



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA

Comparación entre virotipos de *Escherichia coli* diarreogénica
provenientes del Distrito Federal con virotipos de San Luis
Potosí aislados de población infantil.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA

CARMEN MERCADO ALQUICIRA



MÉXICO, D.F.

AÑO 2014



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: MARIA DEL PILAR GRANADA MACIAS

VOCAL: Profesor: ROSALIA GUEVARA LEONEL

SECRETARIO: Profesor: ANA MARIA CASTRO

1er. SUPLENTE: Profesor: BEATRIZ RUIZ VILLAFAN

2° SUPLENTE: Profesor: JAVIER FERNANDEZ TORRES

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

LABORATORIO DE PATOGENICIDAD BACTERIANA. TORRE DE INVESTIGACIÓN,
DEPARTAMENTO DE SALUD PÚBLICA, FACULTAD DE MEDICINA. UNIVERSIDAD
NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO.

ASESOR DEL TEMA:

Dra. Ana María Castro

SUPERVISOR TÉCNICO:

Dra. Andrea A. Toledo Rojas

SUSTENTANTE:

Carmen Mercado Alquicira

1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCION	3
2.1 CARACTERÍSTICAS GENERALES DE <i>Escherichia coli</i>	4
2.2 FACTORES DE VIRULENCIA	5
2.2.1 Adhesinas	5
2.2.2 Toxinas	6
2.3 PATOTIPOS DE <i>E. coli</i>	7
2.3.1 <i>E. coli</i> enteropatógena (EPEC)	7
2.3.2 <i>E. coli</i> enterotoxigénica (ETEC)	8
2.3.3 <i>E. coli</i> enterohemorrágica (EHEC)	9
2.3.4 <i>E. coli</i> enteroinvasiva (EIEC)	10
2.3.5 <i>E. coli</i> de adherencia difusa (DAEC)	11
2.3.6 <i>E. coli</i> enteroagregativa (EAEC)	11
2.4 ADHERENCIA A CÉLULAS HEP-2	12
2.5 BIOPELÍCULA (BIOFILM)	13
2.5.1 Métodos de estudio de la producción de biopelícula	15
2.6 ANTIBIOGRAMA	16
3. OBJETIVO GENERAL	17
4. HIPÓTESIS	18
5. MATERIALES Y MÉTODOS	19
5.1 Muestras biológicas	19
5.2 Identificación bacteriana	19
5.3 Identificación de genes de virulencia a través de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	20
5.3.1 Extracción de ADN genómico	20
5.3.2 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	20
5.3.3 Detección de productos de amplificación	22
5.4 Ensayo de adherencia a células HEP-2	23
5.4.1 Cultivo de bacterias	23
5.4.2 Cultivo de células HEP-2 en placas	23
5.4.3 Ensayo de Adherencia	24

5.4.4 Tinción.....	24
5.5 Producción de biopelícula.....	26
5.5.1 Ensayo en placa.....	26
5.5.2 Método de Christensen (método en tubo)	27
5.6 Antibiograma.....	28
5.7 Análisis estadístico	29
6. RESULTADOS	30
7. DISCUSIÓN	41
8. CONCLUSIONES	49
9.REFERENCIAS	51

Los cambios en la sociedad, la tecnología y los microorganismos por sí mismos, contribuyen a la emergencia de nuevas enfermedades, a la re-emergencia de enfermedades ya controladas y al desarrollo de resistencia a antimicrobianos. Patógenos resistentes a varios antimicrobianos han proliferado tanto en humanos como en la medicina veterinaria.

Las enfermedades diarreicas en infantes constituyen un problema de salud mundial, especialmente en países en vías de desarrollo. En México, este tipo de padecimientos representan un problema de salud, y aún son causa importante de morbi-mortalidad en población infantil. La Encuesta Nacional de Salud nos dice que en 2012, la muerte de niños menores de 5 años a causa de enfermedades infecciosas ocupó el quinto sitio.

Dentro de los agentes etiológicos de las enfermedades diarreicas, se encuentra *Escherichia coli* (*E. coli*), que forma parte de la biota bacteriana endógena y es una de las causas más comunes, tanto de infecciones intestinales como de infecciones extraintestinales. Las *E. coli* diarreogénicas o causantes de diarrea se dividen en seis categorías basadas en los mecanismos de patogenicidad: *E. coli* enteropatógena (EPEC), *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) *E. coli* adherencia difusa (DAEC) y *E. coli* enteroagregativa (EAEC). (Kaper *et al.*, 2004, Croxen *et al.*, 2010)

La distribución y frecuencia tanto de virotipos como de serotipos de *E. coli* pueden variar considerablemente de región a región, esto, debido a las diferencias geográficas, así como al grado de rezago social e incluso a las características de la población de cada región. Por lo cual el objetivo del presente trabajo fue comparar la prevalencia y características de los diferentes virotipos de *Escherichia coli*, aislados de población infantil en dos entidades federativas de la República Mexicana: San Luis Potosí (S.L.P.) y Distrito Federal (D.F.). Los resultados obtenidos muestran que el porcentaje de virotipos encontrados en S.L.P., son

mayores respecto a los virotipos encontrados en el D.F., siendo ETEC el virotipo más frecuente para ambas poblaciones. La incidencia de este virotipo fue mayor para las cepas de S.L.P., y el análisis estadístico mostró una $p < 0.00$. De igual manera, los virotipos EIEC y EHEC presentaron una mayor prevalencia en el estado de S.L.P., con una $p < 0.00$ respectivamente. El fenotipo de adherencia tanto agregativa como difusa, se relacionó con la presencia de los genes *aat* y *astA*. Los ensayos para determinar la producción de biopelículas en cepas de *E. coli*, nos permitió determinar que el método de agar rojo Congo, fue el más eficaz para su evaluación, y que además del flagelo, pueden existir otras estructuras relacionadas con la producción de la biopelícula. Por otro lado se observó que las cepas provenientes del D.F., mostraron una mayor resistencia a los antibióticos evaluados, en relación con cepas provenientes de S.L.P. De los antibióticos probados en el ensayo de antibiograma, seis de ocho mostraron una diferencia estadísticamente significativa entre las cepas del D.F., y las de S.L.P., con una $p < 0.05$.

De forma general, la identificación de virotipos de *E. coli* mediante el uso de un método de diagnóstico molecular, como lo es la PCR, nos permitió identificar marcadores epidemiológicos de patogenicidad, de los cuales algunos de ellos son compartidos por diferentes virotipos. La sensibilidad de la bacteria a agentes antimicrobianos nos brindó información actualizada de resistencia antimicrobiana, esto, para un mejor manejo, control y prevención de las infecciones causadas por este microorganismo. Adicionalmente, la identificación de biopelícula, permitirá asociar estas cepas con virulencia, así como con resistencia a agentes antimicrobianos. Los aspectos evaluados en el presente trabajo nos permitieron corroborar que existen diferentes elementos que influyen en la expresión de factores de virulencia en este caso, de *E. coli*.

2. INTRODUCCION

Las enfermedades gastrointestinales representan uno de los principales problemas de salud pública que afectan a personas de cualquier edad y condición social, sin embargo los grupos más vulnerables son los niños y ancianos. Las enfermedades diarreicas, ocupan el segundo lugar como causa de enfermedad en los niños menores de cinco años, lo cual resulta en una alta demanda de consulta y hospitalización pediátricas.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) estimó en el año 2013, que ocurren 1 700 millones de episodios de diarrea cada año en países en vías de desarrollo. Mundialmente las infecciones gastrointestinales son una de las causas más importantes de morbi-mortalidad entre lactantes y niños (Hernández *et al.*, 2011). La OMS define a la diarrea como la deposición de tres o más veces al día de heces líquidas. Puede ser de tres tipos: diarrea aguda acuosa, diarrea con sangre aguda (conocida como disentería) y diarrea persistente. La mayoría de las personas que fallecen por enfermedades diarreicas en realidad mueren por una grave deshidratación y pérdida de líquidos.

En México las infecciones intestinales representaron la segunda causa de morbilidad en el país con más de cinco millones de casos en el 2011, lo que ubicó a este padecimiento como un problema de salud pública importante, pues la incidencia nacional se incrementó por tercer año consecutivo, siendo el sector más vulnerable los niños menores de cinco años. (www.epidemiologia.salud.gob.mx)

En el 2013, las Enfermedades Diarreicas Agudas (EDA), fueron la segunda causa de morbilidad en la población menor de cinco años en el estado de San Luis Potosí. Las EDA pueden presentar complicaciones graves en niños, debido a algunas circunstancias como: tener un peso al nacer menor de 2.5 kilos, no haber recibido lactancia materna, presentar algún grado de desnutrición, así como no contar con el esquema de vacunación completo de acuerdo a su edad. (Paningua *et al.*, 2007). En el año 2013, la cifra de niños menores de cinco años con enfermedades diarreicas agudas fue de aproximadamente 40 mil casos (<http://slpsalud.gob.mx>). La incidencia de EDA en este estado puede deberse al

rezago social en el que se encuentra, ya que según el Consejo Nacional de Evaluación de la Política de Desarrollo Social (CONEVAL) en el año 2012, S.L.P., ocupó el décimo lugar de rezago social a nivel nacional, mientras que el D.F., se encontró ubicado en el lugar número 31, con un grado de rezago social “muy bajo” (www.coneval.gob.mx).

En general los cuadros de infecciones gastrointestinales pueden ocurrir en cualquier época del año y sus manifestaciones clínicas más frecuentes son: fiebre, vómito, dolor abdominal y diarrea. Estas enfermedades gastrointestinales son causadas comúnmente por parásitos, en primer lugar *Giardia lamblia* y amibas, virus como el rotavirus y bacterias principalmente *Salmonella*, *Shigella* y *Escherichia coli* (Hernández *et al.*, 2011).

Debido a que *E. coli*, es uno de los principales agentes etiológicos causantes de diarrea, se eligió estudiar la prevalencia de los virotipos de *E. coli* en muestras de pacientes infantiles provenientes de dos estados de la República Mexicana: Distrito Federal y San Luis Potosí, con el fin de identificar las diferencias tanto genotípicas como fenotípicas de esta bacteria.

2.1 CARACTERÍSTICAS GENERALES DE *Escherichia coli*

E. coli es el principal anaerobio facultativo de la biota microbiana que reside en el intestino humano ya que lo coloniza a pocas horas después del nacimiento; la mayoría de las cepas intestinales de *E. coli* son no patógenas y forman parte de la biota intestinal, otras son patógenas y pueden causar infecciones intestinales, o infecciones extraintestinales como septicemia, infección del aparato urinario (IAU), meningitis, neumonía, entre otras (Todar, 2008).

De acuerdo al manual de Bergey, esta bacteria forma parte de la familia *Enterobacteriaceae*, la cual incluye los géneros *Escherichia* y *Shigella* (Krieg *et al.*, 1984).

E. coli es un bacilo gramnegativo, anaerobio facultativo, no esporulado, móvil o inmóvil. Crece en un rango de temperatura amplio, de 15° C a 45° C y a un pH de

7.0. Las características morfológicas de sus colonias en medios sólidos, como agar-sangre, se observan redondas, convexas, grisáceas, opacas y pueden ser lisas o rugosas; mientras que en Agar Mc Conckey son colonias circulares, cristalinas y rosadas, lactosa positiva (Tórtora *et al.*, 2007).

El desarrollo de métodos serológicos han permitido identificar un gran número de serotipos de *E. coli* en base a la presencia de tres tipos de antígenos denominados somático "O", capsular "K" y flagelar "H". El antígeno somático (O), forma parte del Lipopolisacárido (LPS), el cual está localizado en la membrana externa, actualmente se conocen 176 variedades. Del antígeno K existen al menos 80 variedades de antígenos conocidos. El antígeno H, es de naturaleza proteica y se conocen hasta el momento 60 diferentes tipos (Vidal *et al.*, 2007, Murray *et al.*, 2009).

2.2 FACTORES DE VIRULENCIA

Dentro de los factores de virulencia de *E. coli* se encuentran las toxinas y las adhesinas.

2.2.1 Adhesinas

Las cepas patógenas de *E. coli* poseen factores específicos de adherencia (Nataro *et al.*, 1998), los cuales les permiten llevar a cabo la colonización del intestino. Estas adhesinas pueden dividirse en dos grupos: adhesinas fimbriales y adhesinas afimbriales. Las fimbrias (*pillis*) son estructuras filamentosas que se localizan en la parte externa de la bacteria y están formadas por subunidades de una proteína denominadas pilina (Tórtora *et al.*, 2007), estos filamentos se han subdividido en dos clases: fimbrias comunes que son pequeñas y permiten a las bacterias adherirse a sus células blanco; están codificadas en cromosomas o en plásmidos; y los *pili* sexuales, cuya función es la transferencia de material genético de una bacteria a otra, y están codificados en plásmidos. También se incluyen dentro de las adhesinas, las afimbriales, las cuales son proteínas de membrana externa

como la intimina (Nataro *et al.*, 1998). Las cepas móviles poseen flagelos peritricos (distribuidos sobre la superficie de la bacteria) que les brinda movilidad. El principal componente de los flagelos es la flagelina, proteína que puede unirse al receptor de la célula hospedera denominado TLR5, ello favorece la activación de la interleucina 8 (IL-8), la cual participa en la respuesta inflamatoria (Nataro *et al.*, 1998).

2.2.2 Toxinas

Las toxinas bacterianas son de dos tipos, endotoxinas lipopolisacárido (LPS) y exotoxinas. Estas últimas están constituidas por dos subunidades A y B. La subunidad B es un pentámero que se une a receptores celulares y la subunidad A es un dímero y es la unidad activa (Tórtora *et al.*, 2007).

El LPS es una molécula termoestable, es el principal antígeno de la membrana externa de las bacterias gramnegativas, formado por tres componentes: polisacárido somático "O" más externo; una región central polisacáridica (KDO) y el lípido A que es la parte más tóxica de esta molécula.

Las exotoxinas se clasifican como enterotoxinas, citotoxinas y neurotoxinas. Las enterotoxinas producen una diarrea acuosa debido a la liberación de agua y electrolitos por el enterocito, y las citotoxinas producen diarrea inflamatoria cuyas evacuaciones contienen sangre y moco (Tórtora *et al.*, 2007)

Dentro de las toxinas que pueden alterar el metabolismo del enterocito, se encuentran las toxinas termolábiles, como lo son las enterotoxina lábil al calor (LT) y la enterotoxina estable al calor (ST), las cuales están involucradas en procesos que conducen a la salida de iones y agua del enterocito y por lo tanto desencadenan diarrea acuosa. La toxina Shiga (STx) actúa uniéndose al ARN ribosomal e inhibe síntesis de proteínas, lo que conduce a la muerte de las células epiteliales o endoteliales, generando una diarrea inflamatoria (Kaper *et al.*, 2004, Clements *et al.*, 2012)

Una vez que *E. coli* ha colonizado el intestino, puede causar enfermedad. Se han descrito varios mecanismos por los cuales esta bacteria desencadena el síndrome diarreico, estos son: producción de enterotoxinas, invasión y/o la adhesión íntima con la membrana de la célula, así como inhibición de síntesis de proteínas.

Por lo tanto, las cepas de *E. coli* causantes de diarrea se clasifican en 6 patotipos, de acuerdo a su mecanismo de patogenicidad y cuadro clínico: Enterotoxigénica (ETEC). Enterohemorrágica, también conocidas como productoras de toxina STx (EHEC), Enteropatógena (EPEC), Enteroagregativa (EAEC), Enteroinvasiva (EIEC) y de adherencia difusa (DAEC) (Nataro *et al.*, 1998)

2.3 PATOTIPOS DE *E. coli*

2.3.1 *E. coli* enteropatógena (EPEC)

EPEC fue el primer grupo que se identificó serológicamente y se asoció con casos de diarrea en población infantil, siendo la adherencia su principal factor de patogenicidad.

El proceso de adherencia entre la bacteria y la membrana del epitelio intestinal, seguida de la destrucción de las microvellosidades, con polimerización de actina en el sitio de unión de la bacteria, se le denomina lesión de adherencia y esfacelamiento (A/E), y se debe a la expresión de genes presentes en la isla de patogenicidad LEE (Locus Enterocyte Effacement) (Rodríguez *et al.*, 2002, Croxen *et al.*, 2010).

La adherencia ocurre primero entre las bacterias y posteriormente las bacterias se adhieren a las células intestinales. Dicho proceso no podría llevarse a cabo sin la presencia de factores de virulencia típicos de las EPEC: “bundle-forming pilus” o BFP (Rodríguez *et al.* 2002, Croxen *et al.*, 2010) y el flagelo. Los BFP son *pilis* tipo IV que logran mediar la adherencia interbacterial y a las células epiteliales, su biogénesis requiere de genes localizados en el plásmido de virulencia denominado

Factor de Adherencia de EPEC (EAF) (Rodríguez *et al.*, 2002, Croxen *et al.*, 2010).

Una vez que estas bacterias se adhieren a las células, inyectan factores de virulencia por medio de sistemas de secreción tipo tres (SST3), entre ellos, participa Tir (receptor translocador de intimina), que se une a la intimina, y origina un reacomodo del citoesqueleto, con formación de pedestales por la acumulación de actina polimerizada y posteriormente se da el esfacelamiento o pérdida de las microvellosidades lo cual induce diarrea e inflamación. (Kaper *et al.*, 2004)

Este patotipo de *E. coli* se clasifica en cepas típicas y atípicas. Las cepas de EPEC típicas son aquellas que poseen los genes que codifican para el *pilus* BFP y la adhesina intimina (gen *eaeA*), mientras que las cepas atípicas sólo poseen el gen *eaeA* gen que codifica para una proteína de membrana externa de origen cromosomal (Kaper *et al.*, 2004).

2.3.2 *E. coli* enterotoxigénica (ETEC)

Este patotipo causa diarrea acuosa, principalmente en niños de países en vías de desarrollo (Kaper *et al.*, 2004). ETEC coloniza la superficie de la mucosa del intestino delgado y produce enterotoxinas. Esta colonización es mediada por los antígenos del factor de colonización (CFA's).

Su principal mecanismo de patogenicidad es la síntesis de una o ambas enterotoxinas denominadas toxina termolábil (LT) y toxina termoestable (ST). Los genes que codifican para estas toxinas son de origen plasmídico.

LT, está estrechamente relacionado tanto en función como en estructura con la toxina del cólera (CT), producida por *Vibrio cholera*. La toxina LT se divide en dos grupos, LT I, asociado con diarrea en humanos y LT II que se expresa principalmente en animales. Estas toxinas son oligoméricas, es decir, presentan dos subunidades A y B, siendo la subunidad A, la que posee actividad enzimática. LT aumenta el nivel intracelular de AMP cíclico, lo cual estimula la secreción de

cloro y debido al aumento en el contenido de iones, se extrae agua pasivamente, lo cual genera la diarrea acuosa. (Nataro *et al.*, 1998, Croxen *et al.*, 2012)

La toxina ST, también se clasifica en dos grupos, STa (ST I) y STb (ST II), que son diferentes tanto en estructura como en mecanismo de acción. STa aumenta los niveles de GMP cíclico lo que conduce la estimulación de la secreción del ión cloruro y/o la inhibición de la absorción de cloruro de sodio dando por lo tanto diarrea acuosa. STb se asocia con enfermedades en animales y su mecanismo de acción induce un aumento en la secreción de iones como el calcio (Kaper *et al.*, 2004, Clements *et al.*, 2012).

2.3.3 *E. coli* enterohemorrágica (EHEC)

Se ha relacionado a EHEC con brotes caracterizados por dolor abdominal y diarrea inflamatoria. Inicia con una diarrea acuosa y las 48 o 72 horas evoluciona a diarrea inflamatoria, con o sin fiebre; a este tipo de diarrea se le llamó colitis hemorrágica.

Las cepas pertenecientes a este patotipo, son capaces de elaborar citotoxinas, las cuales producen un efecto citopático irreversible sobre células Vero (línea celular de riñón de mono), por ello se denominaron verotoxinas (VT). Esta citotoxina puede ser neutralizada con la antitoxina obtenida a partir de *Shigella dysenteriae* tipo 1, por lo que también se llamó Toxina Similar a Shiga (STL por sus siglas en inglés Shiga-like toxin). A las cepas productoras de estas toxinas se les denominó *E. coli* productoras de toxina Shiga.

El principal mecanismo de patogenicidad de EHEC es la producción de citotoxinas (STx), debido a la presencia del bacteriófago STX. Las citotoxinas tienen una estructura AB, la subunidad B consta de 5 subunidades y se une al receptor (glicolípido globotriaosilceramida Gb3) de la célula blanco, la subunidad A actúa en la subunidad 60s de los ribosomas e inhibe la síntesis de proteínas y con ello causa la muerte celular. Se han encontrado dos variantes de la citotoxina, STx1 y

STx2. Las bacterias pueden sintetizar una o ambas toxinas (Rodríguez *et al.*, 2002, Clements *et al.*, 2012).

Además de la síntesis de citotoxinas, EHEC también puede generar el fenómeno de A/E, debido a la expresión del gen *eaeA*, el cual codifica para una proteína de membrana externa denominada intimina. (Kaper *et al.*, 2004). La destrucción celular producida por EHEC, induce la llegada de fagocitos polimorfonucleares (PMN) y mononucleares lo que lleva a un proceso inflamatorio y en consecuencia diarrea con sangre y moco.

2.3.4 *E. coli* enteroinvasiva (EIEC)

Este grupo es genética, bioquímica y patogénicamente similar a *Shigella*. Ambas bacterias comparten factores de virulencia necesarios para llevar a cabo la infección. Por lo general EIEC son lisina decarboxilasa negativa, no móviles y lactosa negativa (Kaper *et al.*, 2004, Clements *et al.*, 2012).

El principal mecanismo de patogenicidad es la invasión al epitelio del colon. Uno de los genes relacionados con este mecanismo de invasividad es el denominado *ial* que se encuentra en el plásmido pInV, en donde además se codifican otras proteínas asociadas al proceso de la invasión (Nataro *et al.*, 1998). La bacteria lleva a cabo la invasión de células intestinales de la siguiente manera: 1) Entrada a las células epiteliales, 2) Lisis de la vacuola endocítica, 3) Multiplicación intracelular, 4) Invasión a células adyacentes, 5) Muerte celular y 6) Migración de células fagocíticas al sitio de infección. El daño ocasionado por EIEC, se traduce en una diarrea inflamatoria. Esta infección se caracteriza por un periodo de diarrea acuosa que precede a la diarrea inflamatoria.

2.3.5 *E. coli* de adherencia difusa (DAEC)

Se conoce poco de su mecanismo de patogenicidad, pero se sabe que presenta una fimbria de superficie, denominada F1845, involucrada en el fenómeno de adherencia difusa. F1845 presenta cierta homología con el grupo *Dr* que son adhesinas bacterianas. Los genes que codifican para F1845 pueden estar en cromosoma o en plásmido. (Kaper *et al.*, 2004)

Al realizar ensayos *in vitro* en células CaCo (línea celular de carcinoma de colon humano) y HEP-2 (línea celular de carcinoma laríngeo humano), este patotipo tiene la capacidad de inducir un efecto citopático que se caracteriza por el desarrollo de extensiones, similares a dedos, desde la superficie de la célula infectada y que envuelven a la bacteria, sin llegar a que ésta se internalice, brindándole protección del medio ambiente (Nataro *et al.*, 1998). Los principales síntomas que presentan los pacientes infectados con DAEC son: diarrea acuosa sin sangre y sin leucocitos. Para el diagnóstico de DAEC se han empleado también ensayos de hibridación de ADN con sondas derivadas del fragmento del gen *daaC*, que codifica para la fimbria F1845, sin embargo, se pueden presentar falsos positivos (Rodríguez *et al.*, 2002; Lozer *et al.*, 2013).

2.3.6 *E. coli* enteroagregativa (EAEC)

Hoy en día EAEC, se define como una bacteria *E. coli* que no secreta LT o ST y que presenta adherencia a células HEP-2 con un patrón de autoagregación, en donde se observa la adherencia de las bacterias a las células como “apilados de ladrillo” (Kaper *et al.*, 2004). En modelos animales infectados con EAEC, se ha encontrado una capa de bacterias adheridas a la mucosa en forma autoagregativa, debido a la presencia de estructuras fimbriales, llamadas fimbrias de adherencia agregativa (AAF) que son de origen plasmídico. Aunque no todas

las EAEC presentan estas fimbrias (Kaper *et al.*, 2004, Jenkins *et al.*, 2006, Clements *et al.*, 2012).

La estrategia básica de EAEC como agente patógeno, comprende la colonización de la mucosa intestinal, seguido de la secreción de enterotoxinas y citotoxinas (Nataro *et al.*, 1998, Kaper *et al.*, 2004), generando así un daño leve pero significativo a la mucosa. El gen *aat* de EAEC, codifica para la dispersina que es una proteína de antiagregación, y se ha considerado como un marcador molecular de EAEC (Pereira *et al.*, 2007). Por otro lado, una de las enterotoxinas presentes en estas cepas es EAST1 (toxina enteroagregativa estable al calor), codificada por el gen *astA*. EAEC también tienen la capacidad de aumentar la producción de moco, el cual atrapa a las bacterias y favorece que se autoaglutinen. El tipo de diarrea asociado a este patotipo es diarrea persistente líquida con sangre y moco. La prueba de referencia para el diagnóstico de EAEC es el ensayo de adherencia a células HEP-2, entre otras.

2.4 ADHERENCIA A CÉLULAS HEP-2

Se ha considerado que la adherencia de las bacterias a las células, es de gran importancia para que los microorganismos pertenecientes a la microbiota habitual, se mantengan en el intestino, pero también se ha considerado como la primera etapa crítica en las infecciones diarreicas causadas por cepas patógenas de *E. coli* (Riveros *et al.*, 2011).

En 1979 Cravioto *et al.*, describieron un ensayo *in vitro* basado en la adherencia de las *E. coli* a células HEP-2, mostrando que el patotipo EPEC presentaba un patrón de adherencia “localizado” sobre las células. Años más tarde, el mismo autor, encontró cepas que presentaban un patrón de adherencia diferente a EPEC, a las que denominó “*E. coli* enteroadherente”.

Mientras tanto, Nataro *et al.*, (1987) reconocieron dos fenotipos diferentes pertenecientes a la cepa enteroadherente: difuso y enteroagregativo, siendo este

descubrimiento la primera descripción de EAEC. La adherencia enteroagregativa se caracteriza por una formación de “apilados de ladrillos” (*stacked-brick* en inglés), en donde las bacterias se adhieren tanto a la superficie celular como al vidrio de la preparación.

La lesión que se genera es la degeneración de las microvellosidades, alterando la morfología normal de la región apical del enterocito. Una característica del patotipo EAEC es que involucra la adherencia inicial al epitelio de la mucosa intestinal y la destrucción subsecuente de la mucosa debido a diferentes toxinas (Jenkins *et al.*, 2006), lo que lleva a que los pacientes infectados con este patotipo presenten diarrea acuosa e inflamatoria.

El ensayo de adherencia se basa en inocular una cepa bacteriana problema, sobre una monocapa confluyente de células HEp-2 e incubar por 3 horas a 37° C y 5% de CO₂. Después de este tiempo de incubación, la monocapa se lava, fija, tiñe y examina con la ayuda de un microscopio fotónico y con ello se determina el patrón de adherencia que presenta la bacteria en cuestión, metodología descrita por Nataro *et al.*, (1987). Los patrones de adherencia descritos son adherencia difusa (AD), adherencia localizada (AL), adherencia agregativa (AA).

La reproducibilidad que ha presentado éste ensayo, lo ha convertido en una prueba estándar para la determinación del fenotipo de adherencia agregativa y con ello la identificación del virotipo EAEC, además de ensayos moleculares como la identificación de la toxina EAST1, codificada por el gen *astA* (Savarino *et al.*, 1991), la identificación del gen *aat*, el cual codifica para una proteína denominada dispersina, así como el gen cromosomal *AggR* presente en una isla de patogenicidad de *E. coli*. (Kaper *et al.*, 2004).

2.5 BIOPELÍCULA (BIOFILM)

En la naturaleza, los microorganismos rara vez viven en colonias aisladas de una sola especie, generalmente viven en comunidades llamadas biopelículas (Pratt *et*

al., 1998). La biopelícula es un término utilizado para definir sistemas biológicos o una matriz con poblaciones bacterianas adheridas entre ellas y/o a una superficie. Esta estructura les permite a las bacterias refugiarse para evitar factores nocivos como el medio ambiente en general, antibióticos e incluso el sistema inmunitario humano (Pratt *et al.*, 1998).

La formación de la biopelícula depende de varios factores, como concentraciones bajas de oxígeno, diferentes concentraciones de glucosa, estructuras propias de la bacteria como el flagelo, *pili* entre otros (Reisner *et al.*, 2003, Wood *et al.*, 2006) que le permiten una colonización adecuada.

La biopelícula está compuesta por exopolisacáridos, proteínas y productos de lisis de las bacterias, siendo su principal componente el agua. La arquitectura de la matriz de la biopelícula no es sólida, pues en el interior, las microcolonias están rodeadas por canales que permiten el acceso a nutrientes, esta estructura favorece la comunicación entre las bacterias así como la eliminación de productos de desecho. (Reisner *et al.*, 2003).

En relación a la formación de biopelícula, se han planteado varias preguntas como ¿qué factores permiten a la bacteria llegar a una determinada superficie? Una vez ahí, ¿qué factores permiten a la bacteria adherirse a dicha superficie?, entre otras.

La movilidad en las bacterias se debe a la presencia de flagelo, ésta estructura también se relaciona con la unión de las mismas a una superficie que colonizan, además de que favorece la propagación bacteriana a otras superficies, por lo que el flagelo se ha considerado un factor importante para la formación de la biopelícula. (Pratt *et al.* 1998). Otras estructuras que se han relacionado con la formación de biopelícula, son el *pili* tipo 1, que está asociado con el establecimiento de la bacteria a una superficie, así como una adhesina membranal denominada Ag43, codificada por el gen *flu*, que estimula la formación de biopelícula prematura. (Pratt *et al.*, 1998, Reisner *et al.*, 2003).

Recientemente se ha mostrado que, en el momento en el que *E. coli* comienza a formar una biopelícula, las bacterias se vuelven ovoides y más pequeñas para eventualmente entrar en una fase estacionaria donde dejan de dividirse. A la par

que ocurre esto, comienzan a producir y excretar fibras “curli” autoagregativas. Estas fibras “curli”, a nivel molecular son proteínas ensambladas en una estructura amiloide, lo que permite su tinción con Rojo Congo (Serra *et al.*, 2013).

La presencia de biopelícula producida por *E. coli* se ha considerado un factor de virulencia muy importante, dado que se ha relacionado con la resistencia a antimicrobianos. La formación de biopelícula se ha detectado en catéteres, instrumentos médicos y en ocasiones válvulas cardíacas, favoreciendo la cronicidad de los padecimientos y dificultando su eliminación. (Sharma *et al.*, 2009, Serra *et al.*, 2013).

2.5.1 Métodos de estudio de la producción de biopelícula

Para el estudio de la producción de biopelícula en diferentes microorganismos se han desarrollado diversas metodologías, dentro de ellas están el Método en Tubo de Christensen y la de rojo Congo en placas de agar.

Christensen *et al.*, (1982) fue uno de los primeros grupos en desarrollar metodologías para determinar la producción de biopelícula, pues al realizar diversas investigaciones de infecciones intrahospitalarias, encontraron cierta sustancia mucoide en catéteres, válvulas cardíacas, prótesis, entre otros, ello asoció a infecciones causadas por estafilococos coagulasa negativos (por lo general *Staphylococcus epidermidis*) que producen, lo que llamaron en ese momento, limo. Ésta metodología se basa en crecer las bacterias en caldo, después de 24 horas de incubación a 37° C, el caldo se decanta y se procede a teñir los tubos con colorante, ya sea cristal violeta o safranina al 1%, para visualizar la formación de la biopelícula.

Dado que el método de Christensen no siempre es exitoso y que las variaciones en el medio de cultivo afectan los resultados, Freeman *et al.*, (1989) describieron una metodología alternativa para detectar la producción de biopelícula en un medio sólido. Esta consiste en agregar rojo Congo en placas de agar infusión cerebro-corazón (BHI), lo que permite la coloración de las colonias bacterianas.

Ambas metodologías fueron descritas para observar la producción de biopelícula por *S. epidermidis*, sin embargo varios autores las han implementado para evaluar la producción de biopelícula también en *E. coli* (Sharma *et al.*, 2009, Hassan *et al.*, 2011, Niveditha *et al.*, 2012, Serra *et al.*, 2013).

2.6 ANTIBIOGRAMA

Con el fin de lograr que los pacientes reciban un tratamiento adecuado, es necesario el aislamiento del microorganismo causal de la infección a través del cultivo. Una vez que se ha identificado al microorganismo, se evalúa la interacción de éste con los antimicrobianos apropiados a través del ensayo del antibiograma.

El antibiograma es el estudio *in vitro* que permite medir la sensibilidad de una bacteria frente a diferentes antimicrobianos. Con este estudio se pueden obtener resultados cualitativos que indican la sensibilidad o resistencia de una a un antibiótico, o cuantitativos que determinan la concentración mínima (CMI) de antibiótico que inhibe el crecimiento bacteriano. La interpretación de los resultados del antibiograma (sensible, intermedio o resistente) se realiza en función de los valores establecidos por diferentes comités, como el “Clinical and Laboratory Standards Institute” en Estados Unidos, el “European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing” en Europa y la “Mesa Española de Normalización de la Sensibilidad y Resistencia a los Antimicrobianos”. Estos comités determinan y establecen puntos de corte basados en propiedades microbiológicas, farmacocinéticas y de eficacia clínica, para definir la sensibilidad o resistencia de las diferentes especies bacterianas a cada antimicrobiano.

3. OBJETIVO GENERAL

- Comparar la prevalencia y características de los diferentes virotipos de *Escherichia coli*, aislados de población infantil en dos entidades federativas: San Luis Potosí y el Distrito Federal.

3.1 Objetivos particulares

- Identificar los virotipos de *E. coli* diarreogénica provenientes del Distrito Federal con virotipos de *E. coli* de San Luis Potosí, aislados de población infantil.
- Evaluar la relación que existe entre la presencia de los genes *aat* y *astA* de *E. coli* y el fenotipo de adherencia en cepas aisladas de población infantil del Distrito Federal y de San Luis Potosí.
- Analizar la producción de biopelícula y su relación con la presencia del flagelo (bacterias móviles) en las cepas de *E. coli* aisladas de población infantil del Distrito Federal y de San Luis Potosí a través de dos metodologías diferentes.
- Evaluar la resistencia a antibióticos de uso común en cepas de *E. coli* aisladas de población infantil del Distrito Federal y de San Luis Potosí.

4. HIPÓTESIS

Debido a que las cepas de *E. coli* fueron aisladas de poblaciones de dos entidades federativas diferentes, los virotipos identificados, así como los fenotipos de adherencia y producción de biopelícula que expresen, y la resistencia a antibióticos, se verán afectados por factores como son la zona geográfica y el tipo de población de cada entidad.

5.1 Muestras biológicas

Se trabajó con muestras de heces de niños con diarrea recolectadas en la época de primavera-verano, 38 provenientes del Hospital Central Dr. Ignacio Morones Prieto del estado de San Luis Potosí (S.L.P.) y 27 muestras del Instituto Nacional de Pediatría (INP) del Distrito Federal (D.F.). Las muestras se trasladaron a 4° C en medio de transporte Cary Blair.

5.2 Identificación bacteriana

Una vez en el laboratorio, se sembraron en medio Agar Mac Conkey (DIBICO®) y se incubaron a 37° C por 24 horas. Se seleccionaron de una a cinco colonias, con características morfológicas de *E. coli*. Posteriormente se realizaron las pruebas de biotipificación para confirmar la presencia de *E. coli*. Las pruebas bioquímicas realizadas fueron Triple Azúcar Hierro (TSI), Citrato de Simmons (CT), Agar Lisina Hierro (LIA), medio Movilidad-Indol-Ornitina (MIO), Rojo de Metilo y Voges Poskauer (RM y VP). A partir de estas pruebas se obtuvieron 100 cepas de *E. coli* provenientes de S.L.P., y 100 cepas de *E. coli* del D.F.

Además de las pruebas bioquímicas, se realizó un ensayo para determinar si la bacteria era capaz de producir β hemólisis. Para ello cada una de las cepas identificadas como *E. coli*, se sembraron por estría abierta (con picadura) en agar sangre de carnero al 5%, se incubaron a 37°C por 24 horas y posteriormente se procedió a evaluar la β hemólisis mediante la observación de la destrucción total de los eritrocitos.

Para la conservación de las cepas puras, se inocularon tubos con medio LB con cada una de las cepas de *E. coli* aisladas y se incubaron por 24 horas a 37°C. Posteriormente se realizó un “stock” de glicerol al 20% de cada una de ellas (200 μ l de glicerol estéril, más 200 μ l de medio LB fresco, más 200 μ l del cultivo de *E. coli*), se mezclaron perfectamente y se guardaron en el congelador a -20 °C.

5.3 Identificación de genes de virulencia a través de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

5.3.1 Extracción de ADN genómico

Se inoculó un tubo de medio LB con cada una de las cepas de *E. coli* aisladas así como los respectivos controles, se incubaron por 24 horas a 37°C; posteriormente un mililitro del inóculo se centrifugó por 10 min a 10 000 rpm, se desechó el sobrenadante y el botón fue resuspendido con 200µl de agua libre de nucleasas, éste se colocó en agua a 95° C durante 10 minutos, posteriormente se colocó a 4°C durante 10 minutos; finalmente se centrifugó a las mismas condiciones y se tomó el sobrenadante (el cual contiene el ADN), se colocó en un tubo Eppendorf de 500 µl, se etiquetó con el número de muestra y se guardó a -20°C para su posterior utilización.

5.3.2 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Una vez obtenido el ADN, se realizó el análisis molecular para cada una de las cepas de *E. coli* aisladas y de las cepas control, mediante la técnica de PCR en donde se identificaron nueve genes para la caracterización de los diferentes virotipos de *E. coli*: ETEC, EPEC, EAEC, EHEC y EIEC.

La PCR se realizó a partir de una mezcla de reacción (50 µl) para cada gen a identificar con: buffer 1X (100 mM tris-HCl, pH 8.5; 500 mM KCl, 15 mM MgCl₂, 1% de triton X-100), 0.2 mM de cada dNTP (Apex mezcla de dNTP, 10 mM), 0.25 mM de cada oligonucleótido (primer), 2.0 U de Taq polimerasa (Taq Apex), 3 µl de ADN problema. En la Tabla 1 se muestran la secuencia de los oligonucleótidos utilizados así como las condiciones de reacción para cada uno de los genes identificados en el presente trabajo. En la tabla 2 se enumeran los controles positivos utilizados para la identificación de cada uno de los genes, como control negativo se utilizó a la cepa saprofita K:12. Aquellos ensayos de PCR que fueron

“multiplex” se realizaron para los genes *LT* y *ST*, *Stx1* y *Stx2*, *eaeA* y *ial*; mientras que los demás genes se realizaron simples.

Tabla 1. Secuencia de oligonucleótidos utilizados para la identificación de genes de virulencia de *E. coli*

GEN	SECUENCIA DE OLIGONUCLEOTIDOS	PRODUCTO ESPERDO (pb)	CONDICIONES DE LA REACCIÓN
<i>eaeA</i>*	F:5'-GAC CCG GCA CAA GCA TAA GC-3' R:5'-CCA CCT GCA GCA ACA AGA GG-3'	384	95°C 44" 50°C 45" 72°C 45"
<i>bfpA</i>*	F:5'-AAT GGT GCT TGC GCT TGC TGC-3' R:5'-GCC GCT TTA TCC AAC CGT GTA-3'	324	95°C 45" 52°C 45" 72°C 45"
<i>ST</i>*	F:5'-ATT TTT CTT TCT GTA TTG TCTT-3' R:5'-CAC CCG GTA CAA GCA GGA TT-3'	190	95°C 45" 50°C 45" 72°C 45"
<i>LT</i>*	F:5'-GGC GAC AGA TTA TAC CGT GC-3' R:5'-CGG TCT CTA TAT TCC CTG TT-3'	450	72°C 45"
<i>ial</i>*	F:5'-GGT ATG ATG ATG ATG AGT CCA-3' R:5'-GGA GGC CAA CAA TTA TTT CC-3'	650	95°C 45" 50°C 45" 72°C 45"
<i>Stx1</i>*	F:5'-CTG GAT TTA ATG TCG CAT AGT G-3' R:5'-AGA ACG CCC ACT GAG ATC ATC-3'	150	95°C 45" 50°C 45" 72°C 45"
<i>Stx2</i>*	F:5'-GGC ACT GTC TGA AAC TGC TCC-3' R:5'-TCG CCA GTT ATC TGA CAT TCT G-3'	255	
<i>aat</i>**	F:5'-CTG GCG AAA GAC TGT ATC AT-3' R:5'-CAA TGT ATA GAA ATC CGC TGT T-3'	630	95°C 1' 55.5°C 1' 72°C 1'
<i>astA</i>**	F:5'-CCA TCA ACA CAG TAT ATC CGA-3' R:5'-GGT CGC GAG TGA CGG CTT TGT-3'	111	95°C 1' 55.5°C 1' 72°C 1'

Secuencias obtenidas de acuerdo a lo publicado por *López-Saucedo *et al.*, 2003 ** Jenkins *et al.*, 2006

Tabla 2. Cepas de referencia utilizadas

VIROTIPOS	SEROTIPOS	GENES
*ETEC	O407:H1	<i>LT, ST</i>
*EPEC	O127:H6	<i>eaeA, bfpA</i>
*EIEC	O143:H23	<i>ial</i>
*EHEC EDL933	O7:H157	<i>STx1, STx2, eaeA</i>
**EAEC	O44:H18	<i>aat, astA</i>

*Cepas donadas al laboratorio por la Dra. M.Teresa Estrada-García, del CINVESTAV

**Cepa donada por la Dra. Chattaway del Public Health England

5.3.3. Detección de productos de amplificación

Los productos amplificados en la prueba de PCR se visualizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% (BIOSELECT®) durante 60 minutos y 80 volts, utilizando como revelador 50µl de Bromuro de etidio por cada 50 ml de agarosa disuelta en buffer TAE 1x. Se utilizó un marcador de peso molecular de 100pb-300pb (AXIGEN BIOSCIENCIAS®). Los productos amplificados se visualizaron bajo un transiluminador de luz UV (UVP, CA, U.S.A.).

Los genes en cada cepa se identificaron y clasificaron en virotipos, basados en la clasificación de Estrada-García *et al.* 2009. (Tabla 3).

Tabla 3. Clasificación de los virotipos de *E. coli*

VIROTIPO	GEN	MECANISMO DE PATOGENICIDAD
tEPEC	<i>bfpA + eaeA</i>	Adherencia localizada, lesiones A/E
aEPEC	<i>eaeA</i>	Adherencia localizada
ETEC	<i>LT y/o ST</i>	Enterotoxinas
EIEC	<i>ial</i>	Invasividad

EHEC	<i>STX1</i> y/o <i>STX2</i> y algunas <i>eaeA</i>	Citotoxinas
EAEC	<i>aat</i> y/o <i>astA</i>	Adherencia agregativa

Clasificación según Estrada-García et al. 2009

5.4 Ensayo de adherencia a células HEp-2

Este ensayo se realizó sólo en cepas que portaban los genes *aat* y/o *astA* (EAE), debido a que estos genes se han relacionado con la adherencia de *E. coli* a monocapas de células. De las cepas de *E. coli* aisladas del D.F., 17 cepas presentaron por lo menos uno de los genes antes mencionados y en S.L.P., 14 cepas presentaron alguno de los genes.

5.4.1 Cultivo de bacterias

Cada una de las *E. coli* antes mencionadas, se creció en medio LB + D-manosa al 1% durante 24 horas a 37° C, para obtener una densidad igual al tubo 0.5 unidades de la Mac Farland (UMF), equivalente entre 1×10^8 a 2×10^8 UFC/mL, posteriormente se centrifugaron a 5000 rpm durante cinco minutos, se desechó el sobrenadante, el botón se resuspendió en un ml de PBS 1X estéril. Se tomaron 100 µl de esta solución PBS-bacterias y se colocaron en 900 µl de medio Eagle's-Dubelco modificado (DMEM; Gibco, BRL).

5.4.2 Cultivo de células HEp-2 en placas

A partir de un cultivo de células HEp-2 en frasco con una confluencia mayor al 90%, se llevó a cabo el cultivo de células HEp-2 en placas de 24 pozos, a las cuales previamente se les había colocado una lenteja de vidrio de 13 mm de diámetro. Para esto, se colocaron 6×10^5 células por pozo, en medio DMEM enriquecido con 5% de suero fetal bovino (BIOWEST®) y 200 µg/mL

penicilina/estreptomicina (PAA, Pasching Austria), las células fueron incubadas bajo una atmosfera de 5% de CO₂ a 37 ° C durante 24 horas o hasta obtener una monocapa celular con una confluencia mayor o igual a 90%.

5.4.3 Ensayo de Adherencia

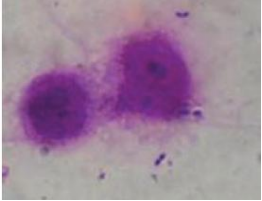
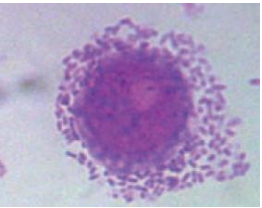
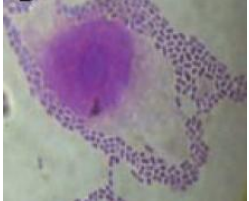
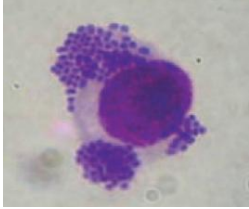
Una vez que se obtuvo una confluencia de 90% de células HEp-2, se procedió a realizar tres lavados con PBS 1x estéril (para eliminar cualquier resto de antibióticos), y se adicionaron 500 µl de medio DMEM sin suplementar. Posteriormente fueron adicionadas 5×10^5 células bacterianas/500 mL del medio DMEM/pozo, por duplicado. Las placas fueron incubadas durante 3 horas a 37 °C y 5% CO₂, de acuerdo a lo descrito por Donnenberg y Nataro (1995). Pasado este periodo, las células se lavaron nuevamente con PBS 1x cinco veces para eliminar las bacterias no adheridas y se procedió a realizar la tinción del cultivo. Se utilizaron como controles positivos, la cepa O:42 y como control negativo no adherente a la cepa saprofita K:12.

5.4.4 Tinción

Las laminillas se fijaron con metanol absoluto por un minuto, se lavaron con agua destilada tres veces, se tiñeron con colorante de Giemsa al 10% durante 20 min, pasado este tiempo se lavaron con agua desionizada hasta eliminar el colorante, se dejó secar por 24 horas a temperatura ambiente. Para montar las laminillas se procedió previamente a desecarlas (pasándolas 2 veces por acetona un minuto, 1 vez por mezcla xilol-acetona [50:50] un minuto, 1 vez por xilol un minuto) posteriormente se procedió a montar las laminillas en un portaobjetos (previamente desengrasado) utilizando una resina de rápido secado Eukitt, (Fluka®). Se contaron un total de 100 campos por laminilla y se reportaron los resultados obtenidos.

La observación del patrón de adherencia de cada cepa se comparó con las imágenes publicadas por Riveros *et al.*, 2011, Tabla 4.

Tabla 4. Patrones de adherencia a células HEP-2

TIPO DE ADHERENCIA	CARACTERÍSTICAS	
Bacteria sin adherencia	Se evalúa como la presencia nula o muy escasas células bacterianas en el cubreobjetos	
Adherencia difusa	Se evalúa como bacterias distribuidas en la superficie celular y en el vidrio sin un orden determinado	
Adherencia agregativa	Se evalúa como bacterias ubicadas en la superficie de las células y en el vidrio en forma de empalizadas. “Agregación en forma de ladrillos”	
Adherencia localizada	Se evalúa como bacterias formando microcolonias localizadas sólo en la monocapa de células	

Fotos tomadas de Riveros *et al.*, 2011

5.5 Producción de biopelícula

La formación de biopelícula se evaluó en placa y en tubo, para este ensayo se seleccionaron cepas de *E. coli* que presentaron flagelo, dado que de acuerdo a Reisner *et al.*, 2003 así como Wood *et al.*, 2006 el flagelo es un factor importante para la formación de biopelícula.

5.5.1 Ensayo en placa

La formación de biopelícula en placa se evaluó por el método en placa de agar rojo Congo (ARC) (Freeman *et al.*, 1989, Niveditha *et al.*, 2012). Cada cepa de *E. coli* que presentó movilidad, se incubó en medio LB- D-manosa al 1% durante toda la noche.

El ensayo en placa se realizó en el medio de agar rojo Congo, que contiene agar cerebro-corazón (BHI) suplementado con 5% de sacarosa y 0.08% de rojo Congo.

La preparación del medio fue por separado, primero se preparó el agar BHI suplementado con la sacarosa y por otro lado la solución de Rojo Congo: ambos se esterilizaron bajo las mismas condiciones (121° C por 15 minutos). El agar se dejó a temperatura ambiente y al adquirir una temperatura de 40° C, se agregó el rojo Congo (SIGMA), se homogenizó y plaqueó en cajas Petri de 15 x 90 mm, para luego colocarlas en control de esterilidad durante 24 horas. (Niveditha *et al.*, 2012).

Cada una de las cepas de *E. coli* se sembró por duplicado, las placas se incubaron durante 48 horas a 37° C. Como control positivo se utiliza la cepa *E. coli* K:12 y como control negativo la cepa de *E. coli* O:42. La lectura de los resultados se realizó con base en lo descrito por Niveditha *et al.*, 2012, con las siguientes modificaciones:

La evaluación de los resultados se realizó a las 48 de incubación. Para considerar un resultado positivo, es decir una cepa de *E. coli* productora de biopelícula se tomó en cuenta la coloración de las colonias, esto es colonias negras con una

consistencia cristalina y se le dio el valor de dos cruces (++), (Imagen 1). Para las cepas que son débilmente productoras de biopelícula se consideró a aquellas colonias que mostraban una coloración gris, o rosa y que en ocasiones presentan centros de color negro, a éstas se les dio valor de una cruz (+). Mientras que aquellas cepas que no presentaron coloración se consideró no formadora de biopelícula, y se le dio el valor (-). (Imagen 1)

Imagen 1. Formación de biopelícula en placa de ARC

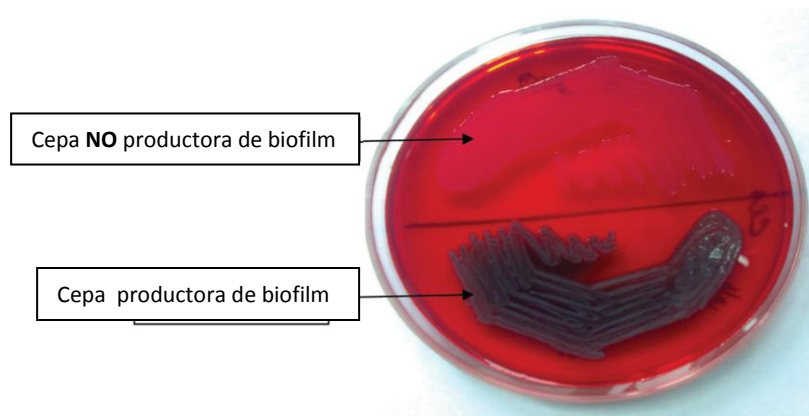


Imagen tomada de Niveditha *et al.*, 2012

5.5.2 Método de Christensen (método en tubo)

A partir del cultivo de la cepa de *E. coli* en LB-D-manosa, se tomó una asada, se inocularon tubos con caldo BHI por triplicado y se incubaron a 35° C durante 48 horas. El sobrenadante se decantó y cada tubo se tiñó con safranina 0.1% por 30 minutos, se lavó en 3 ocasiones con agua destilada y se dejó secar a temperatura ambiente.

Para evaluar los resultados, se tomaron los siguientes criterios: se consideró un resultado positivo (Niveditha *et al.*, 2012) cuando la pared y el fondo del tubo se tornaron de color rojo, dando el valor de positivo de una cruz (+). (Imagen 2).

Un resultado negativo se consideró la ausencia de color (-). La sola observación de la formación del anillo se evaluó como un resultado negativo. (Imagen 2), (Suman *et al.* 2007, Sharma *et al.* 2009 Niveditha *et al.* 2012).

Imagen 2. Producción de biopelícula por el método de Christensen

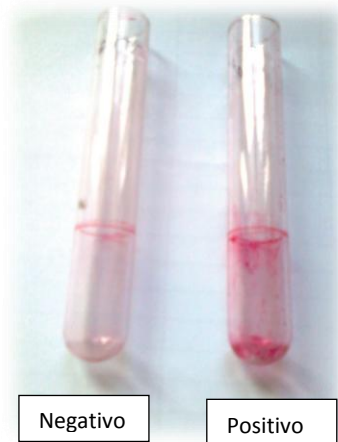


Imagen tomada de Niveditha *et al.* 2012

5.6 Antibiograma

Para realizar este ensayo, las cepas de *E. coli* se crecieron en medio LB a 37°C durante 8 horas hasta, obtener una Densidad Óptica equivalente al tubo 0.5 en la escala de Mc Farland (de 1 a 2×10^8 UFC/mL). A partir de este cultivo se hizo una siembra masiva en placas con medio Müller Hinton (DIBICO®), una vez seca la placa se depositaron los sensibilizadores (con concentraciones determinadas de cada uno de los antibióticos utilizados) mediante el uso de un dispensador (BD Sensi-Disc Antimicrobial Susceptibility Test Discs ®). Posteriormente se incubaron a 37°C durante 24 horas. Se determinaron los diámetros (mm) de inhibición de crecimiento bacteriano. En la Tabla 5, se muestran los criterios para clasificar a una cepa como Resistente (R), intermedio (I) o Sensible (S), a cada uno de los antibióticos, así como la concentración de cada uno de ellos. Se utilizó como control positivo a la cepa *E. coli* ATCC (25922).

Tabla 5. Diámetro correspondiente a los halos de inhibición de crecimiento bacteriano

Antibiótico	Concentración (µg)	*R	*I	*S
Kanamicina (K)	30	≤13	14-17	≥18
Amikacina (AN)	30	≤14	15-16	≥17
Ampicilina (AM)	10	≤13	14-16	≥17
Cefalotina (CF)	30	≤14	15-17	≥18
Amoxicilina/Ac. Clavulónico (AMC)	30	≤13	14-17	≥18
Cefotaxina (CTX)	30	≤14	15-22	≥23
Sulfametoxazol/ trimetoprim (STX)	23.7 y 1.25	≤10	11-15	≥16
Cefoxitina (FOX)	30	≤14	15-17	≥18

*R: resistente, *I: intermedio, *S: sensible. Diámetro en milímetros. BD Sensi-Disc Antimicrobial Susceptibility Test Discs ©. 2010

5.7 Análisis estadístico

Se evaluaron frecuencias simples y frecuencias relativas para analizar las diferencias entre las entidades federativas San Luis Potosí y el Distrito Federal, para lo cual se determinó χ^2 (chi cuadrada), la prueba Exacta de Fisher y razón de ventaja (Odds ratio). Con un intervalo de confianza del 95%, por lo tanto existe diferencia significativa si el valor es $p \leq 0.05$

Los programas utilizados fueron: SPSS20, Stata/SE 12.0 y Excel 2013.

6. RESULTADOS

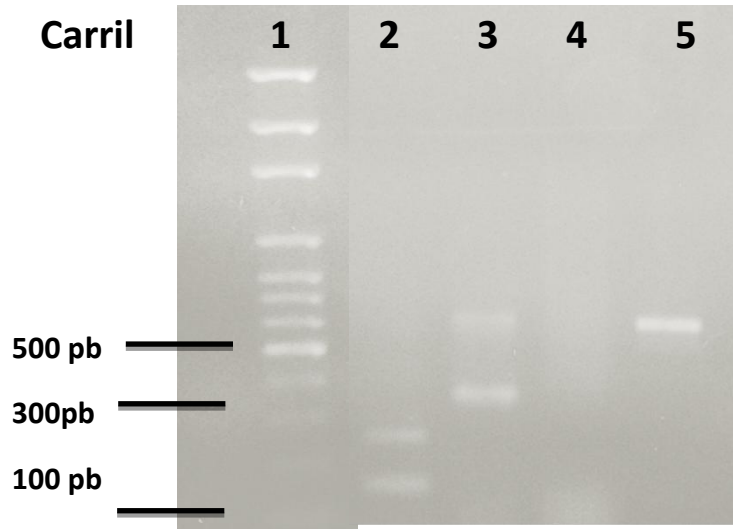
Después de la identificación bacteriana mediante el uso de pruebas bioquímicas para confirmar que se trataba de la bacteria *E. coli*, se obtuvo un total de 200 cepas de la bacteria, de las cuales 100 provienen del Hospital Central Dr. Ignacio Morones Prieto del estado de San Luis Potosí y 100 del Instituto Nacional de Pediatría, del Distrito Federal.

El ensayo de β -hemólisis mostró que 14 cepas provenientes del D.F., producían β -hemólisis así como 11 cepas de S.L.P.

6.1 Identificación de genes de virulencia de *E. coli*

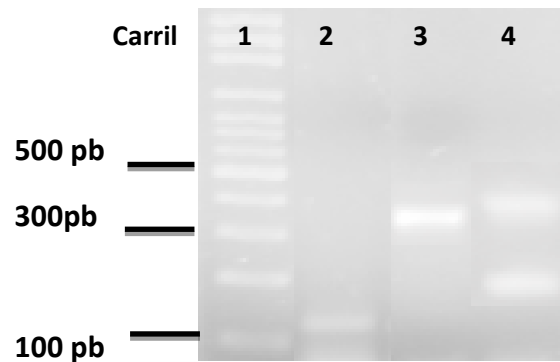
A través del ensayo de la PCR, se identificaron nueve genes de virulencia de los cuales cinco codifican para toxinas (*LT*, *ST*, *STX1*, *STX2* y *astA*), dos para adhesinas (*bfpA* y *eaeA*), uno para invasividad (*ial*) y un gen que participa en la secreción de la proteína llamada dispersina, *aat*. Se visualizaron mediante geles de agarosa al 2%. En la imagen 3 se observan los productos de la amplificación de los genes *Stx1* (150 pb), *Stx2* (255 pb), *eaeA* (384 pb), *ial* (650 pb) *aat* (630 pb) y en la imagen 4 los productos de la amplificación de los genes *astA* (111 pb), *bfpA* (324 pb), *ST* (190 pb) y *LT* (450 pb).

Imagen 3. Amplificación de genes de virulencia en cepas de *E. coli*



En gel de agarosa al 2%, se observa en el carril 1: marcador molecular. Carril 2: *Stx1* (150 pb) *Stx2* (255 pb). Carril 3: *eaeA* (384 pb), *ial* (650 pb). Carril 4: sin muestra. Carril 5: *aat* (630 pb)

Imagen 4. Amplificación de genes de virulencia en cepas de *E. coli*



En gel de agarosa al 2%, se observa: en el carril 1: marcador de peso molecular. Carril 2: *astA* (111 pb). Carril 3: *bfpA* (324 pb) Carril 4: *ST* (190 pb) y *LT* (450 pb)

Como puede observarse en la Tabla 6, de las cepas de *E. coli* aisladas en el D.F., 30% presentaron el gen *LT*; 14% de las cepas el gen *ST*, 2% de las cepas presentaron el virotipo *LT:ST*, 14% el gen *astA*, 4% el gen *ial*, siendo éstos los de mayor prevalencia dentro de los nueve genes estudiados. En tanto que, para el estado de S.L.P. 57% de las cepas presentaron el gen *LT*; 37% presentaron *ST*; 27% presentaron el virotipo *LT:ST*; un 28% de las cepas presentaron el gen *ial* y 13% el gen *astA*.

Tabla 6. Porcentaje de genes encontrados en las cepas de *E. coli* provenientes de cada población estudiada

¹ Genes	% cepas D.F.	% de cepas S.L.P.
<i>LT</i> *	30	57
<i>ST</i> *	14	37
<i>ST:LT</i> *	2	27
<i>ial</i> *	4	28
<i>Stx1</i> *	3	22
<i>Stx2</i>	0	9
<i>Stx1:Stx2</i>	0	5
<i>Stx1:Stx2:eaeA</i>	4	0
<i>eaeA</i>	9	9
<i>bfpA</i>	2	0
<i>astA</i>	14	13
<i>aat</i>	3	1
<i>astA:aat</i>	3	0

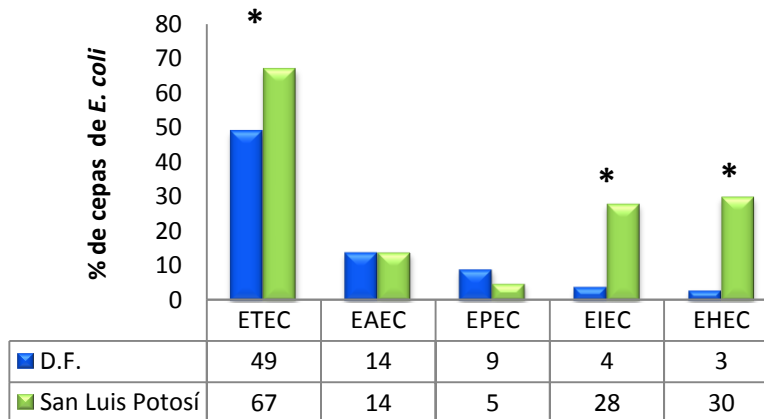
¹genes que codifican para: *LT*: toxina termolábil al calor. *ST*: toxina termoestable al calor. *Stx1* y *Stx2*: citotoxinas "Shiga-like". *eaeA*: gen que codifica para intimina. *bfpA*: codifica para pili formadores de pelos. *ial*: invasividad. *astA*: toxina Enteroagregativa estable al calor EAST1. *aat*: gen que participa en la secreción de la proteína llamada dispersina

* p<0.05

6.2 Virotipos

Debido a la presencia de los genes de virulencia estudiados, las cepas se clasificaron en diferentes virotipos de acuerdo a lo publicado por Estrada-García *et al.* (Tabla 4), obteniendo los siguientes resultados: para el D.F., ETEC se presentó un 49% y para S.L.P., 67%, el análisis estadístico mostró una diferencia significativa con una $p=0.009$; EAEC en el D.F., se presentó en un 14% y en S.L.P., 14%; EIEC en el D.F., con 4% y en S.L.P., 28%, el análisis estadístico mostró una diferencia estadísticamente significativa de $p=0.000$; EHEC para el D.F., con 3% y en S.L.P., 30%, el análisis estadístico mostró una diferencia estadísticamente significativa con una $P=0.000$. De acuerdo a la clasificación de EPEC, las cepas que poseen el gen *eaεA*, se clasifican como aEPEC. El porcentaje de cepas que fueron aEPEC en el D.F., es 9% y para S.L.P., fue de 5% (Gráfica 1).

Gráfica 1. Porcentaje de patotipos de *E. coli* provenientes de San Luis Potosí y del Distrito Federal



ETEC: *E. coli* enterotoxigénica. EAEC: *E. coli* enteroagregativa. EPEC: *E. coli* enteropatogénica. EIEC: *E. coli* enteroinvasiva. EHEC: *E. coli* enterohemorrágica

* $p < 0.00$

Las cepas de *E. coli* estudiadas, no sólo presentaron genes pertenecientes a un grupo patogénico específico, sino que comparten genes, característicos de otros grupos patogénicos de *E. coli*, por lo que se pueden clasificar en más de un grupo, como se observa en la tabla 7. El número de cepas clasificadas dentro de un virotipo fueron para el D.F., 48 y para S.L.P., 49. Las cepas que se pueden clasificar en dos virotipos diferentes fueron para el D.F., 14 y para S.L.P., 32 cepas, con una diferencia estadísticamente significativa de $p < 0.00$. Mientras que aquellas cepas que se pueden clasificar en tres virotipos, solo se presentaron en S.L.P., en 9 cepas. De igual forma, se obtuvieron cepas de *E. coli*, que no presentaron ninguno de los genes que se buscaron en este trabajo, para el D.F., fueron 38 y para S.L.P., 10 cepas, mostrando una diferencia estadísticamente significativa con $p < 0.00$

Tabla 7. Número de cepas que presentan diferentes virotipos

	D.F.	S.L.P.
Ningún virotipo*	38	10
Un virotipo	48	49
Dos virotipos*	14	32
Tres virotipos	0	9

* $p < 0.00$

6.3 Ensayo de adherencia a células HEp-2

La adherencia es uno de los primeros factores para que las cepas de *E. coli* patógenas puedan causar infecciones diarreicas. Para ello se realizó el ensayo de adherencia de las bacterias a una monocapa de células HEp-2, que es considerado como la prueba de oro para identificar el virotipo EAEC.

Como puede observarse en la tabla 8, del total de las 17 cepas de *E. coli* que se evaluaron para el D.F., sólo una cepa presentó adherencia agregativa (AA) y fue *astA+*, 12 cepas presentaron adherencia difusa (AD), de ellas, 2 presentaron ambos genes *astA* y *aat*; las restantes 4 cepas no presentaron patrón de adherencia alguno. (Tabla 8). En la imagen 5C se observa una cepa con patrón de adherencia difusa y en la imagen 5E, se observa el patrón de adherencia agregativa de cepas provenientes del D.F.

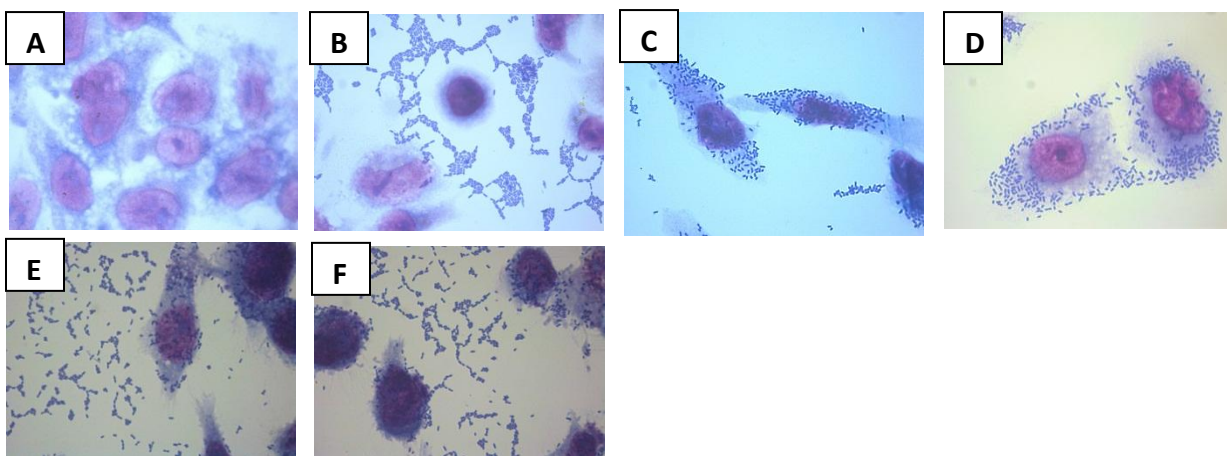
Para S.L.P., 13 cepas presentaron el gen *astA* de las cuales 4 presentaron AA, 4 AD y 5 cepas no presentaron adherencia. Respecto a la cepa que posee el gen *aat*, ésta no presentó adherencia. (Tabla 8). En la imagen 5D se observa una cepa con patrón de adherencia difusa mientras que la imagen 5F se observa una cepa con patrón de adherencia agregativa, ambas pertenecientes a S.L.P.

Tabla 8. Tipo de adherencia y genes que portan cepas de *E. coli*

Localidad	Número de cepas	Genes	Tipo de adherencia*		
			AA	AD	N
D.F.	14	<i>astA+</i>	1	10	3
	0	<i>aat+</i>	0	0	0
	3	<i>astA+;aat+</i>	0	2	1
Total de cepas	17				
S.L.P.	13	<i>astA+</i>	4	4	5
	1	<i>aat+</i>	0	0	1
	0	<i>astA+;aat+</i>	0	0	0
Total de cepas	14				

*AA: Adherencia agregativa. AD: adherencia difusa. N: adherencia negativa. *aat* (gen asociado a la secreción de dispersina). *astA* (toxina enteroagregativa estable al calor)

Imagen 5. Patrones de adherencia obtenidos en diferentes cepas de *E. coli* estudiadas



A) Control negativo cepa *E. coli* K:12 100 x, **B)** Control positivo Adherencia Agregativa cepa *E. coli* O:42 100x, **C)** Adherencia Difusa 100x cepa D.F. **D)** Adherencia Difusa 100x cepa S.L.P. **E)** Adherencia agregativa 100x cepa D.F **F)** Adherencia agregativa 100x cepa S.L.P.

6.4 Producción de biopelícula

Para evaluar la producción de biopelícula, se tomó en cuenta las cepas que mostraron movilidad (flageladas). De las cepas de *E. coli* aisladas del D.F., 60% fueron móviles y para S.L.P., el 84%.

6.4.1 Ensayo en agar rojo Congo

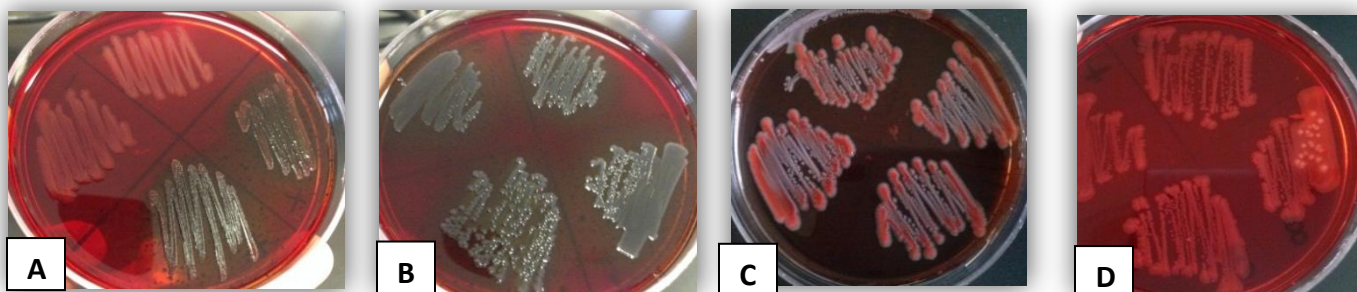
De las 60 cepas de *E. coli* aisladas del D.F., sólo 42 cepas formaron biopelícula de las cuales, 11 fueron fuertes productoras de biopelícula (++), 31 se consideraron débiles productoras del biopelícula (+) y 18 cepas fueron negativas. Para S.L.P., de 84 cepas de *E. coli*, sólo 64 cepas formaron biopelícula, de éstas 28 fueron fuertes productoras (++) y 36 cepas fueron débiles productoras de biopelícula (+) y 20 de ellas fueron negativas. (Tabla 9). En la imagen 6 se observa la coloración que adquieren las colonias al producir biopelícula.

Tabla 9. Evaluación de biopelícula de cepas de *E. coli* por el método de Agar rojo Congo (ARC)

	AGAR ROJO	CONGO
	D.F. n(%)	S.L.P. n(%)
(++)¹	11(19%)	28(33%)
(+)¹	31(51%)	36(43%)
Total de cepas positivas	42(70%)	64(76%)
(-)¹ Total de cepas negativas	18(30%)	20(24%)
Total de cepas evaluadas	60(100%)	84(100%)

¹(++) cepas fuertes productoras de biopelícula (+) cepas débiles productoras de biopelícula. (-) cepas no productoras de biopelícula

Imagen 6. Producción de biopelícula en placas por el método de ARC



A) Parte superior cepa O:42 control negativo (colonias incoloras), parte inferior cepa K:12 control positivo (colonias negras secas cristalinas), **B)** (++) colonias negras secas cristalinas. **C)** Colonias rosadas con el centro negro (+). **D)** colonias incoloras (-). **B, C y D** pertenecen a cepas de S.L.P.

6.4.2 Método de Christensen (Método en tubo)

De acuerdo al método de Christensen, para el D.F., de 60 cepas de *E. coli* evaluadas, 11 cepas fueron productoras de biopelícula, mientras que para S.L.P., de 84 cepas de *E. coli* evaluadas, 18 cepas fueron productoras de biopelícula. El número de cepas que no fueron productoras de biopelícula para el D.F., fue de 48 cepas y para S.L.P., de 66 cepas. (Tabla10). En la imagen 7 se observa la tinción que adquiere la pared y el fondo del tubo inoculado con una cepa productora de biopelícula.

Tabla 10. Número de cepas evaluadas para la formación de biopelícula por método en tubo

Método de Christensen			
	Total de cepas evaluadas n (%)	(+) ¹	(-) ¹
D.F.	60 (100%)	11 (19%)	49(81%)
S.L.P.	84(100%)	18(21%)	66(79%)

¹(+) Número de cepas de *E. coli* productoras de biopelícula (-) Número de cepas de *E. coli* no productoras de biopelícula

Imagen 7. Evaluación de formación de biopelícula por Método de Christensen

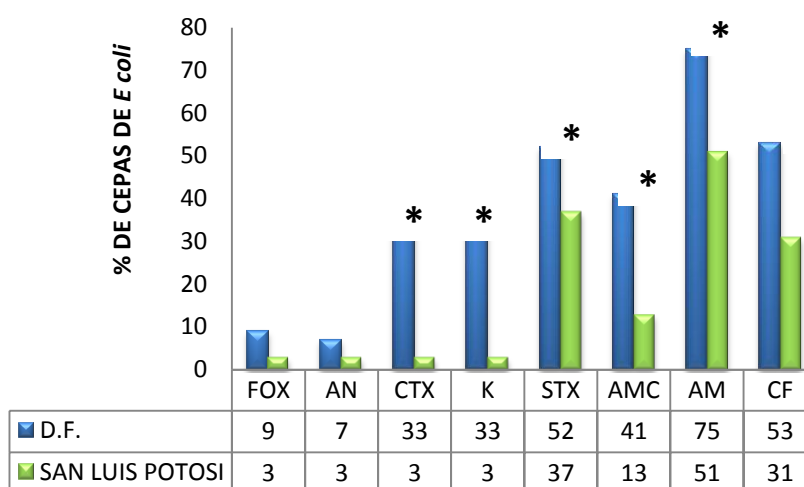


Tubo 1, control positivo(+) cepa *E. coli*: K12. Tubo 2 control negativo (-), cepa O:42

6.5 Antibiograma

Con el fin de evaluar la resistencia y sensibilidad a ciertos antibióticos se realizaron ensayos de antibiograma. Como podemos observar en la gráfica 4, las cepas de *E. coli* aisladas del D.F., presentaron un 75% de resistencia a ampicilina (AM), mientras que las cepas provenientes de S.L.P., 51% fueron resistentes, el análisis estadístico mostró una diferencia estadísticamente significativa con una $p=0.000$; 53% de las cepas del D.F., fueron resistentes a cefalotina (CF) y en S.L.P., sólo un 31 % con una $p=0.001$; 52% de las cepas del D.F., mostraron resistencia a sulfametoxazol/trimetoprim (STX) en relación al 37% de las cepas de S.L.P., con $p= 0.03$ y 41% de las cepas del D.F., mostraron resistencia a amoxicilina/ac. clavulónico (AMC) en relación al 13% de las cepas de S.L.P., con una diferencia estadísticamente significativa de $p=0.000$; 33% de las cepas fueron resistentes a kanamicina en el D.F., en relación con un 3% de las cepas de S.L.P., el análisis estadístico mostró una $p=0.000$, por lo que existen diferencias estadísticamente significativas; al igual que para cefotaxima que presentó 33% de cepas resistentes en el D.F., y 3% en S.L.P, con una $p= 0.000$ (Gráfica 4)

Gráfica 4. Porcentaje de cepas de *E. coli* resistentes a diferentes antibióticos

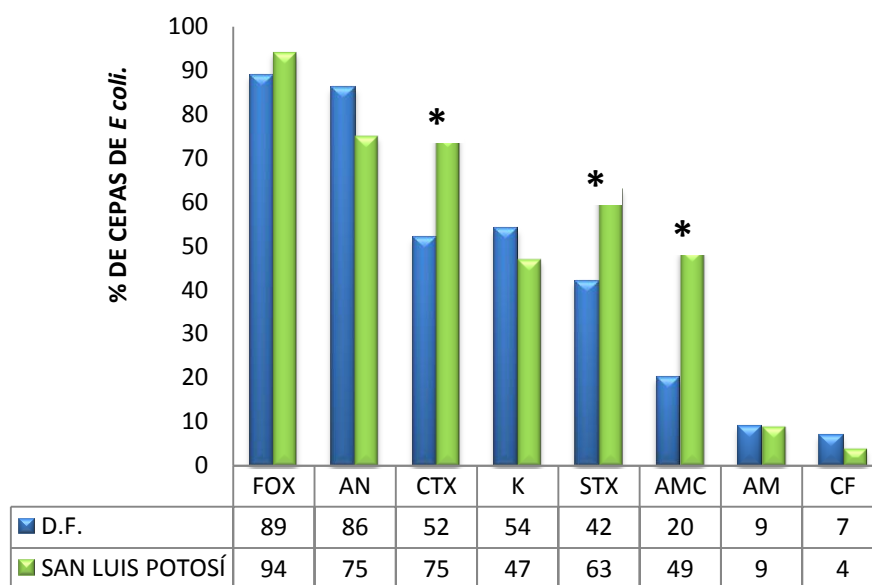


FOX- Cefoxitina, AN- Amikacina, CTX-Cefotaxima, K-Kanamicina, STX- Sulfametoxazol/Trimetoprim, AMC-Amoxicilina/Ac. clavulónico, AM- Ampicilina, CF- Cefalotina

* $p < 0.00$

La sensibilidad que presentaron las cepas de *E. coli* a los diferentes antibióticos se muestran en el gráfico 5. Aquellos antibióticos que presentaron diferencias estadísticamente significativas fueron amoxicilina/ac. clavulónico con una $p=0.000$, cefotaxima con una $p=0.000$ y sulfametoxazol/trimetoprim con una $p=0.004$.

Gráfica 5. Porcentaje de cepas de *E. coli* sensibles a diferentes antibióticos



FOX- Cefoxitina, AN- Amikacina, CTX-Cefotaxima, K-Kanamicina, STX- Sulfametoxazol/Trimetoprim, AMC-Amoxicilina/Ac. clavulónico, AM- Ampicilina, CF- Cefalotina

* $p < 0.00$

7. DISCUSIÓN

Con el objetivo de comparar los virotipos de *E. coli* provenientes de dos estados de la República Mexicana y evaluar tanto genotipo como fenotipo, se trabajó con muestras de heces provenientes de niños de los estados de S.L.P., y del D.F., cuyas poblaciones son diferentes debido a las características geográficas, su población, incluso el grado de rezago social. De acuerdo con datos obtenidos del Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI), en S.L.P., el 36% de la población es considerada como rural y en el D.F., sólo el 0.5% es población rural. Por lo que en el presente trabajo se compararon los virotipos de *E. coli* aislados de muestras provenientes de población infantil de estos dos estados, con el fin de identificar las diferencias tanto genotípicas como fenotípicas de esta bacteria.

En general, la incidencia de todos los virotipos detectados en las cepas de *E. coli* aisladas de muestras diarreicas provenientes del estado de San Luis Potosí, fue mayor a la de los virotipos del Distrito Federal.

El virotipo que presentó una prevalencia mayor fue ETEC en ambos grupos de estudio; en el D.F., con un 49% de las cepas y en S.L.P., con un 67%, presentando diferencia estadísticamente significativa con una $p=0.009$. Los datos obtenidos en este trabajo concuerdan con lo encontrado previamente por diversos autores (Nataro *et al.*, 1998, Paniagua *et al.*, 2007, Quadri *et al.*, 2005), quienes afirman que ETEC es el patotipo más frecuentemente encontrado en países subdesarrollados así como en países desarrollados, y la alta prevalencia de ETEC se ha relacionado con su capacidad de colonización (Nataro *et al.*, 1998).

Respecto a los genes de virulencia identificados para ETEC, los genes que codifican para las toxinas *LT* y *ST*, fueron los que se presentaron con una mayor prevalencia en las cepas estudiadas; el gen prevalente para ambos grupos fue el que codifica para la toxina *LT*: en las cepas aisladas del D.F., se presentó en un 30% y en las cepas de S.L.P., en un 57%, lo cual concuerda con los de estudios de Cortés-Ortiz *et al.*, 2002, Jiang *et al.*, 2000, Paniagua *et al.*, 2007, Estrada-García *et al.*, 2009, Qadri *et al.*, 2005, quienes encontraron al gen que codifica para la toxina *LT* con mayor frecuencia respecto a *ST*, tanto en países

desarrollados como en subdesarrollados. Dado que las cepas de *E. coli* estudiadas, provenían de muestras de heces tomadas durante las estaciones de primavera y verano, es probable que la incidencia del patotipo ETEC, sea estacional, lo cual concuerda con lo publicado por Estrada-García y colaboradores.

El virotipo EHEC fue el segundo más frecuente en el estado de S.L.P., con un 30% de las cepas positivas, sin embargo para el D.F., se encontró en un 3%; el análisis estadístico mostró diferencia estadísticamente significativa en los datos obtenidos, con una $p=0.000$. Llama la atención la alta prevalencia de este virotipo en la población de S.L.P., comparada con la prevalencia de este virotipo tanto en el D.F., como con lo publicado por otros autores. Estrada-García *et al.*, 2009 mostraron que la frecuencia de EHEC en niños con diarrea en el D.F., fue 2.5%; mientras que Vilchez *et al.*, en el 2009 en un estudio realizado en Nicaragua, encontraron que la frecuencia de EHEC en esta población fue de 2.1%, Nataro *et al.*, (1998) mencionan que este virotipo se aísla con menor frecuencia en población subdesarrollada en comparación con los virotipos ETEC y EPEC. Sin embargo de acuerdo con Clarke S. (2001), EHEC se ha convertido en un virotipo importante debido al aumento en el número de brotes que han aparecido tanto en países desarrollados como en países subdesarrollados, y menciona que este incremento puede deberse al alto consumo de alimentos mal cocinados. A pesar de la alta prevalencia de EHEC en S.L.P., no se tiene reporte por parte de las autoridades sanitarias del estado, de brotes de Síndrome Urémico Hemolítico (SUH), como el recién ocurrido en Alemania en el año 2011 (<http://www.who.int/es>).

Al igual que EHEC, la prevalencia del virotipo EIEC fue superior en el estado de S.L.P., con un 28% y para el D.F., con un 4%., encontrándose diferencia estadísticamente significativa con una $p= 0.000$. Estrada García *et al.*, (2009) en un estudio realizado a niños con diarrea en una zona periurbana del D.F., encontraron al virotipo EIEC con un porcentaje de 5%, así mismo Cravioto *et al.*, 1985 en un estudio realizado en una población rural infantil de México, determinaron la prevalencia de EIEC con un 4%, lo cual difiere con los resultados

obtenidos en S.L.P. Clarke S. 2001, así como Escher *et al.*, 2014, consideran al virotipo EIEC como agente causal de morbilidad y mortalidad tanto en niños de países desarrollados como en países subdesarrollados, esto debido a las condiciones sanitarias y de higiene deficientes. Es probable que la alta prevalencia de este virotipo en S.L.P., este relacionada con lo publicado por Clarke S. 2001, pues como se mencionó anteriormente, S.L.P, presenta una alto grado de rezago social.

El virotipo EPEC se presentó en el D.F., en un 9% de las cepas y para S.L.P., en un 5%., Paniagua *et al.*, (2007) en un estudio en niños con diarrea del D.F., determinaron la presencia de EPEC con un porcentaje de 9.3%, similar al encontrado en este trabajo, porcentaje con el que se ha aislado por lo general EPEC en varios países, que va del 5-10% (Ochoa *et al.*, 2008). El virotipo EPEC se clasifica en típicas (tEPEC) y atípicas (aEPEC). De acuerdo a los resultados obtenidos en este trabajo, se lograron identificar solamente cepas aEPEC para ambos grupos de estudio, resultados que coinciden con lo publicado por Ochoa *et al.*, (2011), quienes afirman que aEPEC es el virotipo más comúnmente asociado a la diarrea en población infantil.

El virotipo EAEC, se encontró en un 14% de las cepas para ambos grupos de estudio, datos similares a lo publicado por Aslani *et al.*, (2010), quienes realizaron un estudio para identificar el virotipo EAEC en muestras de niños con diarrea, presentándose en un 10% de su población estudiada; Jenkins *et al.*, (2006) de un total de 500 muestras lograron identificar a EAEC en un 8% de ellas. La diferencia en porcentajes entre los diferentes trabajos, probablemente se deba a que se realizaron en distintos países, por lo tanto las poblaciones en que se realizó el estudio son diferentes. Se ha considerado que EAEC es un patotipo emergente (Cravioto *et al.*, 1991, Weintraub *et al.*, 2007) dado que se ha presentado tanto en países en desarrollo, como en países desarrollados como es el caso del Reino Unido (Weintraub *et al.*, 2007). Además se ha asociado a este patotipo, como uno de los agentes causales de diarrea del viajero (Vilchez *et al.*, 2005).

Los genes identificados para este virotipo fueron *aat* y *astA*, estos genes se han relacionado con el fenotipo de adherencia agregativa, encontrándose que el gen

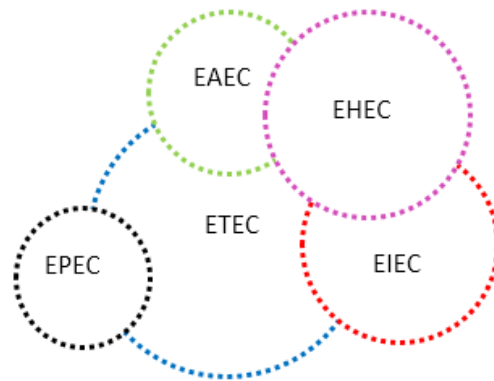
astA es más frecuente para ambos grupos de estudio, respecto al gen *aat*, (Tabla 6) lo cual concuerda con lo publicado por Jenkins *et al.* (2006). Una vez identificados dichos genes, se realizó el ensayo de adherencia, con el objetivo de evaluar la adherencia agregativa en las cepas de *E. coli*, observándose que para el D.F., de un total de 17 cepas evaluadas que portaban alguno de los dos genes, sólo se presentó adherencia agregativa en una cepa y adherencia difusa en 12. Mientras que para S.L.P., de un total de 14 cepas evaluadas, 4 cepas presentaron adherencia difusa y 4 adherencia agregativa. Cabe mencionar que todas las cepas que presentaron algún tipo de adherencia portaban el gen *astA*. Estos datos muestran que la presencia de los genes *astA* y *aat*, están presentes en cepas *E. coli* con fenotipo de adherencia no solo agregativa sino también están presentes en cepas de *E. coli* que se adhieren a las células HEP-2 en forma difusa. Datos que concuerdan con lo publicado por Jenkins *et al.*, 2006, quienes realizaron el ensayo de adherencia a células HEP-2 y no encontraron una relación entre la presencia de los genes y el fenotipo de adherencia agregativa.

Como se mencionó anteriormente, las cepas de *E. coli*, pertenecientes al estado de S.L.P., presentaron una mayor prevalencia de los virotipos respecto a las cepas del D.F., esto puede deberse a las condiciones de la población, ya que de acuerdo con el INEGI, S.L.P., es considerado como uno de los estados con mayor rezago social, pues 53 de los 58 municipios que lo conforman, presentan un alto grado de pobreza, carente de servicios, de educación, salud, con espacios de vivienda deficientes; lo que favorece que las enfermedades gastrointestinales sean un grave problema de salud para dicha población.

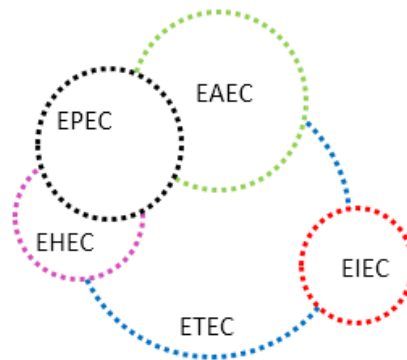
De igual forma se observó una mayor heterogeneidad en la presencia de genes en las cepas estudiadas pertenecientes a S.L.P., respecto a las del D.F., (Tabla 7). Esta heterogeneidad se puede deber a la transferencia de material genético que se da entre las bacterias, lo que puede llevar posteriormente a una nueva clasificación de virotipos. En la siguiente imagen se observa la relación que comparten los virotipos de *E. coli* aislados de cada una de las poblaciones.

Imagen 6. Esquema que ilustra las relaciones entre los virotipos de *E. coli* en ambas poblaciones estudiadas

S.L.P.



D.F.



Otro factor de virulencia que se ha considerado últimamente de gran importancia clínica ha sido la producción de biopelícula en diversas bacterias. En el presente trabajo, se evaluó la producción de biopelícula sólo en las cepas de *E. coli* móviles, basados en los trabajos de Pratt *et al.* 1998, Reisner *et al.*, 2003 y Wood *et al.*, 2006 quienes mostraron que el flagelo está relacionado con la formación de biopelícula. Esta se determinó por dos métodos: agar rojo Congo (ARC) y el método de Christensen (en tubo). Los resultados obtenidos muestran que, a pesar de que todas las cepas evaluadas presentaron movilidad, no todas fueron

productoras de biopelícula. Para el método de rojo Congo en el D.F., 70 % de las cepas fueron productoras de biopelícula y para S.L.P., el 76% (Tabla 9). De igual forma con el método de Christensen, para el D.F., el 19% de las cepas produjeron biopelícula y para S.L.P., el 21% (Tabla 10), por lo tanto consideramos que además del flagelo, existen otros factores que están relacionados con la formación de dicha estructura, y al igual que los factores de virulencia estudiados para ambos grupos, la formación de biopelícula se presentó en un mayor porcentaje en las cepas aisladas en S.L.P, en comparación con las cepas aisladas del D.F.

Estudios recientes, indican que tanto la producción de fibras “curli” así como los genes involucrados en la expresión de estas fibras, son esenciales para el desarrollo de las placas amiloides en la biopelícula (Serra et al., 2013). Dentro de otros factores relacionados con la formación de biopelícula se mencionan, la producción de celulosa (Uhlich *et al.*, 2014), así como la expresión del *pili* tipo 1, que se ha considerado un factor determinante en los primeros pasos en la producción de biopelícula (Soto *et al.*, 2007). Cabe resaltar que la mayoría de estudios realizados para la evaluación de producción de esta estructura, se han realizado en muestras de pacientes con infección urinaria, más no, en pacientes con infección intestinal.

Los resultados muestran que el método más eficaz para evaluar la producción de biopelícula fue el método de ARC. Estos datos concuerdan con lo publicado por Serra *et al.*, 2013, quienes afirman que en un medio de cultivo líquido, éste se encuentra rodeando a la bacteria, brindándole nutrientes la mayor parte del tiempo de incubación, por lo que es menos probable que la bacteria logre producir la biopelícula, sin embargo en un medio sólido (como el ARC) después de un tiempo prolongado de incubación, los nutrientes se consumen y la bacteria entra en un estrés tal, que para lograr la supervivencia, se desarrolla la biopelícula. De igual forma Naves *et al.*, 2008 afirman que la formación de biopelícula de *E. coli* depende de varios factores como son características de la cepa misma, el método de evaluación y la más importante, las condiciones del medio de cultivo. Dentro de las ventajas para la bacteria en la formación de biopelícula, se encuentran la de

resistir las condiciones del entorno que las rodea, evadir la respuesta inmune y generar resistencia a antibióticos (Tyerman *et al.*, 2013).

En los ensayos de antibiograma de *E. coli* realizados en el presente trabajo, se determinó tanto la resistencia como la sensibilidad a algunos antibióticos, para ambos grupos de estudio. Los resultados mostraron en general, un mayor número de cepas resistentes a ampicilina, para el D.F., el 75% de las cepas y para S.L.P., el 51%, con una diferencia estadísticamente significativa de $p=0.000$; a cefalotina en el D.F., se presentó en un 53% de las cepas y en S.L.P, en un 31% de cepas resistentes, con una diferencia estadísticamente significativa de $p=0.001$; para sulfametoxazol/trimetoprim, en el D.F., se obtuvo un porcentaje de 52% y en S.L.P., 37% de cepas, con una diferencia estadísticamente significativa de $p=0.03$ y para cefotaxima y kanamicina, se obtuvieron en el D.F., 33% de cepas resistentes y 3% de cepas resistentes en S.L.P., para ambos antibióticos con una $p=0.000$.

Respecto al porcentaje de cepas resistentes a ampicilina, los resultados coinciden con lo publicado por Zhi-Dong Jiang *et al.*, (2000), quién realizó un estudio de seguimiento de pacientes durante 5 años en Guadalajara, México, determinando que la resistencia frente a ampicilina fue aumentando con el paso de los años, en los primeros 2 años fue de un 37% a 49% y en los últimos años la cifra llegó a un porcentaje del 90%. Ampicilina así como la cefalotina pertenecen al grupo de β -lactámicos, por lo que su mecanismo de acción es inhibir la síntesis de pared, y la alta resistencia de las cepas contra este antibiótico probablemente se relacione con el desarrollo de β -lactamasas. Se ha observado que las bacterias que han desarrollado β -lactamasas, también presentan resistencia hacia amoxicilina y algunas cefalosporinas de primera generación (Karami *et al.*, 2008), como lo es en este caso la cefalotina.

Los resultados obtenidos en este trabajo, muestran un mayor porcentaje de resistencia a antibióticos de las cepas de *E. coli* pertenecientes al D.F., respecto a las cepas de *E. coli* de S.L.P. De acuerdo a Guan *et al.*, 2002, la resistencia puede modificarse debido a la ubicación geográfica, la gestión agrícola así como los niveles y tipos de antibióticos utilizados en la población local; lo que nos indica que

la resistencia para los grupos de estudio con los que se trabajó pueden variar dependiendo de la zona geográfica así como del tipo de población.

Para ambos grupos de estudio, se presentaron altos porcentajes de cepas sensibles a cefoxitina en el D.F., con un 89% y en S.L.P., con un 94% de cepas, para amikacina en el D.F., con un 86% y en S.L.P., con un 75% y para cefotaxima en el D.F., con un 52% y en S.L.P., con un 75%. Dado que estos antibióticos son por lo general de uso de hospitales de segundo y tercer nivel, probablemente a esto se deba la alta sensibilidad obtenida en las cepas de *E. coli* aislada de ambas poblaciones de estudio.

Este es el primer trabajo que se realiza con *E. coli* diarreogénica en México proveniente de dos entidades federativas, en donde se estudiaron tanto aspectos genotípicos como fenotípicos de la bacteria. Observándose una alta prevalencia del virotipo ETEC en ambas poblaciones a diferencia de los virotipos EIEC y EHEC, los que mostraron con una alta prevalencia en las cepas de *E. coli* provenientes de S.L.P., en relación con las provenientes del D.F., resultado que llama la atención, pues no ha sido reportada una prevalencia tan alta de estos virotipos en lo publicado hasta la fecha. De igual forma se observó una gran heterogeneidad de genes presentes en las cepas de *E. coli* estudiadas, ya que las cepas comparten genes que les permiten clasificarse en más de un virotipo, siendo más heterogéneas las cepas provenientes de S.L.P.

También se observó un marcado incremento de resistencia a los antibióticos en las cepas aisladas del D.F., en relación con las cepas provenientes de S.L.P., así como una baja sensibilidad de dichas cepas a los antibióticos estudiados.

Independientemente de que *E. coli* es la bacteria más estudiada, el presente trabajo muestra que esta bacteria aún tiene mucha información por aportarnos. Por otro lado es importante tomar en cuenta los resultados de este trabajo tanto desde el punto epidemiológico como de manejo de antibióticos.

8. CONCLUSIONES

- Se aislaron 100 cepas de *E. coli* diarreogénica del Distrito Federal y 100 cepas de *E. coli* diarreogénica de San Luis Potosí.
- El virotipo ETEC fue el de mayor prevalencia en ambas poblaciones: en el D.F, con un 49% de cepas y en S.L.P., con un 67% de cepas, con una $p < 0.05$.
- Se observó una alta prevalencia del virotipo EIEC en las cepas de *E. coli* aisladas en S.L.P., con un 28% en relación con un 4% de las cepas aisladas del D.F., con una $p < 0.05$.
- Se observó una alta prevalencia del virotipo EHEC en las cepas de *E. coli* aisladas de S.L.P., con un 30% en relación con un 3% de las cepas aisladas del D.F., con una $p < 0.05$.
- Se relacionó la presencia del gen *astA* y/o *aat* con el fenotipo de adherencia a células HEP-2: en el D.F., de un total de 17 cepas evaluadas, 13 presentaron adherencia y en S.L.P., de un total de 14 cepas, 8 presentaron el fenotipo de adherencia.
- Para el D.F., de 100 cepas evaluadas, 60 fueron flageladas; de estas 42 cepas formaron biopelícula con el método de ARC y 11 fueron formadoras de biopelícula con el método de Christensen.
- Para S.L.P., de 100 cepas evaluadas, 84 fueron flageladas; de estas 64 formaron biopelícula con el método de ARC y 18 fueron formadoras de biopelícula con el método de Christensen.
- El método de ARC fue el más eficaz en la producción de biopelícula en cepas aisladas de muestras diarreicas.
- El antibiótico al cual se presentó mayor resistencia fue ampicilina para ambos grupos de estudio, en el D.F., con un 75% de cepas y en S.L.P., con 51% de cepas.
- Se observó que las cepas de *E. coli* pertenecientes al D.F., presentaron mayor resistencia a los antibióticos cefotaxima, sulfametoxazol/trimpetoprim, amoxicilina/ac. clavulónico, ampicilina y

cefalotina que las cepas pertenecientes al estado de S.L.P., con una $p < 0.05$.

- No se encontró una relación entre la resistencia a antibióticos y la formación de biopelícula.
- Los antibióticos a los cuales las cepas de *E. coli* presentaron un alto porcentaje de sensibilidad fueron cefoxitina y amikacina para ambas poblaciones estudiadas.

9. REFERENCIAS

1. Adachi, J. A., J. J. Mathewson, Z. D. Jiang, C. D. Ericsson, and H. L. DuPont. 2002. Enteric pathogens in Mexican sauces of popular restaurants in Guadalajara, Mexico, and Houston, Texas. *Ann. Intern. Med.* 136:884–887.
2. Aslani M. M., M. Y. Alikhani, A. Zavari, R. Yousefi, A.R. Zamani. 2011. Characterization of enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC) clinical isolates and their antibiotic resistance pattern. *Int J Infect Dis*; 15: e136-9.
3. Black, R. E. 1993. Persistent diarrhea in children of developing countries. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 12:751–764.
4. Beloin, C., A. Roux, J. M. Ghigo. 2008. *Escherichia coli* biofilms. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 322:249 –289.
5. Cheng A.C., J.R. McDonald, N.M. Thielman. 2005. Infectious diarrhea in developed and developing countries. *J Clin Gastroenterol*; 39(9):757-773.
6. Christensen G.C., W. A. Simpson, A.L. Bisno, E.H. Beachey. 1982 Adherence of slime-producing strains of *Staphylococcus epidermidis* to smooth surface. *Infect Immun*; 37(1): 318-326
7. Clarke S., R. Haigh, P. Freestone, P. Williams. 2003. Virulence of enteropathogenic *Escherichia coli*, a global pathogen. *Clin Microbiol Rev*; 16(3):365-378.
8. Clarke, S. C., R. D. Haigh, P. P. Freestone, P. H. Williams. 2002 Enteropathogenic *Escherichia coli* infection: history and clinical aspects. *Br. J. Biomed. Sci.* 59:123–127.
9. Clausen, C. R. and D. L. Christie. 1982. Chronic diarrhea in infants caused by adherent enteropathogenic *Escherichia coli*. *J. Pediatr.* 100:358–361.
10. Clements A., J. C. Young, N. Constantinou, G. Frankel. 2012. Infection strategies of enteric pathogenic *Escherichia coli*. *Gut Microbes* 3:71-87.
11. Costerton J.W., P.S. Stewart, E. P. Greenberg. 1999 Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*; 284(5418): 1318-1322.

12. Cravioto, A., R. E. Reyes, R. Ortega, G. Fernández, R. Hernández, D. López. 1988. Prospective study of diarrhoeal disease in a cohort of rural Mexican children: incidence and isolated pathogens during the first two years of life. *Epidemiol. Infect.* 101:123–134.
13. Cravioto, A., R. E. Reyes, F. Trujillo, F. Uribe, A. Navarro, J. M. De La Roca, J. M. Hernandez, G. Perez, and V. Vazquez. 1990 Risk of diarrhea during the first year of life associated with initial and subsequent colonization by specific enteropathogens. *Am. J. Epidemiol.* 131:886–904
14. Cravioto, A., A. Tello, A. Navarro, J. Ruiz, H. Villafan, F. Uribe, C. Eslava. 1991. Association of *Escherichia coli* HEp-2 adherence patterns with type and duration of diarrhoea. *Lancet* 337, 262–264
15. Crespo, M.P. 2005 La Resistencia bacteriana: ¿estamos preparados para detectarla? *Infecto.* 9(1): 31-45
16. Croxen M.A., B. B. Finlay. 2010 Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. *Nat Rev Microbiol*; 8:26-38.
17. Diamond J. B. B., N. G. Mirando. 2007. Biofilm: ¿amenaza latente o factor de protección? *Enf Inf Microbiol.* (1): 22-28.
18. Donnenberg M. S., J. P. Nataro. 1995 Methods for studying adhesion of diarrheagenic *Escherichia coli*. *Methods Enzymol*; 253:324–36.
19. Escher M., G. Scavia, S. Morabito, R. Tozzoli, A. Maugliani, S. Cantoni, S. Fracchia, A. Bettati, R. Casa, G. P. Gesu, E. Torresani, A. Caprioli. 2014. A severe foodborne outbreak of diarrhoea linked to a canteen in Italy caused by enteroinvasive *Escherichia coli*, an uncommon agent. *Epidemiol. Infect.*, 1-8.
20. Estrada-Garcia, T., C. Lopez-Saucedo, R. Thompson-Bonilla, M. Abonce, D. López-Hernández, J. Santos, J. L. Rosado, H. L. DuPont, K. Z. Long. 2008. Association of Diarrheagenic *Escherichia coli* Pathotypes with Infection and Diarrhea among Mexican Children and Association of Atypical Enteropathogenic *E. coli* with Acute Diarrhea. *Journal of Clinical Microbiology*, 93–98

21. Estrada-García, T., J. F. Cerna, L. Pacheco-Gil, R. F. Velázquez, T. J. Ochoa, J. Torres, H. L. DuPont. 2005. Drug resistant diarrheogenic *Escherichia coli*, Mexico. *Emerg. Infect. Dis.* 11, 1306–1308.
22. Freeman D. J., F. R. Falkier, C. T. Kean. 1985. New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci to medical devices. *J Clin Microbiol*; 22:996-1006.
23. Giro'n, J. A., A. G. Torres, E. Freer, J. B. Kaper. 2002. The flagella of enteropathogenic *Escherichia coli* mediate adherence to epithelial cells. *Mol. Microbiol.* 44:361–379.
24. Guan, S., R. Xu, S. Chen, J. Odumeru, C. Gyles. 2002. Development of a procedure for discriminating among *Escherichia coli* isolates from animal and human sources. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 2690–2698
25. Gyles, C. L. 1992. *Escherichia coli* cytotoxins and enterotoxins. *Can J Microbiol* 38(7): 734-746.
26. Hall-Stoodley L, J. W. Costerton, P. Stoodley. 2004. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nat. Rev. Microbiol.* 2:95–108.
27. Hernández C. C., M. G. Aguilera, G. Castro. 2011. Situación de las enfermedades gastrointestinales en México. *Enf Inf Microbiol* 31 (4): 137-151
28. Huilan, S., L. G. Zhen, M. M. Mathan, M. M. Mathew, J. Olarte, R. Espejo, U. Khin Maung, M. A. Ghafoor, M. A. Khan, Z. Sami. 1991. Etiology of acute diarrhoea among children in developing countries: a multicenter study in five countries. *Bull. W.H.O.* 69:549–555.
29. Jenkins, C., H. Chart, G. A. Willshaw, T. Cheasty, H. R. Smith. 2006. Genotyping of enteroaggregative *Escherichia coli* and identification of target genes for the detection of both typical and atypical strains. *Diagn Microbiol Infect Dis* 55, 13–19.
30. Jenkins, C., M. Tembo, H. Chart, T. Cheasty, G. A. Willshaw, A. D. Phillips, D. Tompkins, H. Smith. 2006. Detection of enteroaggregative *Escherichia coli* in faecal samples from patients in the community with diarrhoea. *J Med Microbiol* 55, 1493–1497.

31. Jiang Z.D., J. J. Mathewson, C. D. Ericsson. 2000. Characterization of enterotoxigenic *Escherichia coli* strains in patients with travelers' diarrhea acquired in Guadalajara, Mexico, 1992–1997. *J Infect Dis*; 181:779–782.
32. Kaper, J., J. Nataro. 2004. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature*, 2:123-140.
33. Krieg, N. R., J. G. Holt. 1984. Bergey's manual of systematic bacteriology. (1): 408-600.
34. Kelsey, R.H., G. I. Scott, D. E. Porter, B. Thompson, L. Webster. 2003. Using multiple antibiotic resistance and land use characteristics to determine sources of fecal coliform bacterial pollution. *Environ. Monit. Assess.* 81, 337–348.
35. Kotloff K. L., W. C. Blackwelder, D. Nasrin, J. P. Nataro, T. H. Farag. 2012. The Global Enteric Multicenter Study (GEMS) of diarrheal disease in infants and young children in developing countries: epidemiologic and clinical methods of the case/control study. *Clin Infect Dis* 55 Suppl 4S232–45
36. Lasa I., J. L. del Pozo, J. R. Penadés, J. Leiva. 2005. Biofilms bacterianos e infección. *An Sist Saint Navar*, 28(2): 163-175.
37. López-Saucedo, C., J. F. Cerna, N. Villegas-Sepulveda, R. Thompson, F. R. Velazquez, J. Torres. 2003. Single multiplex polymerase chain reaction to detect diverse loci associated with diarrheagenic *Escherichia coli*. *Emerg Infect Dis*;9:127–31.
38. Martínez, J., F. Baquero. 2002. Interactions among Strategies Associated with Bacterial Infection: Pathogenicity, Epidemicity, and Antibiotic Resistance. *Clinical Microbiology*. (15): 647-679.
39. Mathur, T., S. Singhal, S. Khan, D. J. Upadhyay, T. Fatma, A. Rattan. 2006. Detection of biofilm formation among the clinical isolates of staphylococci: an evaluation of three different screening methods. *Indian Journal of Medical Microbiology*, 24 (1):25-9.
40. Murray, P., K. Rosenthal, M. Pfaller. 2009. Microbiología médica. Ed. Médica Paramericana.
41. Nataro, J.P., J. B. Kaper. 1998. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clinical microbiology reviews*. (11):142-201.

42. Naves, P., G. del Prado, L. Huelves, M. Gracia, V. Ruiz, J. Blanco, V. Rodriguez-Cerrato, M. C. Ponte, F. Soriano. 2008. Measurement of biofilm formation by clinical isolates of *Escherichia coli* is method-dependent. *J Appl Microbiol* 105: 585-590.
43. Niveditha, S., S. Pramodhini, S. Umadevi, K. Shailesh, S. Selvaraj. 2012. Isolation and the Biofilm Formation of Uropathogens in the Patients with Catheter Associated Urinary Tract Infections (UTIs). *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, Vol-6(9): 1478-1482.
44. Ochoa, T. J., F. Barletta, C. Contreras, E. Mercado. 2008. New insights into the epidemiology of enteropathogenic *Escherichia coli* infection. *Trans R Soc Trop Med Hyg*; 102:852-6.
45. Ochoa, T.J., E.H. Mercado, D. Durand, F. P. Rivera, S. Mosquito, C. Contreras, M. Riveros, A. Lluque, F. Barletta, A. Prada, J. Ruiz. 2011. Frecuencia y patotipos de *Escherichia coli* diarrogénica en niños peruanos con y sin diarrea. *Rev Peru Med Exp Salud Pública*; 28(1): 13-20
46. Okeke, I. N., J. P. Nataro. 2001. Enteroaggregative *Escherichia coli*. *Lancet Infect. Dis.* 1(5): 304-313.
47. O'Toole, G., H. B. Kaplan, R. Kolter. 2000. Biofilm formation as microbial development. *Annu. Rev. Microbiol.* 54:49 –79.
48. Paniagua, G. L., E. Monroy, O. García-González, J. Alonso, E. Negrete, S. Vaca. 2007. Two or more enteropathogens are associated with diarrhoea in Mexican children. *Annals Clin Microbiol and Antimicrobials*; 6: 1-8.
49. Pratt, L. A., R. Kolter. 1998. Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilm formation: roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili. *Molecular Microbiology*, 30: 285–293.
50. Pereira, A. L., L. R. Ferraz, R. S. N. Silva, L. G. Giugliano. 2007. Enteroaggregative *Escherichia coli* virulence markers: positive association with distinct clinical characteristics and segregation into 3 Enteropathogenic *E. coli* serogroups. *Journal of Infectious Diseases* 195: 366-74.
51. Qadri, F., A. M. Svennerholm, A. S. Faruque, R. B. Sack. 2005. Enterotoxigenic *Escherichia coli* in developing countries: epidemiology,

- microbiology, clinical features, treatment, and prevention. *Clin Microbiol Rev*; 18:465-83.
52. Riveros, M., F. Barletta, M. Cabello, D. Durand, E. H. Mercado, C. Contreras, F. R. Rivera, S. Mosquito, A. Lluque, T. J. Ocha. 2011. Patrones de adherencia en cepas de *Escherichia coli* Difusamente Adherente (DAEC) provenientes de niños con y sin diarrea. *Salud Pública Perú*; 28(1): 21-28.
53. Reisner, A., J. A. H. Haagensen, M. A. Schembri, E. L. Zechner, S. Molin. 2003. Development and maturation of *Escherichia coli* K-12 biofilms. *Molecular Microbiology*, 48(4), 933–946
54. Rodríguez-Angeles, G. 2002. Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. *Salud Publica México*; 44: 464-475
55. Rosas, I., E. Salinas, L. Martinez, E. Calva, A. Cravioto, C. Eslava, C. F. Amabile-Cuevas. 2006. Urban dust fecal pollution in Mexico City: antibiotic resistance and virulence factors of *Escherichia coli*. *International Journal of Hygiene and Environmental Health* 209, 461–470
56. Scaletsky, I. C., S. H. Fabriccotti, R. L. Carvalho, C. R. Nunes, H. S. Maranhão, M. B. Morais. 2002. Diffusely adherent *Escherichia coli* as a cause of acute diarrhea in young children in Northeast Brazil: a case-control study. *J Clin Microbiol*; 40:645-8.
57. Serra, D.O., A. M. Richter, G. Klauck, F. Mika, R. Hengge. 2013. Microanatomy at cellular resolution and spatial order of physiological differentiation in a bacterial biofilm. *mBio* 4(2):e00103-13. doi:10.1128/mBio.00103-13.
58. Sharma, M., A. Aparna, S. Yadav, U. Chaudhary. 2009. Biofilm production in uropathogenic *Escherichia coli*. *Indian J Pathol Microbiol*; 52: 294.
59. Soto, S. M., A. Smithson, J. A. Martinez, J. P. Horcajada, J. Mensa, J. Vila. 2007. Biofilm formation in uropathogenic *Escherichia coli* strains: relationship with prostatitis, urovirulence factors and antimicrobial resistance. *J Urol*, 177, pp. 365–368.
60. Subramanian, P., N. Shanmugam, U. Sivaraman, K. Shailesh, S. Selvaraj. 2012. Antibiotic Resistance pattern of biofilm--forming uropathogens

- isolated from catheterized patients in Pondicherry, India. *Australasian Medical Journal*. 344---348.
61. Suman, E., J. Jose, S. Varghese, M. S. Kotian. 2007. Study of biofilm production in *Escherichia coli* causing urinary tract infection. *Indian J Med Microbiol*; 305-306.
 62. Todar K. 2008. Patogenic *E. coli* in: Online textbook of bacteriology.
 63. Torres, J., S. González-Arroyo, R. Pérez, O. Muñoz. 1995. Inappropriate treatment in children with bloody diarrhea: clinical and microbial studies. *Arch. Med. Res.* 26:23–29
 64. Tórtora G., B. Funke, C. Case. 2007. Introducción a la Microbiología. 9ª edición. Argentina. pp 821-822.
 65. Varela, G., C. Jasinski, P. Gadea, M. Tanzi, M. Mota, C. Arenas, S. González, G. González, L. Pardo, A. Sirok, F. Schelotto. 2007. *Escherichia coli* enteropatógeno clásico (EPEC) asociado a casos de diarrea en niños usuarios del Hospital Pereira Rossell. Aspectos clínicos y características de las cepas involucradas. *Rev Med Urug*; 23:153-163.
 66. Uhlich, G. A., C. Y. Chen, B. J. Cottrell, L. H. Nguyen. 2014. Growth media and temperature effects on biofilm formation by serotype O157:H7 and non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett.* 1–9
 67. Vidal, J., A. Canizález-Román. 2007. Patogénesis molecular, epidemiología y diagnóstico de *Escherichia coli* enteropatógena. *Salud Pública Méx*;49(5):376-385
 68. Vidal, M., E. Kruger, C. Durán, R. Lagos, M. Levine, V. Prado, C. Toro, R. Vidal. 2005. Single Multiplex PCR Assay To Identify Simultaneously the Six Categories of Diarrheagenic *Escherichia coli* Associated with Enteric Infections. *J Clin Microbiol*; 43(10):5362-5365.
 69. Vilchez, S., D. Reyes, M. Paniagua, F. Bucardo, R. Mollby, A. Weintraub. 2009. Prevalence of diarrhoeagenic *Escherichia coli* in children from León, Nicaragua. *Journal of Medical Microbiology* 58, 630–637
 70. Villaseca, J.M., U. Hernández, T. R. Sainz-Espuñes, C. Rosario, C. Eslava. 2005. Enteraggregative *Escherichia coli* an emergent pathogen with

- different virulence properties. *Revista Latinoamericana de Microbiología*. 47: 140-159.
71. Vu Nguyen, T., P. Le Van, C. Le Huy, G. Nguyen, A. Weintraub. 2006. Etiology and epidemiology of diarrhea in children in Hanoi, Vietnam. *Int J Infect Dis* 10, 298–308.
72. Wolfe, A.J., H. C. Berg. 1989 Migration of bacteria in semisolid agar. *Proc Natl Acad Sci* 86: 6973– 6977.
73. Wood, T. K., A. F. González-Barrios, M. Herzberg, J. Lee. 2006. Motility influences biofilm architecture in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 72:361–367.
74. World Health Organization. 1999. New frontiers in the development of vaccines against enterotoxigenic (ETEC) and enterohaemorrhagic (EHEC) *E. coli* infections. *Weekly Epidemiol. Rec.* 13:98–100

PÁGINAS WEB CONSULTADAS

- <http://www.slpsalud.gob.mx/sala-de-prensa/2093-2012-04-24.html>
- <http://www.slpsalud.gob.mx/sala-de-prensa/2093-2012-04-24.html>
- <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs330/es/>
- www.covenal.gob.mx
- www.inegi.gob.mx
- <http://textbookofbacteriology.net/e.colihtml>