* al parecer es el resultado de la adquisición constante de diferentes factores de virulencia, mismos que son codificados por genes presentes en plásmidos, islas genómicas y fagos, elementos genéticos que son intercambiados a una frecuencia alta con otras bacterias relacionadas, como otras cepas de *E. coli*, *Salmonella* y *Shigella*, este proceso que se ha definido como transferencia horizontal de genes mediado por conjugación, transformación o transducción (10, 11). Por lo tanto las cepas de *E. coli* pueden exhibir características que han sido adquiridas a partir de una amplia variedad de fuentes; lo que les permite causar un amplio espectro de enfermedades (79); ya que promueven la colonización y facilitan la sobrevivencia de las bacterias infectantes, destacando su adherencia mediada por fimbrias, adhesinas no fimbriales, la presencia de toxinas y la cápsula (5, 8).

1.6.1 Toxina Shiga (Stx)

La Stx constituye el principal factor de patogenicidad y la característica distintiva de STEC. Esta toxina está compuesta por dos polipéptidos, un pentámero de adhesión formado por cinco subunidades B y una subunidad A (33 KDa). Una vez fijada a su receptor a través de la subunidad B, la toxina Shiga es internalizada dentro de las células blanco: endoteliales, epiteliales y hematíes. La subunidad A libera un fragmento A1 cuya actividad catalítica resulta en un bloqueo irreversible de la síntesis proteica. La secuencia de la toxina Stx1 está altamente conservada, mientras que existe variación en las secuencias de Stx2, resultando en numerosas variantes (80) las cuales han recibido el nombre de Stx1c, Stx1d, Stx2c, Stx2d, Stx2vhb, Stx2e y Stx2f (11, 81).

1.6.2 Intimina

El gen *eae*, el cual codifica una proteína de membrana externa (94 - a 97-kDa) denominada intimina, localizada en una región del cromosoma conocida como LEE (locus of enterocyte effacement); responsable de la unión íntima de la bacteria al enterocito y de la desorganización de las microvellosidades con producción de la lesión A/E. La formación de lesión A/E está asociada con un reordenamiento del citoesqueleto de la célula huésped, dando como resultado la producción de una estructura con forma de pedestal rica en actina polimerizada (11, 43, 82, 83). Presenta dos subunidades (A y B). La A es necesaria (aunque insuficiente) para producir la lesión A/E en los enterocitos y al parecer, codifica para la intimina; en cuanto a la B, ésta codifica para la secreción de una proteína de 37 kDa, la cual está implicada en el mecanismo disparador de la transducción y fosforilación de la tirosina en la célula hospedero. Actualmente se han identificado 17 variantes genéticas de intimina ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\beta 1$, $\mu R/B$ $\beta 2$, $\delta/\theta/\beta 2$ O, $\gamma 1$, $\zeta/\gamma 2$, $\epsilon 1$, $\lambda R/\epsilon 2$, δ , ϵ , $\eta 1$, $\kappa R/\eta 2$, ι , κB , νB , μB) las cuales codifican diferentes tipos y subtipos de intimina.

Estas variaciones pueden dar lugar a la especificidad por los diferentes tejidos hospedadores y son utilizadas para la subtipificación de cepas EPEC y STEC (84).

1.6.3 *rfbE*_{O157} y *fliC*_{H7}

El serotipo de *E. coli* O157:H7 es determinado por marcadores específicos como *rfbE* y *fliC* que codifican respectivamente para la biosíntesis del lipopolisacárido O157 y la flagelina, lo que a su vez determina respectivamente los antígenos O y H (85). Existen 53 tipos de antígenos flagelares (H) en *E. coli*, y en su mayoría los genes estructurales de la flagelina se encuentra en el locus *fliC*. Estudios de *E. coli* y *Salmonella entérica* demostraron que las proteínas flagelares están conservadas en sus regiones terminales, mientras que la región central es variable, dando lugar a serotipos específicos (86). Además, la tipificación molecular de los genes *fliC* permite identificar los aislamientos de *E. coli* flagelares de los no flagelares (87).

1.6.4 *bfp*: (bundle-forming pilus), permite que las bacterias interaccionen de manera tridimensional y se dispongan en forma de microcolonias a nivel intestinal, promoviendo con esto la adherencia inicial sobre la superficie de la célula (88, 89).

1.6.5 *ipaH*: *ipa* (invasión plasmid antigens) es una proteína, producida por *Shigella*, que se utiliza como marcador genético específico para la identificación de *Shigella* spp. y EIEC (8, 90).

1.6.6 Toxina termolábil (LT)

Es una toxina oligomérica estrechamente relacionadas en estructura y función con la enterotoxina colérica (CT) producida por *Vibrio cholerae*. Existen dos principales tipos de LT (LT-I y LT-II) (39, 91, 92).

LT-I En función y estructura es similar a la toxina colérica, está formada por una subunidad A (28 kDa) y por 5 subunidades B idénticas de 11,5 kDa. Las subunidades B se unen al mismo receptor que la toxina colérica (gangliósidos GM1) y a otras glucoproteínas de superficie en las células epiteliales del intestino delgado. Después de la endocitosis, la subunidad A se transloca a través de la membrana de la vacuola. La subunidad A tiene actividad ADP (adenosín difosfato)-robo siltransferasa e interacciona con una proteína de membrana (Gs) que regula la adenilatociclasa. El resultado neto de esta interacción es un aumento de los valores de adenosín monofosfato cíclico (AMPc), con un incremento de la secreción de cloro y una disminución de la absorción de cloruro de sodio (NaCl). Estos cambios se manifiestan como una diarrea acuosa. La exposición a la toxina estimula también la secreción de prostaglandinas y la producción de citocinas inflamatorias, lo que da lugar a una mayor pérdida de líquidos (8, 93).

LT-II sólo se encuentra en los animales y no está asociada con la enfermedad clínica, LT-II incrementa los niveles intracelulares de AMPc utilizando mecanismos similares a LT-I, la diferencia es que utiliza como receptores a GD1 (8, 93, 94).

1.6.7 La toxina termoestable (ST)

ST es un péptido pequeño (17 a 18 aminoácidos) que se fijan a un receptor de glucoproteína y da por resultado activación de una guanilciclasa fija en la membrana. El incremento subsecuente de la concentración de guanosina-5'-monofosfato cíclico (GMPc).

STa (ST-I) es producida por ETEC y también se identificaron en otras bacterias entéricas como *Yersinia enterocolitica*, *Vibrio cholerae* O1, *Vibrio mimicus*, *Citrobacter freundii* y *Klebsiella pneumoniae*; Sta es un péptido de 18 a 19 aminoácidos. Tiene dos variantes, STp (ST porcina o STIa) y STh (STh humana o STIb). La toxina se une a los receptores de guanilato ciclasa en el borde en cepillo del epitelio intestinal donde estimula su actividad lo cual conduce a un aumento de los niveles intracelulares de GMP cíclico lo que resulta en la alteración de la absorción de Na⁺ y H₂O dentro del lumen intestinal, provocando así un cuadro diarreico (94).

STb comprende 48 aminoácidos, está relacionada con la causa de diarrea en animales; se asocia principalmente con cepas ETEC de origen porcino, aunque también se han encontrado en aislamientos de origen humano y de otras especies como pollos, bovinos, perros y hurones; inducen un daño histológico en el epitelio intestinal que consiste en la pérdida y atrofia de vellosidades en las células epiteliales (8, 11, 93, 95).

Las toxinas termolábil y termoestable se encuentran codificadas principalmente en plásmidos y en algunos casos, pueden encontrarse en transposones o en secuencias de inserción (11)

2. JUSTIFICACIÓN

La presentación de diarreas causadas principalmente por *E. coli* tiene un enorme impacto sobre la economía ganadera debido a la alta mortalidad (hasta un 60%), morbilidad (10- 50%) y la pérdida de peso de los animales; por lo que se incrementan los costos de producción y disminuye la productividad en las unidades de producción ganaderas.

Es importante señalar que para el tratamiento de los diferentes patotipos de *E. coli* comienza con un diagnóstico adecuado en el tiempo pertinente, es decir que debe de realizarse análisis microbiológicos, clasificación de grupos filogenéticos y caracterización de los patotipos para conocer el agente causal presente en el animal al momento de presentar los primeros indicios de infección.

En México, una de las principales causas de mortalidad en cabritos criados bajo los sistemas de producción intensivo y extensivo, son las diarreas; sin embargo al no realizarse diagnósticos de laboratorio confirmatorios, estos cuadros pueden ocultar la participación de *E. coli* diarrogénicas. No existen estudios en Medicina Veterinaria encaminados a determinar la presencia de cepas diarrogénicas de *E. coli* en casos de diarrea en cabritos por medio de caracterización de genes de virulencia. Es de gran importancia realizar estudios para conocer la situación de cepas diarrogénicas en esta especie; de tal manera que el conocimiento y la información generada servirá para mejorar medidas preventivas y de control.

3. HIPÓTESIS

Los aislamientos de *E. coli* procedentes de diarreas de cabritos presentaran características genéticas a las de cepas patógenas intestinales.

4. OBJETIVO GENERAL

Caracterizar aislamientos de *E. coli* obtenidos a partir de diarreas de cabritos de algunas regiones caprinas de México, a través de la determinación de los grupos filogenéticos, genes de virulencia, serotipos y el establecimiento de susceptibilidad a antibióticos.

4.1 Objetivos específicos

- Identificar bioquímicamente cepas de *E. coli* en cabritos con diarrea y serotipificarlos mediante antígenos O y H.
- Establecer la susceptibilidad a quimioterapéuticos por medio de la determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC).
- Determinar los grupos filogenéticos mediante la identificación de los genes de *chuA*, *yjaA* y TSPE4.C2.
- Conocer los factores de virulencia mediante la detección de los genes *bfp*, *eae*, *stx1*, *stx2*, *lt*, *st* e *ipaH* y marcadores de tipificación molecular *rfbE*_{O157} y *fliC*_{H7}.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Muestras

Se tomaron muestras rectales de 33 cabritos con diarrea, éstas fueron transportadas en medio AMIES con carbón activado a 4°C. Los hisopos fueron sembrados en agar MacConkey e incubados por 24 a 48 h. Las colonias lactosa positivas fueron seleccionadas para su identificación bioquímica. Las cepas fueron almacenadas a -70°C en caldo infusión cerebro corazón con 40% de glicerol.

5.2 Concentración mínima inhibitoria

Las cepas fueron sembradas en agar MacConkey e incubadas a 37°C durante 24 h. La identificación y susceptibilidad se realizó en el laboratorio clínico del hospital “Dr. Manuel Gea González” utilizando el sistema automatizado MicroScan WalkAway 96 plus utilizando los siguientes quimioterapéuticos: amikacina, amoxicilina/ácido clavulánico, ampicilina/sulbactam, ampicilina, aztreonam, cefazolina, cefepime, cefotaxima, cefoxitina, ceftazidima, ceftriaxona , ciprofloxacina, gatifloxacina, gentamicina, imipenem, levofloxacina, piperacilina/tazobactam, piperacilina, tircacilina/ácido clavulánico, tobramicina y trimetoprim/sulfametoxazol.

5.3 Serotipificación

La serotipificación se realizó en el Laboratorio de Bacteriología de la Facultad de Medicina de la UNAM; la metodología que se empleó fue de acuerdo a lo descrito por Orskov F y Orskov (96). Para la obtención del antígeno somático (O) las cepas se sembraron por estría cerrada en tubos con agar inclinado de soya tripticaseina (TSA), se incubaron a 37°C por 24 h; posteriormente se les agregó 10 ml de solución salina se mezcló y para obtener el sobrenadante y se depositó en otro tubo que se

colocó en el baño María a 110°C por 1 h; se dejaron enfriar a temperatura ambiente, se agregó 15 ml de solución salina formalinizada (8.76 grs. de cloruro de sodio y 6 ml de formalina para un litro) a cada tubo y se almacenaron hasta su uso. En el caso del antígeno flagelar (H) se sembraron por picadura en tubos de Craigie con agar semisólido, se incubaron a 30°C durante 21 días, posteriormente se sembró el antígeno flagelar en biotriptasa incubados a 28°C por 24 h; después se les agregó de 5 a 10 ml de solución salina formalinizada.

Se utilizaron antisueros de conejo contra los 186 antígenos somáticos (O) y antisueros monovalentes contra los 56 antígenos flagelares (H) del esquema de tipificación (97).

Para la reacción de microaglutinación en placa se realizaron diluciones de los antígenos; se llevaron a cabo tres titulaciones para cada antígeno, donde las dos primeras se utilizaron antisueros diluidos y en la última se utilizó antisuero puro de *E. coli*. En la tipificación del antígeno O se incubó a 50°C por 24 h en estufa de cultivo, la lectura se realizó después de las 24 h (**Figura 2**). El antígeno flagelar se incubó a 50°C por 2 h en estufa de cultivo, posteriormente se realizó la lectura.

Se incluyeron sueros específicos para definir el serogrupo de *E. coli*. En la tipificación serológica se incluyeron 45 sueros anti-O de *Shigella* spp., (*S. dysenteriae* O1-O15; *S. boydii* O1-O20; *S. flexneri* O1-O6, con sus subtipos a y b de O1, O2, O3, O4 y O5 además las variedades X e Y; *S. sonnei* I y II) para diferenciar una reacción cruzada.

Figura 2. Interpretación de la microaglutinación.

Microaglutinación			
			
Negativa	1+ Positiva	2+ Positiva	3+ Positiva

5.4 Determinación de grupos filogenéticos

La determinación del grupo filogenético se realizó mediante una PCR punto final descrita por Clermont *et al.* 2000. Se utilizaron tres genes (*chuA*, *yjaA*, y el fragmento de ADN TspE.4C2) los aislados de *E. coli* se clasificaron en uno de los cuatro grupos filogenéticos: A, B1, B2 y D. En el cuadro 1 se muestran la secuencia de oligonucleótidos que se utilizaron.

Cuadro 1. Iniciadores y secuencias de nucleótidos de los genes para la clasificación de grupos filogenéticos (71).

Gen	Primers	Secuencia de oligonucleótidos (5' a 3')	Amplicón (pb)
<i>chuA</i>	ChuA.1	GACGAACCA ACGGTCAGGAT	279
	ChuA.2	TGCCGCCAGTACCAAAGACA	
<i>yjaA</i>	YjaA.1	TGAAGTGTGAGGAGACGCTG	211
	YjaA.2	ATGGAGAATGCGTTCCTCAAC	
Fragmento de ADN TspE.4C2	TspE4C2.1	GAGTAATGTCGGGGCATTCA	152
	TspE4C2.2	CGCGCCAACAAAGTATTACG	

Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: Desnaturalización inicial por 5 min a 95°C; 30 ciclos de 30 s a 95°C, 33 s a 58°C, y 30 s a 72°C; y una extensión final de 7 min a 72°C. Las reacciones de PCR se corrieron electroforéticamente en geles de agarosa al 2% y por último se tiñeron con bromuro de etidio. Los grupos filogenéticos fueron determinados en base a la presencia o ausencia de los genes (**cuadro 2**).

Cuadro 2. Combinación de genes para la determinación de los Grupos Filogenéticos.

<i>chuA</i>	<i>yjaA</i>	TSPE4.C2	Grupo filogenético
+	+	+/-	B2
+	-	+/-	D
-	+/-	+	B1
-	+/-	-	A

5.5 Identificación de factores de virulencia

La identificación de los factores de virulencia se realizó de acuerdo a lo descrito por DebRoy y Roberts (98), y Tornieporth y colaboradores (99). El total de genes a identificar fueron; *eae*, *stx1*, *stx2*, *bfp*, *lt*, *st*, *ipaH*, *rfbE*_{O157} y *fliC*_{H7}. Se realizaron reacciones de PCR múltiples donde se incluyeron los genes *eae*, *stx1*, *rfbE*_{O157}, *fliC*_{H7}, *lt* y *st*, *bfp* e *ipaH* y para el gen *stx2* se realizó una reacción individual de PCR. Los iniciadores que se emplearon para la detección genética se muestran en el **cuadro 3**.

Cuadro 3. Iniciadores y genes de virulencia para la clasificación de los patotipos (98, 99).

Patotipo	Gen	Secuencia de oligonucleótidos (5' a 3')	Posición	Amplificación
EPEC	<i>bfp</i>	CAATGGTGCTTGCGCTTGCT	119–443	324 pb
		GCCGCTTTATCCAACCTGGT		
EHEC	<i>stx1</i>	ACA CTG GAT GAT CTC AGT GG	938–1520	582 pb
		CTG AAT CCC CCT CCA TTA TG		
	<i>stx2</i>	GGC ACT GTC TGA AAC TGC TCC	603–857	255 pb
		TCG CCA GTT ATC TGA CAT TCT G		
	<i>eae</i>	GTG GCG AAT ACT GGC GAG ACT	2518–3408	890 pb
		CCC CAT TCT TTT TCA CCG TCG		
<i>rfbE_{O157}</i>	AAC GGT TGC TCT TCA TTT AG	287–964	678 pb	
	GAG ACC ATC CAA TAA GTG TG			
<i>fliC_{H7}</i>	TAC CAC CAA ATC TAC TGC TG	735–1294	560 pb	
	TAC CAC CTT TAT CAT CCA CA			
ETEC	<i>lt</i>	GCGACAAATTATACCGTGCT	59–765	708 pb
		CCGAATTCTGTTATATATGT		
	<i>st</i>	CTGTATTGTCTTTTTACCT	79-260	182 pb
		GCACCCGGTACAAGCAGGAT		
EIEC	<i>ipaH</i>	GCTGGAAAACTCAGTGCCT	1061–1484	424 pb
		CCAGTCCGTAAATTCATTCT		

Las condiciones para la PCR punto final para los genes *bfp* y *ipaH* fueron una desnaturalización inicial de 94°C durante 5 min, 30 ciclos a 94°C durante 1 min, 56°C a 2 min y 72°C a 1 min y una extensión final 72°C durante 7 min.

Las condiciones para la PCR punto final para los genes *lt* y *st* fueron una desnaturalización inicial de 94°C durante 5 min, 35 ciclos a 94°C durante 1 min, 55°C a 1.30 min y 72°C a 1.30 min y una extensión final 72°C durante 7 min. Para el gen *stx2* fue una desnaturalización inicial de 94°C durante 5 min, 40 ciclos a 94°C durante 45 s, 58°C a 45 s y 72°C a 45 s y una extensión final 72°C durante 7 min.

Las condiciones para la PCR punto final para los genes *stx1* y *eae* fueron una desnaturalización inicial de 94°C durante 5 min, 30 ciclos a 94°C durante 30 s, 56°C a 30 s y 72°C a 45 s y una extensión final 72°C durante 7 min. Por último para los genes *rfbE_{O157}* y *fliC_{H7}* las condiciones fueron: desnaturalización inicial de 94°C durante 5 min, 30 ciclos a 94°C durante 30 s, 56°C a 30 s y 72°C a 45 s y una extensión final 72°C durante 7 min. Las reacciones de PCR se corrieron electroforéticamente en geles de agarosa al 2% y por último se tiñeron con bromuro de etidio.

6. RESULTADOS

6.1. Identificación y resistencia

La identificación de los 33 aislamientos se realizó mediante el método automatizado MicroScan Walkaway 96 plus, la identificación final fue *E. coli* con un porcentaje de identidad del 100%; al mismo tiempo se determinó la concentración mínima inhibitoria (MIC) utilizando 21 quimioterapéuticos.

De los 33 aislamientos, 30 de estos (91%) mostraron ser sensibles a los quimioterapéuticos empleados en el ensayo de MIC. Solo 3 aislamientos (9%) mostraron ser resistentes; un aislamiento mostro resistencia a ampicilina/sulbactam y ampicilina, el segundo aislamiento a ampicilina, gentamicina, piperacilina, tobramicina y trimetoprim/sulfametoxazol, un tercer aislamiento a amikacina, ampicilina/sulbactam y piperacilina (**cuadro 4**).

Cuadro 4. MIC de 33 aislamientos de *Escherichia coli* aislada a partir de cabritos con diarrea.

QUIMIOTERAPÉUTICO	SENSIBLE	RESISTENCIA
Amikacina	32	1
Amox/A Clav	33	
Amp/Sulbactam	31	2
Ampicilina	31	2
Aztreonam	33	
Cefazolina	33	
Cafepima	33	
Cefotaxima	33	
Cefoxitina	33	
Ceftazidima	33	
Ceftriaxona	33	
Ciprofloxacina	33	
Gatifloxacina	33	
Gentamicina	32	1
Imipenem	33	
Levofloxacina	33	
Pip/Tazo	33	
Piperacilina	31	2
Ticar/A Clav	32	1
Tobramicina	32	1
Trimetoprim/Sulfametoxazol	32	1

6.2. Grupos Filogenéticos

Para la determinación de los grupos filogenéticos se utilizaron los genes *chuA* y *yjaA*, así como el fragmento TspE4.C2, con base en la presencia o ausencia de estos se determinaron los grupos filogenéticos en A, B1, B2 y D. Catorce aislamientos (43%) pertenecieron al grupo B1, 9 (27%) al grupo B2, 5 (15%) al grupo A y 5 (15%) al grupo D (**cuadro 6**) (**Figura 3,4**).

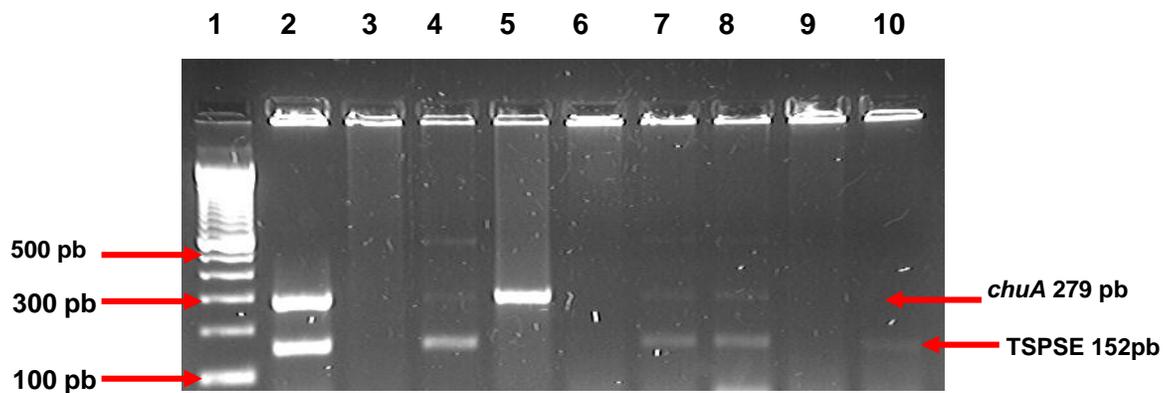


Figura 3. Fotografía que muestra la amplificación de los genes *chuA* y fragmento TspE4.C2. Gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio. Carril 1 marcador de peso molecular 100pb; carril 2 control positivo (UPEC); carril 3 aislamiento negativo a ambos genes, carril 4 aislamiento positivo a ambos genes, carril 5 aislamiento positivo al gen *chuA*, carril 6 aislamiento negativo a ambos genes, carril 7,8 aislamiento positivo a ambos genes, carril 9 aislamiento negativo a ambos genes y carril 10 aislamiento positivo al gen TSPSE4.C2.

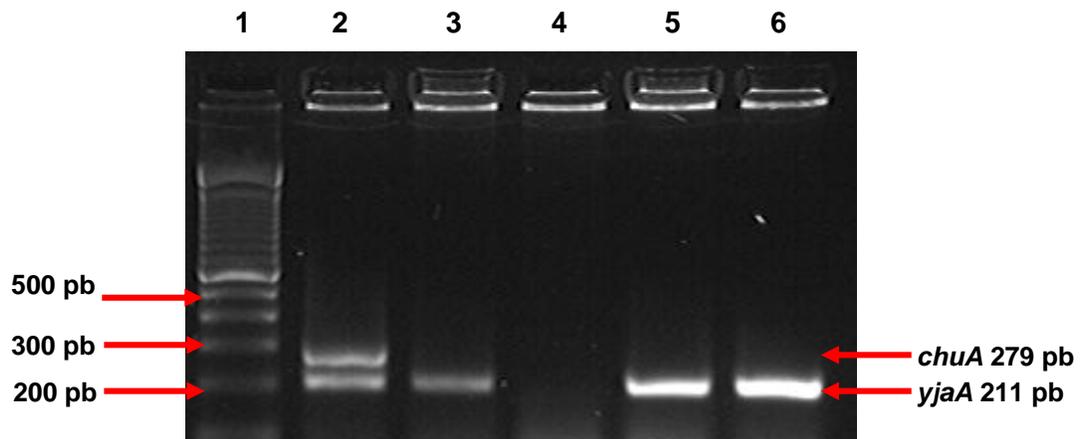


Figura. 4. Fotografía que muestra la amplificación de los genes *chuA* e *yjaA*. Gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio. Carril 1 marcador de peso molecular 100pb; carril 2 control positivo (UPEC); carril 3 aislamiento positivo al gen *yjaA*, carril 4 aislamiento negativo a ambos genes y carril 5,6 aislamientos positivos al gen *yjaA*.

6.3. Factores de virulencia

Mediante PCR se determinó la presencia de los genes de virulencia de los patotipos EPEC, ETEC, STEC y EIEC (*eae*, *stx1*, *stx2*, *rfbE_{O157}*, *fliC_{H7}*, *bfp*, *lt*, *st*, *ipaH*). El gen que se encontró con mayor frecuencia fue *st* en 28 (85%) aislamientos seguido del gen *stx2* en 26 (78%) de aislamientos positivos; con menor frecuencia el gen *lt* en 3 (9%) aislamientos, 2 (6%) aislamientos al gen *fliC_{H7}*, 1 (3%) al gen *stx1* y 1 (3%) al gen *eae* (**Figura 5-8**). El 100% de los aislamientos fueron negativos para los genes *bfpA*, *ipaH* y *rfbE_{O157}*.

Los 33 aislamientos presentaron una combinación de los genes analizados; en 16 aislamientos se observaron los genes *stx2* y *st*, en 2 aislamientos los genes *stx2+st* y *fliC_{H7}*, en 2 aislamientos los genes *stx2+st* y *lt*, 1 aislamiento con los genes *stx1+stx2* y *st*, 1 aislamiento los genes *stx2+st eae* y 1 aislamiento con los genes *stx2* y *lt*. En 6 aislamientos solo se presentó el gen *st* y 4 aislamientos al gen *stx2* (**Cuadro 6**). Los genes que con frecuencia se identificaron fueron *st* y *stx2*; el primero identifica el patotipo ETEC y el segundo al patotipo STEC.

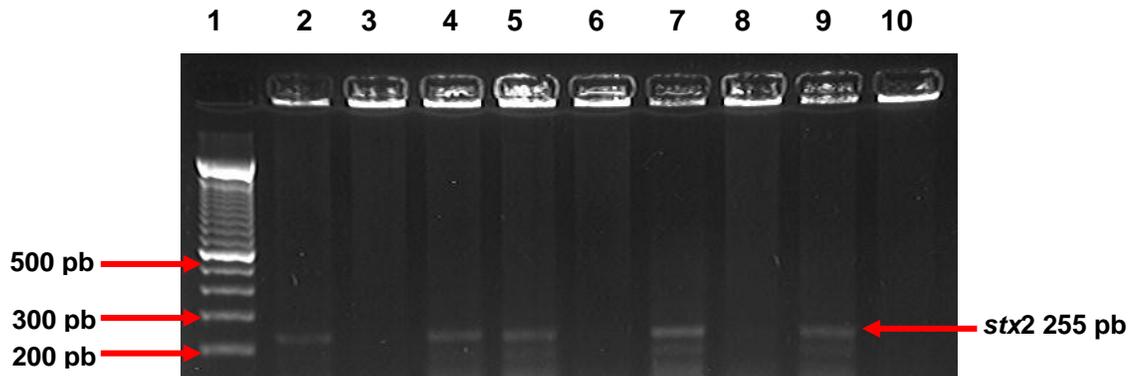


Figura 5. Fotografía que muestra la amplificación del gen *stx2*. Gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio. Carril 1 marcador de peso molecular 100pb; carril 2 control positivo O157:H7 (EHEC), carril 3 aislamiento negativo, carril 4,5 aislamientos positivos, carril 6 aislamiento negativo, carril 7 aislamiento positivo, carril 8 aislamiento negativo, carril 9 aislamiento positivo y carril 10 aislamiento negativo.

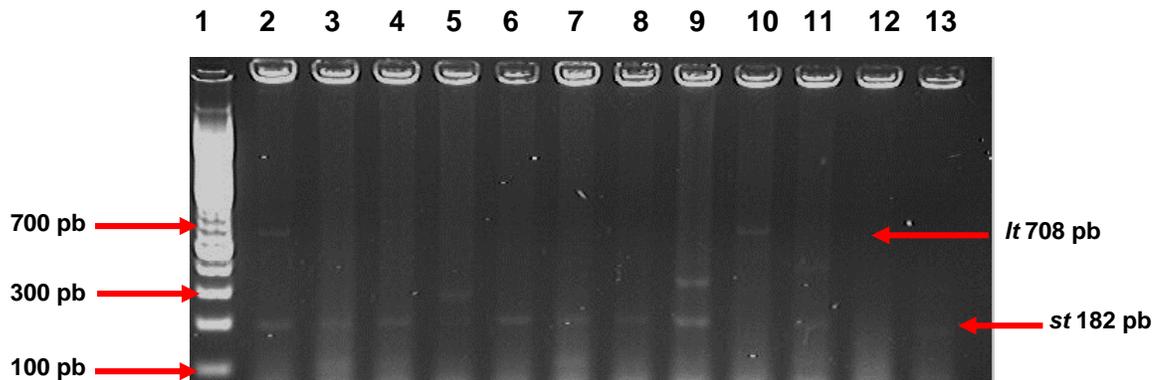


Figura 6. Fotografía que muestra la amplificación de los genes *It* y *st*. Gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio. Carril 1 marcador de peso molecular 100pb; carril 2 control positivo (ETEC), carril 3-9 aislamientos positivos al gen *st*, carril 10 aislamiento positivo al gen *It*, carril 11 aislamiento positivo al gen *st*, carril 12 aislamiento negativo, carril 8 aislamiento negativo, carril 9 aislamiento positivo y carril 10 aislamiento negativo.

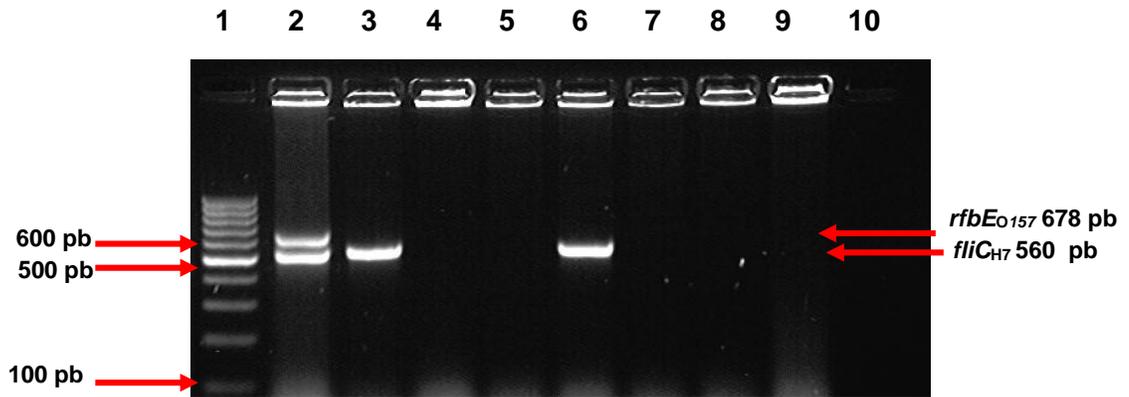


Figura 7. Fotografía que muestra la amplificación de los genes *rfbE₀₁₅₇* y *fliC_{H7}*. Gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio. Carril 1 marcador de peso molecular 100pb; carril 2 control positivo O157:H7 (EHEC); carril 3 aislamiento positivo al gen *fliC_{H7}*, carril 4-5 aislamientos negativos a ambos genes, carril 6 aislamiento positivo al gen *fliC_{H7}*, carril 7-9 aislamientos negativos a ambos genes y carril 10 control negativo.

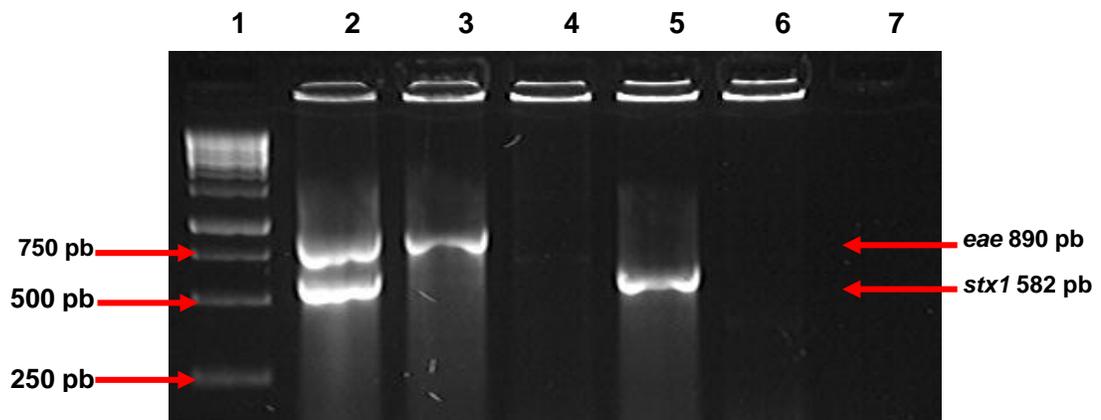


Figura 8. Fotografía que muestra la amplificación de los genes *eae* y *stx1*. Gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio. Carril 1 marcador de peso molecular 250 pb; carril 2 control positivo O157:H7 (EHEC); carril 3 aislamiento positivo al gen *stx1*, carril 4 aislamiento negativo para ambos genes, carril 5 aislamiento positivo al gen *eae*, carril 7 control negativo.

6.4. Serotipificación

Mediante la técnica de microaglutinación en placa se determinaron los antígenos somático (O) y flagelar (H). Los resultados mostraron que de los 33 aislamientos, 3 resultaron no tipificables, 5 correspondieron al serogrupo O25, 3 al O76, 3 al O166, 2 al O39, 2 al O3, 2 al O8 y se encontraron aislamientos positivos a los serotipos O4, O6, O7, O15, O22, O28ac, O48, O70, O86, O93, O140, O172 y O178.

Con respecto a los antígenos flagelares se obtuvo, 7 aislamientos fueron no móviles al no mostrar crecimiento flagelar, 5 aislamientos con H8, 3 aislamientos con H19, 3 aislamientos con H49, 2 aislamientos con H21, 2 aislamientos con H42, 2 aislamientos con H2 y se encontraron aislamientos positivos a los siguientes antígenos flagelares H4, H7, H9, H10, H11, H18, H23, H28 y H41.

El serotipo O25:H8 se presentó en 5 (15%) aislamientos, 2 (6%) aislamientos pertenecieron al serotipo O39:H49 y 26 serotipos más fueron encontrados solo en un aislamiento (ONT:NM, ONT:H2, ONT:H9, O3:H18, O3:H19, O4:H10, O6:H49, O7:H41, O8:H19, O8:H21, O15:H11, O22:H2, O28ac:H42, O48:H7, O70:H-, O76:H-, O76:H4, O76:H19, O86: H-, O93: H-, O140:H-, O166:H21, O166:H28, O166:H42, O172:H23 y O178: H-) (**cuadro 5**).

Cuadro 5. Resultados globales del análisis sobre grupos filogenéticos, factores de virulencia y serotipificación de los 33 aislados de *E. coli* en diarreas de cabritos.

Aislamiento	Grupos Filogenetico	<i>eae</i>	<i>stx1</i>	<i>stx2</i>	<i>rfbE</i>	<i>fliC</i>	<i>bfp</i>	<i>st</i>	<i>lt</i>	Serotipo
1	B1		+	+				+		NT:H2
2	B2			+				+		O166:H28
3	B1							+		O25:H8
4	B1							+		O25:H8
5	B1			+		+		+		O48:H7
6	D			+				+		O93:H-
7	B2			+				+		O86:H-
8	B2			+					+	O166:H42
9	A							+		O39:H49
10	B2			+						O76:H4
11	B1			+				+		O8:H21
12	B2			+						O6:H49
13	B2			+				+		O3:H19
14	B1			+				+		O22:H2
15	B1			+				+		O4:H10
16	B1							+		O172:H23
17	B1			+				+		O76:H-
18	B2			+				+		O140:H-
19	B1			+				+	+	O8:H19
20	B1	+		+				+		O76:H19
21	B1			+				+		O166:H21

22	B2			+			+	O3:H18	
23	D			+			+	NT:H-	
24	A			+				O39:H49	
25	D			+			+	O25:H8	
26	D			+			+	O25:H8	
27	B1			+		+	+	O178: H-	
28	D			+			+	O25:H8	
29	B2			+				NT:H9	
30	B1			+			+	O28ac:H42	
31	A			+			+	+	O70: H-
32	A						+		O15:H11
33	A						+		O7:H41

NT: No tipificable

H-: No móvil

6.5 Resultados generales de grupos filogenéticos, factores de virulencia, serotipificación y MIC.

Integrando la información obtenida de las técnicas realizadas de los 33 aislamientos, se observó la correlación entre los diferentes resultados de cada aislamiento, los aislamientos del grupo filogenético de B2, D presentaron genes de virulencia (*st*, *lt*, *stx2*); los aislamientos con los grupos filogenéticos B1, A mostraron los genes de virulencia *st*, *lt*, *stx1*, *stx2*, *eae* y *fliC_{H7}* (**cuadro 6**). Se pudo observar que las que se han reportado como patógenas intestinales (B1/A) presentaron mayor combinación de genes de virulencia.

Estableciendo una relación de la resistencia y susceptibilidad a los quimioterapéuticos, se observó que los dos aislamientos que pertenecieron al grupo filogenético B2 mostraron resistencia a más de tres antibióticos y 7 mostraron ser susceptibles; los aislamientos que pertenecieron al grupo filogenético A y D fueron susceptibles a los 21 quimioterapéuticos. En cuanto al grupo filogenético B1 solamente un aislamiento mostro resistencia a más de un quimioterapéutico y 13 mostraron ser susceptibles.

El 63.63% (21/33) de los aislamientos presentaron una combinación de los genes de virulencia *st* y *stx2*, donde se distribuyó en los diferentes grupos filogenéticos.

Cuadro 6. Relación de resultados en genes de virulencia, grupos filogenéticos y resistencia a quimioterapéuticos.

Genes de Virulencia	Grupos filogenéticos			
	B1	A	B2	D
<i>stx2</i>	10	2	9	5
<i>stx1</i>	1			
<i>eae</i>	1			
<i>st</i>	14	4	5	5
<i>lt</i>	1	1	1	
Resistencia	1		2	

7. DISCUSIÓN

En el presente trabajo se aisló *Escherichia coli* a partir de muestras de diarreas de cabritos, para determinar los genes de virulencia, así como los grupos filogenéticos, serotipos y sensibilidad a quimioterapéuticos.

Los resultados obtenidos en la sensibilidad demostraron que 30 aislamientos fueron sensibles a los 21 quimioterapéuticos utilizados; sin embargo al menos 3 cepas presentaron resistencia a más de un quimioterapéutico, los cuales fueron la ampicilina/sulbactam, ampicilina, gentamicina, piperacilina, tobramicina, trimetoprim/sulfametoxazol, amikacina y piperacilina; la resistencia a estos quimioterapéuticos se ha reportado en un estudio realizado por Schroeder *et al.*, 2002, en humanos y animales, donde observaron que más del 50% de los aislados de *E. coli* fueron resistentes a uno o más antimicrobianos tales como las penicilinas, sulfonamidas y aminoglucósidos (100); datos similares se obtuvieron en estudio realizado por Verdier *et al.*, 2012, en terneros con diarrea, donde el 20.6% presentó multiresistencia a la estreptomina, sulfonamidas y a las tetraciclinas (101); datos similares fueron reportados por Pena *et al.*, 2004, donde el 88% presentó resistencia a las sulfonamidas y el 85% a las tetraciclinas, en heces de cerdos clínicamente sanos (102); estos resultados difieren a los obtenidos en el presente estudio, donde no se obtuvo cepas multiresistentes a estos grupos de antimicrobianos, la escasa resistencia que se obtuvo en el presente estudio, podría deberse a la edad del cabrito ya que solo tenía entre 3 y 7 días de nacidos cuando se tomaron las muestras y que la resistencia mostrada en algunos de estos quimioterapéuticos podría deberse a que la madre le transfirió cepas resistentes a las crías.

Los antimicrobianos más utilizados para tratamientos de infecciones causadas por *E. coli* en humanos y animales son las penicilinas, sulfonamidas, tetraciclinas y los aminoglucósidos (100, 103-105); sin embargo la resistencia es causada principalmente por el uso inadecuado e irracional de estos antimicrobianos, esto ha

permite a que existan fenotipos resistentes a múltiples antimicrobianos lo cual tiene como base a integrones y plásmidos (100, 106, 107).

Con relación a los grupos filogenéticos, se observó que el filo-grupo B1 fue el más frecuente con un 42.42%, seguido del B2 en un 27.27%, y en menor medida los filogrupos A y D con un 15.15%; estos resultados concuerdan con los reportados en un estudio realizado por Gordon *et al.*, 2003, en Australia, donde encontraron que la mayoría de las cepas de *E. coli* responsables de infecciones intestinales en mamíferos se asocian a los grupos filogenéticos B1 y A y en menor frecuencia con el D (70), datos similares fueron reportados por Russo *et al.*, 2000 y Escobar-Páramo *et al.*, 2006, donde observaron que las cepas patógenas pertenecen principalmente a los grupos filogenéticos A, B1 y D (108, 109), estos resultados concuerdan con los reportados por Dixit *et al.*, 2004, donde observaron que las cepas de *E. coli* aisladas de diferentes regiones del intestino de los cerdos pertenecían a los grupos filogenéticos A y B1 (110).

Asimismo, en un estudio realizado por Rugules *et al.*, 2010, señalan que el 50% de los aislamientos procedentes de diarrea en niños, que se clasificaron en *E. coli* perteneció a los grupos B1-A y el otro 50% al B2-D (75), datos similares se observaron en el presente estudio, en un 57% (19/33) de los aislamientos perteneció al grupo B1-A, y el 42% al B2-D; de acuerdo a la ubicación de cepas patógenas intestinales en los 4 diferentes filogrupos nuestros resultados muestran que la mayoría de nuestras cepas se encuentran en los filogrupos B1 y B2 correspondientes a los grupos patógenos (70%), un 15% en el filogrupo D que incluye aislamientos de origen patógeno intestinal y ambiental y en menor porcentaje un 15% de aislamientos en el filogrupo A, de origen comensal, sin embargo algunas cepas del patotipo ETEC se han ubicado en este grupo. Existen reportados diversos datos que indican que las cepas de *E. coli* procedentes de diarreas de mamíferos están frecuentemente relacionada con base a la zona geográfica, la dieta, la masa corporal y el clima (7, 70, 109).

En estudios realizados (71, 75, 76, 111) en la identificación de los grupos filogenéticos en cepas extra-intestinales, están frecuentemente representados por el grupo B2, las cepas del presente trabajo se ubicaron en un 27% en este grupo, esta situación se atribuye en general al posible origen de las cepas extraintestinales, donde se señala que proceden del recto (7, 70), asimismo se demuestra que la adquisición de genes de virulencia o de otro tipo se debe a una característica muy importante de *E. coli*, la plasticidad del genoma (7).

Por otro lado, se realizó la detección de diferentes genes de virulencia que son marcadores de los diversos patotipos intestinales de *E. coli* (*stx1*, *stx2*, *eae*, *lt*, *st*, *bfp* e *ipaH*). El gen *st* se presentó en un 84.84% (28/33) de los aislamientos; datos similares fueron reportados por Do *et al.*, 2006, en Vietnam, donde se observó el gen *st* en un 92%, en lechones con diarrea en la etapa del pre-destete (115); datos similares fueron reportados por Vu-Khac *et al.*, 2007, en Eslovaquia, en cerdos con diarrea, donde el gen *st* se observó en un 49% (123/250) (112); estos datos difiere por lo obtenido por Bandyopadhyay *et al.*, 2011, en corderos con diarrea, donde el gen *st* se observó en un 18% (4/22) (93).

Las cepas de ETEC se reconocieron por primera vez como una causa de la enfermedad diarreaica en animales, especialmente en lechones y terneros, donde la enfermedad sigue causando una infección letal en los animales recién nacidos (37, 113, 114).

El gen *stx2* se presentó en un 78.78% (26/33) de los aislamientos, datos similares fueron reportados por Sánchez *et al.*, 2009, en España, donde se encontró un 67.7% (44/65) en cepas procedentes de rumiantes (116), así como un estudio realizado en el 2010 donde se reportó un 69.6% (32/46) en cepas de rumiantes (ovinos, bovinos y venados) (117).

En el presente estudio el gen *lt* se presentó en el 9% (3/33) de los aislamientos, datos similares fueron reportados por Nguyen *et al.*, 2011, en bovinos con diarrea, donde se observó en menos del 1% (2/345) (81); estos datos no concuerdan con

los obtenidos por Frydendahl, K., 2002, en lechones con diarrea de 4 a 6 semana de edad, donde el gen *lt* se observó en un 61.6 (135/219) (118).

Los genes *eae* y *stx1* se encontraron con una frecuencia del 3% (1/33), estos resultados concuerdan con los reportados por DebRoy *et al.*, 2006 y Kistler *et al.*, 2011, donde obtuvo una frecuencia del 3% (2/69) en cabras clínicamente sanas (98) y en un 8% (4/50) en venados de cola blanca clínicamente sanos en Pensilvania (51).

En un estudio realizado por Fegan *et al.*, 1999, observaron que los aislamientos procedentes de pequeños rumiantes rara vez presentan el gen *eae* (119); estos datos concuerdan con obtenidos en el presente estudio ya que solo se obtuvo un aislamiento de este gen; sin embargo en un estudio reportado por Rivera *et al.*, 2012, en Perú, el gen *stx1* se presentó en todos los aislamientos de bovinos y en ninguno de cerdos (54).

En estudios realizados por Wieler *et al.*, 1996 (120) y Mainil *et al.*, 2005 (121) han demostrado que la mayoría de los terneros con diarrea sólo producen la toxina Stx1, mientras que las cepas positivas a la toxina Stx2 se encuentran en terneros sanos, datos similares reportados por Taylor *et al.*, 2011, en bovinos clínicamente sanos, el 6% fueron positivos al gen *stx1* y el 44,7% al gen *stx2* (122); esto difiere a lo reportado por Wani *et al.*, 2006, en la India, en cabras sanas, donde se obtuvo en 28 aislamientos positivos al gen *stx1* y en 5 aislamientos al gen *stx2* (123); estos estudios difieren a lo obtenido en el presente estudio ya que el gen *stx1* se observó en un solo aislamiento y el gen *stx2* en 26 aislamientos.

Estudios epidemiológicos y experimentales en humanos indican que la presencia de la toxina Stx2 está estrechamente relacionada con la gravedad de las infecciones tales como la aparición del daño neurológico y SUH (46, 124), la cual se han encontrado en la microbiota de una amplia variedad de animales, incluyendo vacas, ovejas, cabras, cerdos, gatos, perros, conejos, pavos, gallinas y gaviotas (19, 125, 126). Las especies animales más importantes en términos de infección humana son

los rumiantes, cerdos y aves (19); en rebaños bovinos se ha encontrado las tasas más altas de colonización en muchos países (55, 127) y en cabras en un 75% (128). Los estudios realizados en cabras proporciona un rango entre 10% -50% que poseen algunos de los genes *stx1* y *stx2* (123, 129, 130). La detección de *stx2* en mayor proporción en el presente estudio puede ser una gran preocupación para los cuidadores de animales o pastores de ovejas como se informó *stx2* estar intrincadamente relacionados con enfermedades humanas terribles como síndrome urémico hemolítico.

Estudios realizados por Cortes *et al.*, 2005, Orden *et al.*, 2003 y Blanco *et al.*, 1996 en España en la prevalencia de STEC, fue del 2.5% (1/40) (129), 5.9% (1/17) (131) y 13.6% (6/44) (132), en muestras de diarreas en cabritos y corderos; estos datos difieren a los obtenidos en el presente estudio ya que en base a la serología y genes de virulencia se obtuvo una prevalencia del 52% en los aislamientos; datos similares se obtuvieron en un estudio realizado por Zschock *et al.*, 2000, en Alemania en cabras del 75.3% (70/93) y ovinos del 32.1% (9/28) (128).

Para el caso de los genes *bfp* e *ipaH*, el 100% de los aislamientos fueron negativos. La adhesina BFP contribuye a la unión de las bacterias a las células eucariotas, pero no parece ser necesario para causar la enfermedad en los seres humanos. De hecho, las cepas EPEC (que no portan el gen *bfp*) están cada vez más implicadas en brotes de diarrea en los países tanto desarrollados como en vías de desarrollo, sin embargo parece ser específica principalmente en las cepas aisladas de seres humanos (20), esta especificidad podría explicar el hecho de no haber encontrado aislamientos positivos a este gen. El plásmido de invasión (*ipaH*) se encuentra presente en especies de *Shigella* y cepas EIEC (61); en un estudio realizado por Rivera *et al.*, 2012, en Perú, en bovinos y cerdos, 100% de los aislamientos fueron negativos a este gen (54).

En el presente estudio el 57% de los aislamientos en cabritos fueron positivos a serotipos del patotipo STEC, obteniendo los siguientes serogrupos: O3, O4, O22,

O48, O70, O76, O86, O93, O140, O172 y O178; el 33% se clasificó en ETEC con los siguientes serogrupos O6, O7, O8, O15, O25 y O166; el 6% en EPEC con el serogrupo O39 y un 3% en EIEC en el O28ac. De estos serogrupos el O25 y O15 se han visto involucrados como causa de diarrea en corderos y bovinos (5, 93, 133); el serogrupo O8 se ha identificado en muestras de heces de venados (116).

En el presente estudio los serotipos O25:H8 y O39:H49 se identificaron con mayor frecuencia (15% y 6%), de los cuales no han sido reportados en animales. En estudios realizados en la identificación de los serotipos de *E. coli*, indican que podrían ser específicos por especies animales, por ejemplo: en ovinos se han reportado una gran variedad de serotipos los más frecuentes son: O5:H-, O91: H-, O117:H-, O123:H-, O128:H2, O146:H8 y O146:H21 (131, 134-137); en bovinos el O77: H18, O79: H14, O88: H25, O98: H17, O113:H21 y O178: H19 (138); en lechones el O8: H-, O8:H19, O54: H-, O84: H7, O101: H-, O141: H-, O141: H4, O147: H-, O149: H10, O163: H-, y la NT: H- (112); de los serotipos reportados en estas especies, solamente se identificó en un aislamiento el O8:H19.

En el presente estudio los aislamientos con genes del patotipo ETEC se clasificaron con mayor frecuencia (84.84%), seguida del patotipo STEC no-O157 (78.78%). Las cepas STEC no-O157 son más frecuentes en los animales y en la contaminación de los alimentos, probablemente los humanos está más expuesto a estas cepas (48, 54, 139), existe variación en el potencial de virulencia de los serotipos de STEC, y muchos pueden no ser patógenos. De los más de 400 serotipos aislados, al menos 10 serotipos causan la mayoría de las enfermedades relacionadas con STEC en humanos (48). En estudios realizados se estima que del 20 al 50% de todas las infecciones por STEC puede atribuirse a los serotipos STEC no -O157, pero los porcentajes difieren mucho de un país a otro y entre regiones dentro de un mismo país (8, 10, 140). Se estima que al menos el 10% de los casos de SUH en América del Norte son causadas por cepas no-O157 (48, 140), en Alemania, Italia y el Reino Unido, se estima que han causado entre un 10 a 30% de los casos esporádicos de síndrome urémico hemolítico (19), en Estados Unidos causa al menos 37,000 casos

al año (20, 47, 141), en Europa, Argentina, Australia, Chile y Sudáfrica, infecciones causadas por STEC no-O157 son tan frecuentes (8, 142). Varios factores de virulencia están involucrados en la patogenicidad de STEC no-O157; la presencia combinada de ambos genes *eae* y *stx* se ha asociado con mayor virulencia (47, 48); en el presente estudio no se obtuvo esta combinación de genes, lo que nos podría indicar que la presencia de la toxina shiga es parte de la microbiota normal y no es la causa de diarrea en esta especie.

Su modo transmisión de STEC para el ser humano es la ingestión de alimentos como son la carne cruda o mal cocida, mariscos, leche cruda, quesos, agua, frutas y verduras contaminados con heces de rumiantes (69); es importante preservar la inocuidad de los alimentos, en distintos países se han realizado estudios para identificar la presencia de este patotipo. En un estudio realizado por Samadpour *et al.*, 1994, en Estados Unidos analizaron la frecuencia de los genes *stx1* y *stx2*, se observó en un 17% (50/294) de muestras de carne fresca (aves, pescados y mariscos) (143); estos datos difieren a lo obtenido en Francia, Pradel *et al.*, 2000, donde se observó que el 15% (34/220) eran portadoras del gen *stx1*, el 53% (116/220) eran portadoras del gen *stx2* (144); es importante tomar medidas en tema de inocuidad de los alimentos y que con esto se puedan reducir la incidencia, sería de gran importancia operar rastros de modo que se reduzca al mínimo la contaminación de la carne con materia fecal.

En un estudio realizado por Blanco *et al.*, 1991, en cerdos, observaron que los serogrupos O6, O8, O15 y O25 pertenecieron al patotipo ETEC presentando una combinación de las toxinas termolábil y termoestable (145); en el 2011 un estudio realizado por Bandyopadhyay *et al.*, en la India, en corderos con diarrea, observaron que algunos serogrupos de *E. coli* como el O2, O8, O25, O30, O60, O113, O120, O127 y O159 poseían genes de virulencia tanto para la toxina Shiga y toxina termoestable (STEC y ETEC) (93); resultados similares se observaron en el presente estudio, los serogrupos O25 y O8 presentaron una combinación de los factores de virulencia de dos patotipos (ETEC y STEC).

En el presente estudio el 63.63% (21/33) de los aislamientos presentaron la combinación de los genes de virulencia *st* y *stx2*, cada uno de estos caracterizan a patotipos distintos, esto podría indicarnos que se deba a la presencia de cepas híbridas. Hasta el momento no podemos clasificar a que patotipo pertenecen estas cepas, debido a que estas presentan factores de virulencia específicos que caracterizan a dos patotipos distintos, aunque cabe señalar que los serotipos obtenidos se han reportado en distintos estudios que pertenecen a los patotipos de las ETEC y STEC (8, 146, 147). Es importante señalar que estos genes se encuentran codificados en elementos móviles genéticos (bacteriófago y plásmido) (11, 148), lo cual esto podría permitir que se encuentre cada vez más serotipos con esta combinación de genes.

No existen estudios que identifique a *E. coli* diarrogénicas en cabritos, donde se clasifique los serotipos con su patotipo correspondiente y al mismo tiempo identifique factores de virulencia los cuales presentan una combinación de genes que caracterice otro, los estudios que existen solo se basan en la identificación de uno o dos patotipos, utilizando principalmente los genes que los caracterizan o identifican los serotipos y así es como los clasifican en algún patotipo.

El presente estudio representa el primer trabajo de caracterización de cepas de *E. coli* diarrogénicas en cabritos, realizado en México, sin embargo es necesario realizar más estudios para comprobar el patotipo de los aislamientos por medio de la detección de mayor número de genes de virulencia y citotoxicidad en células. Esto nos permitirá caracterizar el patotipo presente y verificar si es una cepa híbrida, además nos permitirá conocer el potencial de virulencia de las cepas.

8. CONCLUSIONES

- Este es el primer trabajo de *E. coli* diarrogénicas en cabritos con diarrea realizado en México donde se determinaron los grupos filogenéticos, sensibilidad a quimioterapéuticos, genes de virulencia y serotipificación.
- Se observó escasa resistencia a los quimioterapéuticos utilizados, esto podría deberse a que en las unidades de producción muestreadas no administran tratamientos a las infecciones que se presentan, debido a que pertenecen a un sector de escasos recursos.
- Las cepas aisladas de *E. coli* de diarrea de cabritos, presentan un alto potencial patógeno y pertenecieron principalmente al grupo filogenético B1 presentando los genes de virulencia de *st*, *stx2*, *stx1*, *eae* y *lt*.
- Los resultados obtenidos en este estudio muestran que los aislamientos de cabritos con diarrea, presentaron una combinación de los genes *st* y *stx2* que caracterizan a dos patotipos distintos como es el ETEC y STEC, el primer gen indica ser la principal causa de diarrea y el segundo es parte de la microbiota normal en el intestino de esta especie, este último podría ser un riesgo para la salud de los humanos debido a que este se ha identificado que juega un papel importante en que se desencadene el síndrome urémico hemolítico.

9. REFERENCIAS

1. Producción anual de leche en caprinos [database on the Internet]. Citado en Diciembre del 2012. En línea:
http://www.campomexicano.gob.mx/portal_siap/Integracion/EstadisticaBasica/Pecuario/Estacionalidad/Nacional/lcaprino.pdf. 2008.
2. Producción anual en carne de caprinos [database on the Internet]. Citado en Diciembre del 2012. En línea:
<http://www.sagarpa.gob.mx/ganaderia/Publicaciones/Lists/Programa%20Nacional%20Pecuario/Attachments/1/PNP260907.pdf>. 2008.
3. Programa Nacional Pecuario [database on the Internet]. Citado en Diciembre del 2012. En línea:
<http://www.sagarpa.gob.mx/ganaderia/Publicaciones/Lists/Programa%20Nacional%20Pecuario/Attachments/1/PNP260907.pdf>. 2012.
4. Muñoz M, Álvarez M, Lanza I, Carmenes P. Role of enteric pathogens in the aetiology of neonatal diarrhoea in lambs and goat kids in Spain. *Epidemiol Infect* 1996 Aug;117(1):203-11.
5. Gyles CL, Fairbrother JM. *Escherichia coli*. Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals: Blackwell; 2010. p. 267-308.
6. Momtaz H, Farzan R, Rahimi E, Safarpour Dehkordi F, Souod N. Molecular Characterization of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Isolated from Ruminant and Donkey Raw Milk Samples and Traditional Dairy Products in Iran. *ScientificWorldJournal* 2012;2012:231342.
7. Tenailon O, Skurnik D, Picard B, Denamur E. The population genetics of commensal *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol* 2010 Mar;8(3):207-17.
8. Nataro JP, Kaper JB. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev* 1998 Jan;11(1):142-201.
9. Sabarly V, Bouvet O, Glodt J, Clermont O, Skurnik D, Diancourt L, de Vienne D, Denamur E, Dillmann C. The decoupling between genetic structure and metabolic

phenotypes in *Escherichia coli* leads to continuous phenotypic diversity. J Evol Biol 2011 Jul;24(7):1559-71.

10. Croxen MA, Finlay BB. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. Nat Rev Microbiol 2010 Jan;8(1):26-38.

11. Kaper JB, Nataro JP, Mobley HL. Pathogenic *Escherichia coli*. Nat Rev Microbiol 2004 Feb;2(2):123-40.

12. Duriez P, Clermont O, Bonacorsi S, Bingen E, Chaventre A, Elion J, Picard B, Denamur E. Commensal *Escherichia coli* isolates are phylogenetically distributed among geographically distinct human populations. Microbiology 2001 Jun;147(Pt 6):1671-6.

13. Khan MA, Steiner TS. Mechanisms of Emerging Diarrheagenic *Escherichia coli* Infection. Curr Infect Dis Rep 2002 Apr;4(2):112-7.

14. Rasko DA, Rosovitz MJ, Myers GS, Mongodin EF, Fricke WF, Gajer P, Crabtree J, Sebahia M, Thomson NR, Chaudhuri R, Henderson IR, Sperandio V, Ravel J. The pangenome structure of *Escherichia coli*: comparative genomic analysis of *E. coli* commensal and pathogenic isolates. J Bacteriol 2008 Oct;190(20):6881-93.

15. Johnson JR, Stell AL. Extended virulence genotypes of *Escherichia coli* strains from patients with urosepsis in relation to phylogeny and host compromise. J Infect Dis 2000 Jan;181(1):261-72.

16. Johnson JR, Russo TA. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: "the other bad *E. coli*". J Lab Clin Med 2002 Mar;139(3):155-62.

17. Hernandez RT, Elias WP, Vieira MA, Gomes TA. An overview of atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. FEMS Microbiol Lett 2009 Aug;297(2):137-49.

18. Bugarel M, Martín A, Fach P, Beutin L. Virulence gene profiling of enterohemorrhagic (EHEC) and enteropathogenic (EPEC) *Escherichia coli* strains: a basis for molecular risk assessment of typical and atypical EPEC strains. BMC Microbiol 2011;11:142.

19. Caprioli A, Morabito S, Brugere H, Oswald E. Enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: emerging issues on virulence and modes of transmission. *Vet Res* 2005 May-Jun;36(3):289-311.
20. Bardiau M, Szalo M, Mainil JG. Initial adherence of EPEC, EHEC and VTEC to host cells. *Vet Res* 2010 Sep-Oct;41(5):57.
21. Carvalho VM, Gyles CL, Ziebell K, Ribeiro MA, Catao-Dias JL, Sinhorini IL, Otman J, Keller R, Trabulsi LR, Pestana de Castro AF. Characterization of monkey enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) and human typical and atypical EPEC serotype isolates from neotropical nonhuman primates. *J Clin Microbiol* 2003 Mar;41(3):1225-34.
22. Doughty S, Sloan J, Bennett-Wood V, Robertson M, Robins-Browne RM, Hartland EL. Identification of a novel fimbrial gene cluster related to long polar fimbriae in locus of enterocyte effacement-negative strains of enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Infect Immun* 2002 Dec;70(12):6761-9.
23. Krause G, Zimmermann S, Beutin L. Investigation of domestic animals and pets as a reservoir for intimin- (*eae*) gene positive *Escherichia coli* types. *Vet Microbiol* 2005 Mar 20;106(1-2):87-95.
24. Blanco JE, Blanco M, Blanco J, Mora A, Balaguer L, Mourino M, Juárez A, Jansen WH. O serogroups, biotypes, and *eae* genes in *Escherichia coli* strains isolated from diarrheic and healthy rabbits. *J Clin Microbiol* 1996 Dec;34(12):3101-7.
25. Cid D, Ruiz-Santa-Quiteria JA, Marin I, Sanz R, Orden JA, Amils R, de la Fuente R. Association between intimin (*eae*) and *EspB* gene subtypes in attaching and effacing *Escherichia coli* strains isolated from diarrhoeic lambs and goat kids. *Microbiology* 2001 Aug;147(Pt 8):2341-53.
26. Blanco M, Blanco JE, Dahbi G, Mora A, Alonso MP, Varela G, Gadea MP, Schelotto F, González EA, Blanco J. Typing of intimin (*eae*) genes from enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) isolated from children with diarrhoea in Montevideo, Uruguay: identification of two novel intimin variants (*muB* and *xiR/beta2B*). *J Med Microbiol* 2006 Sep;55(Pt 9):1165-74.

27. DeVinney R, Puente JL, Gauthier A, Goosney D, Finlay BB. Enterohaemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli* use a different Tir-based mechanism for pedestal formation. *Mol Microbiol* 2001 Sep;41(6):1445-58.
28. Denamur E. The 2011 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O104:H4 German outbreak: a lesson in genomic plasticity. *Clin Microbiol Infect* 2011 Aug;17(8):1124-5.
29. Chaudhuri RR, Sebahia M, Hobman JL, Webber MA, Leyton DL, Goldberg MD, Cunningham AF, Scott-Tucker A, Ferguson PR, Thomas CM, Frankel G, Tang CM, Dudley EG, Roberts IS, Rasko DA, Pallen MJ, Parkhill J, Nataro JP, Thomson NR, Henderson IR. Complete genome sequence and comparative metabolic profiling of the prototypical enteroaggregative *Escherichia coli* strain 042. *PLoS One* 2010;5(1):e8801.
30. Malik A, Toth I, Nagy B. Colonisation of conventional weaned pigs by enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) and its hazard potential for human health. *Acta Vet Hung* 2012 Sep;60(3):297-307.
31. Gunzburg ST, Tornieporth NG, Riley LW. Identification of enteropathogenic *Escherichia coli* by PCR-based detection of the bundle-forming pilus gene. *J Clin Microbiol* 1995 May;33(5):1375-7.
32. Mainil J. *Escherichia coli* virulence factors. *Vet Immunol Immunopathol* 2013 Mar 15;152(1-2):2-12.
33. Fujioka M, Kasai K, Miura T, Sato T, Otomo Y. Rapid diagnostic method for the detection of diarrheagenic *Escherichia coli* by multiplex PCR. *Jpn J Infect Dis* 2009 Nov;62(6):476-80.
34. DebRoy C, Maddox CW. Identification of virulence attributes of gastrointestinal *Escherichia coli* isolates of veterinary significance. *Anim Health Res Rev* 2001 Dec;2(2):129-40.
35. Lundkvist J, Steffen R, Jonsson B. Cost-benefit of WC/rBS oral cholera vaccine for vaccination against ETEC-caused travelers' diarrhea. *J Travel Med* 2009 Jan-Feb;16(1):28-34.

36. Paschke C, Apelt N, Fleischmann E, Perona P, Walentiny C, Loscher T, Herbinger KH. Controlled study on enteropathogens in travellers returning from the tropics with and without diarrhoea. *Clin Microbiol Infect* 2011 Aug;17(8):1194-200.
37. Mazariego-Espinosa K, Cruz A, Ledesma MA, Ochoa SA, Xicohtencatl-Cortes J. Longus, a type IV pilus of enterotoxigenic *Escherichia coli*, is involved in adherence to intestinal epithelial cells. *J Bacteriol* 2010 Jun;192(11):2791-800.
38. Al-Majali AM, Ababneh MM, Shorman M, Saeed AM. Interaction of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin (STa) with its putative receptor on the intestinal tract of newborn kids. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2007 Feb;49(1):35-40.
39. Hur J, Lee KM, Lee JH. Age-dependent competition of porcine enterotoxigenic *E. coli* (ETEC) with different fimbria genes - short communication. *Acta Vet Hung* 2011 Dec;59(4):411-7.
40. Roubos-van den Hil PJ, Nout MJ, Beumer RR, van der Meulen J, Zwietering MH. Fermented soya bean (tempe) extracts reduce adhesion of enterotoxigenic *Escherichia coli* to intestinal epithelial cells. *J Appl Microbiol* 2009 Mar;106(3):1013-21.
41. Bisi-Johnson MA, Obi CL, Vasaikar SD, Baba KA, Hattori T. Molecular basis of virulence in clinical isolates of *Escherichia coli* and *Salmonella* species from a tertiary hospital in the Eastern Cape, South Africa. *Gut Pathog* 2011;3(1):9.
42. Sherlock O, Vejborg RM, Klemm P. The TibA adhesin/invasin from enterotoxigenic *Escherichia coli* is self recognizing and induces bacterial aggregation and biofilm formation. *Infect Immun* 2005 Apr;73(4):1954-63.
43. Mohawk KL, O'Brien AD. Mouse models of *Escherichia coli* O157:H7 infection and shiga toxin injection. *J Biomed Biotechnol* 2011;2011:258185.
44. Dean-Nystrom EA, Melton-Celsa AR, Pohlenz JF, Moon HW, O'Brien AD. Comparative pathogenicity of *Escherichia coli* O157 and intimin-negative non-O157 Shiga toxin-producing *E coli* strains in neonatal pigs. *Infect Immun* 2003 Nov;71(11):6526-33.

45. Silagyi K, Kim SH, Lo YM, Wei CI. Production of biofilm and quorum sensing by *Escherichia coli* O157:H7 and its transfer from contact surfaces to meat, poultry, ready-to-eat deli, and produce products. *Food Microbiol* 2009 Aug;26(5):514-9.
46. Nishikawa K. Recent progress of Shiga toxin neutralizer for treatment of infections by Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 2011 Aug;59(4):239-47.
47. Brooks JT, Sowers EG, Wells JG, Greene KD, Griffin PM, Hoekstra RM, Strockbine NA. Non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections in the United States, 1983-2002. *J Infect Dis* 2005 Oct 15;192(8):1422-9.
48. Mathusa EC, Chen Y, Enache E, Hontz L. Non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in foods. *J Food Prot* 2010 Sep;73(9):1721-36.
49. Barkocy-Gallagher GA, Arthur TM, Siragusa GR, Keen JE, Elder RO, Laegreid WW, Koochmaraie M. Genotypic analyses of *Escherichia coli* O157:H7 and O157 nonmotile isolates recovered from beef cattle and carcasses at processing plants in the Midwestern states of the United States. *Appl Environ Microbiol* 2001 Sep;67(9):3810-8.
50. Bentancor A, Rumi MV, Gentilini MV, Sardoy C, Irino K, Agostini A, Cataldi A. Shiga toxin-producing and attaching and effacing *Escherichia coli* in cats and dogs in a high hemolytic uremic syndrome incidence region in Argentina. *FEMS Microbiol Lett* 2007 Feb;267(2):251-6.
51. Kistler WM, Mulugeta S, Mauro SA. Detection of *stx* and *stx* Genes in Pennsylvanian White-Tailed Deer. *Toxins (Basel)* 2011 Jun;3(6):640-6.
52. Kagambega A, Martikainen O, Siitonen A, Traore AS, Barro N, Haukka K. Prevalence of diarrheagenic *Escherichia coli* virulence genes in the feces of slaughtered cattle, chickens, and pigs in Burkina Faso. *Microbiologyopen* 2012 Sep;1(3):276-84.
53. Borriello G, Lucibelli MG, De Carlo E, Auriemma C, Cozza D, Ascione G, Scognamiglio F, Iovane G, Galiero G. Characterization of enterotoxigenic *E. coli* (ETEC), Shiga-toxin producing *E. coli* (STEC) and necrotoxigenic *E. coli* (NTEC)

isolated from diarrhoeic Mediterranean water buffalo calves (*Bubalus bubalis*). Res Vet Sci 2012 Aug;93(1):18-22.

54. Rivera FP, Sotelo E, Morales I, Menacho F, Medina AM, Evaristo R, Valencia R, Carbajal L, Ruiz J, Ochoa TJ. Short communication: Detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) in healthy cattle and pigs in Lima, Peru. J Dairy Sci 2012 Mar;95(3):1166-9.

55. Karmali MA, Gannon V, Sargeant JM. Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC). Vet Microbiol 2010 Jan 27;140(3-4):360-70.

56. Dhanashree B, Mallya PS. Detection of shiga-toxigenic *Escherichia coli* (STEC) in diarrhoeagenic stool & meat samples in Mangalore, India. Indian J Med Res 2008 Sep;128(3):271-7.

57. EFSA. EFSA publishes scientific report on the public health risk of Shiga-toxin producing *Escherichia coli* (STEC) in fresh vegetables. Euro Surveill 2011;16(23).

58. Sasaki Y, Tsujiyama Y, Kusukawa M, Murakami M, Katayama S, Yamada Y. Prevalence and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 and O26 in beef farms. Vet Microbiol 2011 May 12;150(1-2):140-5.

59. Bando SY, Moreno AC, Albuquerque JA, Amhaz JM, Moreira-Filho CA, Martínez MB. Expression of bacterial virulence factors and cytokines during in vitro macrophage infection by enteroinvasive *Escherichia coli* and *Shigella flexneri*: a comparative study. Mem Inst Oswaldo Cruz 2010 Sep;105(6):786-91.

60. Parsot C, Ageron E, Penno C, Mavris M, Jamoussi K, d'Hauteville H, Sansonetti P, Demers B. A secreted anti-activator, OspD1, and its chaperone, Spa15, are involved in the control of transcription by the type III secretion apparatus activity in *Shigella flexneri*. Mol Microbiol 2005 Jun;56(6):1627-35.

61. Sobieszczanska B, Duda AK, Turniak M, Duda-Madej A, Franiczek R, Kasprzykowska U. Characterization of genes associated with internalization of enteroaggregative *Escherichia coli*. Microb Pathog 2011 Mar-Apr;50(3-4):141-7.

62. Méndez-Arancibia E, Vargas M, Soto S, Ruiz J, Kahigwa E, Schellenberg D, Urassa H, Gascon J, Vila J. Prevalence of different virulence factors and biofilm

production in enteroaggregative *Escherichia coli* isolates causing diarrhea in children in Ifakara (Tanzania). *Am J Trop Med Hyg* 2008 Jun;78(6):985-9.

63. Cassar CA, Ottaway M, Paiba GA, Futter R, Newbould S, Woodward MJ. Absence of enteroaggregative *Escherichia coli* in farmed animals in Great Britain. *Vet Rec* 2004 Feb 21;154(8):237-9.

64. Cravioto A, Tello A, Navarro A, Ruiz J, Villafan H, Uribe F, Eslava C. Association of *Escherichia coli* HEp-2 adherence patterns with type and duration of diarrhoea. *Lancet* 1991 Feb 2;337(8736):262-4.

65. Eslava C, Navarro-García F, Czczulin JR, Henderson IR, Cravioto A, Nataro JP. Pet, an autotransporter enterotoxin from enteroaggregative *Escherichia coli*. *Infect Immun* 1998 Jul;66(7):3155-63.

66. Nataro JP. Enteroaggregative *Escherichia coli* pathogenesis. *Curr Opin Gastroenterol* 2005 Jan;21(1):4-8.

67. Piva IC, Pereira AL, Ferraz LR, Silva RS, Vieira AC, Blanco JE, Blanco M, Blanco J, Giugliano LG. Virulence markers of enteroaggregative *Escherichia coli* isolated from children and adults with diarrhea in Brasilia, Brazil. *J Clin Microbiol* 2003 May;41(5):1827-32.

68. Hardegen C, Messler S, Henrich B, Pfeffer K, Wurthner J, MacKenzie CR. A set of novel multiplex Taqman real-time PCRs for the detection of diarrhoeagenic *Escherichia coli* and its use in determining the prevalence of EPEC and EAEC in a university hospital. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 2010;9:5.

69. Chin J, Association APH. El control de las enfermedades transmisibles: American Public Health Association; 2001.

70. Gordon DM, Cowling A. The distribution and genetic structure of *Escherichia coli* in Australian vertebrates: host and geographic effects. *Microbiology* 2003 Dec;149(Pt 12):3575-86.

71. Clermont O, Bonacorsi S, Bingen E. Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. *Appl Environ Microbiol* 2000 Oct;66(10):4555-8.

72. Clermont O, Lescat M, O'Brien CL, Gordon DM, Tenailon O, Denamur E. Evidence for a human-specific *Escherichia coli* clone. *Environ Microbiol* 2008 Apr;10(4):1000-6.
73. Didelot X, Meric G, Falush D, Darling AE. Impact of homologous and non-homologous recombination in the genomic evolution of *Escherichia coli*. *BMC Genomics* 2012;13:256.
74. White AP, Sibley KA, Sibley CD, Wasmuth JD, Schaefer R, Surette MG, Edge TA, Neumann NF. Intergenic sequence comparison of *Escherichia coli* isolates reveals lifestyle adaptations but not host specificity. *Appl Environ Microbiol* 2011 Nov;77(21):7620-32.
75. Rugeles LC, Bai J, Martínez AJ, Vanegas MC, Gómez-Duarte OG. Molecular characterization of diarrheagenic *Escherichia coli* strains from stools samples and food products in Colombia. *Int J Food Microbiol* 2010 Apr 15;138(3):282-6.
76. Gordon DM. Geographical structure and host specificity in bacteria and the implications for tracing the source of coliform contamination. *Microbiology* 2001 May;147(Pt 5):1079-85.
77. Picard B, García JS, Gouriou S, Duriez P, Brahimi N, Bingen E, Elion J, Denamur E. The link between phylogeny and virulence in *Escherichia coli* extraintestinal infection. *Infect Immun* 1999 Feb;67(2):546-53.
78. Ziebell K, Konczy P, Yong I, Frost S, Mascarenhas M, Kropinski AM, Whittam TS, Read SC, Karmali MA. Applicability of phylogenetic methods for characterizing the public health significance of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* strains. *Appl Environ Microbiol* 2008 Mar;74(5):1671-5.
79. Lavigne JP, Blanc-Potard AB. Molecular evolution of *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* and pathogenic *Escherichia coli*: from pathogenesis to therapeutics. *Infect Genet Evol* 2008 Mar;8(2):217-26.
80. Mauro SA, Koudelka GB. Shiga toxin: expression, distribution, and its role in the environment. *Toxins (Basel)* 2011 Jun;3(6):608-25.
81. Nguyen TD, Vo TT, Vu-Khac H. Virulence factors in *Escherichia coli* isolated from calves with diarrhea in Vietnam. *J Vet Sci* 2011 Jun;12(2):159-64.

82. Hacker J, Kaper JB. Pathogenicity islands and the evolution of microbes. *Annu Rev Microbiol* 2000;54:641-79.
83. Frankel G, Phillips AD, Trabulsi LR, Knutton S, Dougan G, Matthews S. Intimin and the host cell--is it bound to end in Tir(s)? *Trends Microbiol* 2001 May;9(5):214-8.
84. Bolton DJ. Verocytotoxigenic (Shiga toxin-producing) *Escherichia coli*: virulence factors and pathogenicity in the farm to fork paradigm. *Foodborne Pathog Dis* 2011 Mar;8(3):357-65.
85. Paton AW, Paton JC. Detection and characterization of Shiga toxigenic *Escherichia coli* by using multiplex PCR assays for *stx1*, *stx2*, *eaeA*, enterohemorrhagic *E. coli hlyA*, *rfb*_{O111}, and *rfb*_{O157}. *J Clin Microbiol* 1998 Feb;36(2):598-602.
86. Wang L, Rothmund D, Curd H, Reeves PR. Sequence diversity of the *Escherichia coli* H7 *fliC* genes: implication for a DNA-based typing scheme for *E. coli* O157:H7. *J Clin Microbiol* 2000 May;38(5):1786-90.
87. Reid SD, Selander RK, Whittam TS. Sequence diversity of flagellin (*fliC*) alleles in pathogenic *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 1999 Jan;181(1):153-60.
88. Giron JA, Ho AS, Schoolnik GK. An inducible bundle-forming pilus of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Science* 1991 Nov 1;254(5032):710-3.
89. Donnenberg MS, Kaper JB, Finlay BB. Interactions between enteropathogenic *Escherichia coli* and host epithelial cells. *Trends Microbiol* 1997 Mar;5(3):109-14.
90. Venkatesan MM, Buysse JM, Kopecko DJ. Use of *Shigella flexneri ipaC* and *ipaH* gene sequences for the general identification of *Shigella* spp. and enteroinvasive *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol* 1989 Dec;27(12):2687-91.
91. Nalin DR, McLaughlin JC, Rahaman M, Yunus M, Curlin G. Enterotoxigenic *Escherichia coli* and idiopathic diarrhoea in Bangladesh. *Lancet* 1975 Dec 6;2(7945):1116-9.

92. Qadri F, Svennerholm AM, Faruque AS, Sack RB. Enterotoxigenic *Escherichia coli* in developing countries: epidemiology, microbiology, clinical features, treatment, and prevention. Clin Microbiol Rev 2005 Jul;18(3):465-83.
93. Bandyopadhyay S, Mahanti A, Samanta I, Dutta TK, Ghosh MK, Bera AK, Bhattacharya D. Virulence repertoire of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) from diarrhoeic lambs of Arunachal Pradesh, India. Trop Anim Health Prod 2011 Mar;43(3):705-10.
94. Dubreuil JD. *Escherichia coli* STb toxin and colibacillosis: knowing is half the battle. FEMS Microbiol Lett 2008 Jan;278(2):137-45.
95. Dubreuil JD. *Escherichia coli* STb enterotoxin. Microbiology 1997 Jun;143 (Pt 6):1783-95.
96. Orskov I, Orskov F, Jann B, Jann K. Serology, chemistry, and genetics of O and K antigens of *Escherichia coli*. Bacteriol Rev 1977 Sep;41(3):667-710.
97. Scheutz F, Cheasty T, Woodward D, Smith HR. Designation of O174 and O175 to temporary O groups OX3 and OX7, and six new *E. coli* O groups that include Verocytotoxin-producing *E. coli* (VTEC): O176, O177, O178, O179, O180 and O181. APMIS 2004 Sep;112(9):569-84.
98. DebRoy C, Roberts E. Screening petting zoo animals for the presence of potentially pathogenic *Escherichia coli*. J Vet Diagn Invest 2006 Nov;18(6):597-600.
99. Tornieporth NG, John J, Salgado K, de Jesus P, Latham E, Melo MC, Gunzburg ST, Riley LW. Differentiation of pathogenic *Escherichia coli* strains in Brazilian children by PCR. J Clin Microbiol 1995 May;33(5):1371-4.
100. Schroeder CM, Meng J, Zhao S, DebRoy C, Torcolini J, Zhao C, McDermott PF, Wagner DD, Walker RD, White DG. Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* O26, O103, O111, O128, and O145 from animals and humans. Emerg Infect Dis 2002 Dec;8(12):1409-14.
101. de Verdier K, Nyman A, Greko C, Bengtsson B. Antimicrobial resistance and virulence factors in *Escherichia coli* from Swedish dairy calves. Acta Vet Scand 2012;54:2.

102. Pena A, Serrano C, Reu C, Baeta L, Calderon V, Silveira I, Sousa JC, Peixe L. Antibiotic residues in edible tissues and antibiotic resistance of faecal *Escherichia coli* in pigs from Portugal. *Food Addit Contam* 2004 Aug;21(8):749-55.
103. Meng J, Zhao S, Doyle MP, Joseph SW. Antibiotic resistance of *Escherichia coli* O157:H7 and O157:NM isolated from animals, food, and humans. *J Food Prot* 1998 Nov;61(11):1511-4.
104. Schroeder CM, Zhao C, DebRoy C, Torcolini J, Zhao S, White DG, Wagner DD, McDermott PF, Walker RD, Meng J. Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* O157 isolated from humans, cattle, swine, and food. *Appl Environ Microbiol* 2002 Feb;68(2):576-81.
105. Stephan R, Schumacher S. Resistance patterns of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) strains isolated from animals, food and asymptomatic human carriers in Switzerland. *Lett Appl Microbiol* 2001 Feb;32(2):114-7.
106. Jones ME, Peters E, Weersink AM, Fluit A, Verhoef J. Widespread occurrence of integrons causing multiple antibiotic resistance in bacteria. *Lancet* 1997 Jun 14;349(9067):1742-3.
107. Zhao S, White DG, Ge B, Ayers S, Friedman S, English L, Wagner D, Gaines S, Meng J. Identification and characterization of integron-mediated antibiotic resistance among Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolates. *Appl Environ Microbiol* 2001 Apr;67(4):1558-64.
108. Russo TA, Johnson JR. Proposal for a new inclusive designation for extraintestinal pathogenic isolates of *Escherichia coli*: ExPEC. *J Infect Dis* 2000 May;181(5):1753-4.
109. Escobar-Paramo P, Le Menac'h A, Le Gall T, Amarin C, Gouriou S, Picard B, Skurnik D, Denamur E. Identification of forces shaping the commensal *Escherichia coli* genetic structure by comparing animal and human isolates. *Environ Microbiol* 2006 Nov;8(11):1975-84.
110. Dixit SM, Gordon DM, Wu XY, Chapman T, Kailasapathy K, Chin JJ. Diversity analysis of commensal porcine *Escherichia coli* - associations between genotypes

and habitat in the porcine gastrointestinal tract. *Microbiology* 2004 Jun;150(Pt 6):1735-40.

111. Ruiz del Castillo B, Ocampo-Sosa AA, Martínez-Martínez L. Detection of phylogenetic group B1 *Escherichia coli* by multiplex PCR: description of a new amplification pattern. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2011 Dec;29(10):785-6.

112. Vu-Khac H, Holoda E, Pilipcinec E, Blanco M, Blanco JE, Dahbi G, Mora A, Lopez C, González EA, Blanco J. Serotypes, virulence genes, intimin types and PFGE profiles of *Escherichia coli* isolated from piglets with diarrhoea in Slovakia. *Vet J* 2007 Jul;174(1):176-87.

113. Nagy B, Fekete PZ. Enterotoxigenic *Escherichia coli* in veterinary medicine. *Int J Med Microbiol* 2005 Oct;295(6-7):443-54.

114. Ruan X, Liu M, Casey TA, Zhang W. A tripartite fusion, FaeG-FedF-LT(192)A2:B, of enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) elicits antibodies that neutralize cholera toxin, inhibit adherence of K88 (F4) and F18 fimbriae, and protect pigs against K88ac/heat-labile toxin infection. *Clin Vaccine Immunol* 2011 Oct;18(10):1593-9.

115. Do TN, Cu PH, Nguyen HX, Au TX, Vu QN, Driesen SJ, Townsend KM, Chin JJ, Trott DJ. Pathotypes and serogroups of enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from pre-weaning pigs in north Vietnam. *J Med Microbiol* 2006 Jan;55(Pt 1):93-9.

116. Sánchez S, García-Sánchez A, Martínez R, Blanco J, Blanco JE, Blanco M, Dahbi G, Mora A, Hermoso de Mendoza J, Alonso JM, Rey J. Detection and characterisation of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* other than *Escherichia coli* O157:H7 in wild ruminants. *Vet J* 2009 Jun;180(3):384-8.

117. Sánchez S, Martínez R, Rey J, García A, Blanco J, Blanco M, Blanco JE, Mora A, Herrera-León S, Echeita A, Alonso JM. Pheno-genotypic characterisation of *Escherichia coli* O157:H7 isolates from domestic and wild ruminants. *Vet Microbiol* 2010 May 19;142(3-4):445-9.

118. Frydendahl K. Prevalence of serogroups and virulence genes in *Escherichia coli* associated with postweaning diarrhoea and edema disease in pigs and a comparison of diagnostic approaches. *Vet Microbiol* 2002 Mar 1;85(2):169-82.

119. Fegan N, Desmarchelier P. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in sheep and preslaughter lambs in eastern Australia. *Letters in Applied Microbiology* 1999;28:335–9.
120. Wieler LH, Vieler E, Erpenstein C, Schlapp T, Steinruck H, Bauerfeind R, Byomi A, Baljer G. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains from bovines: association of adhesion with carriage of eae and other genes. *J Clin Microbiol* 1996 Dec;34(12):2980-4.
121. Mainil JG, Daube G. Verotoxigenic *Escherichia coli* from animals, humans and foods: who's who? *J Appl Microbiol* 2005;98(6):1332-44.
122. Taylor EV, Shi X, Alam MJ, Peterson G, Narayanan SK, Renter DG, Nagaraja TG. Genetic variations in Shiga toxin-producing abilities of bovine and human *Escherichia coli* O157:H7. *Zoonoses Public Health* 2011 May;58(3):185-91.
123. Wani SA, Samanta I, Munshi ZH, Bhat MA, Nishikawa Y. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* and enteropathogenic *Escherichia coli* in healthy goats in India: occurrence and virulence properties. *J Appl Microbiol* 2006;100(1):108-13.
124. Beutin L, Kruger U, Krause G, Miko A, Martín A, Strauch E. Evaluation of major types of Shiga toxin 2E-producing *Escherichia coli* bacteria present in food, pigs, and the environment as potential pathogens for humans. *Appl Environ Microbiol* 2008 Aug;74(15):4806-16.
125. Chekabab SM, Paquin-Veillette J, Dozois CM, Harel J. The ecological habitat and transmission of *Escherichia coli* O157:H7. *FEMS Microbiol Lett* 2013 Apr;341(1):1-12.
126. Beutin L, Geier D, Steinruck H, Zimmermann S, Scheutz F. Prevalence and some properties of verotoxin (Shiga-like toxin)-producing *Escherichia coli* in seven different species of healthy domestic animals. *J Clin Microbiol* 1993 Sep;31(9):2483-8.
127. Paddock Z, Shi X, Bai J, Nagaraja TG. Applicability of a multiplex PCR to detect O26, O45, O103, O111, O121, O145, and O157 serogroups of *Escherichia coli* in cattle feces. *Vet Microbiol* 2012 May 4;156(3-4):381-8.

128. Zschock M, Hamann HP, Kloppert B, Wolter W. Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* in faeces of healthy dairy cows, sheep and goats: prevalence and virulence properties. *Lett Appl Microbiol* 2000 Sep;31(3):203-8.
129. Cortes C, De la Fuente R, Blanco J, Blanco M, Blanco JE, Dhabhi G, Mora A, Justel P, Contreras A, Sánchez A, Corrales JC, Orden JA. Serotypes, virulence genes and intimin types of verotoxin-producing *Escherichia coli* and enteropathogenic *E. coli* isolated from healthy dairy goats in Spain. *Vet Microbiol* 2005 Sep 30;110(1-2):67-76.
130. Vu-Khac H, Cornick NA. Prevalence and genetic profiles of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from buffaloes, cattle, and goats in central Vietnam. *Vet Microbiol* 2008 Jan 25;126(4):356-63.
131. Orden JA, Ruiz-Santa-Quiteria JA, Blanco M, Blanco JE, Mora A, Cid D, González EA, Blanco J, de la Fuente R. Prevalence and characterization of Vero cytotoxin-producing *Escherichia coli* isolated from diarrhoeic and healthy sheep and goats. *Epidemiol Infect* 2003 Apr;130(2):313-21.
132. Blanco J, Cid D, Blanco JE, Blanco M, Ruiz Santa Quiteira JA, de la Fuente R. Serogroups, toxins and antibiotic resistance of *Escherichia coli* strains isolated from diarrhoeic lambs in Spain. *Vet Microbiol* 1996 Apr;49(3-4):209-17.
133. Padola NL, Sanz ME, Blanco JE, Blanco M, Blanco J, Etcheverria AI, Arroyo GH, Usera MA, Parma AE. Serotypes and virulence genes of bovine Shigatoxigenic *Escherichia coli* (STEC) isolated from a feedlot in Argentina. *Vet Microbiol* 2004 May 20;100(1-2):3-9.
134. Rey J, Blanco JE, Blanco M, Mora A, Dhabhi G, Alonso JM, Hermoso M, Hermoso J, Alonso MP, Usera MA, González EA, Bernardez MI, Blanco J. Serotypes, phage types and virulence genes of shiga-producing *Escherichia coli* isolated from sheep in Spain. *Vet Microbiol* 2003 Jun 24;94(1):47-56.
135. Bettelheim KA, Bensink JC, Tambunan HS. Serotypes of verotoxin-producing (Shiga toxin-producing) *Escherichia coli* isolated from healthy sheep. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 2000 Jan;23(1):1-7.

136. Kudva IT, Hatfield PG, Hovde CJ. Characterization of *Escherichia coli* O157:H7 and other Shiga toxin-producing *E. coli* serotypes isolated from sheep. *J Clin Microbiol* 1997 Apr;35(4):892-9.
137. Vettorato MP, Leomil L, Guth BE, Irino K, Pestana de Castro AF. Properties of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) isolates from sheep in the State of Sao Paulo, Brazil. *Vet Microbiol* 2003 Aug 29;95(1-2):103-9.
138. Irino K, Kato MA, Vaz TM, Ramos, II, Souza MA, Cruz AS, Gomes TA, Vieira MA, Guth BE. Serotypes and virulence markers of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) isolated from dairy cattle in Sao Paulo State, Brazil. *Vet Microbiol* 2005 Jan 5;105(1):29-36.
139. Couturier MR, Lee B, Zelyas N, Chui L. Shiga-toxigenic *Escherichia coli* detection in stool samples screened for viral gastroenteritis in Alberta, Canada. *J Clin Microbiol* 2011 Feb;49(2):574-8.
140. Johnson KE, Thorpe CM, Sears CL. The emerging clinical importance of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *Clin Infect Dis* 2006 Dec 15;43(12):1587-95.
141. Mead PS, Slutsker L, Dietz V, McCaig LF, Bresee JS, Shapiro C, Griffin PM, Tauxe RV. Food-related illness and death in the United States. *Emerg Infect Dis* 1999 Sep-Oct;5(5):607-25.
142. Werber D, Fruth A, Liesegang A, Littmann M, Buchholz U, Prager R, Karch H, Breuer T, Tschape H, Ammon A. A multistate outbreak of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O26:H11 infections in Germany, detected by molecular subtyping surveillance. *J Infect Dis* 2002 Aug 1;186(3):419-22.
143. Samadpour M, Ongerth JE, Liston J, Tran N, Nguyen D, Whittam TS, Wilson RA, Tarr PI. Occurrence of Shiga-like toxin-producing *Escherichia coli* in retail fresh seafood, beef, lamb, pork, and poultry from grocery stores in Seattle, Washington. *Appl Environ Microbiol* 1994 Mar;60(3):1038-40.
144. Pradel N, Livrelli V, De Champs C, Palcoux JB, Reynaud A, Scheutz F, Sirot J, Joly B, Forestier C. Prevalence and characterization of Shiga toxin-producing

Escherichia coli isolated from cattle, food, and children during a one-year prospective study in France. J Clin Microbiol 2000 Mar;38(3):1023-31.

145. Blanco J, Blanco M, Garabal JI, González EA. Enterotoxins, colonization factors and serotypes of enterotoxigenic *Escherichia coli* from humans and animals. Microbiologia 1991 Sep;7(2):57-73.

146. Jay JM, Loessner MJ, Golden DA. Foodborne Gastroenteritis Caused by *Escherichia coli*. Modern Food Microbiology: Food Science Text Series; 2005. p. 637-55.

147. Meng J, Schroeder CM. *Escherichia coli*. In: Simjee S, editor. Foodborne Diseases: Infectious Disease; 2007. p. 1-25.

148. Casas V, Sobrepena G, Rodríguez-Mueller B, Ahtye J, Maloy SR. Bacteriophage-encoded shiga toxin gene in atypical bacterial host. Gut Pathog 2011;3(1):10.