



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA
Y ZOOTECNIA

PARTICIPACIÓN DE LOS PERROS EN LA TRANSMISIÓN DE
Escherichia coli PATÓGENA, CAUSANTE DE ENFERMEDAD EN HUMANOS

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MÉDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA

PRESENTA

LUZ ANAHÍ UBIARCO LÓPEZ

Asesores:

Dr. Antonio Verdugo Rodríguez
Dra. Delia Xochil Vega Manríquez
Dr. Carlos Alberto Eslava Campos

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.

DEDICATORIA

La presente tesis la dedico a mi familia porque a ustedes dedico cada uno de mis días. Por su apoyo y confianza, por ayudarme a cumplir mis metas personales y también profesionales. Gracias por brindarme las herramientas necesarias para poder concluir esta etapa, por estar a mi lado acompañándome y aconsejándome. Los amo.

AGRADECIMIENTOS

A mis asesores:

Dr. Antonio Verdugo Rodríguez por demostrarme que para alcanzar el éxito se necesita esfuerzo y dedicación.

Dra. Delia Xochil Vega Manríquez por depositar su confianza en mí para la realización de este proyecto, por su apoyo incondicional y sobre todo por brindarme su amistad.

Dr. Carlos Alberto Eslava Campos por todos los conocimientos que ha compartido conmigo, y el tiempo que ha dedicado a mi trabajo, por sus valiosas enseñanzas tanto para mi formación académica, como para la vida diaria.

A mi jurado:

Dr. José Alfonso Barajas Rojas, Dr. Marco Antonio Casillas Fabila, Dr. Alfredo Sahagún Ruiz, Dr. Antonio Verdugo Rodríguez y Dr. Joaquín Aguilar Bobadilla por sus aportaciones para el enriquecimiento de mi trabajo.

A quienes colaboraron conmigo:

Al Laboratorio de Patogenicidad Bacteriana del Hospital Infantil de México Federico Gómez, encabezado por el Dr. Carlos Eslava, en especial a Paloma Salazar, por su apoyo, dedicación y comprensión, por su paciencia para compartir conmigo enseñanzas, tiempo y las técnicas necesarias para la realización de este

proyecto. Al Dr. Ulises, Ale y Eduardo por sus explicaciones, por los datos y consejos para poder realizar de una manera más sencilla mi trabajo, por proporcionarme materiales, equipo y su valioso tiempo, por ayudarme hasta en el más mínimo detalle, por alentarme día a día.

Al Dr. Armando Navarro Ocaña y a todo el grupo de trabajo del Laboratorio de Serología de la Facultad de Medicina UNAM, por haber invertido su tiempo en mi aprendizaje, por asesorarme y escucharme durante la realización de mi trabajo, por esas largas horas, amenizadas por los momentos tan agradables que pase en su compañía.

Al Departamento de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia UNAM, en particular a la Jefa de Departamento Dra. Rosa Elena Miranda Morales, por otorgarme las facilidades para realizar este proyecto, por permitirme continuar con la actualización sobre el manejo y desarrollo de técnicas para el diagnóstico microbiológico, que pude emplear durante la elaboración de este trabajo.

A mi familia:

A mi papá por darme todo lo necesario para poder culminar mis estudios, por estar siempre a mi lado animándome, por levantarte temprano todos los días para poder acompañarme en este largo viaje, por repetirme una y mil veces que puedo hacer cualquier cosa que me proponga.

A mi mamá por ser el mayor ejemplo de fuerza, empuje y perseverancia, por demostrarme que siempre se puede superar cualquier obstáculo que la vida te

ponga en el camino, por exigirme e inculcarme el amor al estudio, por tu dedicación y preocupación por mi bienestar.

A Santi por ser mi inspiración, el motor que me permite avanzar día tras día, por la hermosa sonrisa con la que me compartes palabras llenas de esperanza y amor, por ser mi compañía en el trabajo diario, por alegrar cada uno de mis días.

A Viviam por tu apoyo incondicional, por ser mi amiga, por escucharme y aconsejarme, por permitirme momentos de distracción y relajamiento durante este proceso lleno de estrés, por impedir que me dé por vencida.

A Itzel por tu apoyo y confianza, por llenarme de pláticas, datos y estadísticas que desconocía y que me han mantenido entretenida.

A Tina porque aunque no estás físicamente conmigo, fuiste mi apoyo total, porque te fuiste cuando comenzaba este proyecto, y hoy donde qui era que es tés podrás verlo culminado.

A Juan porque a pesar de todos los momentos difíciles, has sido muy importante en mi formación profesional y personal, porque me diste un maravilloso regalo, que me ha hecho infinitamente feliz, permitiéndome continuar y alcanzar todas mis metas. Por ser mi compañero desde hace ya varios años y por llenarme de alegría y bellos momentos.

A mis amigos:

Arty por ser mi mejor amigo, por compartir experiencias, técnicas, frustraciones y muchas cosas más, por tantas horas de pláticas a veces sin sentido alguno, por haber estado a mi lado durante los momentos difíciles y por celebrar hoy conmigo.

A M VZ Esp. Raúl Segura por sus enseñanzas y guía sobre el diagnóstico bacteriológico, por hablarme sobre sus experiencias profesionales, por permitirme aprender datos que difícilmente pueden encontrarse en los libros, pero sobre todo por regalarme su amistad.

CONTENIDO

	Página
RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN.....	2
MATERIAL Y MÉTODOS	16
RESULTADOS	23
DISCUSIÓN	34
CONCLUSIONES	38
PROSPECTIVA	39
REFERENCIAS	40

RESUMEN

UBIARCO LÓPEZ LUZ ANAHÍ. Participación de los perros en la transmisión de *Escherichia coli* patógena, causante de enfermedad en humanos (bajo la dirección de: Dr. Antonio Verdugo Rodríguez, Dra. Delia Xochil Vega Manríquez y Dr. Carlos Alberto Eslava Campos).

Cada año se reportan 1, 700 millones de casos de diarrea infecciosa en el mundo. *Escherichia coli* es en primer lugar la bacteria asociada con el síndrome diarreico, en general es adquirida por la ingestión de alimentos o agua contaminada. Sin embargo, poco se sabe sobre la participación de los animales de compañía. En este trabajo se presentan resultados sobre el aislamiento y caracterización de bacterias causantes de diarrea en perros, teniendo por objetivo contribuir al conocimiento sobre la importancia de estos en la transmisión de *E. coli*. Se analizaron muestras de heces, de 17 perros clínicamente sanos y 13 con cuadro diarreico, de la ciudad de San Luis Potosí. La identificación se realizó por pruebas bioquímicas tradicionales. Los aislados de *E. coli* se tipificaron y analizaron por PCR para definir la presencia de genes de virulencia, así como grupos filogenéticos. El 90% de las cepas recuperadas se identificaron como *E. coli*. El serogrupo O2 se presentó con mayor frecuencia (33%). La detección de genes mostró que 40% de las *E. coli* presentaron al menos un amplificado y el análisis filogenético mostró la amplificación del gen *chuA*, que ha sido referido para definir las *E. coli* extraintestinales virulentas.

Participación de los perros en la transmisión de *Escherichia coli* patógena, causante de enfermedad en humanos.

INTRODUCCIÓN

México es el país de Latinoamérica con mayor número de población canina, de acuerdo con el último censo del Instituto Nacional de Geografía y Estadística, estimándose en 22 millones el número de perros que habitan el país. Sin embargo solamente el 30% cuentan con propietario. La Secretaría de Salud estima que tan solo en el Distrito Federal, se produce más de media tonelada de heces caninas al día, lo que suma 182 toneladas al año.

La evidente sobrepoblación canina repercute directamente en la salud pública humana, ya que se conocen al menos 65 enfermedades zoonóticas transmitidas por los perros (1).

La diarrea aguda canina es una de las afecciones intestinales más frecuentes, representando un 80% de la consulta médica. Se incluyen dentro de las principales causas, patógenos de origen viral, parasitario y bacteriano; su morbilidad supera el 80%, presentando un cuadro clínico caracterizado por hemoconcentración e hiponatremia. (2).

Se define a la diarrea aguda como una disminución en la consistencia e incremento en la frecuencia y número de las evacuaciones, o bien, al menos una evacuación disminuida en consistencia con sangre en 24 horas, con o sin fiebre o vómito. La mayoría de los pacientes que fallecen por enfermedades diarreicas en

(3)

realidad mueren por una grave deshidratación a consecuencia de la pérdida de líquidos. Los individuos jóvenes, malnutridos o inmunodeprimidos, son los que presentan mayor riesgo de enfermedades diarreicas potencialmente mortales (3).

Las enfermedades diarreicas aún representan un serio problema de salud pública que afecta niños menores de cinco años, principalmente en países subdesarrollados. La Organización Mundial de la Salud (OMS) y UNICEF (Fondo de las Naciones Unidas para la Infancia), señalan que cada año se producen aproximadamente 1,700 millones de casos de diarrea infecciosa en el mundo. Las enfermedades diarreicas son la segunda mayor causa de muerte de niños menores de cinco años, ocasionando la muerte de 1.87 millones de niños cada año. Esto representa el 19% de todas las muertes de niños menores de cinco años, y significa que más de 5,000 niños mueren cada día como resultado de enfermedades diarreicas (4).

Los virus, principalmente rotavirus, seguido por los norovirus, astrovirus y adenovirus son responsables del 70 al 80% de los casos de gastroenteritis aguda en México. Distintos patógenos bacterianos explican el otro 10 a 20% de los casos; 10% puede ser atribuible a *Escherichia coli* que produce diarrea, seguido por microorganismos como *Shigella sp.*, *Campylobacter sp.*, *Salmonella spp.* y *Vibrio cholerae*. Los parásitos son causa poco frecuente de diarrea en niños menores de cinco años, *Cryptosporidium* y *Giardia* son los más comunes, tienden a causar diarrea crónica (5-9).

ANTECEDENTES

(4)

Como ya fue referido, *E. coli* es la bacteria que con mayor frecuencia se asocia con la etiopatogenia de la diarrea. Coloniza el intestino de todos los mamíferos y algunas aves unas horas después de nacer, para posteriormente formar parte de la biota normal del tracto gastrointestinal (10). En becerros sanos se ha encontrado que *E. coli* está presente a lo largo del intestino y que su concentración aumenta de la porción proximal a la distal (11).

Sin embargo, también existen clones de *E. coli* capaces de causar infecciones intestinales que ocasionan cuadros de diarrea de moderados a graves, en perros, lechones, becerros, corderos, aves y humanos principalmente. Algunas otras clones pueden ocasionar infecciones extraintestinales como es el caso de las del tracto urinario o del sistema nervioso como meningitis, septicemias, entre otras (10).

E. coli es un bacilo Gramnegativo de la familia *Enterobacteriaceae*, dotado de motilidad por flagelos peritricos; crece sobre peptona o medios con extracto de carne, anaerobio facultativo, fermenta la glucosa y produce gas a partir de ésta. Es negativo a la prueba de oxidasa, descarboxila la lisina, reduce el nitrato a nitrito, produce indol, fermenta manitol y sorbitol y puede o no utilizar la lactosa (12). Mide de 2 a 3 micras de longitud por 0.6 micras de ancho. En agar sangre las colonias son de manera clásica color gris y planas, o levemente elevadas; producen un olor distintivo por el metabolismo del triptófano a indol, y se puede relacionar con hemólisis completa (12-14).

La presentación de la enfermedad depende del subtipo infectante, así como de la edad y el estado fisiológico y nutricional del individuo infectado. (14). El mecanismo de producción de la enfermedad también varía de acuerdo con el subtipo de *E. coli*, ya que la enteritis causada por estos microorganismos se puede desencadenar por efecto de uno o varios factores de patogenicidad entre los que se incluyen, adhesinas, invasinas o toxinas que expresa la bacteria, o una combinación de estos (14,15). Esta diversidad de comportamientos se debe principalmente a la presencia de ciertos genes en el cromosoma, que permiten tanto la inserción como la expresión de los genes adquiridos, algunos de los cuales se consideran como responsables de la virulencia del microorganismo (16, 17).

En cerdos la manifestación más común es la diarrea sin enteritis ni bacteremia. La enfermedad ocurre principalmente durante la primera semana de vida y se caracteriza por pérdida de líquidos y electrolitos en heces, lo que produce deshidratación y puede desencadenar la muerte. Los serogrupos de *E. coli* asociados con diarrea en lechones son O 96, O 5, O 8, O 6, O 45, O 139, O 149, O 138, O 108 y O 35 (18).

La diarrea ocasionada por *E. coli* se presenta en todas las razas de bovinos, principalmente durante las dos primeras semanas de edad. Los becerros enfermos presentan fiebre, debilidad y frecuencia respiratoria y cardíaca elevadas. Puede o no ser mortal, dependiendo del nivel de deshidratación. Los serogrupos asociados son O 78, O 137, O 35 y O 15 (18).

(6)

La diarrea colibacilar de los corderos, se presenta entre los 2 y 8 días de edad, produce depresión, anorexia, deshidratación y en algunos casos la muerte. Entre los serogrupos asociados con diarrea en corderos están O8 y O121 (18).

La infección por *E. coli* en aves es una enfermedad principalmente de pollos de engorda de 6 a 10 semanas de edad, puede producir colisepticemia, enteritis, artritis, peritonitis y salpingitis: los serogrupos aislados de brotes en aves son O1, O2 y O78 (18).

Para identificar los grupos patógenos asociados con la producción de enfermedad, Kauffman-White (11) desarrollaron un esquema de tipificación con sueros de conejo con lo que se ha podido establecer los serogrupos o serotipos más comunes. En la actualidad se conocen 186 variedades del antígeno somático (O) formado por unidades repetidas de polisacáridos presentes en el lipopolisacárido (LPS) de la membrana externa o pared celular de la bacteria. Los antígenos O son resistentes al calor y al alcohol y generalmente se detectan mediante pruebas de aglutinación. Otro antígeno utilizado en la tipificación de *E. coli* es el flagelo (H) que se desnaturaliza mediante calor, alcohol o el uso de formalina, de este se conocen 56 variedades. La identificación del antígeno "O" permite establecer el serogrupo de la bacteria y la combinación de los antígenos somático y flagelar (O:H) permite definir el serotipo (10,19).

Considerando el mecanismo de patogenicidad, cuadro clínico y distribución, las cepas causantes de diarrea se clasifican en los grupos patógenos de *E. coli*: enterotoxigénica (ETEC), enteropatógena (EPEC), enteroinvasiva (EIEC),

enterohemorrágica (EHEC), enteroagregativa (EAEC) y de adherencia difusa (DAEC) (10, 15, 20).

***Escherichia coli* enterotoxigénica (ETEC)**

ETEC es el grupo más común en los países subdesarrollados que carecen de servicios sanitarios apropiados, así como de recursos para el tratamiento del agua. La forma más importante de transmisión es el agua contaminada, tratada de manera no apropiada, las frutas y verduras que se riegan con agua contaminada y no se cocinan antes de ingerirse, (14, 21). Se presenta principalmente en niños en edad escolar y es responsable de un importante número de casos de la diarrea de los viajeros que visitan éstos países (14, 21, 22).

Los individuos con enteritis ocasionada por *E. coli* enterotoxigénica presentan diarrea acuosa súbita de intensidad leve a moderada, en ocasiones acompañada de fiebre, náuseas y dolor abdominal, la deshidratación puede ser intensa y requiere terapia de líquidos (10, 14, 21).

E. coli enterotoxigénica produce una o las dos toxinas conocidas como enterotoxina termolábil y termoestable (LT y ST), los genes que codifican estas toxinas se localizan en plásmido. La enterotoxina LT facilita el ingreso al interior del citosol y ribosila a la proteína G reguladora de la ciclase de adenilato, que da lugar a un aumento intenso del AMP cíclico citosólico. Esto, a su vez, produce una alteración de los canales del ion cloruro y causa diarrea osmótica (14, 23-25).

La toxina St_a induce diarrea osmótica por medio de la activación de la guanilato ciclasa cuyo incremento ocasiona aumento de las concentraciones de GMP cíclico citológico. Por su parte la variedad ST_b , aumenta el calcio intracelular, promueve la secreción de bicarbonato, y estimula la liberación de serotonina y prostaglandina E_2 . Asimismo, ST_b lesiona los enterocitos y causa pérdida de células epiteliales y atrofia parcial de las vellosidades. Estos cambios también contribuyen a disminuir la absorción y la diarrea osmótica (14, 24, 25).

La prueba definitiva para considerar a una cepa como toxigénica, consiste en demostrar la presencia de los genes que las codifican o de las enterotoxinas mismas, por medio de técnicas moleculares como la Reacción en Cadena de la Polimerasa (26).

***Escherichia coli* enteropatógena (EPEC)**

Los alimentos y agua contaminados por qui en los manipulada, son el principal vehículo en la transmisión de *E. coli* enteropatógena. Causa enfermedad en niños menores de dos años, causando brotes en salas pediátricas, salas de recién nacidos y guarderías infantiles. Ocasionalmente puede causar enfermedad en adultos, cuando existen factores predisponentes, como es el caso de los pacientes diabéticos. EPEC causa principalmente diarrea acuosa aguda, profusa, no sanguinolenta, puede presentarse fiebre con náusea y vómito. (14, 27).

EPEC contiene un aislado de patogenicidad conocida como LEE, e sta incluye diferentes genes involucrados en la virulencia de la bacteria. La intimina proteína

de membrana externa de 94 kDa codificada por *eae* presente en dicha isla favorece la adherencia íntima entre la bacteria y el enterocito. También contiene los genes que contribuyen a la fijación y la inducción de las lesiones de adherencia y esfacelamiento (A/E). La adherencia está mediada por pilos o fimbrias rizadas que se llaman Bfp (bundle-forming pilus), cuya información genética es tá codificada en un plásmido de 50-70MDa denominado EAF (EPEC adherence factor) y de algunos genes cromosomales (14, 27).

Las cepas EPEC se consideran típicas cuando tienen los genes *eae* para la íntima, que participa en A/E, y el plásmido EAF que codifica para el Bfp; se dice que son atípicas cuando sólo presentan los genes *eae* pero no el plásmido EAF (27-29).

Las cepas EPEC pueden identificarse por su capacidad para adherirse formando microcolonias en monocapas de células HEP-2, así como por la producción de la lesión A/E (30).

***Escherichia coli* enteroinvasiva (EIEC)**

La infección por esta bacteria ocasiona diarrea de grado moderado a intenso, que comienza siendo acuosa, pero durante la evolución de la enfermedad puede presentar sangre y moco, en algunas ocasiones fiebre y cólicos abdominales. EIEC se disemina por vía oral fecal (31).

EIEC se adhiere a la pared celular de los enterocitos del intestino delgado y la diarrea acuosa es consecuencia de la producción de una enterotoxina, codificada

por el gen *sen*. La penetración de la bacteria es facilitada por genes plasmídicos y cromosomales, utilizando el sistema de secreción tipo III (inyectisoma), la bacteria se desplaza a través del citoplasma por la inducción de polímeros de actina, para posteriormente transfectarse a los enterocitos contiguos. Finalmente se produce muerte celular y desfacelamiento de la mucosa, que provocan la respuesta inflamatoria exagerada (14).

EIEC presenta características fenotípicas de *Shigella spp.*, sin embargo muestran particularidades bioquímicas de *E. coli*. Lo anterior dificulta la diferenciación de EIEC de una especie de *Shigella spp.* y es posible que muchos microorganismos aislados sean identificados erróneamente como *Shigella spp.* La detección de antígenos O vinculados con EIEC subtipos O: H, es útil para concluir la presencia de esta bacteria (11-14, 32).

Se han usado métodos como el análisis inmunoabsorbente ligado a enzimas, sondas de ácido nucleico o la PCR para la diferenciación de especies de *Shigella spp.* de EIEC (33, 34).

***Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC)**

El grupo de EHEC representa patógenos comensales de los rumiantes, su principal forma de propagación es por los alimentos, el agua o las bebidas no pasteurizadas, que se contaminan con heces de animales (14, 35).

En la evolución de la enfermedad se desarrolla una diarrea acuosa en algunas ocasiones acompañada de náuseas y vómito, cólicos abdominales y fiebre. La

diarrea puede tornarse sanguinolenta en unos días. En la mayoría de los casos la enfermedad es resuelta espontáneamente, aunque en un 10% de los casos puede desarrollarse el Síndrome Urémico Hemolítico, que consiste en anemia hemolítica angiopática, insuficiencia renal y trombocitopenia (14, 35).

El factor más importante en la patogénesis de EHEC además de la adherencia íntima, es la toxina llamada semejante a shiga (SLT) cuya codificación se realiza en genes presentes en un bacteriófago. Esta toxina del tipo AB también se conoce como verotoxina (VT) por su efecto tóxico sobre células Vero (36, 37).

El método de detección más común es una placa de McConkey que contiene sorbitol en vez de lactosa (SMAC). Las colonias que no fermentan sorbitol y que no producen glucoronidasa β , se sujetan a una prueba para detectar la presencia del antígeno O157 por medio de aglutinación con antisuero específico o por un ensayo de PCR con un iniciador tipo. Los microorganismos que son positivos a O157 se examinan luego en relación con el antígeno flagelar H7 (38, 39).

Los serotipos de EHEC que no son O157 son más difíciles de detectar, ya que fermentan el sorbitol y su identificación se basa en métodos para identificar la toxina STX. Pueden ser utilizados el inmunoanálisis, PCR y sondas de ácido nucleico para la detección del gen STX (40).

***Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC)**

Los alimentos y agua contaminados actúan como la principal fuente de transmisión en el ciclo fecal-oral. Es causa de enfermedad tanto en países en vías de desarrollo como desarrollados (41, 42).

Los niños menores de un año son los principalmente afectados y puede producirse retraso en el desarrollo del crecimiento por diarrea persistente. EAEC produce diarrea secretora aguda que suele tener consistencia acuosa o mucosa, en algunos casos es posible observar sangre a simple vista (14, 41, 42).

EAEC se adhiere a los eritrocitos por medio de fimbrias designadas como fimbrias de adherencia agregadora o AAF/I, y una proteína de membrana externa de 38 kDA. Después de la colonización, promueve la secreción de moco, el cual forma una biopelícula que puede disminuir la absorción de nutrientes (14).

La prueba de referencia para el diagnóstico de EAEC es la adherencia agregativa en células HEP-2 de cultivos bacterianos, previamente inoculados en medio Luria e incubados en condiciones estacionarias y a 37 °C (27, 42).

***Escherichia coli* de adherencia difusa (DAEC)**

Escherichia coli de adherencia difusa infecta principalmente a niños de entre cuatro y cinco años. DAEC produce diarrea acuosa, por lo general sin sangre (14, 27).

La adherencia de fusa a la superficie de los erocitos está mediada por una fimbria de superficie, conocida como F1845 (43). Los genes que codifican para esta fimbria se pueden encontrar en el cromosoma o en un plásmido. (27, 44)

Diversos estudios han demostrado similitud genética entre las cepas aisladas de humanos y las aisladas de perros y gatos, principalmente entre los serogrupos O4 y O6 (45-49).

En uno de estos estudios al realizar una comparación filogenética, en cepas de *E. coli* serogrupo O6, de aislamientos clínicos y fecales de humano, perro y gato se encontraron similitudes cercanas en el fondo filogenético, genotipo de virulencia e identidad clonal en los tres grupos de aislamientos (49). Lo anterior soporta la idea de una potencial zoonosis ya que humanos y mascotas pueden estar colonizados e infectados por cepas de *E. coli* con características similares.

Tal situación plantea la posibilidad de que los hospederos funcionen como reservorios de cepas con potencial patogénico y que se den eventos de transmisión entre humanos y perros debido a la convivencia estrecha que existe entre ambos. Ante el hecho de un posible intercambio de microorganismos que favorezca la diseminación de patógenos resistentes a antibióticos utilizados para tratamientos de humanos, representa un problema con impacto social y financiero importante.

JUSTIFICACIÓN

Existen estudios realizados en Norteamérica y Europa relacionados con la presencia de *E. coli* patógena en perros, sin embargo en México se carece de información al respecto. Por tal motivo, resulta importante estudiar si los perros están infectados y colonizados, por cepas de *E. coli* con características similares a las identificadas en humanos realizando la importancia de transmisión al humano.

La Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) en su Sistema Internacional de Notificación de Enfermedades, así como en México la Dirección General de Salud Animal, a través del Sistema de Vigilancia Epidemiológica, refieren a la gastroenteritis infecciosa como enfermedad de informe anual, sin embargo, no existe una especificación sobre la tipificación de éstas.

Ante estos hechos, es que en este trabajo se propuso analizar si *E. coli* que coloniza el intestino de perros presenta factores de virulencia, relacionados con alguno o algunos de los grupos patógenos, que se presentan en humanos enfermos.

HIPÓTESIS

Los perros son portadores de cepas de *Escherichia coli* de diferentes grupos patógenos, lo que representa un riesgo de transmisión de la bacteria al humano.

OBJETIVO GENERAL

Contribuir al conocimiento sobre la participación de los perros en la transmisión de *Escherichia coli* patógena, causante de enfermedad en el humano, mediante la caracterización de cepas aisladas de perros clínicamente sanos y con diarrea.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar el aislamiento e identificación de *Escherichia coli* a partir de muestras de heces de perros clínicamente sanos y con cuadro clínico diarreico.
- Identificar la presencia de genes relacionados con la etiología de la diarrea por *Escherichia coli*, para conocer el patotipo al que pertenecen.
- Conocer los serogrupos y serotipos de *Escherichia coli*, aislados de perros y su relación con genes de virulencia.
- Establecer el grupo filogenético de los aislamientos de *Escherichia coli* y su relación con genes de virulencia.

MATERIAL Y MÉTODOS

MATERIAL

1. Paquete comercial para extracción de ADN*
 - Iniciadores para los genes*: *lt*, *st*, *stx1*, *stx2*, *bfpA*, *eaeA*, e *ial*.
 - Paquete comercial para PCR*: MgCl, enzima Taq, nucleótidos

*©Invitrogen TM2013 Life Technologies Corporation. (Acceso Lab S. A. de C. V. Juan Salvador Agraz No. 50, Piso 4° Col. Lomas de Santa Fé. Delegación Cuajimalpa, México D.F., CP 05348).

2. Paquete comercial para PCR © 2012 Thermo Fisher Scientific Inc.**
3. Water nuclease free © 2012 Thermo Fisher Scientific Inc.**
4. Iniciadores para los genes**: *chuA*, *yjaA* y el fragmento TSPE4.C2

**BioAdvanced Systems, S.A. de C.V. Insurgentes Sur #800 8 Piso Col. del Valle
México

, D.F. , CP 03100 México biasys@biasys.com.mx

+52 (55) 5691-7875

Fax: +52 (55) 2608-5624

METODOLOGÍA

Se realizó un estudio observacional, en perros de la Ciudad de San Luis Potosí, México.

Se obtuvieron 30 muestras de heces de perros, 17 clínicamente sanos y 13 perros con cuadro clínico diarreico, se sembraron en medios básicos y selectivos para aislar a los microorganismos presentes e identificarlos de acuerdo a sus reacciones metabólicas en medios bioquímicos básicos.

Los microorganismos identificados como *Escherichia coli* fueron sometidos a distintas técnicas y pruebas para conocer sus características moleculares y antigénicas.

MUESTREO

El muestreo se realizó en la Ciudad de San Luis Potosí, ya que el desarrollo del proyecto permitirá equipar un laboratorio que será utilizado tanto para docencia en la carrera de Medicina Veterinaria y Zootecnia en la Facultad de Agronomía y Veterinaria de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí, así como el desarrollo de nuevas líneas de investigación con énfasis en microbiología veterinaria. Todo esto mediante el registro del proyecto ante PROMEP (Programa para el Mejoramiento del Profesorado) con la clave PROMEP/103.5/12/7964, bajo el título: "Participación de animales de compañía en la transmisión de *Escherichia coli* patógena y su resistencia a los antimicrobianos".

Criterios de selección de la muestra

Criterios de inclusión

Se incluyeron 17 perros clínicamente sanos, es decir que no manifestaron ningún signo de enfermedad, y 13 que presentaron cuadro clínico diarreico, todos con propietario.

Criterios de eliminación o exclusión

De acuerdo a la población establecida y al tipo de estudio no se tomaron en cuenta factores como edad, sexo o raza, por lo que no se identificaron criterios de eliminación.

OBTENCIÓN DE LA MUESTRA

Se colectaron muestras de heces con hisopo rectal de 17 perros clínicamente sanos y 13 perros que presentaron cuadro clínico diarreico. El hisopo se colocó en medio de transporte Stuart en refrigeración (4°C) para la mejor conservación de las bacterias.

SIEMBRA

El hisopo se sembró en medio Mac Conkey utilizando la técnica de primocultivo y se incubó durante 18 horas a 37°C en microaerobiosis.

Posteriormente se tomaron cinco colonias con reacción de lactosa positivas y dos colonias lactosa negativas al azar, de cada uno de los aislamientos de los perros. Las colonias se sembraron en dos tubos de Tripticasa Soya Agar (TSA) y se incubaron 18 horas a 37°C para conservar hasta su uso.

IDENTIFICACIÓN BIOQUÍMICA

Se realizó con base en las reacciones metabólicas de los aislamientos en medios bioquímicos básicos para enterobacterias: agar Triple Azúcar Hierro (TSI), agar Citrato de Simmons, Medio Christensen (agar base urea), Medio Motilidad Indol Ornitina (MIO), Medio Lisina Hierro Agar (LIA) y Medio Rojo de Metilo Vogues-Proskauer (MR-VP).

TIPIFICACIÓN SEROLÓGICA

Las cepas identificadas como *E. coli* fueron tipificadas serológicamente mediante la técnica empleada en el Laboratorio de Serología de la Facultad de Medicina UNAM, de acuerdo con Ørskov y Ørskov (18), con sueros específicos SERUNAM®.

IDENTIFICACIÓN DE GENES ASOCIADOS A LA VIRULENCIA

Extracción de ADN por el Método de ebullición (52)

Se realizó a los cultivos identificados como *E. coli* de acuerdo a las pruebas bioquímicas.

1. Se colocaron 500 µl de agua inyectable en tubos eppendorf® de 1 mL.
2. Se tomó la cepa de cada uno de los cultivos identificados como *E. coli*, a partir de TSA con asa bacteriológica y se suspendieron en los tubos con agua inyectable.
3. Se hirvieron 5 min., utilizando un Thermo-Block ajustado a 100°C.
4. Los viales se retiraron del Thermo-Block y se colocaron en hielo durante 10 min.
5. Se centrifugaron 5 min. a 11,952 g (10 000 rpm).
6. Se obtuvo el sobrenadante donde se encuentra el ADN.

Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Se cuantificó el ADN y se realizó la técnica de PCR, para amplificar los genes de virulencia: *lt* y *st* (ETEC), *stx1* y *stx2* (EHEC), *bfpA* y *eaeA*, (EPEC) e *ial* (EIEC).

Las constantes de la reacción de amplificación que se utilizaron son:

- 2 min., 50 °C, 1 ciclo
- 5 min., 95 °C, 1 ciclo
- 45 seg., 95 °C, 50 °C y 72 °C, 35 ciclos
- Extensión final de 10 min., 72 °C.

Los productos obtenidos de la PCR se analizaron por electroforesis en un gel de agarosa en TBE (Tris-Borato-EDTA) al 1.2% a 86 Volts.

- El gel fue teñido con bromuro de etidio durante 20 min.

- Se visualizó en un transiluminador de rayos UV.
- Se utilizó un marcador de peso molecular de 100 pb para comparar la banda que amplificó.
- Se consideró positiva la muestra al aparecer una banda del tamaño esperado.

IDENTIFICACIÓN DE GRUPOS FILOGENÉTICOS

Se realizó la técnica de PCR para filogenia para las cepas identificadas como *E. coli*, mediante la técnica empleada en el Laboratorio de Patogenicidad Bacteriana del Hospital Infantil Federico Gómez, de acuerdo con Clermont, Bonacorsi y Bingen (53).

La reacción fue llevada a cabo con una mezcla de 25 µl, conteniendo 12.5 µl de PCR Master Mix (2x) © 2012 Thermo Fisher Scientific Inc., 1µl de cada uno de los iniciadores, 6µl de ADN. La PCR se realizó en el C1000™ Thermal Cycler, bajo las siguientes condiciones:

- Desnaturalización por 4 minutos a 94°C
- 30 ciclos de 5 segundos a 94°C
- Extensión final de 5 minutos a 72°C.

Los iniciadores utilizados fueron:

- *chuA.F* (59-GACGAACCAACGGTCAGGAT-39)
- *chuA.R* (59-TGCCGCCAGTACCAAAGACA-39)
- *yjaA.F* (59-TGAAGTGTCAGGAGACGCTG-39)

- *yjaA*.R(59ATGGAGAATGCGTTCCTCAAC-39)
- TspE4C2.F (59GAGTAATGTCTGGGGCATTCA-39)
- TspE4C2.R (59CGCGCCAACAAAGTATTACG-39)

El tamaño esperado para los fragmentos de ADN fue (53):

- *chuA*: 279 pb
- *yjaA*: 211 pb
- TspE4C2: 152 pb

Los productos obtenidos de la PCR se analizaron por electroforesis en un gel de agarosa en TBE (Tris-Borato-EDTA) al 1.2% a 86 Volts.

- El gel fue teñido con Gel Red™ Nucleic acid Gel Stain, 10000X in water.
- Se visualizó en un transiluminador de rayos UV.
- Se utilizó un marcador de peso molecular de 100 pb para comparar la banda que amplificó.

RESULTADOS

IDENTIFICACIÓN BIOQUÍMICA

Se analizaron 119 aislados obtenidos de 30 perros, 17 (75 aislados) clínicamente sanos, y 13 (44 aislados) de perros que presentaron cuadro clínico diarreico. De cada una de las 30 muestras estudiadas se seleccionaron de cinco a siete colonias, lo anterior con el interés de evaluar si los animales estaban colonizados por las bacterias aisladas.

El análisis de las pruebas metabólicas mostró que en 15 (88%) de los perros del grupo de animales clínicamente sanos, se identificó *E. coli* en por lo menos una de las colonias analizadas. Además este análisis mostró que 46 (61%) de los aislamientos obtenidos a partir de perros sin diarrea se identificaron como *E. coli*, 22 (30%) correspondieron a otros microorganismos provenientes del tracto digestivo y 6 (7%) de las colonias aisladas no pudieron ser identificadas por métodos bioquímicos tradicionales para enterobacterias (54) (Cuadro 1).

Con respecto a las muestras de perros que presentaron diarrea, se identificó la presencia de *E. coli* en 12 (92%) de los perros y *Klebsiella pneumoniae* en 7 (54%) de ellos. De las 44 colonias analizadas a partir de muestras de estos perros, 39 (89%) fueron identificadas como *E. coli* y 5 (11%) como *Klebsiella pneumoniae* (Cuadro 1).

Cuadro 1			
FRECUENCIA DE BACTERIAS AISLADAS DE MUESTRAS COLECTADAS POR HISOPO RECTAL DE PERROS SIN Y CON DIARREA			
Microorganismos identificados	Sin diarrea No. (%)	Con diarrea No. (%)	Total
<i>E. coli</i>	7 (41)	6 (46)	13
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Ninguno	1 (8)	1
<i>E. coli, Klebsiella pneumoniae</i>	3 (18)	6 (46)	9
<i>E. coli, No identificado*</i>	1 (6)	Ninguno	1
<i>Klebsiella pneumoniae, No identificado*</i>	2 (12)	Ninguno	2
<i>E. coli, Klebsiella pneumoniae, Citrobacter freundii</i>	2 (12)	Ninguno	2
<i>E.coli, Klebsiella pneumoniae, Proteus mirabilis</i>	2 (12)	Ninguno	2
Total	17	13	30
*No identificados con las pruebas bioquímicas empleadas para enterobacterias.			

TIPIFICACIÓN SEROLÓGICA

En el grupo de perros clínicamente sanos, se presentó con mayor frecuencia (33%) el serotipo O2:H6. Los serotipos O22:H1 y O157:H16 se identificaron en 2 perros. Además se identificaron únicamente en un animal los serotipos O185:H6, O2:H-, O32:H-, O36:H2, O15:H31, O?:H12, O25:H4, O153:H12, O?:H-, O128ab:H35, O?:H41, O85:H8, O?:H6, O176:H30, O23:H28, O169:H8, O11:H49, O185:H42, O113:H42, O?:H42, O74:H6 (Cuadro 2).

En el grupo de los perros que presentaron cuadro clínico diarreico, los serotipos O?:H25, O153:H1, O139:H1, O?:H1, O103:H49 fueron identificados respectivamente en 2 de los 13 perros incluidos en el estudio. Los serotipos O185:NM (no móvil), Dys4:H-, O?:H4, O103:H16, O137:H41, O22:H5, O96:H41, O11:H6, O26:H32, O139:H1 fueron identificados únicamente en uno de los perros (Cuadro 2). El serotipo O20:NM y los serogrupos O153, O22 y O11 fueron identificados tanto en el grupo de perros clínicamente sanos, como en el de los perros que presentaron cuadro clínico diarreico (Cuadro 2).

Cuadro 2
RESULTADOS DE LA TIPIFICACIÓN SEROLÓGICA DE CEPAS
DE E. coli AISLADAS DE PERROS SIN Y CON DIARREA

Serotipo	No. (%)		Total
	Sin diarrea	Con diarrea	
O2:H6	5 (33)	0	5
O22:H1	2 (13)	0	2
O157:H16	2 (13)	0	2
O20:H-	1 (7)	1 (8)	2
O103:H49	0	2 (17)	2
O139:H1	0	2 (17)	2
O153:H31	0	2 (17)	2
O?:H1	0	2 (17)	2
O?:H25	0	2 (17)	2

*Los serotipos O2:H-, O11:H49, O15:H31, O23:H28, O25:H4, O32:H-, O36:H2, O74:H6, O85:H8, O113:H42, O128ab:H35, O153:H12, O169:H8, O176:H30, O185:H6, O185:H42, O?:H6, O?:H12, O?:H41, O?:H42, O?:H-, fueron encontrados únicamente en uno de los perros aparentemente sanos.

* Los serotipos O11:H6, O22:H5, O26:H32, O96:H41, O103:H16, O137:H41, O185:H-, Dys4:H-, O?:H4 fueron encontrados únicamente en uno de los perros que presentaron cuadro clínico diarreico.

IDENTIFICACIÓN DE GENES ASOCIADOS CON LA VIRULENCIA DE *E. coli* QUE CAUSA DIARREA.

En 11 (73%) de l os per ros clínicamente sanos, s e i dentificaron c epas que presentaban por l o menos un o de los g enes analiz ados, en estos ad e más s e observó l a pr esencia de m ás de un g ene de l os distintos g rupos pat ógenos (Cuadro 3).

Al realizar el análisis por genes específicos se encontró en 11 (73%) de los perros sin di arrea, c epas de *E. coli* que am plificaron *eae* en f orma úni ca (33%) o combinado con otros genes (40%), *st* en 3 (20%) y *stx1* en 4 (27%). Además en este mismo grupo de animales, se identificaron las asociaciones *eae/st*, *eae/stx1* y *stx1/ st*, Con relación al grupo de per ros con cuadro clínico de diarrea, solo se identificó la presencia de *eae* en 11 (92%) animales (Cuadro 3).

Cuadro 3			
DETECCIÓN DE GENES ASOCIADOS CON LA VIRULENCIA EN CEPAS DE <i>E. coli</i> AISLADAS DE PERROS SIN Y CON DIARREA			
PERROS			
Genes de virulencia	No. (%)	No. (%)	Total
amplificados	Sin diarrea	Con diarrea	
<i>eae</i>	5 (33)	11 (92)	16
<i>st</i>	3 (20)	0	3
<i>stx1</i>	4 (27)	0	5
<i>eae, st</i>	5 (33)	0	6
<i>eae, stx1</i>	1 (7)	0	1
<i>stx1, st</i>	1 (7)	0	1

GRUPOS FILOGENÉTICOS

Con el árbol de decisión (Figura 1) diseñado por Clermont *et al.* (2000), se realizó la clasificación en grupos filogenéticos.

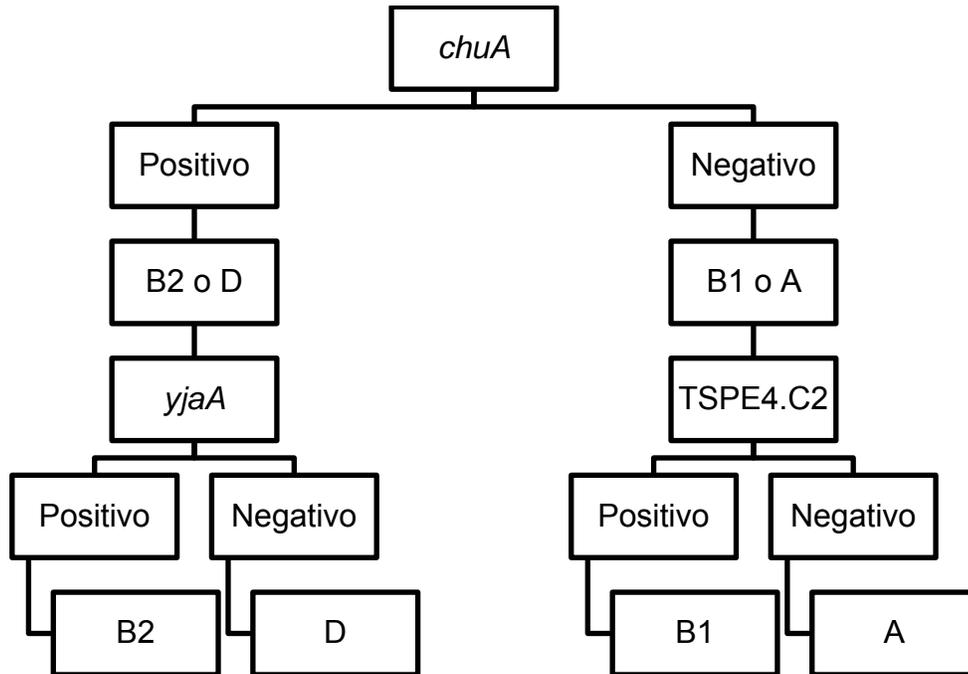


Figura 1 Árbol de decisión para determinar el grupo filogenético de cepas de *E. coli* de acuerdo con los resultados de la amplificación por PCR de los genes *chuA*, *yjaA* y el fragmento de DNA TSPE4.C2. Modificado de Clermont, Bonacorsi y Bingen (53).

La técnica de PCR multiplex para definir la ubicación filogenética de las cepas analizadas (Figura 2), gracias a las combinaciones entre la amplificación de los genes *chuA*, *yjaA* y el fragmento de ADN TSPE.C2, mostró que en el grupo de perros clínicamente sanos 5 (11%) cepas presentaron los genes que permiten incluirlas en el grupo filogenético A y 21 (46%) del grupo B1, en ambos grupos se incluyen las cepas definidas como comensales de *E. coli*.



Figura 2 Perfiles de PCR multiplex para grupos filogenéticos de *Escherichia coli*. Carril M Marcador de Peso Molecular (100pb). Carril 1 Cepa control de *Escherichia coli*. Carriles 2, 3, 4, 11, 12, 13 y 14 fragmento de ADN *TSPE4.C2*. Carril 5 genes *chuA*, *yjaA* y fragmento de ADN *TSPE4.C2*. Carril 6 gen *yjaA*. Carriles 7, 8 y 10 genes *chuA* y fragmento de ADN *TSPE4.C2*.

En los grupos D y B2 que incluyen las cepas consideradas extraintestinales virulentas se integraron 13 (28%) y 7 (15%) cepas respectivamente. Con relación a las cepas de *E. coli* aisladas de los perros con diarrea, 9 (23%) pertenecen al grupo A y 3 (8%) al B1, con relación a los grupos D y B2 que incluyen a las cepas virulentas se identificaron 22 (56%) y 5 (13%) cepas respectivamente (Cuadro 4).

Cuadro 4				
GRUPO FILOGENÉTICO AL QUE PERTENECEN LAS CEPAS DE <i>E. coli</i> ANALIZADAS.				
<i>E. coli</i>	Grupo filogenético (no. de cepas)	No. (%) de cepas que amplificaron:		
		<i>chuA</i>	<i>yjaA</i>	TSPE4.C2
Perros sin diarrea	A (5)	0	5 (11)	0
	B1 (21)	0	0	21 (46)
	D (13)	13 (28)	0	10 (21)
	B2 (7)	7 (15)	7 (15)	7 (15)
TOTAL	46	20 (43)	12 (26)	38 (83)
Perros con diarrea	A (9)	0	9 (23)	0
	B1 (3)	0	0	3 (8)
	D (22)	22 (56)	0	1 (3)
	B2 (5)	5 (13)	5 (13)	2 (5)
TOTAL	39	27 (69)	14 (36)	6 (15)

RELACIÓN ENTRE LOS RESULTADOS DE LA PRUEBA DE PCR PARA LA AMPLIFICACIÓN DE GENES ASOCIADOS CON LA VIRULENCIA DE *E. coli* Y DE GENES ASOCIADOS CON LA FILOGENIA DE *Escherichia coli*.

Al realizar la comparación entre la amplificación de *chuA* y la presencia de genes de virulencia en los perros sin diarrea, se encontró *eae* (1), *st* (2), *eae/st* (1), *st/stx1* (1) en las cepas de dichos animales. Con relación a *yjaA* se encontró que los aislados de dos perros amplificaron *eae*, 1 *st*, y en otro *eae/st*. El fragmento de DNA TSPE4.C2 se presentó en aislados de 4 de los perros que amplificaron el gen *eae*, en todos los perros que amplificaron tanto *st* como *stx1* respectivamente, en 3 de los perros que amplificaron *eae*, *st* y en todos los perros que amplificaron las asociaciones *st, stx1* (Cuadro 5).

En el grupo de los perros con diarrea, *chuA* se presentó en 9 de los 10 perros que amplificaron *eae*. Además se observó la amplificación del gen *yjaA* y el fragmento de ADN TSPE4.C2 en cepas de 4 perros que amplificaron también el gen *eae* (Cuadro 5).

Cuadro 5			
ASOCIACIÓN ENTRE LA PRESENCIA DE GENES DE VIRULENCIA Y GRUPOS FILOGENÉTICOS EN CEPAS DE <i>E. coli</i> AISLADAS DE PERROS SIN Y CON DIARREA			
Gene	Grupo filogenético	No. (%) Sin diarrea	No. (%) Con diarrea
<i>eae</i>	A	1 (4)	1 (4)
	B1	5 (23)	1 (4)
	D	0	19 (86)
	B2	1 (4)	3 (14)
<i>st</i>	A	0	0
	B1	2 (9)	0
	D	1 (4)	0
	B2	1 (4)	0
<i>Stx1</i>	A	0	0
	B1	4 (18)	0
	D	0	0
	B2	0	0
<i>eae, st</i>	A	1 (4)	0
	B1	3 (14)	0
	D	1 (4)	0
	B2	0	0
<i>eae, stx1</i>	A	0	0
	B1	1 (4)	0
	D	0	0
	B2	0	0
<i>st, stx1</i>	A	0	0
	B1	0	0
	D	0	0
	B2	1 (4)	0

DISCUSIÓN

Los coliformes son un grupo de bacterias que se encuentran colonizando el intestino de distintas especies (10, 55), en este trabajo se encontró como lo señala Betancor A (2006), que *E. coli* y *Klebsiella pneumoniae* forman parte de la microbiota de los perros. Aunque, se identificaron microorganismos como *Citrobacter freundii* y *Proteus mirabilis*, estos se aislaron en menor proporción. Algunas colonias aisladas no fueron identificadas, lo anterior pudiera estar relacionado con las pruebas bioquímicas empleadas, ya que el protocolo se diseñó para el aislamiento e identificación de enterobacterias, microorganismos de interés para este estudio.

La caracterización de los aislados de *E. coli* por tipificación con sueros específicos mostró la presencia del serogrupo O2, incluido dentro del grupo uropatógeno (UPEC) de importancia médica para el humano (56), a diferencia de lo demostrado por Cherifi A, *et al* (1991) y Johnson J R *et al* (2008) en sus estudios, donde identificaron en mayor proporción cepas pertenecientes al serogrupo O6.

El serogrupo O2 se detectó en el 33% de los perros que no presentaron diarrea, lo que indica que este serotipo causante del 75 al 90% de los episodios de infecciones urinarias en el humano de acuerdo con Mars CF, *et al* (2005), se encuentra colonizando a perros que aparentemente no manifiestan ningún signo de enfermedad, lo anterior sugiere que el perro podría estar actuando como reservorio de un serotipo de *E. coli* que puede ocasionar enfermedad en el humano.

Además en este grupo de perros sin diarrea, aunque en menor proporción, se identificaron serotipos como O 25:H4, O 85:H8 y O 153:H12 también del grupo UPEC. Por otro lado, en este grupo de perros sin diarrea también se identificaron cepas de los serogrupos O11, O15, O20, O25, O85 y O128 de EPEC, O113 y O157 pertenecientes al grupo EHEC y O rugoso identificado como parte de las cepas EAEC. En el grupo de los perros con diarrea los serotipos O 137:H41 y O26:H32 se presentaron en el 8% de estos, también se identificaron los serogrupos O11, O20, O139 y O153 pertenecientes al grupo ETEC, O26 que ha sido identificado dentro del grupo EHEC, y O? dentro del grupo EAEC, de acuerdo con la clasificación de Orskov y Orskov (1992).

Los serotipos O22:H1 y O15:H31 aislados en el 7% de los perros clínicamente sanos y los serotipos O137:H41 y O26:H32 que se presentaron en el 8% de los perros con diarrea, han sido identificados como STEC, grupo patógeno que al igual que el SUH ha sido clasificado por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como Enfermedad Transmitida por Alimentos (ETA), por lo que cobra importancia analizar las vías de transmisión, ya que se ha reportado su presencia en animales de compañía clínicamente sanos. Lo anterior sustenta la idea de que el perro puede actuar como reservorio de cepas de *E. coli* productoras de infecciones extraintestinales en el humano, consistente con el estudio realizado con anterioridad por Johnson JR *et al* (2001).

No se presentaron diferencias significativas en cuanto a los resultados de tipificación serológica entre los dos diferentes grupos de perros, señalando que los serotipos identificados se encuentran colonizando normalmente al perro. Además

la gran variedad de serotipos identificados en el estudio hace difícil establecer alguna otra relación entre ambos grupos de perros.

Con la prueba de PCR realizada para identificar la presencia de genes asociados con la virulencia de *E. coli* patógena, no se detectaron diferencias significativas entre el grupo de perros clínicamente sanos y el grupo de perros que no presentaron diarrea. Aproximadamente en el 80% de las muestras de los perros de ambos grupos se amplificó el gen cromosomal *eae* que codifica para la proteína de membrana externa (OMP) de 94 kDa, llamada intimina, necesaria para el proceso de adherencia íntima entre la bacteria y la membrana de las células del epitelio intestinal, como lo señala Rodríguez-Ángeles G (2002).

Lo anterior señala que a pesar del gran porcentaje de las muestras de perros que amplificaron el gen *eae*, *E. coli* puede no estar relacionada directamente con la producción de diarrea en el perro, ya que en ambos grupos se presentó la misma relación, es decir que este gen se encuentra presente en *E. coli*, colonizando el intestino del perro, sosteniendo nuevamente la idea de que el perro aun clínicamente sano puede actuar como reservorio en la transmisión de *E. coli* patógena como lo indicó previamente Beutin L *et al* (1999).

Además debe resaltarse la repercusión ambiental por la contaminación de los suelos, debida a la liberación de manera azarosa de las heces de las mascotas, principalmente de los perros, y a que es un problema de magnitud considerable que puede influir directamente en la transmisión de estas cepas patógenas para el humano.

El análisis filogenético mostró que en ambos grupos de perros, (clínicamente sanos y con diarrea) se amplificó el gen *chuA*, el cual ha sido referido para definir las *E. coli* virulentas productoras de infecciones extraintestinales como las de vías urinarias, septicemia, e incluso meningitis neonatal. Lo anterior confirma el impacto clínico y epidemiológico de los perros en la transmisión de *E. coli* patógenas para el humano, congruente con los estudios realizados por Marrs CF *et al* (2005), Johnson JR *et al* (2001) y Beutin L *et al* (1999).

Otro hecho relevante fue la relación de los grupos filogenéticos virulentos, basada en la clasificación de Clermont O *et al* (2000), y la presencia de genes asociados con cepas causantes de diarrea en humanos. Esta asociación fue mayor en el grupo de los perros que presentaron cuadro clínico diarreico, ya que a partir de las cepas de estos animales se amplificó principalmente *eae*, de EPEC, uno de los grupos patógenos causantes de diarrea en niños menores de cinco años según Nataro JP *et al* (1998), Wilson WR *et al* (2001) y Rodríguez-Ángeles G (2002).

Nuevamente tal observación nos plantea la relevancia de los perros y su posible participación en la transmisión de patógenos causantes de diarrea, hecho que debiera ser considerado cuando se plantea el origen de las enfermedades y en pocas ocasiones se atribuye a la convivencia estrecha con animales.

CONCLUSIONES

- I. El presente es el primer trabajo hecho en México, en el que se muestran datos sobre las características serológicas y genotípicas de cepas de *Escherichia coli* aisladas de perros.
- II. No se identificaron diferencias significativas en los resultados de las pruebas realizadas entre los aislados de perros clínicamente sanos y con cuadro clínico diarreico.
- III. Los serotipos de *Escherichia coli* que presentaron genes de virulencia se han reportado como causantes de enfermedades tanto intestinales como extraintestinales en el humano.
- IV. De acuerdo a los resultados del estudio, los perros pueden actuar como reservorio en la transmisión de *Escherichia coli* patógena al humano.

PROSPECTIVA

Los resultados sugieren la importancia de realizar nuevos estudios que permitan ampliar la información sobre la relación existente entre genes asociados con la virulencia y la ubicación filogenética de una de las bacterias de mayor impacto en infecciones intestinales y de vías urinarias en el humano.

Por lo anterior se pretende realizar pruebas de susceptibilidad bacteriana a quimioterapéuticos, a las cepas aisladas de perros que pertenecen a grupos patógenos de *Escherichia coli*, ya que diversos estudios han mostrado que cepas comensales de *Escherichia coli* aisladas de diferentes especies de animales de compañía presentan resistencia múltiple a antimicrobianos de uso terapéutico en humanos.

Asimismo se plantea obtener muestras de heces de humanos propietarios de perros, para realizar el aislamiento microbiológico y comparación de cepas de *Escherichia coli*, por medio de un análisis estadístico de razón de prevalencias, para poder establecer la correlación existente entre las cepas de *Escherichia coli* aisladas de perros, con los serotipos descritos como patógenos para humanos.

REFERENCIAS

1. Ortega-Pacheco A . La sobrepoblación canina: un problema con repercusiones potenciales para la salud humana. *Rev Biomed.* 2001;12:290-291.
2. Molina DVM, Efecto antihemorrágico del etamsilato comparado con placebo en gastroenteritis hemorrágica canina. *J Agricultr Anim Sc.* 2013;2:42-54.
3. Baqui A H, Black R E, Yu nus M D, Ho que ARA, Chowhuey HR, Sa ck RB . Methodological issues in diarrheal diseases epidemiology: definition of diarrheal episodes. *Int J Epidemiol* 1991;20:1057-1063.
4. Boschi-Pinto C, Ve lebit L , Sh ibuya K. Estimating child mortality due to diarrhea in developing countries. *Bulletin of the World Health Organization* 2008;86:70-71.
5. Velázquez FR , G arcía-Lozano H, R odríguez E , C ervantes Y , G ómez A , Melo M, *et al.* Diarrhea morbidity and mortality in Mexican children: impact of rotavirus disease. *Peadiatr Infect Dis J.* 2004; 23 Suppl:149-155.
6. Velázquez FR, C astellanos A , Luna G , *et. al.* Importancia de los agentes virales como causa de diarrea grave en los niños menores de cinco años de edad que requieren hospitalización y factores de riesgo asociados. En: las múltiples facetas de la investigación en salud. *Proyectos Estratégicos del Instituto Mexicano del Seguro Social.* 1ª ed. México: Editorial Sesante, S.A. de C.V., 2001.
7. Richardson V , H ernandez-Pichardo J , Q uintanar-Solares M , Esparza-Aguilar M , J ohnson B, G omez-Altamirano C M, *et. al.* Effect of rotavirus

16. Girão DM, Girão VB, Irino K, Gomes TA. Classifying *Escherichia coli*. *Emerg Infect Dis* 2006;12:1297-1299.
17. Parreira VR, Gyles CL. A novel pathogenicity island integrated adjacent to the *t_{hrW}* tRNA gene of avian pathogenic *Escherichia coli* encodes a vacuolating autotransporter toxin. *Infect Immun* 2003;71:5087-5096.
18. López-Álvarez J. *Escherichia coli*: Mecanismos de patogenicidad. *Ciencia Veterinaria* [en línea] [citado 10 de Noviembre de 2014] ; 1 (1): [39 pantallas]. Disponible en:
<http://www.fmvz.unam.mx/fmvz/cienciavet/revistas/CVvol1/CV1v1c01.pdf>.
19. Orskov F , Orskov I. *Escherichia coli* serotyping and disease in man and animals. *Can J Microbiol* 1992;38:699-704.
20. Bonacorsi S, Bingen E. Molecular epidemiology of *Escherichia coli* causing neonatal meningitis. *Int J Med Microbiol* 2005;295:373-81.
21. Flores-Abuxapquí J J, Suárez-Itoil GJ , Heredia-Navarrete M R, Puc-Franco MA, Franco-Monsreal J. Frequency of enterotoxigenic *Escherichia coli* in infants during the first three months of life. *Arch Med Res* 1994;25:303-306.
22. World Health Organization. Zoonotic non-O157 shiga toxin producing *Escherichia coli* (STEC). Report of a WHO scientific working group meeting. 1998.
23. Gutiérrez-Cázar Z , Qadri F , Albert MJ, Giron J A. Identification of enterotoxigenic *Escherichia coli* harboring longus type IV pilus gene by DNA amplification. *J Clin Microbiol* 2000;38:1767-1771.
24. McVeigh A, Fasano A, Scott DA, Jelacic S, Moseley SL, Robertson DC *et al*. IS1414 an *Escherichia coli* insertion sequence with a heat -stable

- enterotoxin gene embedded in a transposase-like gene. *Infect Immun* 2000;68:5710-5715.
25. Sears CL, Kaper JB. Enteric bacterial toxins: Mechanisms of action and linkage to intestinal secretion. *Microbiol Revs* 1996;60:167-215.
26. Cassels FJ, Wolf MK. Colonization factors of diarrheagenic *E. coli* and their intestinal receptors. *J Ind Microbiol* 1995;15:214-226.
27. Rodríguez-Ángeles G. Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. *Salud pública Mex* 2002; 44:464-475.
28. Girón JA, Ho A SY, Schoolnik GK. An inducible bundle-forming pilus of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Science* 1991;254:710-713.
29. Donnenberg MS, Girón JA, Kaper JB. A plasmid-encoded type IV fimbrial gene of enteropathogenic *Escherichia coli* associated with localized adherence. *Mol Microbiol* 1992;6:3427-3437.
30. Cravioto A, Gross RJ, Scotland SM, Rowe B. An adhesive factor found in strains of *Escherichia coli* belonging to the traditional infantile enteropathogenic serotypes. *Curr Microbiol* 1979;3:95-99.
31. Snyder JD, Wells JG, Yashuk J, Puhner N, Blake PA. Outbreak of invasive *Escherichia coli* gastroenteritis on a cruise ship. *Am J Trop Med Hyg* 1984;33:281-284.
32. Rico-Martínez MG. Biología molecular en la patogenicidad de *Shigella* sp y *Escherichia coli* enteroinvasiva. *Rev Latinoam Microbiol* 1995;37:367-385.
33. Halet T, Sansonetti P, Schad P, Austin S, Formal SB. Characterization of virulence plasmids and plasmids associated outer membrane proteins in

- Shigella flexneri*, *Shigella sonnei* and *Escherichia coli*. *Infect Immun* 1983;40:340-350.
34. Sethabutr O, Venkatesan M, Yam S, Pang LW, Smoak BL, Sang WK, *et al.* Detection of PCR products of the ipaH gene from *Shigella* and enteroinvasive *Escherichia coli* by enzyme linked immunosorbent assay. *Diagn. Microbiol Infect Dis* 2000;37:11-16.
35. Riley LW, Remis RS, Helgerson SD, McGee HB, Wells JG, Davis BR, *et al.* Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. *N Engl J Med* 1983;308:681-685.
36. Konowalchuk J, Speirs JI, Stavric S. *Vero* response to a cytotoxin of *Escherichia coli*. *Infect Immun* 1977;18:775-779.
37. O'Brien A, G D La Veck, M R Thompson, Formal S B. 1982. Production of *Shigella dysenteriae* type 1-like cytotoxin by *Escherichia coli*. *J Infect Dis* 1977;146:763-769.
38. Ojeda A, Prado V, Martínez J, Arellano C, Borczyk A, Johnson W *et al.* Sorbitol-negative phenotype among enterohemorrhagic *Escherichia coli* strains of different serotypes and from different sources. *J Clin Microbiol* 1995;33:2199-2201.
39. Ammon A, Petersen LR, Kar ch H. A large outbreak of hemolytic uremic syndrome caused by an unusual sorbitol-fermenting strain of *Escherichia coli* O157:H7. *J Infect Dis* 1999;179:1274-1277.
40. Donnenberg MSS, Tzipori S, McKee ML, O'Brien AD, Alroy J, Kaper JB. The role of the *eae* gene of enterohemorrhagic *Escherichia coli* in intimate attachment in vitro and in a porcine model. *J Clin Invest* 1993;92:1418-1424.

41. Cobeljic M , M ilijkovic-Selimovic B, Pa unovic-Todosije vic D, Ve lickovic Z , Lepsanovic Z, Savic D, *et al.* Enteroaggregative *Escherichia coli* associated with an outbreak of diarrhea in a neonatal nursery ward. *Epidemiol Infect* 1996;117:11-16.
42. Cravioto A, Tello A, Navarro A, Ruiz J, Villafan H, Uribe F, *et al.* Association of *Escherichia coli* Hep-2 adherence patterns with type and duration of diarrhea. *Lancet* 1991;337:262-264.
43. Bilge SS, Clausen CR, Lau W, Moseley SL. Molecular characterization of a fimbrial adhesin, F1845, mediating diffuse adherence of diarrhea-associated *Escherichia coli* to Hep-2 cells. *J Bacteriol* 1989;171:4281-4289.
44. Poitrineau P, Forestier C , Meyer M, Jallat C , Rich C, Malpuech G , *et al.* Retrospective case-control study of diffusely adhering *Escherichia coli* and clinical features in children with diarrhea. *J Clin Microbiol* 1995 ;33:1961-1962.
45. Cherifi A , Contrepolis M, Picard B , Gouillet P , Orskov I, Orskov F , *et al.* Clonal relationships among *Escherichia coli* serogroup O6 isolates from human and animal infections. *FEMS Microbiol Lett* 1991;80:225– 230.
46. Féria C, Machado J, Duarte CJ, Goncalves J, Gaastra W. Virulence genes and P fimbriae PapA subunit diversity in canine and feline uropathogenic *Escherichia coli*. *Vet Microbiol* 2001;82:81-89.
47. Garcia E, Bergmans HEN, Bosch van den JF, Orskov I, Zeijst van der BAM, Gaastra W. Isolation and characterization of dog uropathogenic *Escherichia coli* strains and their fimbriae. *Antonie van Leeuwenhoek* 1988;54:149-163.

48. Johnson J R, Delavari P, Stell AL, Whittam T S, Carlino U, Russo T A. Molecular comparison of extraintestinal *Escherichia coli* isolates from the same electrophoretic lineages from humans and domestic animals. *J Infect Dis* 2001;183:154–159.
49. Johnson JR, Johnston B, Clabots CR, Kuskowski MA, Roberts E, DeRoy C. Virulence Genotypes and Phylogenetic Background of *Escherichia coli* serogroup O6 isolates from humans, dogs, and cats. *J Clin Microbiol* 2008;46:417-422.
50. Karczmarczyk M, Abbott Y, Walsh C, Leonard N, Fanning S. Characterization of multidrug-resistant *Escherichia coli* isolates from animals presenting at a University Veterinary Hospital. *Appl Environ Microbiol* 2011;77:7113-7120.
51. Karczmarczyk M, Walsh C, Slowey R, Leonard N, Fanning S. Molecular Characterization of Multidrug-Resistant *Escherichia coli* isolates from Irish cattle farms. *Appl Environ Microbiol* 2011;77:7121–7127.
52. López-Saucedo C, Cerna J F, Villegas-Sepulveda N, Thompson R, Velázquez R, Torres J, Tarr P, *et al.* Single Multiplex Polymerase Chain Reaction To Detect Diverse Loci Associated with Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Emerg Infect Dis* 2003; 9:127-131.
53. Clermont O, Bonacorsi S, Bingen E. Rapid and Simple Determination of the *Escherichia coli* Phylogenetic Group. *Appl Environ Microbiol* 2000;66:4555-4558.

54. Farmer J J III. *Enterobacteriaceae*: Introduction and identification. *Manual of clinical microbiology*. 6^a ed. Washington D.C.:ASM Press, 1995:440.
55. Betancor A. El rol epidemiológico de las mascotas en el ciclo de la transmisión de cepas STEC. *Med Buenos Aires*. 2006;66 Supl 3:37-41.
56. Marrs C F, Zhang L, Foxman B. Escherichia coli mediated urinary tract infections: Are there distinct uropathogenic E. coli (UPEC) pathotypes? *FEMS Microbiol Letters*. 2005;252:183-190.
57. Johnson J R, Sell AL, Delavari P. Canine feces as a reservoir of extraintestinal pathogenic Escherichia coli. *Infect Immun* 2001;69:1306-1314.
58. Beutin L, Geier D, Steinruck H, Zimmermann S, Scheutz F. Prevalence and some properties of verotoxin (Shiga-like toxin)-producing Escherichia coli in seven different species of healthy domestic animals. *J Clin Microbiol* 1993;31: 2483-2488.
59. Beutin L. Escherichia coli as a pathogen in dogs and cats. *Vet Res* 1999;30:285-298.
60. Low D A, Braaten BA, Ling G V, Johnson D L, RUBY A L. Isolation and comparison of Escherichia coli strains from canine and human patients with urinary tract infections. *Infect Immun* 1988;56:2601-2609.