



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**TÍTULO DEL TEMA ESCRITO**

***Tesis: Caracterización y sensibilidad a antimicrobianos en cepas de Escherichia coli, pertenecientes a diferentes virotipos.***

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**

**QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

**PRESENTA**

**Héctor Fernando Santos Balbuena**



**MÉXICO, D.F.**

**2015**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

**JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:** Profesor: Luciano Hernández Gómez

**VOCAL:** Profesor: Rosalía Guevara Leonel

**SECRETARIO:** Profesor: Ana María Castro

**1er. SUPLENTE:** Profesor: Mónica Berenice Heras Chavarría

**2° SUPLENTE:** Profesor: Martha Patricia Coello Coutiño

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: FACULTAD DE MEDICINA, UNAM**

ASESOR DEL TEMA:

Dra. Ana María Castro

SUPERVISOR TÉCNICO:

DRA. ANDREA TOLEDO ROJAS

SUSTENTANTE:

Héctor Fernando Santos Balbuena

	Página
<b>Resumen</b>	<b>5</b>
<b>1. Introducción</b>	<b>6</b>
<b>1.1. Diarrea</b>	<b>7</b>
1.1.1. Agentes etiológicos de diarrea en el mundo	8
1.1.2. Agentes etiológicos de diarrea en México	8
1.1.3. Clasificación clínica de la diarrea	8
<b>1.2. <i>Escherichia coli</i></b>	<b>9</b>
1.2.1. Factores de virulencia	11
1.2.1.1. Adhesinas	11
1.2.1.2. Toxinas	11
1.2.1.3. Invasión	12
1.2.2. Cepas de <i>Escherichia coli</i> diarreogénicas en niños	12
1.2.2.1. <i>E. coli</i> enteropatógena (EPEC)	14
1.2.2.2. <i>E. coli</i> enterotoxigénica (ETEC)	17
1.2.2.3. <i>E. coli</i> Shiga toxin (STEC)	20
1.2.2.4. <i>E. coli</i> enteroagregativa (EAEC)	24
1.2.2.5. <i>E. coli</i> enteroinvasiva (EIEC)	26
1.2.2.6. <i>E. coli</i> adherente difusa (DAEC)	28
<b>1.3. Antimicrobianos y su resistencia</b>	<b>34</b>
1.3.1. Resistencia a los antimicrobianos	34
<b>1.4. Diagnóstico de cepas ECD</b>	<b>35</b>
<b>2. HIPÓTESIS</b>	<b>37</b>
<b>3. OBJETIVOS</b>	<b>37</b>
3.1. Objetivo general	37
3.2. Objetivos particulares	37
<b>4. MATERIAL Y MÉTODOS</b>	<b>38</b>
4.1. Identificación de <i>Escherichia coli</i> .	38
4.1.1. B hemólisis	38
4.1.2. Sensibilidad a antimicrobianos	39
4.2. Extracción de ADN	40
4.2.1. Conservación de muestras	40
4.3. Ensayo de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	40
4.3.1. Revelación de genes	44
4.4. Ensayos de adherencia bacteriana y cultivo celular	44
4.4.1. Cultivo bacteriano	44

4.4.2. Cultivo células HEP-2	44
4.4.3. Ensayo de adherencia	44
4.4.4. Tinción	45
5. RESULTADOS	46
5.1. Cepas de E. coli aisladas de muestras diarreogénicas	46
5.2. Identificación de genes de virulencia	47
5.3. $\beta$ -hemólisis	48
5.4. Virotipos	49
5.5. Ensayos de adherencia a células HEP-2	54
5.6. Antibiograma	56
6. DISCUSIÓN	59
7. CONCLUSIONES	67
8. BIBLIOGRAFIA	68

## RESUMEN

Las enfermedades diarreicas continúan siendo un problema de salud pública mundial, principalmente en países en vías de desarrollo. En México, este tipo de padecimientos son causa importante de morbi-mortalidad en población infantil

Los agentes etiológicos de diarrea, son virus, parásitos y bacterias principalmente, siendo *Escherichia coli* (*E. coli*) uno de los microorganismos que con mayor frecuencia causan diarrea, sobre todo en niños. Las *E. coli* diarreogénicas o causantes de diarrea se dividen en seis grupos patogénicos basadas en los mecanismos de daño: *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).

El objetivo del presente trabajo fue identificar mediante el ensayo de la PCR los principales genes de virulencia que caracterizan a los diferentes patotipos de *E. coli* productores de diarrea en niños menores de cinco años, sensibilidad a antitímicos y adherencia a células HEp-2. Para esto, se analizaron un total de 151 muestras de heces de niños con diarrea, de las cuales, se identificaron 284 cepas de *E. coli* a las que se les extrajo ADN y se amplificaron los genes virulencia que codifican para LT, ST, Stx1, Stx2, EAST1, *eaeA*, *bfpA*, *ial*, *aatA*. De las 284 cepas analizadas el 63.0 % de ellas presentó al menos un gen de los estudiados y 37.0% no presentaron ningún gen. Del 63.0% ETEC se identificó en un 63%, STEC en un 25% al igual que EAEC, EIEC en un 21.0% y EPEC en un 11%. La mayor prevalencia de los distintos virotipos se presentó en los meses cálidos y húmedos. Los niños menores de dos años fueron los más susceptibles en adquirir este tipo de patógenos. El antibiograma mostró que las cepas de *E.*

*coli* fueron resistentes principalmente a ampicilina, cefalectina, amoxicilina/acido clavulónico, sulfametoxazol-trimetoprim.

## **1. INTRODUCCIÓN**

### **1.1. Diarrea**

Las enfermedades diarreicas representan la segunda causa de muerte en niños menores de cinco años, y ocasionan cada año en el mundo, la muerte de 760 000 niños [1]. Puede durar varios días y privar al organismo del agua y de sales necesarias para la supervivencia.

La diarrea se considera como una alteración en el movimiento peristáltico del intestino, con un incremento en el contenido de agua así como en el número de evacuaciones; suele estar acompañada de dolor, fiebre, náuseas, vómito, debilidad y pérdida del apetito. El volumen de líquido perdido por día a través de las deposiciones puede variar de 5 ml por Kg de peso corporal (considerado como normal) hasta 200 ml por Kg o más, esta pérdida de agua y sales, resulta en deshidratación, la cual sucede más rápido en edad infantil y preescolar, en clima caliente y en presencia de fiebre [2]. Estas enfermedades, siguen siendo un problema de salud pública en los países en desarrollo, así como una causa importante de morbi-mortalidad en menores de cinco años de edad. Se estima que ocurren de 1,5 y hasta 2,5 millones de muertes cada año, es decir, cerca de 10 muertes cada minuto [3].

#### **1.1.1. Agentes etiológicos de diarrea a nivel mundial**

Los agentes infecciosos son la causa más común de gastroenteritis aguda. En países desarrollados, los virus, principalmente rotavirus, son responsables del 70 al 80% de casos de diarrea infecciosa, varios patógenos bacterianos explican el otro 10 a 20% de los casos, en donde de

éstos el 10% puede ser atribuible a *Escherichia coli* diarreogénica (ECD) [4].

En los países en desarrollo, las bacterias y parásitos entéricos como por ejemplo *Giardia* intestinales y *Entamoeba histolytica* principalmente, tienen una mayor prevalencia que los virus, y su pico de mayor incidencia se observa habitualmente durante los meses más cálidos. Entre los agentes etiológicos implicados en la enfermedad de la diarrea infantil, se considera que las cepas de ECD son los segundos patógenos más frecuentes después de rotavirus [5].

A nivel mundial, en el año 2011, se estimó que más de la mitad de los episodios de diarrea grave en niños menores de 5 años, fueron atribuibles a rotavirus, *E. coli enteropatógena* (EPEC), calicivirus y *E. coli enterotoxigénica* (ETEC), respectivamente [6].

### **1.1.2. Agentes etiológicos de diarrea en México**

Las enfermedades diarreicas en México ocupan uno de los primeros lugares como causa de morbilidad en población menor de cinco años de edad, generando el 20% de la demanda de consulta en los servicios de salud, y el 10% de las hospitalizaciones pediátricas. Este grupo de edad presenta entre 2 y 4 episodios diarreicos al año. En 2010, las enfermedades infecciosas intestinales ocuparon el 5° sitio como causa de muerte en los niños de 1 a 4 años de edad (266 muertes con tasa de 3.5 por 100 000 nacimientos estimados) [7].

Las cepas de ECD son la principal causa de diarrea de etiología bacteriana. Estudios realizados por el Gobierno Federal en un perfil epidemiológico [8], reportó que los niños menores de dos años de edad son

los más susceptibles a estas bacterias. El Instituto Nacional de Referencia Epidemiológica (INDRE) en el 2002 encontró que el grupo de ECD más frecuente fue *E. coli* enterotoxigénica (ETEC) (48%), seguido *E. coli* enteroinvasiva (EIEC) (9%), el (4%), *E. coli* enteropatogénica y el (1%) por *E. coli* enterohemorrágica (EHEC). También se determinó que la presencia de *E. coli* es mayor durante los meses húmedos y calurosos, y que afecta a menores de cinco años [9].

### **1.1.3. Clasificación clínica de la diarrea**

#### **En relación al tiempo de evolución:**

- Diarrea aguda: tiene un inicio repentino, de poca duración, menos de tres semanas, casi siempre es de carácter infeccioso y autolimitada.
- Diarrea crónica o persistente (evolución prolongada): se caracteriza por un inicio de diarrea aguda, con una duración mayor a 14 días, cuya principal consecuencia es la desnutrición y la deshidratación [1].

#### **En relación al agente causal:**

- Diarrea acuosa o secretora: es la forma más común de gastroenteritis, se caracteriza por evacuaciones intestinales frecuentes, líquidas. Es acuosa sin sangre, ni moco y la fiebre suele estar ausente. A menudo se genera en el intestino delgado y no causa destrucción de la mucosa. El principal peligro de esta patología, es la deshidratación y la pérdida de peso. Los patotipos de *Escherichia coli* causantes de esta tipo de diarrea pueden ETEC

y DAEC, los cuales producen una diarrea acuosa similar a la producida por *Salmonella sp.* [10].

- Diarrea inflamatoria: comienza con evacuaciones líquidas, con duración de dos o tres días, para posteriormente evolucionar a evacuaciones que contienen sangre y moco. Se desarrolla en el intestino grueso y la fiebre, el dolor abdominal y el tenesmo son síntomas habituales, uno de los agentes causales de esta diarrea es EHEC, además de EIEC, los cuales pueden producir una diarrea con sangre y moco similar a la producida por *Shigella sp.* [10].

## **1.2. *Escherichia coli***

*E. coli* forma parte de la familia *Enterobacteraceae* dentro de la tribu *Escherichieae*; la cual incluye los géneros *Escherichia* y *Shigella*. Se caracteriza por ser un bacilo gramnegativo, anaerobio facultativo, no esporulado, móvil o inmóvil, cuyas principales características bioquímicas son: indol (+), utilización de citrato como única fuente de carbono (-), gas (+), rojo de metilo (+); fermentación de lactosa y glucosa (+), con o sin movilidad, producción de H<sub>2</sub>S (-). Es una bacteria mesófila, es decir, se desarrollan a temperatura de 20 a 45 grados Celsius (° C), con una temperatura óptima de 37 ° C y un pH de 6 a 8.

*E. coli* fermenta la lactosa formando colonias de color rosa en el medio de cultivo MacConkey. En el medio de cultivo eosina azul de metileno (EMB), las colonias son de color verde metálico [11]. La colonia de *E. coli* se caracteriza por tener forma circular, convexa, de superficie lisa, con bordes definidos y mide de dos a cuatro milímetros de diámetro.

La bacteria se puede identificar tradicionalmente con base en sus características bioquímicas y serológicas aunque también se pueden estudiar sus mecanismos de patogenicidad mediante ensayos en cultivos celulares y empleando técnicas de biología molecular que evidencian la presencia de genes involucrados en dichos mecanismos.

Esta es una de las bacterias que colonizan el intestino humano después de las primeras horas de nacimiento y posteriormente algunos serotipos permanecen como parte de la biota de este hábitat [12]. *E. coli* representa una especie de enterobacterias versátil y diversa, que puede subdividirse en: no patógenas, patógena intestinal y patógena extraintestinal. La información genética relacionada con factores de virulencia, se localiza en cromosoma, plásmidos o fagos. Ésta se adquiere en forma vertical, es decir de madre a hija y en forma horizontal a través de mecanismos de recombinación genética como son los de transducción, transformación y conjugación [13].

### **1.2.1. Factores de virulencia**

La patogenicidad se define como la capacidad de los microorganismos para causar enfermedad y virulencia se entiende como el grado de patogenicidad que presenta un microorganismo. Al igual que la mayoría de los patógenos de la mucosa intestinal, *E. coli* sigue una estrategia de infección; colonización a través de sus adhesinas, evasión a las defensas del hospedero, multiplicación y daño al hospedero.

#### **1.2.1.1. Adhesinas**

La bacteria cuenta con tres tipos de apéndices proteicos: flagelos para el movimiento; organelos involucrados en la transferencia de material genético denominados fimbria o *pili* sexual y factores de adherencia denominados fimbrias o *pilis*. Las adhesinas bacterianas se pueden dividir en dos grandes grupos: adhesinas fimbriales y las no fimbriales [14].

#### **1.2.1.2. Toxinas**

Se clasifican en endotoxinas y exotoxinas

Las endotoxinas son los lipopolisacáridos (LPS), estas son moléculas que forman parte de las estructuras de las bacterias gramnegativas; causan fiebre, inflamación, cambios en el tiempo de coagulación, shock letal, y muchos otros eventos tóxicos.

Las exotoxinas están constituidas por dos subunidades A y B. La subunidad B es un pentámero que se une a los receptores celulares y la subunidad A es un dímero y es la subunidad activa. Estas se clasifican en enterotoxinas, citotoxinas y neurotoxinas; las enterotoxinas producen una diarrea acuosa debido a la liberación de agua y electrolitos por parte de enterocito, y las citotoxinas producen una diarrea inflamatoria cuyas evacuaciones contienen moco y sangre [14] [4].

#### **1.2.1.3. Invasión**

En este proceso la bacteria se introduce en el citoplasma de la célula infectada, se multiplica e invade las células vecinas, lo que permite a la bacteria evadir los mecanismos de protección del hospedero [4].

#### **1.2.2. Cepas de *Escherichia coli* diarreogénicas en niños**

Las cepas de ECD, representan una causa importante de síndromes diarreicos en países en desarrollo, esto por la falta de higiene, saneamiento y acceso limitado al agua potable; así como las condiciones subyacentes, como es la desnutrición, la cual aumenta el riesgo de contraer diarrea.

De acuerdo con sus diferentes mecanismos de patogenicidad ECD (Tabla 1) se clasifica en seis diferentes patotipos, estos son *E. coli* enteropatógena (EPEC), *E. coli* enterohemorrágica productora de toxina Shiga (EHEC), *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC) y *E. coli* de adherencia difusa (ECAD) [12] [15].

**Tabla 1. Características de los grupos de *Escherichia coli* causante de diarrea en humanos**

<b>Patotipos</b>	<b>Síntomas clínicos</b>	<b>Edad que afecta</b>	<b>Factores relacionados con la virulencia</b>
<b>EPEC</b>	Diarrea aguda, dolor abdominal, vómito y fiebre baja.	Niños mayores de 6 meses y hasta 2 años.	Intimina (A/E), bfp, plásmido EAF (60 MDa)
<b>EHEC</b>	Colitis hemorrágica, síndrome urémico hemolítico,	Todas las edades	STx (toxina shiga), intimina (A/E)
<b>EIEC</b>	Diarrea con moco y sangre	Todas las edades.	Invasividad
<b>ETEC</b>	Diarrea acuosa	Niños menores de 5 años.	ST y LT
<b>EAEC</b>	Diarrea persistente (14 días), líquida con moco sin sangre.	Recién nacidos y niños menores de 2 años.	Proteínas Pet y Pic, EAST 1

<b>DAEC</b>	Diarrea acuosa	Niños de 1 a 5 años	Fimbria F1845
-------------	----------------	---------------------	---------------

Modificado de Tobias J, Vutukuru SR. 2012. [16]

### 1.2.2.1. *E. coli* enteropatógena (EPEC)

*Escherichia coli* enteropatógena, fue la primera en describirse y es tal vez uno de los microorganismos más estudiados ya que es una de las causas más comunes de diarreas en niños menores de dos años, principalmente en niños de seis meses, en países en desarrollo [17] [18]. La prevalencia de infecciones por EPEC, varía en relación con la población en estudio, grupos de edad, criterios de diagnóstico, etc. Actualmente EPEC es responsable, en promedio, de 5 a 10% de los episodios de diarrea pediátrica en países en desarrollo. Sin embargo, este dato ha ido disminuyendo en los últimos años [11].

Una de las principales características de la infección por EPEC es la diarrea acuosa, la cual puede ocurrir en diversos grados de intensidad, en niños es común la presencia de vómito y fiebre. Es transmitida por vía fecal-oral, por la contaminación de manos, alimentos y mamilas. El periodo de incubación es de 3 a 24 horas después de que el individuo ingiere un inóculo grande de bacterias que va de  $10^9$  a  $10^{10}$  unidades formadoras de colonias (UFC) [15].

### Patogenia

Este patotipo se caracteriza por presentar un patrón de adherencia localizada (AL) a células HEp-2 (línea celular de carcinoma faríngeo),

formando microcolonias. Este patrón fue denominado posteriormente como adherencia localizada por Scaletsky y col [19], para diferenciarlo de otro más, al cual se le llamó de adherencia difusa. La adherencia de EPEC, está asociada a la presencia del plásmido de 50-70 MDa EAF (EPEC adherence factor). La histopatología de la *E. coli* enteropatógena en el intestino se denomina adherencia y esfacelamiento (A/E) y es causada por la unión íntima de las bacterias a la membrana de los enterocitos, ello da lugar a la polimerización de actina con la posterior formación de un pedestal. Una vez formadas las microcolonias comienza una segunda etapa de adherencia, que se caracteriza por la destrucción de las microvellosidades intestinales, a lo que se le ha llamado esfacelamiento. La falta de microvellosidades, la polimerización de la actina y otros factores inducen la salida de agua y electrolitos al espacio luminal [20], Figura 1.

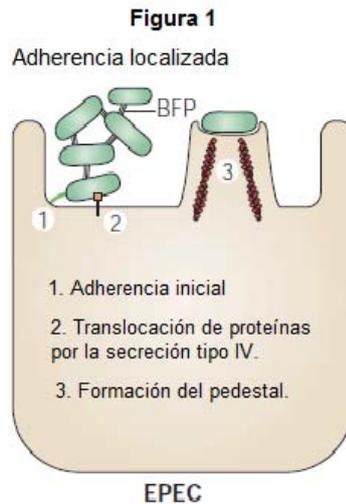
Los principales factores de virulencia que se encuentran en las cepas de EPEC, están codificados en una isla de patogenicidad cromosómica de 35 kb llamado locus de esfacelamiento del enterocito (LEE); LEE está organizado en 5 grandes operones policistrónicos llamados LEE1 a LEE5 en donde los productos son: un sistema de secreción de tipo III ( LEE1 a LEE3 ), un sistema de translocación de proteínas (LEE4 ), un sistema de adherencia que consiste en una proteína de membrana externa de 94 KDa denominada intimina (*eae* del inglés *E. coli* attaching and effacing protein) la cual es responsable de la adherencia íntima entre la bacteria y la célula epitelial, así como un receptor translocador de intimina (TIR del inglés traslocator intimin receptor) codificados por LEE5 [21].

En la adherencia también participa un *pili* tipo IV o fimbrias rizadas llamadas *bfp* (bundle-forming pilus), cuya información genética está codificada en el plásmido “factor de adhesión de *E. coli*” (EAF), quien también codifica para un activador transcripcional llamado “regulador codificado en el plásmido” (Per) que se requiere para la activación y la función óptima de genes codificados en LEE y para la expresión de Bfp [22]. El gen *bfpA* es el responsable del fenotipo de AL, caracterizado por la capacidad de las bacterias para formar microcolonias en la superficie de las células epiteliales de intestino [23] [24].

### **Clasificación de EPEC**

Este patotipo se clasifica en EPEC típicas y EPEC atípicas. Las cepas de EPEC típicas poseen los genes que codifican para el *pilus bfpA* y la intimina *eae*, en donde la proteína Bfp induce un patrón de adherencia localizada en células HEp-2. Si la bacteria es *eaeA* + y *bfpA* – es una EPEC atípica y presenta una adherencia similar a la localizada o difusa [25].

EPEC típica ha sido considerada durante muchos años como la principal causa de diarrea infantil en los países en desarrollo y se considera poco frecuente en los países industrializados, en donde EPEC atípica parece ser una causa importante de diarrea.



**Figura 1.** Muestra el mecanismo por el cual EPEC, causa diarrea. James B. Kaper, James P. Nataro and Harry L. T. Mobley 2004.

### 1.2.2.2. *E. coli* enterotoxigénica (EPEC)

A nivel mundial, ETEC es responsable de 280 y 400 millones de casos de diarrea en niños menores de cinco años de edad causando aproximadamente 300,000 a 500,000 muertes anuales [26]. Entre los cinco y 14 años de edad ETEC causa aproximadamente 100 millones de episodios de diarrea [27]. Por otro lado, al parecer estos microorganismos contribuyen sustancialmente a la desnutrición, ya que los niños desnutridos son más propensos de adquirir infecciones por ETEC [28]. Estas bacterias son el agente etiológico de la diarrea del viajero, siendo responsables de entre un 30% a 70% de los casos [29].

El periodo de incubación es de 14 a 50 horas, se transmite por vía fecal-oral, debido a la ingesta de alimentos y agua contaminados. Las manifestaciones clínicas de la infección por ETEC están asociadas con diarrea acuosa aguda. Estas infecciones pueden variar desde diarrea levemente sintomática hasta diarrea acuosa similar a la del cólera, lo que

conduce en pocas horas a una rápida deshidratación, algunos pacientes pueden presentar periodos de diarrea prolongada (una semana o más). Adicionalmente a la diarrea, se pueden presentar otros signos y síntomas como: cefalea, fiebre, náuseas y vómito [30].

## **Patogenia**

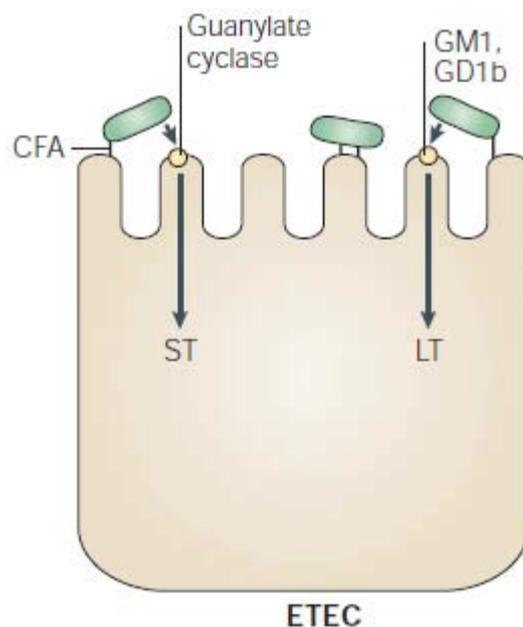
Cepas de ETEC se adhieren a las células intestinales a través de un grupo heterogéneo de estructuras superficiales proteicas denominadas factores de colonización (CFS) o factor de colonización de antígeno (CFA) [31].

Después de la adherencia inicial y la colonización, las cepas ETEC producen enterotoxinas termolábiles (LT) y/o enterotoxinas termoestables (ST). LT es una proteína hexamérica de 84 KDa, codificada por el gen *eltB* y *eltA*, que se encuentra en el plásmido de virulencia *Ent*, la cual tiene una estructura y función muy similar a la toxina de *Vibrio cholerae*. Esta toxina, es miembro de la familia de toxinas AB<sub>5</sub> y está constituida por moléculas de cinco subunidades B (11.5KDa) y una subunidad A (28 KDa) [32].

En humanos se han descrito dos enterotoxinas termolábiles patógenas (LTI y LTII) de las cuales solo la primera predomina en humanos, LT se destruye parcialmente de 60 a 80 °C durante 30 minutos y totalmente a 100°C de 2 a 10 minutos [33]. La toxina LT se une al gangliosido GM1 por medio de la subunidad B, la subunidad A es endocitada y translocada a través de la célula hasta el aparato de Golgi en donde es dividida en dos partes A1 y A2. A1 induce la activación permanente de la adenilato-ciclasa, la cual aumenta los niveles de AMP<sub>c</sub> y provoca la salida de agua así como de iones cloruro de la célula [26], Figura 2.

ST se caracteriza porque contiene múltiples residuos de cisteína, algunos de los cuales se encuentran formando enlaces disulfuro que hacen a la toxina termoestable. Es codificada por el gen *estA*, como una pre-toxina de 72 aminoácidos que se procesa en una toxina activa de 18 a 19 aminoácidos llamada STa y una toxina de 42 aminoácidos llamada STb. La toxina STa es producida por cepas que afectan a humanos y animales, mientras que STb se detecta principalmente en cepas de origen veterinario [34].

El receptor de ST es la guanilato-ciclase C, localizados en la membrana apical de las células epiteliales del intestino, su activación da lugar a un aumentando en el nivel intracelular de GMPc, provocando la salida de agua y de iones cloro [35] [36].



**Figura 2.** ETEC se adhiere a los enterocitos del intestino e inducen diarrea acuosa provocada por la secreción de enterotoxinas ST y/o LT. James B. Kaper, James P.Nataro and Harry L. T.Mobley 2004

### **1.2.2.3. *E. coli* enterohemorrágica productora de toxina Shiga (EHEC)**

En 1983 en Estados Unidos, se presentaron brotes de diarrea con sangre llamada también colitis hemorrágica (CH) provocada por una cepa de *E. coli* con serotipo O157:H7, asociados con el consumo de hamburguesas de un restaurante de comida rápida [37]. En ese mismo año en Canadá, se reportaron casos esporádicos de síndrome urémico hemolítico (SUH) y púrpura trombocitopénica, ambos relacionados con el aislamiento en estos pacientes de la cepa de *E. coli* O157:H7 productora de una toxina con efecto citotóxico en células Vero (células de riñón de mono verde) por lo cual se le llamo verotoxina [38].

En el año de 1982 se publicó que extractos de ciertas cepas de *E. coli* resultaban citotóxicas para las células de cáncer de cérvix (HeLa) y que tal actividad podía ser neutralizada con anticuerpos dirigidos contra la toxina de Shiga (Stx), producida por *Shigella dysenteriae* tipo 1; razón por la cual fue nombrada toxina semejante a Shiga (SLT, Shiga like toxin) y una de dichas cepas coincidía plenamente con la productora de verotoxina; más tarde en 1987 se hizo notar que las verotoxinas y las SLT en realidad eran las mismas y a las cepas productoras de estas se les nombró *E. coli* Shiga toxin (STEC) [39] [15].

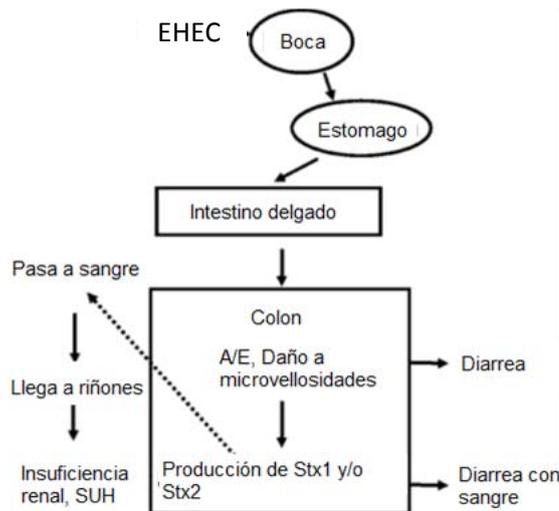
Recientemente, apareció una nueva cepa de *E. coli* productora de la toxina SLT, esta es una cepa de *E. coli* enteroagregativa, identificada en Alemania, causante de uno de los mayores brotes de SUH en todo el mundo. La cepa causante pertenecía al serotipo O104: H4, que contenía los factores de virulencia de la EAEC típica y Stx2 (se encuentra codificada

en un profago), pero carecía de la isla de patogenicidad LEE. Este descubrimiento ha llevado a la aparición de un nuevo tipo patógeno para el cual se ha sugerido el nombre de patotipo de *Escherichia coli* enteroagregativo-hemorrágico (EAHEC) [40] [41]. Este caso ejemplifica la plasticidad del genoma de *E. coli* y ha puesto de manifiesto la necesidad de vigilancia de la salud pública de las infecciones por y la importancia en la elaboración y aplicación de medidas de control.

La infección por EHEC es una enfermedad zoonótica, por lo que los rumiantes, sobre todo ganado bovino, son el reservorio natural, albergando EHEC como biota habitual del tracto gastrointestinal. La transmisión al hombre se produce normalmente a través del consumo de EHEC en carne contaminada, ingerida cruda o mal cocinada y, o de productos contaminados con las heces del ganado. La dosis infecciosa de EHEC es baja, alrededor de 100 UFC. La transmisión de esta bacteria también puede ser fecal-oral [42] [43].

### **Patogenia**

Al igual que otras ECD, la EHEC primero coloniza el intestino y después causa un daño debido a las toxinas que esta cepa en particular produce. Una visión general del proceso de la enfermedad de EHEC se da en la Figura 3. La colonización es el proceso por el cual EHEC supera los mecanismos de defensa del hospedero y se establecen en el intestino. La acidez gástrica es un mecanismo importante de defensa del hospedero en el tracto gastrointestinal, pero la resistencia a los ácidos es una característica general de la especie *E. coli* [44] y esto se ha demostrado para EHEC O157 así como para otros patotipos de la bacteria [45].

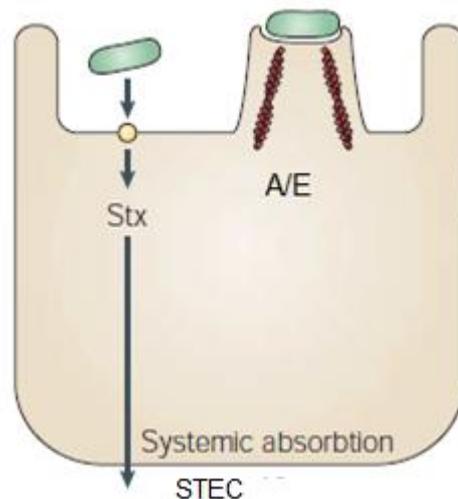


**Figura 3.** Muestra el proceso de infección de EHEC.

Después de que EHEC pasa la acidez del estómago, llega al intestino y produce lesiones características de tipo como son A/E en los enterocitos [46]. Estas lesiones se han atribuido a los productos del locus de la isla de patogenicidad LEE, el cual incluye el sistema de secreción de tipo 3 (T3SS), un sistema de translocación de proteínas así como a la isla de patogenicidad EAE cuyo gen *eae* codifica para la adhesina intimina. Se requiere la combinación de la expresión de intimina y Stx para tener una virulencia completa. Sin embargo, un reciente brote de EHEC O:104 causado por una cepa intimina negativa parece mostrar que Stx es el principal factor de virulencia y la adherencia por intimina puede ser sustituido por otros factores de adherencia [47], Figura 4.

Como ya se mencionó anteriormente, la citotoxina Stx es el principal factor de virulencia de este patotipo, está codificada en el bacteriófago Stx, insertado en el genoma de EHEC. Se han encontrado dos variantes de toxinas Stx las cuales son inmunológicamente distintas, comparten casi el

60 % de identidad y de secuencia, pero varían en potencia, estas son Stx1 y Stx2, compuestas por una subunidad A que es la fracción con actividad enzimática, tiene un peso de 32 KDa, y se encuentra unida no covalentemente a un pentámero que forma la subunidad B, quién se une a los receptores específicos globotriaosilceramida (Gb-3) y/o globotetraosilceramida (Gb-4) [48] [49]. Después de que la subunidad B se une a su receptor, la subunidad A es internalizada por endocitosis, ya en el citoplasma ésta se libera y ejerce su mecanismo de acción, esto es, inhibir la síntesis de proteínas por escisión del enlace N-glicosídico de adenina 4324 en el ARNr 28S, provocando que no se una al ARNt lo que resulta en la muerte celular [50] [51].



**Figura 4.** EHEC a través de la intimina (A/E), forma un pedestal y posteriormente se producen las citotoxinas Stx, las cuales son endocitadas e inhiben síntesis de proteínas, lo que conduce la muerte celular. James B. Kaper, James P. Nataro and Harry L. T. Mobley 2004.

#### 1.2.2.4. *E. coli* enteroagregativa (EAEC)

EAEC es la segunda causa de la diarrea del viajero después de ETEC, causa diarrea persistente (14 días o más) en los recién nacidos, así como en las personas infectadas por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) [52]. Un estudio realizado en Brasil identificó a la infección EAEC como la causa más común de diarrea en los niños pequeños, y se encontró que se asocia más frecuentemente con diarrea en niños menores de 2 años de edad [53]. Los síntomas más comunes son diarrea acuosa que puede ser aguda o crónica, con o sin sangre, dolor abdominal, náuseas, vómitos y fiebre de bajo grado.

El descubrimiento de la EAEC, se derivó de los estudios que mostraron que EPEC se adhería a las células HEp-2 en un patrón de tipo adherencia localizada (AL) [54], mientras que había cepas que no eran EPEC y que se adherían a células HEp-2 mostrando un fenotipo diferente al de dicha cepa. Este patrón de adhesión, que había sido llamado “difuso” fue posteriormente subdividido en adherencia agregativa (AA) y adherencia difusa (AD). La AA consiste en la formación de un patrón semejante a ladrillos apilados en las células HEp-2 y que hasta el momento se ha caracterizado por ser el método patrón para el diagnóstico e identificación de EAEC [55].

### **Patogenia**

La patogénesis de EAEC implica tres etapas:

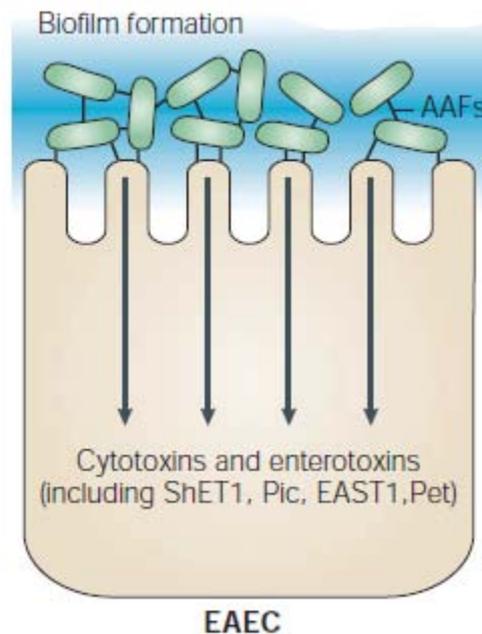
- 1) La primer etapa es la adherencia a la mucosa intestinal por fimbrias de adherencia agregativa (AAF, por sus siglas en ingles), las cuales están codificadas en un plásmido de peso molecular de 55-65 MDa llamado pAA,

en donde se encuentra: el gen *aggA* o AAF/I, que es el responsable del fenotipo de agregación y de la hemaglutinación de eritrocitos humanos, el gen *aafA* o AAF/II, permite a EAEC adherirse a la mucosa intestinal, y el gen *agg-3* o AAF/III funciona como una adhesina [56] [57].

2) La segunda etapa se caracteriza por la presencia de una biopelícula (regulada por el gen *aggR*), la cual requiere varios genes, incluidos el gen *Fis*, que codifica para una proteína de unión a ADN implicada en la regulación del crecimiento, el gen *yafK* que codifica para una proteína de 28 KDa [58], el gen *aatA*, que corresponde a un fragmento de CVD432 el cual codifica una proteína de la membrana externa (TolC), componente de un transportador ABC que participa en la secreción de dispersina (codificada por el gen *aap*), la cual permite la dispersión de EAEC en la mucosa intestinal en los seres humanos [59] [60] [61]. La formación de biopelícula podría explicar por qué las personas infectadas por el EAEC, especialmente los niños de los países en desarrollo con desnutrición preexistente, pueden desarrollar heces mucoides [62].

3) La tercer etapa de la patogénesis de EAEC implica los efectos citotóxicos debido a la liberación de toxinas, como son, la toxina codificada en el plásmido (Pet), un autotransportador de serina proteasa que divide la espectrina alfa III dentro del citoesqueleto del epitelio, lo que resulta en la elongación celular y exfoliación, una toxina enteroagregativa termoestable (EAST1) codificada por el gen *astA*, esta toxina comparte similitudes con la toxina ST de ETEC por lo que el mecanismo de acción es muy similar [44],  
Figura 5.

Las cepas que tienen el plásmido pAA representan a las cepas típicas de EAEC (tEAEC), sin embargo las cepas EAEC son un grupo muy heterogéneo, y ciertas cepas que son capaces de producir diarrea, no contienen dicho plásmido AA y son denominadas como EAEC atípicas (aEAEC) ( Jenkins, et. al., 2006a).[63] [1]



**Figura 5.** Mecanismo de acción de EAEC para producir diarrea: inicialmente se adhiere al epitelio intestinal, favorece la secreción de moco, formación de biopelícula, acortamiento de microvellosidades y liberación de toxinas. *Modificado de James B. Kaper, James P. Nataro and Harry L. T. Mobley 2004.*

#### 1.2.2.5. *E. coli* enteroinvasiva (EIEC)

Las cepas de EIEC y *Shigella spp*, están relacionados genética y bioquímicamente ya que son lisina descarboxilasa negativas, no móviles y lactosa negativas. Sin embargo, la enfermedad inducida por EIEC es generalmente menos grave que la inducida por *Shigella spp* [64] [65]. Esta diferencia en el daño, puede estar asociada con un menor nivel de

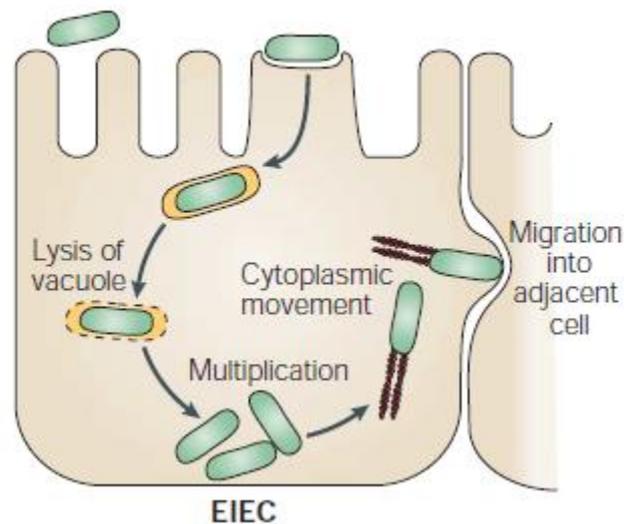
expresión de factores de virulencia [66]. Las infecciones por EIEC se presentan en la mucosa del colon y los síntomas característicos son un inicio de aproximadamente dos días de evolución con diarrea acuosa y posteriormente evacuaciones con sangre y moco. En algunos casos sólo presentan diarrea acuosa, indistinguible de la que produce ETEC. Las cepas EIEC se asocian más con brotes que con casos aislados, en los cuales la transmisión puede ser por ingestión de alimentos y agua contaminada, convirtiéndose en un patógeno importante en niños mayores de seis meses [67].

### **Patogenia**

El mecanismo de patogenicidad de EIEC es la invasión del epitelio del colon, para ello el primer paso es la adherencia de la bacteria a las microvellosidades de la mucosa, requiriendo de mucina y adhesinas, para después entrar por endocitosis a la células donde produce una enzima superoxidasa dismutasa que le permite vivir dentro de la vacuola para luego romperla, pasar a citoplasma, multiplicarse dentro de la célula, y por último diseminarse a células adyacentes. La destrucción de las células, junto con la movilización de polimorfonucleares y macrófagos, desencadena el proceso de inflamación y la aparición de diarrea con moco y sangre, además de presentar fiebre, muy similar a la producida por *Shigella* [4] [68], Figura 6.

Los genes necesarios para la invasión se encuentran en un plásmido de 140 MDa llamado pINV, que codifica para proteínas, como por ejemplo la IpaC que promueve la internalización, la IpaB que participa en la lisis de la

vacuola, los genes *mxi* y *spa* los cuales codifican para el sistema de secreción tipo III y otros que están involucradas en el proceso de patogénesis [69].



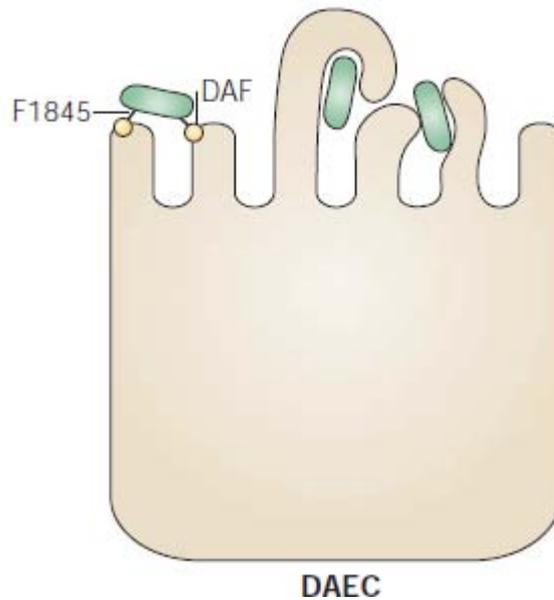
**Figura 6.** Mecanismo de daño de EIEC: inicialmente se adhiere al epitelio del colon, luego es endocitada, lisa las vacuolas endocíticas, se multiplica en el citoplasma de la célula, invade células adyacentes y las destruye, lo que da lugar a muerte celular y formación de úlceras, generando una respuesta inflamatoria de la lámina propia. Modificado de James B. Kaper, James P.Nataro and Harry L. T.Mobley 2004.

#### 1.2.2.6. E. coli adherente difusa (DAEC)

DAEC es un grupo heterogéneo que genera un patrón de adherencia difusa en células HEP-2 y se ha asociado con diarrea acuosa, que puede llegar a ser persistente en los niños pequeños tanto en países desarrollados como en desarrollo, además de infecciones recurrentes del tracto urinario [70]. DAEC produce una diarrea acuosa sin sangre.

## Patogenia

Poco se sabe acerca de las características patogénicas de diarrea que induce DAEC, pero hasta el momento se sabe que las adhesinas de la familia Afa/Dr como lo son AFAE-I, AFAE-II, AFAE-III, AFAE-V y F1845, han sido implicadas en la patogénesis de este virotipo [71]. La unión de cepas que expresan F1845 o adhesina Dr a receptores específicos como el factor acelerador de decaimiento (DAF) o moléculas relacionadas con el antígeno carcinoembrionario (CEACAMs), puede promover el desordenamiento de la red actina en las células intestinales, causando alargamiento de microvellosidades y la redistribución de proteínas del citoesqueleto [72]. Estas proyecciones aparentemente "integran" a las bacterias, proporcionando protección contra ciertos antibióticos, pero sin la internalización completa. Además de las adhesinas se ha encontrado una toxina secretada por un autotransportador (Sat) la cual pertenece a la familia de los autotransportadores de serina proteasa de la familia *Enterobacteriaceae* (SPATE). Sat es capaz de causar lesiones en las uniones estrechas de células epiteliales, que a su vez puede conducir a un aumento de su permeabilidad (Figura 7).



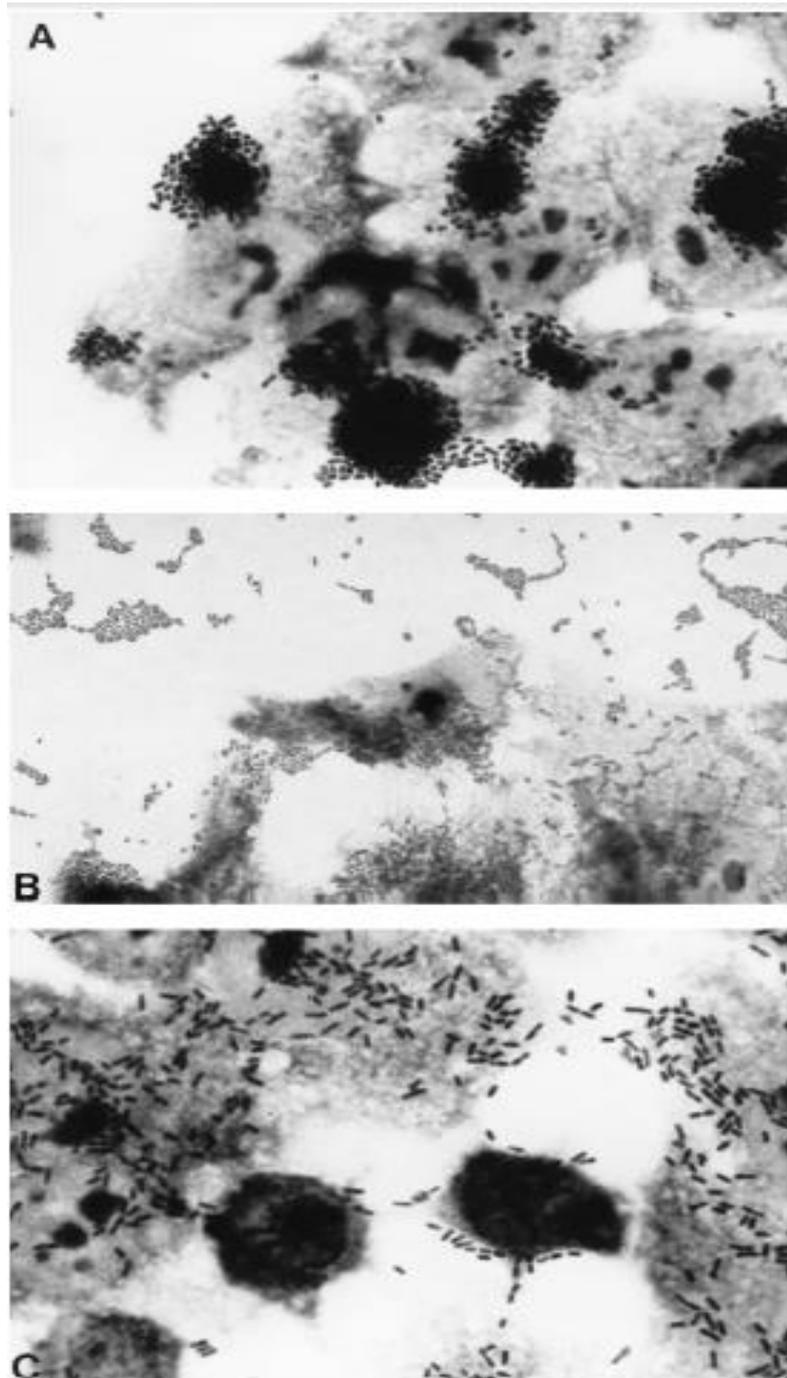
**Figura 7.** Mecanismo de daño de DAEC: inicialmente se adhiere a los receptores DAF del epitelio intestinal mediante las adhesinas Afa/Dr, las cuales provocan el alargamiento de las microvellosidades, para después liberar la toxina Sat. Modificado de James B. Kaper, James P. Nataro and Harry L. T. Mobley 2004.

### **Adherencia bacteriana**

La adhesión es el primer paso para mantener a los miembros de la microflora habitual en el intestino; sin embargo, es también la primera etapa crítica en todas las infecciones diarreicas causadas por cepas patógenas de *E. coli*. La línea celular HEp-2 proviene de un carcinoma de laringe humano y se utiliza para detectar la capacidad adherente de cepas de *E. coli* a estas células, mediante una adherencia localizada (AL), en donde las bacterias forman microcolonias en la superficie de la célula, adherencia difusa (AD), cuando las bacterias se dispersan sobre la superficie de la célula, o adherencia agregativa (AA), en este caso las bacterias se adhieren tanto sobre la monocapa de células como sobre el vidrio, en una configuración característica de ladrillos apilados.

Esta propiedad de adherencia se puede constatar, también, en material inerte (vidrio o plástico), por lo que estas cepas de *E. coli* se pueden diferenciar de acuerdo con el tipo de adherencia que presenta, EPEC (AL), DAEC (AD) y EAEC (AA), respectivamente. No obstante, recientemente se ha sugerido nuevos tipos de patrones de adherencia que comprenden simultáneamente la adherencia localizada y la difusa (AL/AD) y otra similar a la localizada (ASL o LAL por el inglés “localized adherence-like”) [73].

Uno de los ensayos fenotípicos más útiles para el diagnóstico de *E. coli* diarreogénica es el ensayo de adherencia a células HEp-2. Este ensayo fue descrito por primera vez en 1979 por Cravioto y col., y sigue siendo el "estándar de oro" para el diagnóstico de la EAEC y DAEC. El ensayo de células HEp-2 se ha modificado desde su primera descripción, incluyendo variaciones tales como ampliar el tiempo de incubación por más de tres horas, o cambiar el medio de crecimiento durante el ensayo de adhesión. Sin embargo, estudios comparativos [74] han demostrado que el ensayo realizado esencialmente como se describió por primera vez, ofrece la mejor capacidad de diferenciar entre las tres categorías de adherentes en cepas diarreogénicas (EPEC, EAEC y DAEC). El ensayo de adherencia de HEp-2 implica la inoculación de la cepa de prueba con células HEp-2, incubando durante 3 horas a 37 ° C bajo 5% de CO<sub>2</sub>. Después de este período de incubación, la monocapa se lava, se fija, se tiñe y se examina con el microscopio óptico [4], Figura 8.



**Figura 8.** Muestra los tres patrones de la adherencia por *E. coli* diarreogénicas a células HEp- 2. (A) adherencia localizada (AL), (B) adherencia agregativa (AA), (C) adherencia difusa (DA). James B. Kaper, James P.Nataro and Harry L. T.Mobley 2004.

## **Antimicrobianos y su mecanismo de acción**

Con base en el mecanismo de acción, los antimicrobianos se clasifican en seis grupos [75]:

- ✓ **Los que inhiben la síntesis de la pared celular:** actúan a distintos niveles de la síntesis del peptidoglucano lo que se traduce en pérdida de rigidez de la célula bacteriana, que puede causar la muerte, y por lo tanto, son considerados como agentes bactericidas. Los representantes de este grupo son los  $\beta$  Lactámicos.
- ✓ **Los que actúan a nivel de la membrana citoplasmática:** alteran la permeabilidad de la membrana ocasionando la salida de cationes de la célula bacteriana como es el caso de las polimixinas; o produciendo un desacoplamiento de la fosforilación oxidativa y la formación de poros por donde puede haber pérdida del contenido citoplasmático de la célula bacteriana como es el caso de la gentamicina.
- ✓ **Inhibidores de la síntesis de ácidos nucleicos:** los antimicrobianos de este tipo constituyen una de las clases de antimicrobianos más utilizadas. Se trata de antibióticos que inhiben las enzimas topoisomerasa de ADN de tipo II (girasa) o topoisomerasa de tipo IV, las cuales son necesarias para la replicación, la recombinación y la reparación de ADN. Un ejemplo de este grupo es la rifampicina, el grupo de las quinolonas y los nitroimidazoles.

- ✓ **Inhibidores de la función ribosomal (síntesis de proteínas):**  
inhiben la síntesis de proteínas mediante la unión irreversible a las proteínas ribosómicas 30S o 50S. Esta unión a los ribosomas tiene dos efectos: la producción de proteínas anómalas como resultado de una lectura incorrecta del ARN mensajero, y la interrupción de la síntesis de proteínas a raíz de la separación precoz del ribosoma del ARNm. Por mencionar algunos ejemplos tenemos al grupo de los aminoglucosidos (amikacina, kanamicina etc.) y las tetraciclinas, ambas actúan en la subunidad 30S; el cloranfenicol, los macrolidos y lincinoides actúan en la subunidad 50S.
- ✓ **Inhibidores del metabolismo de los folatos (antimetabolitos):** los antibióticos de este tipo interfieren en la síntesis de ácido fólico, el cual es necesario para la síntesis de ARN, ADN y proteínas de la pared celular bacteriana, un ejemplo de este grupo son las sulfonamidas.
- ✓ **Inhibidores de betalactamasas:** las betalactamasas son enzimas producidas por algunas especies de bacterias y son las responsables de la resistencia a antibióticos que en su estructura química presentan un anillo betalactámico. Algunos inhibidores de dichas enzimas son el ácido clavulánico, tazobactam y sulbactam.

### **1.3.1. Resistencia a los antimicrobianos**

Desde la introducción de los antibióticos, la resistencia de las bacterias a los antibióticos cada vez es más frecuente, y esto dificulta el tratar las infecciones bacterianas. Los microorganismos pueden ser intrínsecamente

resistentes o pueden volverse resistentes por una mutación. La mayoría de los determinantes de resistencia a antibióticos están codificados en elementos génicos tales como plásmidos, fagos, transposones, integrones o casetes de genes [76].

En 1967, se aislaron cepas patógenas de *E. coli* de las heces de un pequeño número de niños en Dublín, Irlanda, con múltiples resistencias a antibióticos. Cabe señalar que los niños no habían estado hospitalizados y no habían sido tratados con antibióticos [77]. A partir de ese momento, la presencia de cepas resistentes a los antibióticos de *E. coli* en los niños se ha estudiado en varios países.

#### **1.4 Diagnóstico de cepas ECD**

El diagnóstico de las ECD se basa en el aislamiento e identificación de la bacteria a través del coprocultivo, biotipificación, identificación de serotipos/serogrupos, de factores de virulencia específicos de cada bacteria (toxinas, factores de adherencia, invasividad, etc.), así como ensayos de adherencia en cultivos celulares (en células HEp-2, HeLa, etc.). Hoy en día, la identificación basada únicamente en la determinación de los serotipos, no es del todo confiable, ya que las enterobacterias comparten antígenos somático, capsular y flagelar, lo cual da reacción cruzada al ser tratadas con anticuerpos dirigidos contra estos antígenos. En los últimos años se están empleando con mayor frecuencia métodos moleculares para la identificación de estos patógenos, como es la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) [78]. Esta prueba tiene una sensibilidad de 99% y una especificidad de 100% [79].

La idea básica de la PCR, es sintetizar varias veces un fragmento de ADN, utilizando una polimerasa que puede trabajar a temperaturas muy elevadas, ya que proviene de la bacteria *Thermus aquaticus* que vive a altas temperaturas (79°C a 85°C). Es una reacción enzimática cíclica, en la cual se sintetiza ADN *in vitro*, en ésta, las cadenas individuales de ADN blanco son duplicadas por la Taq polimerasa, en cada uno de los ciclos (generalmente de 20 a 30) que integran la reacción, logrando así una producción exponencial de ADN utilizado como plantilla. Los componentes requeridos para una PCR son: Taq polimerasa, bases púricas y pirimidinas, una solución amortiguadora, MgCL<sub>2</sub>, ADN y agua libre de nucleasas así como la secuencia específica del gen que se quiere iniciar su síntesis, a este iniciador, se le conoce como “primer” u oligonucleótido.

Cada uno de los ciclos de la reacción consta de tres pasos determinados por temperatura y tiempo específicos, los cuales son:

- Paso 1) Desnaturalización: proceso en el cual se separan las dos cadenas complementarias de ADN blanco.
- Paso 2) Alineación: es la unión específica entre los oligonucleótidos (con la secuencia específica) y las cadenas simples de ADN blanco.
- Paso 3) Extensión: en este paso la ADN polimerasa sintetiza la cadena complementaria al ADN blanco a partir de los oligonucleótidos.

## 2. OBJETIVOS

### OBJETIVO GENERAL

Determinar la prevalencia de los diferentes virotipos de *E. coli* y su resistencia a antimicrobianos en población de niños de edad infantil y preescolar con diarrea (menores de cinco años).

### OBJETIVOS PARTICULARES

- ✓ Identificar mediante una técnica de alta sensibilidad y especificidad como lo es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de punto final, simple y múltiple, algunos de los principales genes de virulencia asociados a cepas de *E. coli* enterotoxigénicas (ETEC), *E. coli* enteropatógenicas (EPEC), *E. coli* enteroinvasivas (EIEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC).
- ✓ Identificar mediante ensayos de adherencia a células HEp-2 *in vitro*, los principales tipos de adherencia bacteriana que presentan los virotipos EPEC y EAEC.
- ✓ Determinar la sensibilidad a diferentes agentes antimicrobianos, de las cepas de *E. coli* aisladas.

**3.**

### **HIPÓTESIS**

Dado que la diarrea sigue siendo una causa importante de morbi-mortalidad infantil en nuestro país, es probable que uno de los agentes etiológicos responsables de este síndrome, sean cepas diarreogénicas de *Escherichia coli*.

## **4. MATERIAL Y MÉTODOS**

### **4.1. Identificación de *Escherichia coli***

Las muestras fueron obtenidas por personal médico altamente capacitado del Instituto Nacional de Pediatría, para estos fines, con el propósito de no poner en riesgo la salud de los niños y tener un adecuado manejo de los mismos, posteriormente se transportaron al laboratorio en el medio de transporte Cary Blair®, donde se sembraron en Agar Mac Conkey, se incubaron por 24 horas a 37 °C; transcurrido este tiempo se seleccionaron de una a cinco colonias que cumplieran con las características morfológicas de *E. coli*, para luego identificar la especie de la bacteria, a través de pruebas bioquímicas (LIA, MIO, Citrato, RM-VP, TSI).

Ya identificada la especie *E. coli*; a partir de las cepas puras, se tomó una colonia y se sembró en agar sangre al 5% para evaluar hemólisis, así como en tubos con medio Luria Broth (LB), para realizar los ensayos de sensibilidad a agentes antimicrobianos y obtención ADN.

#### **4.1.1. $\beta$ hemolisis**

La  $\beta$  hemolisis fue evaluada mediante la siembra en medio agar sangre de carnero al 5%. A partir de las cepas puras de *E. coli* se tomó una colonia y se sembró con la técnica de agotamiento de asa (con picadura), se incubó por 24 horas a 37°C y se procedió a evaluar la  $\beta$  hemolisis observando la destrucción total del eritrocito.

#### **4.1.2. Sensibilidad a antimicrobianos**

Se tomó una asada y se inoculó un tubo con medio LB con cada una de las *E. coli* aisladas, se incubaron por 8 horas para obtener una turbidez de 0.5

en la escala de Mc Farland (UMF) (aprox.  $1.5 \times 10^8$  UFC/mL), medidos en un espectrofotómetro a 625nm, posteriormente se sembraron masivamente en placas con medio Müller Hinton, acorde a los lineamientos del Comité de Control de Laboratorios Clínicos (NCCLS), en donde explica que se debe de sembrar dentro de los 15 minutos después de haber ajustado la turbidez de la suspensión del inóculo, en el cual se sumerge un hisopo estéril de algodón en la suspensión ajustada, se gira el hisopo varias veces y se presiona firmemente en el interior de la pared del tubo, por encima del nivel del inóculo, esto para eliminar el exceso de líquido. Se inocula la superficie seca de la placa de MH pasando el hisopo sobre toda la superficie de agar estéril, realizando una rotación de la placa para asegurar una distribución uniforme de inóculo. Se deje la tapa de la placa abierta durante cinco minutos, para que cualquier exceso de humedad de la superficie sea absorbida antes de aplicar los discos impregnados con el fármaco, estos discos son aplicados con ayuda de un dispensador automático (BD, BBL Sensi-Disc Antimicrobial Susceptibility test Discs, Sparks MD, USA) (Tabla 2). Las placas se dejaron secar por 5 minutos y se incubaron por 24 horas a 37°C. Pasado este tiempo se procedió a medir el halo de inhibición de crecimiento bacteriano, para determinar la resistencia y sensibilidad a cada uno de los agentes antibacterianos. Se utilizó como control sensible a la cepa *E. coli* ATCC (25922), Tabla 2.

**Tabla 2. Características de los antibióticos utilizados**

Antibiótico	Concentración (µg)	R (mm)	I (mm)	S (mm)
Kanamicina (K30)	30	≤13	14-17	≥18
Amikacina (AN30)	30	≤14	15-16	≥17
Ampicilina (AM10)	10	≤13	14-16	≥17
Cefalotina (CF30)	30	≤14	15-17	≥18
Amoxicilina (AMC30)	30	≤13	14-17	≥18
Cefotaxina (CTX30)	30	≤14	15-22	≥23
Sulfametoxazol, trimetoprima (STX)	23.7 y 1.25	≤10	11-15	≥16
Cefoxitina (FOX30)	30	≤14	15-17	≥18

R: resistente, I: intermedio, S: sensible. Diámetro en milímetros. CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing [108].

#### **4.2. Extracción de ADN**

Se inoculó un tubo de medio LB con cada una de las cepas de *E. coli* aisladas, se incubó por 24 horas a 37°C; posteriormente un mililitro de inóculo se trasvasó a un tubo eppendorf. 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, por 10 minutos y posteriormente se colocó a 4°C durante 10 minutos; finalmente se centrifugó a las mismas condiciones antes mencionadas 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.

#### **4.2.1. Conservación de muestras**

Se inocularon tubos con medio LB con cada una de las cepas de *E. coli* aisladas, se incubaron por 24 horas a 37°C. Posteriormente se realizó un “stock” de glicerol al 20% de cada una de ellas (200 µl de glicerol estéril, mas 200 µl de medio LB fresco, mas 600 µl del cultivo de *E. coli*), las muestras fueron etiquetadas, se mezclaron perfectamente y se guardaron en el congelador a -20 °C.

#### **4.3. Ensayo de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)**

A través de la PCR simple o múltiple, se identificaron 9 genes (Tabla 3) para la caracterización de los diferentes virotipos de *E. coli* causantes de diarrea, como lo son EAEC, EPEC, ETEC, EHEC y EIEC, con la secuencia de oligonucleótidos presentados en la Tabla 3 y utilizando como control cepas de *E. coli* que se muestran en la Tabla 4.

Se identificaron los genes que codifican para las toxinas ST, LT, Stx1, Stx2, astA y genes que codifican para adhesinas como *eae* (intimina), *bfpA* (pili tipo IV), el gen que codifica para invasividad *ial* y un gen que codifica para la dispersina *aat*.

Para la PCR simple se utilizó la siguiente mezcla de reacción de 50 µl: buffer 1X (100 mM tris-HCl, pH 8.5; 500 mM KCl, 15 mM Mg Cl<sub>2</sub>; 1% de triton X-100), 0.2 mM de cada dNTP (Apex mezcla de dNTP, 10 mM), 0.25 mM de cada cebador (primer), 2.0 U de Taq ADN polimerasa (Axygen, Biosciences, CA, U.S.A.), 3 µl de ADN templado y 37 µl de agua libre de nucleasas.

**Tabla 3. Secuencias de oligonucleótidos utilizados para la amplificación de genes de virulencia de *E. coli* a través de PCR**

Gene	Producto esperado (pb)	Secuencia de oligonucleótidos [Referencia]	Virotipo a identificar	Condiciones de la reacción
<b>eaeA</b>	384	F:5'-GAC CCG GCA CAA GCA TAA GC-3' [80] R:5'-CCA CCT GCA GCA ACA AGA GG-3'	EPEC*	95°C 44'' 50°C 45'' 72°C 45''
<b>bfpA</b>	324	F:5'-AAT GGT GCT TGC GCT TGC TGC-3' [80] R:5'-GCC GCT TTA TCC AAC CGT GTA-3'		95°C 45'' 52°C 45'' 72°C 45''
<b>ST</b>	190	F:5'-ATT TTT CTT TCT GTA TTG TCTT-3' [80] R:5'-CAC CCG GTA CAA GCA GGA TT-3'	ETEC	95°C 45'' 50°C 45'' 72°C 45''
<b>LT</b>	450	F:5'-GGC GAC AGA TTA TAC CGT GC-3' [80] R:5'-CGG TCT CTA TAT TCC CTG TT-3'		95°C 45'' 50°C 45'' 72°C 45''
<b>lal</b>	650	F:5'-GGT ATG ATG ATG ATG AGT CCA-3' [80] R:5'-GGA GGC CAA CAA TTA TTT CC-3'	EIEC	95°C 45'' 50°C 45'' 72°C 45''
<b>Stx1</b>	150	F:5'-CTG GAT TTA ATG TCG CAT AGT G-3' [80] R:5'-AGA ACG CCC ACT GAG ATC ATC-3'	EHEC**	95°C 45'' 50°C 45'' 72°C 45''
<b>Stx2</b>	255	F:5'-GGC ACT GTC TGA AAC TGC TCC-3' [80] R:5'-TCG CCA GTT ATC TGA CAT TCT G-3'		95°C 45'' 50°C 45'' 72°C 45''
<b>Aat</b>	630	F:5'-CTG GCG AAA GAC TGT ATC AT-3' [81] R:5'-CAA TGT ATA GAA ATC CGC TGT T-3'	EAEC	95°C 1' 55.5°C 1' 72°C 1'
<b>astA</b>	111	F:5'-CCA TCA ACA CAG TAT ATC CGA-3' [81] R:5'-GGT CGC GAG TGA CGG CTT TGT-3'		95°C 1' 55.5°C 1' 72°C 1'

Se muestra la clasificación de patotipos de *E. coli* de acuerdo a Estrada-García y cols. 2009; \*Puede o no tener el gen *bfpA* pero sí el gen *eaeA* \*\* Pueden tener el gen *eaeA* (intimina) y es catalogado como EHEC, siempre y cuando tenga alguna de las toxinas Shiga.

**Tabla 4. Características serotípicas y genotípicas de las cepas de referencia de *E. coli* utilizadas como controles**

Patotipo	Serotipo	Gen
<b>EPEC*</b>	O127:H6	eaeA, bfpA
<b>EIEC*</b>	O143:H23	ial
<b>EHEC*</b>	O7:H157	Stx1 y/o Stx2, algunas cepas pueden presentar eaeA
<b>EAEC**</b>	O44:H18	astA, y/ o aat
<b>ETEC*</b>	O407:H1	ST y/o LT

Modificado de Estrada-García \*Cepas donadas por Dra. Teresa Estrada-García del CINVESTAV (stx1 stx2 st It ial eae bfp), \*\*Cepas donadas por la Dra, Chattaway del Public Healt England.

#### **4.3.1. Revelación de Genes**

Los productos amplificados en la prueba de PCR se visualizaron mediante electroforesis, a 80 Volts por 60 minutos, en gel de agarosa al 2% utilizando como revelador 50 µL de Bromuro de Etidio por cada 50 mL de TAE 1X, se utilizó un marcador de peso molecular de 100pb-3000pb de la marca *AXYGEN BIOSCIENCIAS*<sup>®</sup>. Los productos amplificados se visualizaron bajo un transiluminador de luz UV (UVP, CA, U.S.A.).

#### **4.4 Ensayos de adherencia bacteriana y cultivo celular**

##### **4.4.1 Cultivo Bacteriano**

Se creció cada una de las *E. coli* en medio LB + D-manosa al 1% durante 24 horas para obtener una densidad de 0.5 UMF, 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; Bio West, NW, Miami, FL, U.S.A).

#### **4.4.2 Cultivo de células HEp-2**

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  $6 \times 10^5$  células por pozo, en medio DMEM high glucose (Bio West, NW, Miami, FL, U.S.A.), 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 CO<sub>2</sub> a 37 ° C durante 24 horas o hasta obtener una monocapa celular con una confluencia mayor o igual a 90%.

#### **4.4.3 Ensayo de Adherencia**

Una vez que se tuvo una confluencia de 90% de células HEp-2, se procedió a realizar tres lavados con PBS 1x estéril (para eliminar cualquier vestigio de antibióticos), posteriormente se les adicionaron 500 µl de medio DMEM sin suplementar y  $0,5 \times 10^6$  células bacterianas/500 del medio DMEM/pozo, el ensayo fue realizado por duplicado. Las placas fueron incubadas durante 3 horas a 37 °C y 5% CO<sub>2</sub>, de acuerdo con lo descrito por Donnenberg y Nataro (6). 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.

#### **4.4.4 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 (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.

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Cepas de *E. coli* aisladas de muestras diarreogénicas

Se aislaron un total de 284 cepas de *Escherichia coli* provenientes de 151 muestras de niños con diarrea, menores de cinco años. De las 151 muestras, 81 fueron provenientes de muestras de niños y 70 de niñas (Tabla 5).

**Tabla 5.** Número de cepas de *E. coli* aisladas de acuerdo al sexo

	Muestras <sup>a</sup>	Cepas de <i>E. coli</i> aisladas <sup>b</sup>
<b>Masculino</b>	81 <sup>1</sup>	162
<b>Femenino</b>	70 <sup>1</sup>	122
<b>Total</b>	151 <sup>1</sup>	284

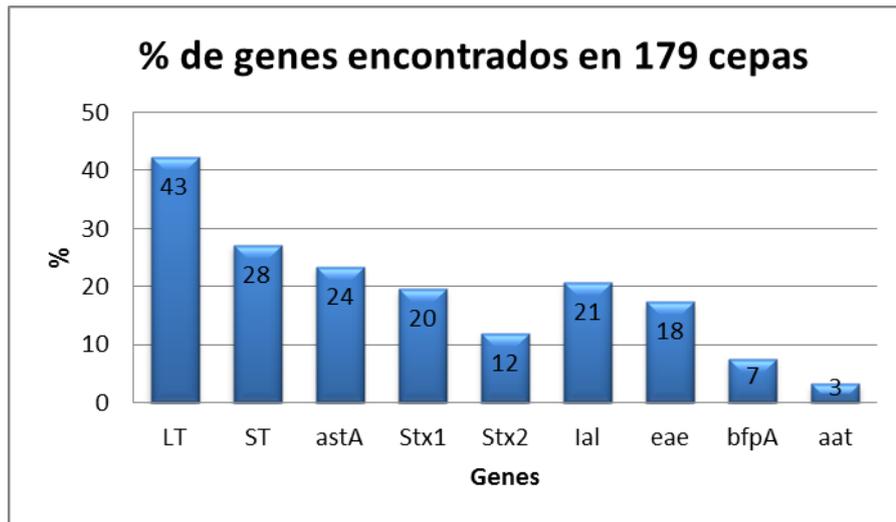
a: De las muestras obtenidas se aislaron de una a cinco colonias con características morfológicas de *E. coli*. b: A las colonias aisladas se les hicieron pruebas bioquímicas para la identificación de *E. coli*.

### 5.2 Identificación de genes de virulencia.

#### 5.2.1 Genes que codifican para toxinas y genes que codifican para adhesinas

De las 284 cepas de *E. coli* aisladas de niños con diarrea, sólo 179 cepas fueron positivas para al menos uno de los nueve genes estudiados en el presente trabajo. De las 179 cepas positivas, se presentó una mayor prevalencia de genes que codifican para las toxinas LT (78/ 179) y ST (50/179), seguido de *astA* (43/ 179), *Stx1* (36/ 179), *Stx2* (22/179) respectivamente (Grafica 1, imagen 1). Mientras que los genes que codifican tanto para adhesinas así como para otros factores de virulencia; se encontró que el gen *ial*, que codifica para invasividad,

tuvo una alta prevalencia (38/179), seguido del gen que codifica para la intimina *eaeA* (32/179) y el gen *bfpA* que codifica para el transporte de la proteína bundlina (12/179). El que presentó una menor prevalencia fue el gen *aat* (6/179) que codifica para el transportador de la proteína antiagregativa antes denominada CVD432, la cual se ha asociado con cepas EAEC típicas (tEAEC) (imagen 1).



**Gráfica 1.** Porcentaje de los genes de *E. coli*, encontrados en las 179 cepas que fueron positivas para al menos un gen.

### 5.3 $\beta$ -hemolisis

Del total de las 179 cepas obtenidas, sólo 37 de ellas mostraron una hemolisis completa, de éstas solo 16 presentaron al menos un gen de virulencia, como puede observarse en la Tabla 6.

**Tabla 6.** Relación de  $\beta$ -hemolisis y genes de virulencia

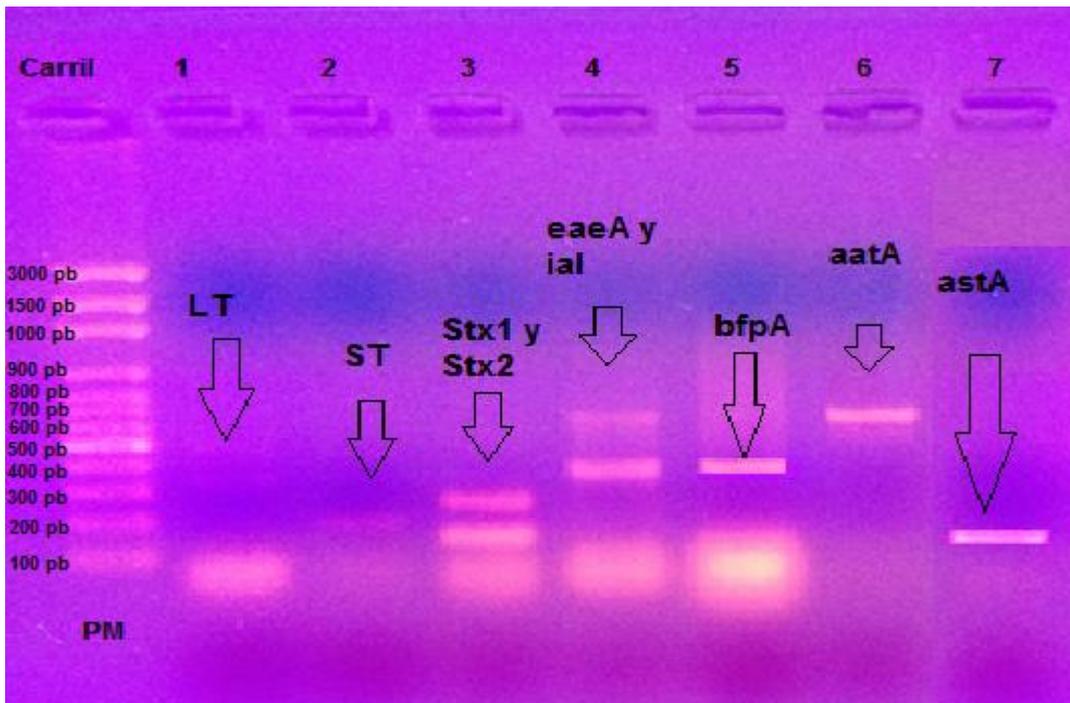
Número de cepas $\beta$ hemolisis positiva	Genes encontrados
1	LT, eae
1	ST, Stx1
1	LT, ST, Stx2
1	aat, astA
1	ST, Stx1, eae
2	Stx2
2	ST
1	astA
2	LT, astA
1	LT, Stx1
1	LT
1	Eae
1	LT, ST

#### 5.4. Virotipos

Los virotipos de *E. coli* se identificaron con base a la clasificación de Estrada-García y cols. 2009 (Tabla 4). Como puede observarse en la Tabla 7, se detectaron 113 cepas ETEC, 48 EHEC, 44 EAEC y 22 EPEC, de estas últimas 19 fueron aEPEC y solo 2 tEPEC.

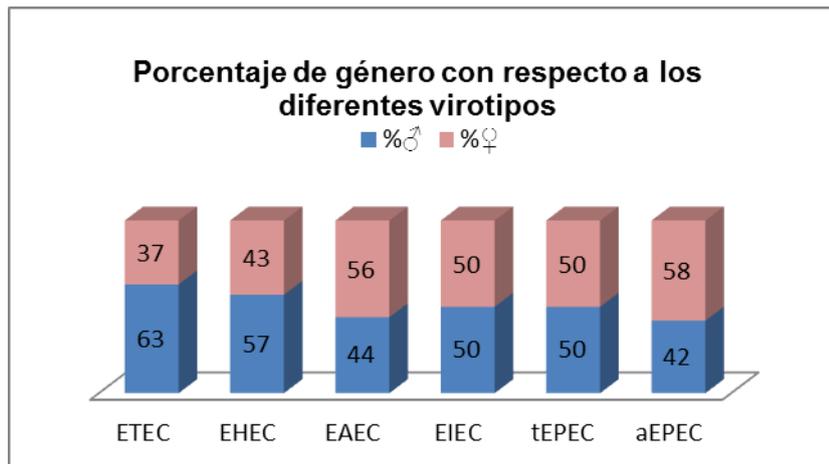
**Tabla 7.** Genes de virulencia y virotipos de *E. coli*

Virotipo	No. de cepas positivas	% (n=179)	Genes identificados (número de muestras positivas)
ETEC	113	63	LT (63) ST (36) LT:ST (14)
EHEC	45	25	Stx1 (17) Stx2 (8) Stx1:eaeA (6) Stx1:Stx2(10) Stx2:eaeA(2) Stx1:Stx2:eaeA (2)
EAEC	45	25	aatA (2) astA ( 39) aatA:astA (4)
EIEC	38	21	lal (38)
aEPEC	19	11	eaeA (19)
tEPEC	2	1	eaeA:bfpA (2)



**Imagen 1.** En gel de agarosa al 2%, se observa: Carril 1: Gen Lt 450 pb, carril 2: Gen st 190 pb, carril 3: Gen stx1 y stx2 de 150 y 255 pb respectivamente, carril 4: Gen eaeA e ial de 384 y 650 pb respectivamente, carril 5: Gen bfpA de 324 pb, carril 6: aatA de 630 pb y carril 7: astA 111pb.

Cabe mencionar que los virotipos EHEC y ETEC se presentaron en un mayor porcentaje en las muestras provenientes de niños con 57% y 63 % respectivamente, en relación a las obtenidas de niñas (37% y 43%). Mientras que los virotipos EAEC (56%), y aEPEC (58%) se observaron más frecuentemente en niñas. El virotipo tEPEC solo se observó en dos muestras, provenientes una de cada sexo (Gráfica 2). El virotipo de EIEC se observó en el 50% de las muestras provenientes tanto de niñas como de niños.



**Gráfica 2.** Muestra el porcentaje de los virotipos de *E. coli* comparados por sexo

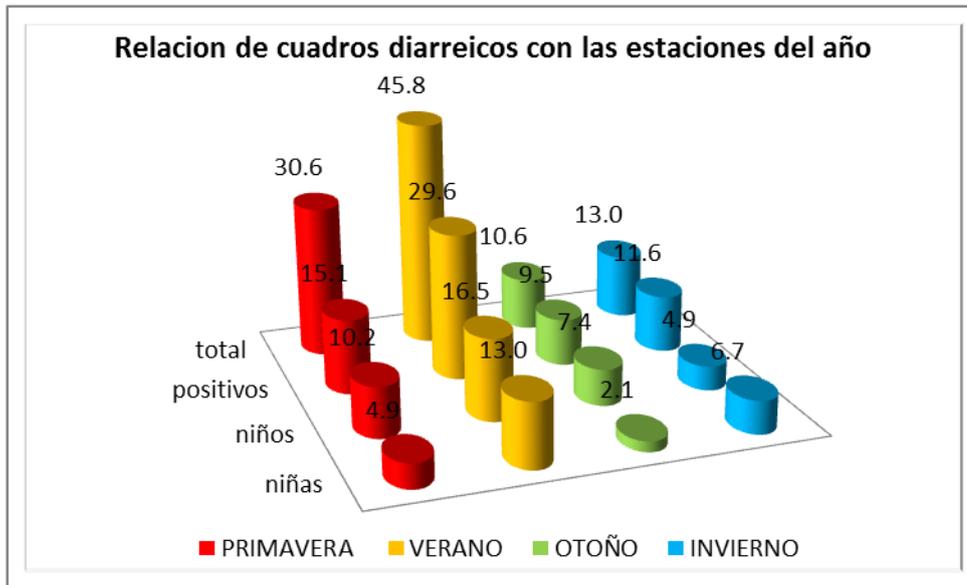
Como puede observarse en la tabla 8, de las 179 cepas de *E. coli* positivas, 115 de ellas (64 %) fueron positivas a un solo virotipo de los cuales en 46 pacientes se encontró una cepa, en diez pacientes se encontraron dos cepas positivas para un solo virotipo y en dos pacientes se encontraron cinco cepas principalmente. Se encontraron cepas con dos virotipos en 45 (25%) casos de los cuales en 26 pacientes solo se encontró una cepa positiva para dos virotipos, en cinco pacientes con diarrea se encontraron dos cepas y solo en tres pacientes se encontraron tres cepas positivas para dos virotipos. El 10% de las 179, es decir, 17 cepas fueron positivas tres virotipos, de las cuales 12 cepas provenían de 12 pacientes, solo 2 muestras fueron positivas a 4 virotipos y provenían de niños diferentes.

**Tabla 8. Relación entre número de cepas de *E. coli* positivas y virotipos compartidos**

<b>Virotipos compartidos</b>	<b>No. cepas positivas</b>	<b>Porcentaje</b>	<b>No. Pacientes</b>	<b>No. Pacientes (No. Cepas)</b>
1	115	64	69	2 (5 cepas)
				6 (4 cepas)
				5 (3 cepa)
				10 (2 cepas)
				46 (1 cepas)
2	45	25	34	3 (3 cepas)
				5 (2 cepas)
				26 (1 cepa)
3	17	10	14	1 (3 cepas)
				1 (2 cepas)
				12 (1 cepa)
4	2	1	2	2 (1 cepa)
<b>Total</b>	<b>179</b>	<b>100</b>		

**Aislamiento y virotipos de *E. coli* de acuerdo con la etapa estacional.**

Como se observa en la gráfica 3, en verano y primavera se recolectaron el 45.8% y 30.6% de las muestras respectivamente, ya que en otoño e invierno solo se recolectaron el 23.6% de las muestras totales.



**Gráfica 3.** Porcentaje de las muestras de heces obtenidas con respecto a cada estación del año.

De las 113 cepas ETEC, el 52% se obtuvo en verano, el 25% en primavera, el 14% en otoño y el 9% en invierno, esta incidencia también se presentó para EAEC, en el caso del virotipo EHEC fue el único que no mostró una tendencia ya que todas las muestras fueron recolectadas a lo largo de las cuatro estaciones del año. En cuanto a las 38 cepas de EIEC, el comportamiento fue distinto ya que el 37% de las cepas fueron recolectadas en invierno seguido de verano con un 29%, otoño con un 24% y por último primavera con un 10%. En las cepas EPEC se puede observar una mayor presencia de cepas en la época de verano, seguida de invierno con un 25%, otoño 17% y 5% de primavera (Tabla 9).

**Tabla 9. Porcentaje de virotipo encontrados y su relación con la etapa estacional del año**

<b>Viotipo</b>	<b>Total de muestras</b>	<b>Primavera (%)</b>	<b>Verano (%)</b>	<b>Otoño (%)</b>	<b>Invierno (%)</b>
<b>ETEC</b>	113	26	52	14	8
<b>EHEC</b>	45	24	29	20	27
<b>EAEC</b>	45	31	51	9	9
<b>EIEC</b>	38	11	29	24	37
<b>tEPEC</b>	2	0	50	50	0
<b>aEPEC</b>	19	0	68	11	21

### **5.5 Ensayos de adherencia a células HEp-2**

Para la realización del ensayo de adherencia a células HEp-2 de los virotipos EAEC y EPEC, se consideraron sólo las cepas que presentaron los genes *aat* y/o *astA* para el patotipo EAEC, así como *eaeA* y/o *bfpA* para el patotipo EPEC. Se probaron como cepas EPEC típicas (tEPEC) las cepas que resultaron ser *eae: bfpA* positivas y EPEC atípicas (aEPEC) las cepas que solo fueron positivas para el gen *eaeA*, sin la presencia de *Stx1* y/o *Stx2*.

De las 45 cepas obtenidas con el virotipo de EAEC, los resultados muestran que las cepas ya sea *astA+* y/o *aat +* presentaron adherencia

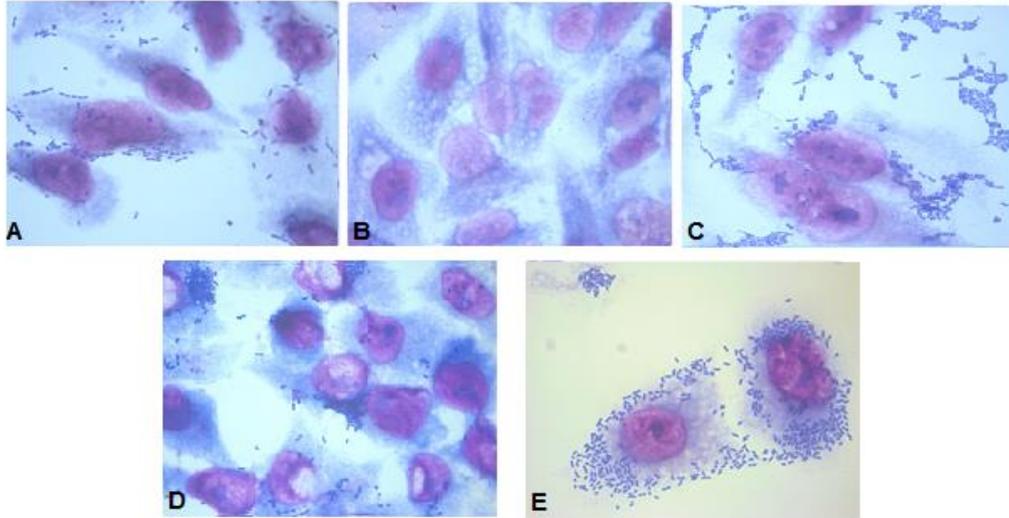
agregativa y difusa principalmente (33/45, 73%). Solo tres cepas que fueron *astA* positivas presentaron adherencia localizada.

De las 21 cepas que presentaron el virotipo EPEC, 19 fueron aEPEC, de las cuales 12 de ellas (63 %) presentaron algún tipo de adherencia, siendo la adherencia difusa la más observada, sin embargo 37% de las cepas no presentaron ningún tipo de adherencia a células HEp-2; en tanto que las dos cepas de tEPEC, una presentó adherencia localizada y otra difusa. (Tabla 10, Imagen 1).

**Tabla 10. Adherencia de los virotipos EAEC y EPEC a células HEp-2**

<b>EAEC</b>	<b>Muestras totales</b>	<b>*AA (%)</b>	<b>*AD (%)</b>	<b>*AL (%)</b>	<b>*NA (%)</b>
<b><i>astA</i></b>	39	12 (31)	16 (41)	3 (8)	8 (20)
<b><i>Aat</i></b>	2	1 (50)	1 (50)	0	0
<b><i>astA: aat</i></b>	4	3 (75)	0	0	1 (25)
<b>aEPEC <i>eaeA</i></b>	19	2 (10)	7 (37)	3 (16)	7 (37)
<b>tEPEC <i>eaeA: bfpA</i></b>	2	0	1 (50)	1 (50)	0

\*AA: adherencia agregativa, \*AD: adherencia difusa, \*AL: adherencia localizada, \*NA: no adherentes.



**Imagen 2.** Se observa la adherencia de *E. coli* a células HEp-2. A: Control positivo cepa O42 (100 X), B: Control negativo no adherente K12 (100 X), C: Adherencia agregativa cepa 102, (100 X) D: Adherencia localizada cepa 82, (100 X) E: Adherencia difusa cepa 190, (100 X).

### 5.6. Antibiograma

Se realizó el ensayo de antibiograma a las 284 cepas de *E. coli* para determinar la sensibilidad y resistencia a los diferentes agentes antimicrobianos evaluados. Como puede observarse en la tabla 11, los resultados nos mostraron, que hay una amplia resistencia de *E. coli* a ampicilina, sulfametoxazol-trimetoprim, amoxicilina-ác. clavulánico, y a cefalotina, principalmente.

**Tabla 11.** Resultados de antibiograma en 284 cepas de *E. coli* diarreogénicas

	Numero de cepas		
	R*(%)	I**(%)	S***(%)
<b>K</b>	30 (11)	55 (19)	82 (29)
<b>AN</b>	11 (4)	32 (11)	242 (85)
<b>AM</b>	195 (69)	36 (13)	53 (19)
<b>CF</b>	85 (30)	65 (23)	19 (7)
<b>AMC</b>	117 (41)	73 (26)	77 (27)
<b>CTX</b>	67 (24)	23 (8)	187 (66)
<b>STX</b>	126 (44)	4 (2)	153 (54)
<b>FOX</b>	16 (6)	15 (5)	228 (80)

Antibiograma de 284 cepas de *E. coli*. \*Resistente, \*\*Intermedio, \*\*\*Sensible.

K, kanamicina; AN, amikacina; AM, ampicilina; CF, cefalotina; AMC, amoxicilina/ac. clavulónico; CTX, cefotaxima; STX, sulfametoxazol/trimetoprim; FOX, cefoxitina.

Se analizó el porcentaje de resistencia de las diferentes cepas de *E. coli* a cada uno de los 8 antibióticos, así como para cada virotipo.

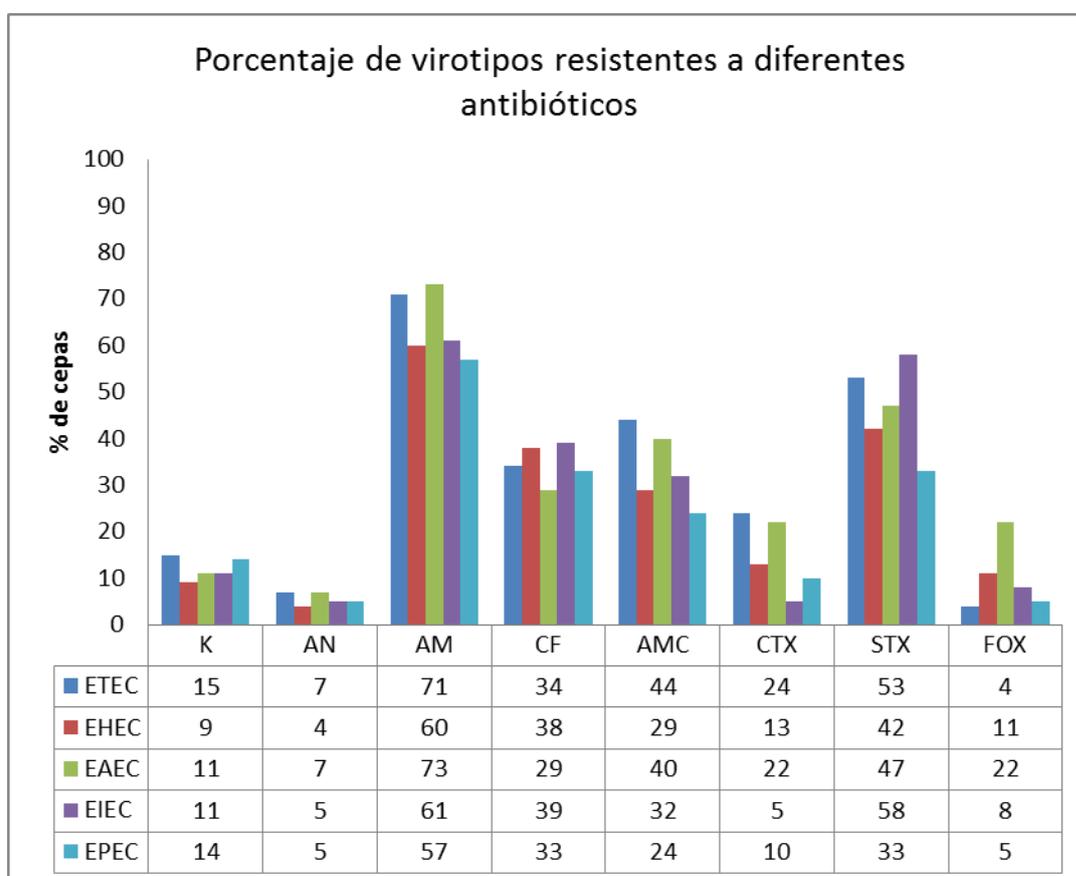
Se observó que la resistencia a ampicilina fue de un 73% de las cepas EAEC (n= 45), ETEC (n= 113) en 71% de las cepas, EIEC (n= 38) en 61%, EHEC (n= 45) en 60% y EPEC (n= 21) en 57%.

Respecto al sulfametoxazol/trimetoprim EIEC presentó una resistencia en 58% de las cepas, ETEC en 53%, EAEC 47%, EHEC 42%, EPEC 33%.

A amoxicilina-ác clavulánico ETEC mostró una resistencia en 44% de las cepas, EAEC en 40%, EHEC en 29%, EIEC en 32% y el virotipo EPEC en 24%.

También encontramos resistencia a cefalotina entre un 29 y 39% de los diferentes virotipos.

Como podemos observar en la grafica 4, la mayoría de las cepas presentan una multirresistencia a los diferentes antibióticos probados en el presente trabajo, principalmente al sulfametoxazol/Trimetoprim, ampicilina, cefalotina y amoxicilina/ac. clavulónico.



**Grafico 4.** Patrón de resistencia a antibióticos de los diferentes virotipos de *Escherichia coli* diarreogénicas \*FOX- cefoxitina, AN- amikacina, CTX-cefotaxima, K-kanamicina, STX-sulfametoxazol/Trimetoprim, AMC-amoxicilina/ac. clavulónico, AM- ampicilina, CF- cefalotina.

## 6. DISCUSIÓN

En el presente trabajo se analizaron un total de 284 cepas de *E. coli*, aisladas de 151 muestras de heces de niños con diarrea, menores de cinco años. De las 151 muestras, 81 (54%) provenían de niños y 70 (46%) de niñas (Tabla 6). Estudios hechos en Nicaragua, en 526 muestras, arrojaron que, el 60,8% provenía de niños y 39,2% niñas [82], estos datos concuerdan con los resultados del presente trabajo y con lo reportado por varios autores [83] [84], quienes revelan que existe una asociación entre las infecciones intestinales y sexo, dado que la mayoría de las muestras provienen de varones.

De las 179 cepas de *E. coli* que fueron positivas para al menos uno de los nueve genes estudiados, 113 cepas presentaron el virotipo ETEC, de las cuales 63 (34.8%) tuvieron el gen que codifica para la toxina LT, 36 (19.6%) ST, y 14 (7.6%) presentaron el virotipo LT:ST (Tabla 7). Estos resultados concuerdan con lo publicado por Cortés-Ortiz *et al.*, 2002 en México, y Chandra *et al.*, 2012 en la India; no así en Bolivia en donde se detectaron con la misma frecuencia LT (40,5%) y ST (39,5%), mientras que las cepas que portaban el virotipo LT:ST se detectaron con una menor frecuencia [85]. Los virotipos con el gen que codifica para LT, son mayormente encontrados en poblaciones de América Latina, en comparación con Asia y África en donde el gen predominante es el que codifica para ST [86] [87].

Debido a la importancia clínica de ETEC, este patotipo es considerado por la OMS como un grupo bacteriano de atención especial, ya que asociado a

rotavirus ocasiona el 80% de los casos de enfermedad diarreica aguda a nivel mundial.

Después de ETEC en este trabajo, el virotipo más frecuentemente encontrado fue EHEC con 45 cepas, lo que equivale al 25% (Tabla 7). De estas 45 cepas, 10 fueron positivas al gen *eaeA* (adicional a las toxinas Stx1 y Stx2) que codifica para intimina provocando lesiones que se caracterizan por el borramiento de microvellosidades y la formación de pedestales ricos en actina (es decir cambios histopatológicos en las células), estas lesiones son características de cepas O157:H7. [81]. Los resultados obtenidos, difieren de los estudios realizados por Estrada-García *et al.*, 2009, Cortez *et al.*, 2002, así como los de Cravioto *et al.*, 1990, en cuyos trabajos EHEC se presentó en porcentajes menores del 4%. Cravioto *et al.*, mencionan, que en países en vías de desarrollo la incidencia de EHEC es baja, ya que esta cepa en particular solo se presentaba en países industrializados; como por ejemplo EUA en donde existen anualmente 20,000 infecciones ocasionadas por EHEC, en específico por la cepa O157:H7 [88]. Sin embargo, recientemente se ha descrito que este patotipo se presenta tanto en países desarrollados como en países en vías de desarrollo, como lo muestran estudios realizados en Chile, quienes encontraron que las cepas EHEC en el 2012 [89], se presentaron en mayor proporción que las cepas EHEC aisladas en el 2011. Por lo que los autores consideran que se trata de un patotipo de bacteria emergente en países en vías de desarrollo, lo cual puede deberse a la creciente comunicación y comercialización a nivel mundial, así como a que ahora se conoce que la carne no es la única vía de transmisión de dicho patógeno ya que se han

reportado otras vías de infección que incluyen agua, embutidos, yogures artesanales entre otros, lo cual probablemente esté relacionado con los resultados obtenidos.

El virotipo EAEC fue el tercer virotipo con mayor número de aislamientos, con un porcentaje de 24.5% (Tabla 7). Existen otros estudios que muestran que este patotipo es el responsable de la mayoría de infecciones diarreicas en países en desarrollo, así como el segundo causante de la diarrea del viajero como lo muestra Chandra *et al.*, 2012 o lo encontrado por Ochoa *et al.*, 2009, en Perú en donde EAEC fue aislado en un 12.9% del total de las muestras analizadas. EAEC mostró en su mayoría una AA y AD principalmente (Tabla 10), los primeros estudios moleculares de este patotipo revelaron que el fenotipo AA era debido a la presencia de los plásmidos llamados colectivamente pAA, los cuales llevan muchos factores asociados a la patogénesis de EAEC, incluidas las toxinas (EAST-1), adhesinas fimbriales termoestables (AAF / I, II, III y IV), la *aatA* (que corresponde al fragmento CVD432) principalmente. Es importante señalar que no todos estos factores se encuentran en las cepas de EAEC, lo que puede explicar el resultado obtenido en donde se ve una heterogeneidad en cuanto al tipo de adherencia presentado [90].

El virotipo EIEC se presentó en un 20.7% del total de las cepas, dato que difiere con lo reportado en otros países en vías de desarrollo como Vietnam [91] en donde se encontró a EIEC en el 2% de los casos estudiados o en Tanzania en donde no fue detectado este patotipo [92]. EIEC se considera como causa poco frecuente de enfermedades gastrointestinales, aunque, Nataro *et al.*, 1998 mencionan que la prevalencia de EIEC puede estar

subestimada ya que el 60% de las cepas son lactosa negativas y generalmente solo se seleccionan aquellas cepas lactosa positivas, como lo realizado en el presente trabajo ya que de haberse realizado el aislamiento de cepas de *E. coli* lactosa negativas seguramente se hubiera obtenido un porcentaje mayor a lo encontrado, para lo cual aún no se tiene una explicación.

El virotipo de *E. coli* que se presentó en un menor porcentaje, fue EPEC con un 11.41% de las cepas estudiadas, la presencia de este virotipo es comparable con lo publicado por Rajendran *et al.*, 2010 quienes encontraron a EPEC en un 10% en un estudio realizado en la India. Se considera que EPEC es causante del 5 al 10 % de los casos de diarrea en niños menores de cinco años en países en desarrollo. EPEC atípica, se presentó en un 90% (es decir en 19 de las 21 cepas) y sólo en dos casos, que equivale al 10%, se presentó EPEC típica, resultado que difiere con lo publicado en el 2011 por Afset *et al.*, y Nguyen *et al.*, en 2006, quienes mencionan que la EPEC atípica es más frecuente en países industrializados. Por otro lado Estrada-García y colaboradores, sugieren que EPEC atípica es un patógeno emergente, no solo en los países industrializados, sino también en los países en desarrollo, como México [83], Brasil [97] y la India [98].

La etapa del año en donde se aislaron más cepas de *E. coli*, fue en verano 69 (45.8%), seguido de primavera con 46 (30.6%), invierno 20(13%) y otoño 16(10.6%) (Grafico 3). La presencia de *E. coli* en las muestras obtenidas, fue en los meses cálidos y húmedos, con un descenso en los meses fríos y secos, a diferencia de la diarrea de etiología viral, que se

presenta preferentemente en los meses fríos y secos [9] [5]. El virotipo ETEC fue encontrado principalmente en los meses más cálidos, esto es, de junio a septiembre, lo que coincide con lo publicado por Estrada-García en 2009 y por Quadri en 2002, quienes encontraron un pico de los aislamientos de ETEC de junio a octubre (Tabla 9), Estrada-García sugiere que la humedad es un factor importante para la propagación de ETEC en la Ciudad de México. De igual manera, EAEC se presenta preferentemente en meses cálidos, mostrando una disminución en otoño e invierno, mientras que EIEC fue el único virotipo que identificamos en mayor proporción en invierno. En cuanto a EPEC se presentó en verano e invierno (Tabla 9), Estrada-García *et al.*, 2009, encontraron que EPEC se distribuye a lo largo del año, principalmente de abril a octubre, con un pico en junio. Un estudio realizado en Noruega encontró que EPEC se aisló de niños menores de cinco años de edad, a lo largo del año, pero se encontró con mayor frecuencia a fines de verano e inicio de otoño [95].

En relación con la resistencia a diferentes agentes antimicrobianos, las 284 cepas aisladas de *E. coli* mostraron un mayor porcentaje de resistencia a cuatro de los ocho antibióticos probados, estos fueron: ampicilina, sulfametoxazol-trimetoprim, amoxicilina-ac. clavulónico, y cefalotina (Tabla 11), dato que concuerda con lo publicado por Literak *et al.*, 2011[96] quienes encontraron una gran resistencia hacia la ampicilina principalmente, o lo publicado por Estrada-García *et al.*, 2005 en México, en donde la ampicilina y el sulfametoxazol-trimetoprim son de los antibióticos que presentan una mayor resistencia en cepas de *E. coli*. Estos resultados pueden ser atribuibles al uso indiscriminado de antibióticos.

En relación a los virotipos, ETEC presentó una multiresistencia a la ampicilina, trimetoprim-sulfametoxazol y a amoxicilina/ac. Clavulónico, principalmente, esto probablemente esté relacionado con uso de esos antibióticos en México durante los últimos años [83]. Los resultados del antibiograma realizado al virotipo EHEC dio como resultado una multiresistencia a la ampicilina, trimetoprim-sulfametoxazol y cefalotina respectivamente (grafica 4), estos datos concuerdan con los resultados presentado por Fazeli y Selehi en 2007, quienes mostraron que las cepas de EHEC aisladas de niños con diarrea presentaron una alta resistencia a derivados de la penicilina así como a trimetoprim-sulfametoxazol. En relación a EAEC, este virotipo presentó una resistencia mayor hacia ampicilina, seguido de amoxicilina/ac. clavulónico y cefalotina, este dato concuerda con lo descrito por Sobieszczanska *et al.*, 2003, quienes reportaron que EAEC puede tener de un moderado a alto nivel de resistencia a la ampicilina, debido a que estos medicamentos son los recomendados por la OMS para el tratamiento en diarreas persistentes [102] [103] [104]. EPEC en general, presentó un porcentaje menor de resistencia (grafica 4), lo que sugiere que las cepas EPEC pudieron ser adquiridas “recientemente” en este país.

Por otro lado la resistencia de las cepas de *E. coli*, no ocurre para un solo agente antimicrobiano como se puede observar en el presente trabajo, sino que en la mayor parte de las cepas, se presenta una multi-resistencia a mas de 4 antibióticos, dificultando aún más el tratamiento. Djie-Maletz en el 2008 [105] expone que las cepas *E. coli* diarrogénicas aisladas de infantes tienen una frecuente resistencia antimicrobiana hacia AM, CL, y SXT

debido al tratamiento tradicional de la diarrea en los países en desarrollo, donde el uso y abuso es común, lo que daría respuesta al elevado porcentaje de resistencia en los aislados de infantes hacia AM, STX, AMX y CF en el presente estudio.

A nivel mundial se observa un aumento continuo del porcentaje de resistencia en organismos patógenos. Levy *et al.*, proponen que el incremento de la resistencia bacteriana se le puede atribuir a la combinación de varios factores, como las características propias de los microorganismos, la presión selectiva ejercida por el uso de los antimicrobianos, y ciertos cambios sociales y técnicos que contribuyen con la transmisión de los organismos resistentes, tales como el incremento en el número de hospederos susceptibles y las inconstantes políticas de control de las infecciones.

El análisis de los virotipos de *E. coli* se ha convertido en una opción más para la identificación de los diferentes patotipos de *E. coli* causantes de alguna enfermedad gastrointestinal, los ensayos de PCR simple y múltiple son fundamentales para la vigilancia epidemiológica de los niños con diarrea y la información obtenida puede facilitar un diagnóstico rápido, así como poder guiar al médico a proporcionar el tratamiento más adecuado para el paciente.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo demostraron la presencia de un alto porcentaje de genes compartidos por diferentes virotipos, encontrando que el 36% de las cepas aisladas fueron positivas a más de un virotipo, esta heterogeneidad genética nos sugiere la existencia de un alto potencial de transferencia horizontal de genes, lo que ya fue descrito

por *Donnenberg y cols 2002* (Figura 1), quienes encontraron cierta relación de genes de virulencia entre diferentes patotipos. En el presente trabajo encontramos que varios genes fueron positivos en una misma cepa dando como consecuencia el poder ser clasificados en diferentes patotipos, lo cual nos estaría indicando una relación más estrecha entre los diferentes patotipos de *E. coli* (Figura 2) provenientes de muestras de niños con diarrea de población Mexicana.

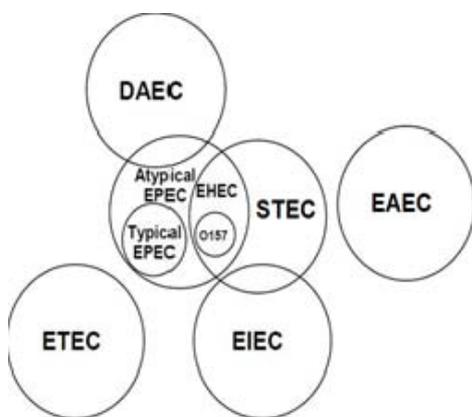


Figura 1

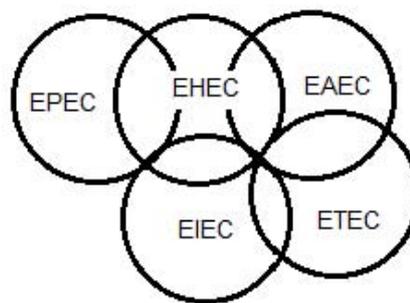


Figura 2

Finalmente, en términos de conocimiento, este trabajo nos permitió implementar y complementar un grupo de técnicas entre sí, como son las microbiológicas, de cultivo celular y moleculares, con las cuales se logró determinar la distribución de los diferentes patotipos de *E. coli* asociados a episodios de diarreas en niños menores de cinco años. El desarrollo de este tipo de diagnóstico microbiológico “integral” pudiera contribuir a la detección eficaz de probables cepas de *E. coli* emergentes que porten combinaciones de genes de virulencia conocidos y que debido al intercambio genético entre cepas, así como a la multirresistencia antimicrobiana, pudieran ser causantes de un brote epidemiológico originando un problema de salud pública.

## 7. CONCLUSIONES

- ✓ De las 151 muestras de heces, se lograron identificar 284 cepas de *E. coli*, 179 fueron positivas para al menos uno de los genes estudiados.
- ✓ ETEC fue el virotipo que se encontró en un mayor número de cepas con un 62.0%, seguido de EHEC 25.0%, EAEC con 24.5%, EIEC con 20.7% y por último EPEC con un 11.4%.
- ✓ De los genes estudiados, el que se encontró en un mayor porcentaje fue el gen que codifica para la toxina LT (42.4%), seguido de ST (27.2%).
- ✓ De los 9 genes identificados, varios de ellos fueron encontrados en una misma cepa permitiendo su clasificación en más de un virotipo.
- ✓ Primavera y verano fueron las etapas estacionales en donde se aisló un mayor número de cepas de *E. coli*.
- ✓ No se encontró una relación específica entre los genes correspondientes para los virotipos EPEC y EAEC y la adherencia bacteriana a células HEp-.
- ✓ Las cepas de *E. coli* aisladas fueron resistentes principalmente a ampicilina, sulfametoxazol-trimetoprim, amoxicilina/ac. clavulónico y cefalotina.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

1. WHO Media centre. (Abril de 2013). *WHO Media centre*. Recuperado el 23 de Agosto de 2013, de <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs330/es/>
2. Vidal, E., & Navarro, GF. (2006). Efficient translocation of EspC into epithelial cells depends on enteropathogenic *Escherichia coli* and host cell contact. *Infection and Immunity*, 74(4), 2293-2303
3. Guerrant, RL; M, Kosek; S, Moore; B, Lorntz; R, Brantley; AA, Lima (2002). Magnitude and impact of diarrheal diseases. *Arch Med Res* 33, 351-355.
4. Nataro, J., & Kaper, J.B. (1998). Diarrheogenic *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol. Rev*, 11(1), 142-201.
5. Thielman, N., & Guerrant, G. (2004). Clinical practice. Acute infectious diarrhea. *N Engl J Med* 350, 38-47.
6. Lanata, C. F., Christa, L., Walker, F., Olascoaga, A., Torres, C., Aryee, M., y otros. (2013). Global Causes of Diarrheal Disease Mortality in Children, 5 Years of Age: A Systematic Review. *PLOS ONE*, 8(9), e72788.
7. [http://ensanut.insp.mx/doctos/analiticos/EDA\\_EnfDiarAgu.pdf](http://ensanut.insp.mx/doctos/analiticos/EDA_EnfDiarAgu.pdf). (2012). Agosto 2013
8. Rodríguez, A. (2002). Principales características y diagnósticos de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. *Sal Pub Mex*, 44, 464-475.

9. [http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/doctos/infoepid/publicaciones/2012/Monografias4\\_Enf\\_Infecciosas\\_Intestinales\\_%20junio12.pdf](http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/doctos/infoepid/publicaciones/2012/Monografias4_Enf_Infecciosas_Intestinales_%20junio12.pdf).  
Agosto 2013
10. World Health Organization. The treatment of diarrhoea A manual for physicians and other senior health care workers. Geneva, Switzerland: WHO; 2005. [http://www.who.int/maternal\\_child\\_adolescent/documents/9241593180/en/index.htm](http://www.who.int/maternal_child_adolescent/documents/9241593180/en/index.htm) Septiembre 2013
11. Raul, G. V. (2005). *Manual de practicas de Bacteriologia*. México: Facultad de Química.
12. Kaper, JB., Nataro, JP., Mobley, HL. (2004). Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol* 2, 123-140.
13. Dobrindt, U. (2005). (Patho-)Genomics of *Escherichia coli*. *Int J Med Microbiol*, 295(7), 357-71.
14. P. Murray, K. Rosenthal y M. Pfaller. 2006. *Microbiología Médica*, Quinta edición ed., Elsevier, pp. 193-201, 35-46.
15. Levine, M. (1987). *Escherichia coli* that cause diarrhea: enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic, and enteroadherent. *J Infect Dis*, 155, 377-389.
16. Tobias J, V. S. (2012). Simple and rapid multiplex PCR for identification of the main human diarrheagenic *Escherichia coli*. *Microbiol. Res.* (167), 564–570.

17. Cravioto, A., & Vasquez, V. (1988). *Escherichia coli*: pathogenic mechanisms and enterohemorrhagic strains. *Bol Med Hosp Infant Mex*, 45(3), 196-197.
18. Clarke, S., Haigh, R., Freestone, P., & Williams, P. (2003). Virulence of enteropathogenic *Escherichia coli*, a global pathogen. *Clin Microbiol Rev*, 16(3), 365-378.
19. Scaletsky, I. C., Pelayo, J. S., Giraldi, R., Rodrigues, J., Pedroso, M. Z., & R., T. L. (1996). EPEC adherence to HEp-2 cells. *Rev Microbiol.* (27), 58–62.
20. Knutton, S., Lloyd, D., & McNeish, A. (1987). Adhesion of enteropathogenic *Escherichia coli* to human intestinal enterocytes and cultured human intestinal mucosa. *Infect Immun*, 55(1), 69-77.
21. Gyles, C. (2007). Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. An overview. *J. Anim Sci.*, 85, E45-62.
22. Baldini, M. M., Kaper, J. B., Levine, M. M., Candy, D. C., & Moon, H. W. (1983). Plasmid mediated adhesion in enteropathogenic *Escherichia coli*. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr*, 534–538.
23. Chen, H., & Frankel, G. (2005). Enteropathogenic *Escherichia coli*: unravelling pathogenesis. *FEMS Microbiol.*, 83–98.
24. Vallance, B., & Finlay, B. (2000). Exploitation of host cells by enteropathogenic *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97, 8799–8806.

25. Schmidt, M. (2010). LEeways: tales of EPEC, ATEC, and EHEC. *Cell Microbiol.*
26. Fleckenstein, J., Hardwidge, P., Munson, G., & H., R. D. (2010). Molecular mechanism of enterotoxigenic *Escherichia coli* infection. *Microbes Infect*, 12, 89-98.
27. Qadri, F., Saha, A., Ahmed, T., Tarique, A. A., Begum, Y., & Svennerholm, A. (2007). Disease burden due to enterotoxigenic *Escherichia coli* in the first 2 years of life in an urban community in Bangladesh. . *Infect Immun*, 75, 3961-3968.
28. Petri Jr, W., Miller, M., Binder, H., Levine, M., Dillingham, R., & Guerrant, R. (2008). Enteric infections, diarrhea, and their impact on function and development. *J Clin Invest*, 118, 1277-1290.
29. Wiedermann, U., & Kollaritsch, H. (2006). Vaccines against traveler's diarrhea and rotavirus disease. *Wein Klin Wochenscher*, 2-8.
30. Yoder, J., Cesario, S., & V. Plotkin, X. M.-S. (2006). Outbreak of enterotoxigenic *Escherichia coli* infection with an unusually long duration of illness. *Clin Infect Dis*, 42, 1513-1517.
31. Croxen, M., & Finlay, B. (2010). Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. *Nat Rev Microbiol* , 8(1), 26-38.
32. Beddoe, T., Paton, A., J, L. N., J, R., & JC, P. (2010). Structure, biological functions of the AB5 toxins. *Cell*, 411-418.

33. Cerna Cortes, J. F. (2003). Prevalencia y caracterización molecular de los principales grupos de *Escherichia coli* diarreogénicas en niños menores de 5 años hospitalizados por diarrea aguda, en la ciudad de México. México: Tesis (Doctor en Ciencias). IPN, Centro de investigación y Estudios Avanzados, Departamento de Biomedicina Molecular.
34. Nagy, B., & Fekete, P. (2005). Enterotoxigenic *Escherichia coli* in veterinary medicine. *Int J Med Microbiol*, 295, 443-454.
35. Savarino, S.J., Guandalini, A. F., & Guerry. (1993). Enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1 represents another subfamily of E. coli heat-stable toxin. *Proc Natl Acad Sci USA*, 90, 3093-3097.
36. McVeigh, A., Fasano, A., Scott, D., Jelacic, S., Moseley, S., Robertson, D., y otros. (2000). IS1414, an *Escherichia coli* insertion sequence with a heat-stable enterotoxin gene embedded in a transposase-like gene. *Infect Immun*, 68, 5710-5715.
37. Riley, L. W., Remis, R. S., & S. D. Helgerson, H. B. (1983). Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. *N. Engl. J. Med.* , 308, 681-685.
38. Karmali, M. A., & B. T. Steele, M. P. (1983). Sporadic cases of haemolytic uremic syndrome associated with faecal cytotoxin and cytotoxin-producing *Escherichia coli* in stools. *Lancet*, 619-620.

39. O'Brien, A. D., LaVeck, G. D., & M. R. Thompson, a. S. (1982). Production of *Shigella dysenteriae* type 1-like cytotoxin by *Escherichia coli*. *J. Infect. Dis.*, *146*, 763–769.
40. Brzuszkiewicz, E., Thurmer, A., Schuldes, J., Leimbach, Liesegang, H., F-D, M., y otros. (2011). Genome sequence analyses of two isolates from the recent *Escherichia coli* outbreak in Germany reveal the emergence of a new pathotype: Entero-Aggregative-Haemorrhagic *Escherichia coli* (EAHEC). *Arch Microbiol*, *193*, 883-891.
41. Wu, C.-J., Hsueh, P.-R., & Ko, W.-C. (2011). A new health threat in Europe: Shiga toxin producing *Escherichia coli* O104:H4 infections. . *J Microbiol Immunol Infect*, *44*, 390-393.
42. Hussein, H., & Bollinger, L. (2005). Prevalence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in beef cattle. *J Food Prot*, *68*(10), 2224–41.
43. Oporto, B., Esteban, J., & G., A. (2008). *Escherichia coli* O157:H7 and non-O157 Shiga toxin-producing *E. coli* in healthy cattle, sheep and swine herds in Northern Spain. *Zoonoses Public Health*, *55*(2), 73–81.
44. Fukushima, H., & K. Hoshina, a. M. (2000). Selective isolation of eae-positive strains of shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *J. Clin. Microbiol.*, *38*, 1684–1687.

45. Waterman, S. R. (1996). Characterization of the acid resistance phenotype and rpoS alleles of shiga-like toxin-producing *Escherichia coli*. *Infect. Immun.*, *64*, 2808–2811.
46. Croxen, M., & Finlay, B. (2010). Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. *Nat Rev Microbiol*, *8*(1), 26-38.
47. Group., S. W. (2012). Experiences From Shiga Toxin-producing *Escherichia Coli* O104:H4 outbreak in Germany and research needs in the field. *Euro Surveill*, *17*(7).
48. O'Brien, A. D., & Holmes, R. K. (1987). Shiga and Shiga-like toxins. *Microbiol Rev.*, *51*, 206–220.
49. Fuller, C., Pellino, C., Flagler, M., Strasser, J., & AA, W. (2011). Shiga toxin subtypes display dramatic differences in potency. *Infect Immun*, *79*(3), 1329-1337.
50. O'Brien, A. D., & al., e. (1992). Shiga toxin: biochemistry, genetics, mode of action, and role in pathogenesis. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, *180*, 65-94.
51. Silberstein, C., Creydt, V. P., Gerhardt, E., & P. Núñez, a. C. (2008). Inhibition of water absorption in human proximal tubular epithelial cells in response to Shiga toxin-2. *Pediatr. Nephrol.*, *23*, 1981-1990.
52. Bhan, M., Bhandari, N., & Sazawal S, e. a. (1989). Descriptive epidemiology of persistent diarrhoea among young children in rural

- northern India. *Bulletin of the World Health Organization.*, 67(3), 281–288.
53. Araujo, J., Tabarelli, G., & Aranda KRS, e. a. (2007). Typical enteroaggregative and atypical enteropathogenic types of *Escherichia coli* are the most prevalent diarrhea-associated pathotypes among Brazilian children. . *Journal of Clinical Microbiology*, 45(10), 3396-3399.
54. Cravioto, A., Gross, R., Scotland, S., & B., R. (1979). An adhesive factor found in strains of *Escherichia coli* belonging to the traditional infantile enteropathogenic serotypes. *Curr Microbiol* , 3 , 95-99.
55. Bouzari S, J. A.-M. (1994). Adherence of non-enteropathogenic *Escherichia coli* to HeLa cells. *J Med Microbiol*, 40, 95-7.
56. Nataro, J., Yikang, D., & Giron JA, S. S. (1993). Aggregative adherence fimbria I expression in enteroaggregative *Escherichia coli* requires two unlinked plasmid regions. *Infection and Immunity.* , 61(3), 1126–1131.
57. Bernier, C., Gounon, P., Le Bouguéneq (2002). Identification of an aggregative adhesion fimbria (AAF) type III-encoding operon in enteroaggregative *Escherichia coli* as a sensitive probe for detecting the AAF-encoding operon family. . *Infection and Immunity*, 70(8).
58. Sheikh J, H. S. (2001). Roles for Fis and YafK in biofilm formation by enteroaggregative *Escherichia coli*. . *Molecular Microbiology.* , 41(5), 983–997.

59. Sheikh, J., Czeczulin, J., Harrington, S., & Hicks S, H. I. (2002). A novel dispersin protein in enteroaggregative *Escherichia coli*. *J Clin Invest*, 110, 1329–1337.
60. Monteiro, B., Campos, L., Sircili, M., & Franzolin MR, B. L. (2009). The dispersin-encoding gene (aap) is not restricted to enteroaggregative *Escherichia coli*. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 65, 81-84.
61. Imuta, N., Nishi, J., & Tokuda K, e. a. (2008). The *Escherichia coli* efflux pump TolC promotes aggregation of enteroaggregative E. coli 042. *Infection and Immunity*., 76(3), 1247–1256.
62. Wakimoto, N., Nishi, J., & Sheikh J, e. a. (2004). Quantitative biofilm assay using a microtiter plate to screen for enteroaggregative *Escherichia coli*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 71(5), 687–690.
63. Jenkins, C., Chart, H., Willshaw, G. A. y Cheasty, R., (2006a). 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.
64. Dupont, H., Levine, M., Hornick, R., & SB, F. (1989). Inoculum size in shigellosis and implications for expected mode of transmission. *J Infect Dis*, 159, 1126-1128.
65. Moreno, A., Fernandes, A., Gomes, T., Ramos, S., & LPG, M. (2010). Etiology of childhood diarrhea in the Northeast of Brazil:

- significant emergent diarrheal pathogens. *Diagn Microbiol Infect Dis* , 66, 50-57.
66. Moreno, A.C., Ferreira, L.G., Martinez (2009). Enteroinvasive *Escherichia coli* vs. *Shigella flexneri*: how different patterns of gene expression affect virulence. *FEMS Microbiol Lett* , 301, 156-163.
67. Snyder, J., Wells, J., Yashuk, J., N, P., & PA., B. (1984). Outbreak of invasive *Escherichia coli* gastroenteritis on a cruise ship. . *Am J Trop Med Hyg* , 33, 281-284.
68. Rico-Martínez, M. (1995). Biología molecular en la patogenia de *Shigella sp* y *Escherichia coli* enteroinvasiva. *Rev Latinoam Microbiol*, 37, 367-385.
69. Blanco, J., Blanco, M., Blanco, J. E., & Mora, A. (s.f.). *Escehrichia coli* patogenos para seres humanos y animales.
70. Croxen, M., & Finlay, B. (2010). Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. *Nat Rev Microbiol* , 8(1), 26-38.
71. Le Bouguenec C, S. A. (2006). Diffusely adherent *Escherichia coli* strains expressing Afa/Dr adhesins (Afa/Dr DAEC): hitherto unrecognized pathogens. *FEMS Microbiol Lett* (256), 185–194.
72. Rosane Mansan-Almeida, A. L. (2013). Diffusely adherent *Escherichia coli* strains isolated from children and adults constitute two different populations . *BMC Microbiology* , 13(22).

73. Scaletsky, I.C., Pedrosa, M.C., Oliva, C.A., Carvalho, R.L., Morais, M.B., Fagundes-Neto (1999). A localized adherence-like pattern as a second pattern of adherence of classic enteropathogenic *Escherichia coli* to HEp-2 cells that is associated with infantile diarrhea. *Infect Immun.* , 7(67), 3410-5.
74. Vial, P. A., Mathewson, J. J., DuPont, H. L., & Guers, L. a. (1990). Comparison of two assay methods for patterns of adherence to HEp-2 cells of *Escherichia coli* from patients with diarrhea. *J. Clin. Microbiol.*, 28, 882–885.
75. Murray, P., Rosenthal, K., y Pfalle. (2006). Microbiología Médica, Quinta edición ed., Elseiver , pp. 193-201.
76. Zavala, D. J. (2012) Microbiología y Parasitología Medica de Tay, México, Cuarta Edición, p. 34.
77. Moorhouse, E. C., & McKay, L. (1968). Hospital study of transferable drug resistance. *Br. Med. J.*, 2, 741–742.
78. Vidal R, V. M. (2004). Multiplex PCR for diagnosis of enteric infections associated with diarrheagenic *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol.*, 42(4), 1787-9.
79. Ochoa, T.J., & Guion, C.E. (2006). Rapid diagnosis of diarrheagenic *E. coli* using real time multiplex PCR. *Pediatric Academic Societies' (PAS) Annual Meeting in San Francisco, California, USA.*

80. Lopez, S. C., Cerna, J., Villegas, S. N. (2003). Single multiplex polymerase chain reaction to detect diverse loci associated with diarrheagenic *Escherichia coli*. *Emerg Infect Dis*, 9, 127-131.
81. Pereira, L., Ferraz, R., & Silva, S. (2007). Enteroaggregative *Escherichia coli* Virulence Markers: Positive Association with Distinct Clinical Characteristics and Segregation into 3 Enteropathogenic *E. coli* Serogroups. . *Journal of Infectious Disease*, 195, 366-374.
82. Vilchez, S., Reyes, D., Paniagua, M., Bucardo, F., & Mollby, R. (2009). Prevalence of diarrhoeagenic *Escherichia coli* in children from Leon, Nicaragua. *J Med Microbiol* , 58, 630–637.
83. Cortes, O.A., Rodriguez, A.G., Moreno, E., Tenorio, L., Torres M., Montiel, V. (2002). Brote causado por *Escherichia coli* en Chalco, México. *Sal. Pú. Méx*, 44, 297-302.
84. Estrada-Garcia, T., Cerna, J. F., Paheco-Gil, L., Velazquez, R. F., Ochoa, T. J., & J. Torres. (2005). Drug-resistant diarrheogenic *Escherichia coli*, Mexico. *Emerg. Infect. Dis.* (11:), 1306–1308.
85. Chandra, K., Singh, G., Taneja, N., Pahil, S., & Singhi, S. a. (2012). Diarrhoeagenic *Escherichia coli* as a predominant cause of paediatric nosocomial diarrhoea in India . *Journal of Medical Microbiology* (61), 830–836.
86. Karch, H. (2001). The role of virulence factors in enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) associated hemolytic-uremic syndrome. *Semin Thromb Hemost* , 27, 207–213.

87. Vicente AC, T. L.-R. (2005). Outbreaks of cholera-like diarrhoea caused by enterotoxigenic *Escherichia coli* in the Brazilian Amazon Rainforest Trans . *R Soc Trop Med Hyg* , 99, 669-674.
88. Rivas, M., Binsztein, N., Basanta, G. (1995). Antibody responses against *Escherichia coli* heat-labile toxin and colonization factor antigens I and II in Argentinean children. *J Inf Dis* 1995, 171, 1045-1049.
89. Boyce, T., Swerdlow, D., & Griffin, P. (1995). Current concepts: *Escherichia coli* O157:H7 and the hemolytic-uremic syndrome. *N Engl J Med.*, 333, 364-368.
90. Vallance, B. C. (2000) Exploitation of host cells by enteropathogenic *Escherichiacoli*. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 97, 8799–8806.
91. Nataro, J. (2005). Enteroaggregative *Escherichia coli* pathogenesis. *Curr Opin Gastroenterol* , 21, 4-8.
92. Ochoa, T. J., Ecker, L., Barletta, F., Mispireta, M., Gil, A., Contreras, C., y otros. (2009). Age-related susceptibility to infection with diarrheagenic *E. coli* in infants from peri-urban areas . *Clin. Infect. Dis.*, 11(49), 1694-1702.
93. Nguyen, T.V., Le Van, P., Le Huy, C., Gia K.N., Weintraub, A. (2005). Detection and characterization of diarrheagenic *Escherichia coli* from young children in Hanoi, Vietnam. *J ClinMicrobiol*(43), 755-60.

94. Moyo, S.J., Maselle, S.Y., Matee, M.I., Langeland, N., Mylvaganam, H. (2007). Identification of diarrheagenic *Escherichia coli* isolated from infants and children in Dar es Salaam, Tanzania. *BMC Infect Dis* (7), 92.
95. Rajendran, P., Ajjampur, S.S., Chidambaram, D., Chandrabose, G., Thangaraj, B., Sarkar, R., Samuel, P., Rajan, D.P., Kang, G. 2010. Pathotypes of diarrheagenic *Escherichia coli* in children attending a tertiary care hospital in South India.,» *Diagn Microbiol Infect Dis.*, vol. 68, n° 117.
96. Literak, I., Petro, R., Dolejska, M., Gruberova, E., Dobiasova, H., & Petr, J. a. (2011). Antimicrobial Resistance in Fecal *Escherichia coli* Isolates from Healthy Urban Children of Two Age Groups in Relation to Their Antibiotic Therapy. *ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY*, 55(6), 3005–3007.
97. Afset, J. E., L. Bevanger, P. Romundstad, and K. Bergh. . (2004). Association of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) with prolonged diarrhea. . *J. Med. Microbiol.* (53), 1137–1144.
98. Nguyen, R. N.-B. (2006.). Atypical enteropathogenic *Escherichia coli* infection and prolonged diarrhea in children. *Emerg. Infect. Dis.* (12), 597–603.
99. Trabulsi, L. R., & Gomes, R. K. (2002). Typical and atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. *Emerg. Infect. Dis.* (8), 508–513.

100. Wani, S. A., Nabi, A., Fayaz, I., Ahmad, I., Nishikawa, Y., Qureshi, K., y otros. (2006). Investigation of diarrhoeic faecal samples for enterotoxigenic, Shiga toxin-producing and typical or atypical enteropathogenic *Escherichia coli* in Kashmir. *FEMS Microbiol. Lett.* (261), 238-244.
101. Fazeli, H., & Salehi, R. (2007). Antibiotic resistance pattern in shiga toxin producing *Escherichia coli* isolated from diarrheal patients in Al-Zahra Hospital, Isfahan, Iran. . *Res Pharmacoeut Sci*, 1(2), 29-33.
102. Sobieszczanska, B., Kowalska-Krochmal, B., Mowszet, K., & Pytrus, T. (2003). Susceptibility to antimicrobial agents of enteroaggregative *Escherichia coli* strains isolated from children with diarrhea. *Przegl Epidemiol*( 57), 499–503 .
103. Sang, W., Oundo, J., Mwituria, J., Waiyaki, P., Yoh, M., Iida, T., y otros. (1997). Multidrug-resistant enteroaggregative *Escherichia coli* associated with persistent diarrhea in Kenyan children. *Emerg Infect Dis*(3), 373–4.
104. Aslani MM, S.-A. S. (2008). Molecular detection and antimicrobial resistance of diarrheagenic *Escherichia coli* strains isolated from diarrheal cases. . *Saudi Med J* (29), 388–92.
105. Djie-Maletz A, Reither K, Danour S, Anyidoho L, Saad E, Danikuu F, Ziniel P, Weitze, T, Wagner J et al. 2008. High rate of resistance to locally used antibiotics among enteric bacteria from children in Northern Ghana. *J Antimicrob Chemother.* 61:1315-1318.

106. Levy SB, Marshall B. 2004. Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. *Nat Med.* 10:S122-129.
107. Donnenberg, M. (2002). Introduction. In: *Escherichia coli: Virulence Mechanisms of a Versatile Pathogen*. USA: Elsevier Science Inc. xxi-xxv.
108. CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Second Informational Supplement. CLSI document M100-S22.