



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTILÁN

*COMPARACIÓN DE GENES DE VIRULENCIA, GRUPOS
FILOGENÉTICOS Y RESISTENCIA A β -LACTÁMICOS Y
FLUOROQUINOLONAS EN *Escherichia coli* O9 Y O104 AISLADA
DE DIFERENTES FUENTES.*

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

P R E S E N T A

CANALES BRAVO JESÚS

ASESOR:

M. en C. ARMANDO NAVARRO OCAÑA

CUAUTILAN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO. 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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES**

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

**M. en C. JORGE ALFREDO CUELLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE**

**ATN: M. EN A. ISMAEL HERNÁNDEZ MAURICIO
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán.**

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos a comunicar a usted que revisamos el: Trabajo de Tesis

Comparación de genes devirulencia, grupos filogenéticos resistencias a β -lactámicos y fluoroquinolonas en *Escherichia coli* 09 y 0104 aislada de diferentes fuentes

Que presenta el pasante: Jesús Canales Bravo

Con número de cuenta: 304067053 para obtener el Título de: Químico Farmacéutico Biólogo

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 21 de Octubre de 2014.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	<u>QFB. Dulce Ma. Ruvalcaba Sil</u>	
VOCAL	<u>M. en C. Armando Navarro Ocaña</u>	
SECRETARIO	<u>QFB. Jonathan Pablo Paredes Juárez</u>	
1er. SUPLENTE	<u>M. en C. Maritere Domínguez Rojas</u>	
2do. SUPLENTE	<u>QFB. Alejandro Gutiérrez García</u>	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al M. en C. Armando Navarro Ocaña, por brindarme la oportunidad de llevar a cabo este proyecto de tesis, por su asesoría, su apoyo y por la confianza que deposito en mí, por sus acertadas y oportunas correcciones, y por su valioso tiempo dedicado a la revisión de esta tesis.

A la Bióloga Delia Licona por su apoyo en la realización de todas las técnicas empleadas en este trabajo, gracias por tenerme paciencia, creo que aparte de enseñarme como preparar medios de cultivo, PCR's, etc, te agradezco tus consejos, me ayudaron mucho en mi desarrollo personal, gracias por tu amistad, gracias a Pepe también, ambos son excelentes personas.

Al Técnico Luis León y a Gabriel Pérez por su asesoría en el desarrollo de la serología, gracias por hacer muy agradable mi estancia en el Laboratorio, también agradezco a mis compañeros de servicio social Ivonne, Alfredo, Juan Carlos, me la pase muy bien con ustedes, gracias por dejarme conocerlos.

También manifiesto mi más profundo agradecimiento a mis sinodales: QFB. Dulce Ruvalcaba Sil, QFB. Jonathan Pablo Paredes, M. en C. Maritere Domínguez Rojas, y QFB. Alejandro Gutiérrez García, por sus sugerencias y observaciones que contribuyeron a mejorar la calidad y contenido de este trabajo.

Agradezco en especial a mi padre y mejor amigo Faustino y a mi hermano del alma Miguel, sin su apoyo no lo hubiera logrado, creo que ustedes son la pieza más importante de mi ser y de mi persona, gracias por sus valiosos consejos y por darme ánimos en esos momentos en los que me dejaba dominar por la apatía, son los mejores.

Gracias a mi madre María de Jesús por darme la vida, sino fuera por usted yo no existiría, y aunque tal vez no me crea, la quiero mucho. Gracias a mi hermana Ana, tú tienes tres grandes razones por las cuales me esfuerzo día con día para ser una mejor persona, creo que debo de ser un ejemplo de vida para ustedes Yael, Hatzel y Josselin los amo a todos, son mi Familia.

Gracias a la Universidad Nacional Autónoma de México por abrirme las puertas, por brindarme la oportunidad de obtener conocimientos y experiencias de vida, por dejarme conocer personas magnificas, como por ejemplo a la chica que cada que pienso en ella se me dibuja una sonrisa en el rostro, Gracias Ivy por tu amistad, por tu cariño, por tu amor, hoy en día eres una persona súper importante para mí, que bueno que te conocí en esta etapa tan importante de mi vida, gracias al destino por ponerte en mi camino, te amo mucho.

En esta misma institución conocí a grandes camaradas como Daniel, Xavi, Ax, Neto, Edgar, Roy, Liz, Silvia, Iván, Isaac, Bruno, Julio, Patricio, Raúl, Diego, Vladimir, Jorge, Elías, Omar, etc, etc, con los que compartí varios años de mi vida, en lo personal me dejaron grandes aprendizajes, sé que me faltaran por mencionar muchos compañeros, pero creo que si lo hago llenaría varias hojas, así es que mejor terminare por agradecer a mis amigos de toda la vida, Francisco, Eduardo, Ángel, Sergio y John, chido por su amistad pandilla.

Este trabajo tuvo el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología CONACyT-SEP mediante el Proyecto de Ciencia Básica: Obtención de un Inmunógeno polivalente con capacidad protectora contra diferentes enterobacterias, con clave: CB-2012-01/ 000179000.

“Querer es una gran cosa, porque la Actividad y el Trabajo son consecuencias generalmente de la Voluntad, y casi siempre el Trabajo va acompañado del Éxito. Trabajo, Voluntad y Éxito llenan la vida de un hombre. La Voluntad abre las puertas del Éxito con brillantez y felicidad; el Trabajo hace pasar a través de estas puertas, y al final del viaje el Éxito corona los esfuerzos realizados.” - Luis Pasteur

“La literatura es una fuerza en el mundo y no me imagino la vida sin literatura. Aunque haya un lector o haya un millón, siempre hay un lector y un libro. Es una relación uno a uno, autor y lector colaborando juntos. En cierto sentido, es el único lugar del mundo donde dos personas pueden conocerse y reunirse en términos de igualdad. La gente habla de la muerte de la literatura, pero yo creo que no se va producir.” - Paul Auster

ÍNDICE GENERAL

Contenido	No. De páginas
I. Resumen	1
II. Introducción	3
II.1 Características generales de <i>Escherichia coli</i>	3
II.2. <i>E. coli</i> enteropatógena	4
II.2.1. Factores de virulencia	5
II.3. <i>E. coli</i> productora de toxina Shiga	7
II.3.1. Factores de virulencia	8
II.3.2. <i>E. coli</i> enterohemorrágica	10
II.4. <i>E. coli</i> enteroagregativa	11
II.4.1. Factores de virulencia	12
II.5. Grupos filogenéticos	14
II.6. Mecanismo de acción de los antimicrobianos	15
II.6.1. Mecanismos de resistencia a antimicrobianos	17
II.6.2. Beta lactamasas de espectro extendido	19
III. Antecedentes	20
IV. Justificación	22
V. Objetivo General	24
V.1. Objetivos particulares	24

VI. Metodología	25
VI.1. Cepas bacterianas	25
VI.2. Identificación bioquímica	25
VI.3. Serotipificación: Caracterización antigénica de los cultivos de <i>E. coli</i>	25
VI.4. Identificación del serogrupo de las cepas por reacciones de microaglutinación	26
VI.5. Ensayos de absorción de suero de conejo anti- <i>E. coli</i> O104 y anti- <i>E. coli</i> O9	26
VI.6. Serología de antígeno flagelar H	27
VI.7. Extracción de ADN	27
VI.8. Grupos filogenéticos y factores de virulencia	28
VI.8. Determinación de patrones de resistencia a antimicrobianos mediante pruebas de difusión de disco en agar	31
VII. Resultados	33
VIII. Discusión de Resultados	53
IX. Conclusiones	60
X. Referencias Bibliográficas	61

INDICE DE CUADROS Y FIGURAS

Contenido	No. De páginas
Cuadro 1. Secuencia de iniciadores utilizados para la identificación de grupos filogenéticos y genes de virulencia.	29
Cuadro 2. Mezclas de reacción para la amplificación de genes de virulencia y de filogrupo.	30
Cuadro 3. Condiciones del termociclador y concentraciones utilizadas para cada PCR.	31
Cuadro 4. Interpretación por el diámetro inhibición.	32
Cuadro 5. Origen y año de aislamiento de cepas de <i>E. coli</i> O9 aislada de niños menores de 2 años.	33
Cuadro 6. Cepas de <i>E. coli</i> O9 aisladas de animales.	34
Cuadro 7. Cepas de <i>E. coli</i> O104 aisladas de muestras de heces de niños menores de dos años de diferentes zonas geográficas.	35
Cuadro 8. Serotipos identificados en cepas de <i>E. coli</i> O9 y O104 aisladas de diferentes fuentes.	37
Cuadro 9. Títulos de aglutinación de sueros anti- <i>E. coli</i> O9 y anti- <i>E. coli</i> O104 sin absorber y absorbidos.	38
Cuadro 10. Títulos de aglutinación de sueros anti- <i>E. coli</i> O9 y anti- <i>E. coli</i> O104 sin absorber y absorbidos contra cepas de <i>E. coli</i> O104.	39
Cuadro 11. Títulos de aglutinación de sueros anti- <i>E. coli</i> O9 y anti- <i>E. coli</i> O104 sin absorber contra cepas de <i>E. coli</i> O9.	40

Cuadro 12. Relación de grupos filogenéticos, factores de virulencia y patotipos en cepas de <i>E. coli</i> O9 aisladas de niños menores de 2 años de diferentes zonas geográficas.	43
Cuadro 13. Relación de grupos filogenéticos con los serotipos de cepas de <i>E. coli</i> O9 aislada de muestras de bovinos y aves.	44
Cuadro 14. Relación de grupos filogenéticos, factores de virulencia y patotipos de cepas de <i>E. coli</i> aisladas de casos de diarrea infantil de diferentes zonas geográficas.	47
Cuadro 15. Halos de inhibición obtenidos en la cepa control <i>E. coli</i> ATCC 25922.	48
Grafica 1. Porcentajes de resistencia a antimicrobianos en cepas <i>E. coli</i> O9 aisladas de humanos.	49
Grafica 2. Porcentajes de resistencia a antimicrobianos en cepas <i>E. coli</i> O104 aisladas de humanos.	49
Grafica 3. Porcentajes de resistencia a antimicrobianos en cepas <i>E. coli</i> O9 aisladas de aves.	50
Grafica 4. Porcentajes de resistencia a antimicrobianos en cepas <i>E. coli</i> O9 aisladas de bovinos.	51
Figura 1. Adherencia localizada de una cepa de <i>E. coli</i> enteropatógena en células HeLa.	6
Figura 2. Patrón de adherencia de <i>E. coli</i> enteroagregativa (EAEC) en células HEp-2.	11

Figura 3. Árbol de decisión dicotómica de Clermont.	42
Figura 4. Electroforesis de genes utilizados para la agrupación filogenética en gel de agarosa al 1.5 %.	42
Figura 5. Electroforesis de gen <i>aggR</i> en gel de agarosa al 1.5 %.	46
Figura 6. Electroforesis de gen <i>aap</i> en gel de agarosa al 1.5 %.	46

ABREVIATURAS

DEC	<i>Escherichia coli</i> diarreogénica
EPEC	<i>Escherichia coli</i> enteropatógena
STEC	<i>Escherichia coli</i> productora de toxina Shiga
EHEC	<i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica
EAEC	<i>Escherichia coli</i> enteroagregativa
ADEC	<i>Escherichia coli</i> de adherencia difusa
EIEC	<i>Escherichia coli</i> entero invasiva
UPEC	<i>Escherichia coli</i> uropatógena
ECOR	Cepas de referencia estándar de <i>E. coli</i> aisladas de poblaciones naturales.
ExPEC	<i>Escherichia coli</i> patógeno extra intestinal
ATCC	American type culture collection
AND	Ácido desoxiribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
LT	Toxina termolábil de ETEC
ST	Toxina termoestable de ETEC
Gb3	Globotriacilceramida
DNTP's	Desoxinucleotidos trifosfatados

PCR	Reacción en cadena polimerasa
Taq	Polimerasa <i>Termus aquaticus</i>
TBE	Tris-borato-EDTA
MPM	Marcador de peso molecular
OMP	Protein outer membrane
LPS	Lipopolisacarido
SUH	Síndrome urémico hemolítico
CH	Colitis hemorrágica
ITU's	Infecciones del tracto urinario
NeuNAc	Ácido α -N-acetimurámico
GalNAc	N-acetil galactosamina
Gal	Galactosa
LEE	Locus de esfacelamiento del enterocito
<i>Bfp</i>	Bundle forming pilus
<i>Stx</i>	Toxina tipo Shiga
<i>ehxA</i>	Enterohemolisina
<i>pAA</i>	Plásmido de adherencia agregativa
<i>AAF</i>	Fimbrias de adherencia agregativa
<i>eafA</i>	Factor de adherencia de EPEC
<i>EAST</i>	Enteroagretive <i>E. coli</i> stable toxin
<i>Pet</i>	Plasmid-encode toxin
<i>SPATE</i>	Serine protease autotransporter of Enterobacteriaceae
WHO	World Health Organization

ECDC	European Centre for Disease Prevention and Control
SSTIII	Sistema de secreción tipo tres
SIM	Sulfuro Indol Motilidad
KIA	Agar Hierro de Kliger
TSA	Agar Soya Trypticaseína
MR-VP	Rojo de Metilo- Vogues Proskauer
LB	Luria Bertain
PBP's	Proteínas de unión de penicilina
PABA	Ácido para-amino benzoico
CIM	Concentración mínima inhibitoria
FOX	Cefoxitina
CRO	Ceftriaxona
CAZ	Ceftazidima
CTX	Cefotaxima
FEP	Cefepima
IPM	Imipenem
ATZ	Aztreonam
OFX	Ofloxacina
NOR	Norfloxacina
CIP	Ciprofloxacina
NA	Ácido Nalidíxico
STX	Trimetoprim/Sulfa-metoxazol
TE	Tetraciclina

I. RESUMEN

Escherichia coli O104:H4 productora de toxina Shiga (STEC) fue responsable en 2011 de un brote de colitis hemorrágica (CH) y síndrome urémico hemolítico (SUH) en países de la comunidad Europea. Dada la importancia clínica y epidemiológica que adquirió el serogrupo, analizamos 121 cultivos conservados en el cepario del laboratorio de Salud Pública UNAM identificados como *E. coli* de los serogrupos O9 y O104; ya que previamente fue reportado que el antígeno somático de *E. coli* O104 presenta epitopos compartidos con el antígeno capsular de *E. coli* O9. **El objetivo** del presente trabajo fue establecer la relación antigénica entre *E. coli* O9 y O104, definir los serotipos de dichas cepas, conocer los genes de virulencia que presentan, el grupo filogenético al que pertenecen y evaluar sus perfiles de resistencia a diferentes antibióticos. **Material y Métodos.** Se analizaron 121 cultivos obtenidos de estudios epidemiológicos realizados en México, Egipto, Argentina y Bangladesh. Los serotipos y las reacciones cruzadas se identificaron a través de ensayos de microaglutinación en placa utilizando sueros obtenidos en conejo dirigidos contra los antígenos somáticos (O) y flagelar (H) de *E. coli*. Mediante la técnica de la reacción de la polimerasa (PCR) se analizó la presencia de los genes *eae*, *bfp*, *eafA*, *stx1*, *stx2*, *aatA*, *aggR* y *aapA* de los patotipos EPEC, STEC y EAEC, y los genes *chuA*, *yjaA* y TspE4 para su ubicación filogenética. La resistencia a los antimicrobianos se determinó por el método de Kirby-Bauer (difusión en agar).

Resultados. El 75 % de los cultivos fueron aislados de muestras de heces de 57 niños menores de dos años con y sin diarrea de México, Egipto, Argentina y Bangladesh, el otro 25 % de los aislamientos se obtuvieron de muestras rectales de un hato de 45 vacas lecheras de México. El periodo de obtención de muestras comprendió del año 1985 hasta el 2013. Los resultados obtenidos de la tipificación serológica mostraron que 25 cepas del serogrupo O104,

presentaron una reacción de aglutinación con los sueros anti-O9 y anti-O104 a títulos elevados, esta reacción cruzada se eliminó mediante obtención de sueros específicos o absorbidos contra los antígenos heterólogos. Los serotipos identificados en cepas *E. coli* O104 fueron: O104:H4 (35 %), O104:H12 (30 %), O104:NM (9 %), O104:H7 (4 %) y O104:H12 (22 %) estas últimas fueron de origen bovino; en el caso de *E. coli* O9 aislada a partir de humanos se identificaron trece serotipos siendo los más frecuentes, O9:NM (30 %), O9:H25 (19 %) y O9:H33 (5 %), con respecto a las cepas de *E. coli* O9 de origen animal se identificaron 7 serotipos, el más frecuente fue O9:NM con 11 (11 %) aislamientos. El análisis de filogrupos mostró que la mayoría de las cepas pertenecen a los grupos A (59 %), B1 (38 %) y D (3 %). Las cepas de *E. coli* O104 presentaron los genes de virulencia *stx1* (78 %), *eae* (44 %), *app*, *aggR* y *aatA* (39 %), por lo que se pudieron clasificar como STEC, EPEC-A, EAEC, EHEC. El mismo ensayo en *E. coli* O9 mostró la presencia del gen *eae* (10 %), *bfp* (3 %), *stx1* (26 %), *aggR* (32 %), *aap* (8 %) y *aatA* (4 %), por lo que estas cepas se agruparon dentro de los patotipos STEC, EPEC-A, EAEC. La presencia de estos genes indica una gran plasticidad genética y la capacidad de recombinación de estos microorganismos para incorporar en su genoma material genético de otros microorganismos. Por otra parte las cepas de origen bovino presentaron los porcentajes de resistencia a antibióticos más altos, 74 % a trimetoprim sulfametoxazol y 65 % a tetraciclina, las cepas de origen humano también presentaron una marcada resistencia a estos antibióticos. **Conclusión** *E. coli* O104 presenta epitopos compartidos con *E. coli* O9 y aunque presentan genes de virulencia de *E. coli* asociada con diarrea, se ubican principalmente en los grupos filogenéticos definidos como comensales, los porcentajes de resistencia encontrados sugieren que se debe controlar el empleo de los antimicrobianos en el tratamiento de las infecciones intestinales.

II. INTRODUCCIÓN

II.1. Características generales de *Escherichia coli*

E. coli es una bacteria que coloniza el tracto gastrointestinal del humano desde las pocas horas del nacimiento estableciendo una relación de mutuo beneficio con su hospedero, este microorganismo presenta una doble función, por un lado existen clonas que forman parte de la microbiota normal del intestino y son indispensables para la adecuada función de este y por otro se reconocen variedades asociadas con infecciones intestinales, estas últimas se conocen como *E. coli* diarreogénica (DEC) [Nataro J, 1998]. *E. coli* es un integrante de la familia *Enterobacteriaceae*, es un bacilo Gram negativo, no formador de esporas, puede ser inmóvil, pero usualmente cuenta con flagelos peritricos, frecuentemente presenta una cápsula, por lo que algunas cepas presentan colonias mucoides, la mayoría son fermentadoras de lactosa y glucosa con producción de ácido y de gas dentro de las primeras 24 horas de incubación a 37 °C, carecen de la enzima oxidasa, es un anaerobio facultativo, crece a temperaturas desde 25-45 °C y puede sobrevivir a temperaturas de refrigeración y congelación. El pH óptimo para su crecimiento es de 7.0 aunque crece en un intervalo de pH de 4.4-9.0 [Rodríguez-Ángeles, 2002]. Los aislamientos de *E. coli* se pueden serotipificar en base a que presenta 3 tipos de antígenos de superficie: los antígenos somáticos O (lipopolisacáridos o LPS), capsulares K (polisacáridos) y flagelares (flagelina de naturaleza proteica). En 1940 Kauffman desarrollo un esquema de serotipificación que continuamente varía y actualmente presenta 186 antígenos somáticos O, 60 antígenos capsulares K y 53 antígenos flagelares H [Orskov, 1984].

El antígeno O se caracteriza por ser termoestable en la superficie de todas las enterobacterias, además de que es el responsable del serogrupo, mientras que el antígeno K corresponde al polisacárido capsular. Con respecto a los antígenos flagelares H son termolábiles, de forma que se inactivan al calentarlos a 100 °C durante 30 min. La determinación del antígeno somático y flagelar indica el serotipo (formula O:H) de una cepa, el cual en ocasiones se asocia con un cuadro clínico en particular [Orskov F, 1984].

***E. coli* diarreogénica**

De acuerdo al cuadro clínico que producen, los factores de virulencia y su distribución epidemiológica, *E. coli* diarreogénica se ha agrupado en seis tipos patógenos [Nataro, 1998] conocidos también como patotipos, estos son designados como: *E. coli* enteropatógena (EPEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* con adherencia difusa (DAEC) y *E. coli* productora de la toxina tipo Shiga (STEC) [Kaper, 2004].

II.2 *E. coli* enteropatógena

EPEC es uno de los principales agentes causantes de diarrea infantil en países en vías de desarrollo, actualmente las cepas EPEC se clasifican en cepas típicas y atípicas, siendo más frecuente encontrar estas últimas en países industrializados [Trabulsi, 2002]. Las cepas EPEC típicas (EPEC-T) contienen el gen *eae* que se relaciona con la proteína denominada intimina, la cual permite la adherencia íntima a las microvellosidades del enterocito y por lo tanto es responsable de las lesiones de adherencia y esfacelamiento (borramiento) (**A/E**) de dichas células, además presentan en el plásmido EAF el gen (*bfpA+*), que codifica para fimbrias formadoras de haces, mientras que las cepas clasificadas como EPEC atípicas

(EPEC-A) pueden producir el fenotipo A/E, pero no contienen el plásmido EAF (*bfpA*-) [Afset, 2004], las cepas que son *eae* positivas y además contienen genes que codifican para la producción de toxina Shiga (*stx1* y/o *stx2*) son clasificadas como *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) [O'Brien, 1987].

En general las cepas típicas son más homogéneas en sus características de virulencia, con escasas excepciones, producen los factores de virulencia codificados en la isla de patogenicidad de 35-kb denominada "locus of enterocyte effacement" (LEE), y los del plásmido EAF, en contraste las cepas atípicas, frecuentemente expresan la toxina EAST1 (EAEC), y otros factores de virulencia no contenidos en la isla LEE [Trabulsi, 2002].

II.2.1. Factores de virulencia

Modelo de adherencia y esfacelamiento. Este modelo es el más destacado de las patologías debidas a este microorganismo, la principal característica es la eliminación de las microvellosidades del enterocito y la íntima adherencia entre la bacteria y la membrana de la célula epitelial, surgen cambios importantes en el citoesqueleto, involucrando cambios que incluyen la acumulación de la polimerización de actina, por debajo de las bacterias adheridas, lo que provoca cambios en la secreción de agua y electrolitos por el epitelio, y por lo tanto el aumento de la permeabilidad de la membrana, lo cual impide la función de absorción del intestino [Brüssow, 2014].

Adherencia localizada. En 1979 Cravioto A y cols, fueron los primeros en describir que las cepas EPEC se adhieren en forma localizada a células HEp-2 las cuales provienen de células cancerosas de laringe de humano. Posteriormente Baldini [1983] demostró que esta característica es dependiente de la presencia de un plásmido de 60-MDa, este plásmido fue

designado como el Factor de Adherencia de EPEC (EAF). Posteriormente Girón [1991] describió una fimbria de 7-nm de diámetro producida por cepas EPEC las cuales tendían a agregarse y formar haces, por lo tanto se sugirió el nombre “bundle-forming pilus” (BFP). La secuencia del gen *bfpA* (BFP) de diferentes cepas EPEC mostro tener un alto grado de homología y parece ser específico de EPEC [Gunzburg, 1995].

Transducción de señales. La adherencia de EPEC a las células epiteliales induce una variedad de vías de transducción de señales. Los genes bacterianos responsables de activar esta señalización son codificados en una isla de patogenicidad de 35-kb denominada LEE, los cuales codifican para sistemas de secreción tipo III, además de secretar múltiples proteínas. [Nataro, 1993]

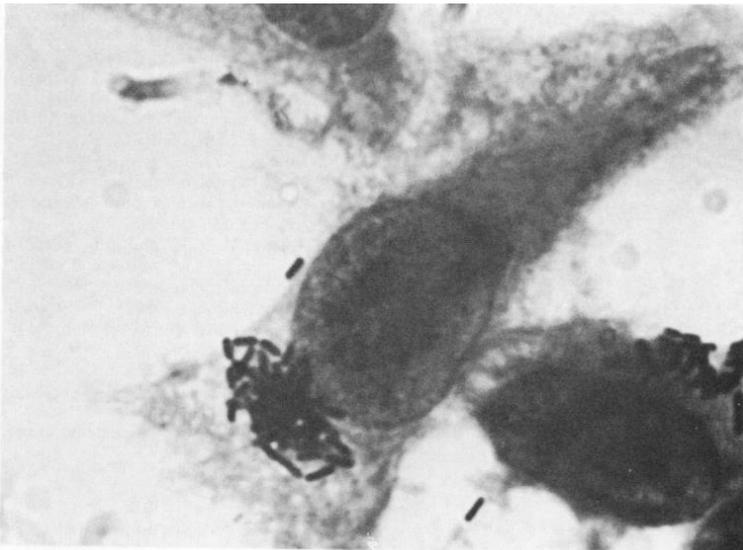


Figura 1. Adherencia localizada de una cepa de *E. coli* enteropatógena en células HeLa. EPEC presenta la propiedad de adherirse en forma de microcolonias a células epiteliales. [Scaletsky, 1984]

Intimina. Otro de los factores de virulencia importantes de las EPEC es su sistema de adherencia al epitelio intestinal, lo cual lo realiza por medio de una proteína de membrana externa llamada intimina cuyo peso varía entre 94 a 97 kDa, codificada por el gen *eae*, localizado en la isla de patogenicidad *LEE*. Este gen no es exclusivo de las EPEC, ha sido

descrito en otras especies que causan lesiones del tipo A/E y son responsables de diferentes tipos de diarrea como la causada por las cepas STEC [Nataro, 1998]. El gen *eae* presenta dos subunidades: la *eaeA* y la *eaeB*. Por lo que respecta a la primera (*eaeA*) codifica para la intimina, esta es necesaria, aunque insuficiente para la producción de la lesión A/E en los enterocitos, que al unirse a sus receptores en la superficie de las células eucariotas, funciona como soporte de los filamentos de actina [Louie, 1993]. En cuanto a la subunidad *eaeB*, este codifica para la secreción de una proteína de 37 kDa, denominada Tir, la cual resulta muy representativa de la actividad de este microorganismo, ya que es translocada para que se incorpore en la superficie de los enterocitos, a fin de que funcione como receptor de intimina y, consecuentemente se produzcan lesiones A/E [Foubister, 1994]. La adherencia inicial del microorganismo aun incluye eventos desconocidos, sin embargo, se ha detectado que una vez que la bacteria se ha adherido, inyecta Tir en la membrana de la célula hospedera, a través de una serie de proteínas bacterianas, estas integran el sistema de secreción tipo III (SSTT III), la mayoría de las cuales se encuentra codificada en *LEE* [Nataro, 1998]. Los pedestales que se forman debajo de la bacteria se componen principalmente de actina polimerizada y otras proteínas relacionadas, tales como fibrina, miosina, talina y ezrina. Evidentemente, dicha reorganización del citoesqueleto altera la fisiología y morfología de la región apical de las células intestinales, lo que conduce a su disfunción y a la pérdida de microvellosidades [Campellone, 2003].

II.3. *E. coli* productora de toxina Shiga (STEC).

Estudios sobre la frecuencia de aislamiento de esta bacteria tanto en humanos y animales en México, muestran que no es mayor al 2.5%, hecho que a su vez podría ser el principal motivo de la baja incidencia de los cuadros clínicos relacionados con el

microorganismo [Navarro, 2007]. El serotipo O157:H7 es el más representativo de un subgrupo de STEC denominado EHEC, considerando de mayor importancia en países desarrollados, ya que provoca aproximadamente el 10 % del total de los casos de diarrea aguda, el 90 % de colitis hemorrágica (CH), el 10 % de casos de síndrome urémico hemolítico (HUS) en pacientes menores de 10 años, [Nataro, 1998].

II.3.1. Factores de virulencia

Toxina Shiga. Las toxinas Stx corresponden a exotoxinas del tipo A-B, cuyo fragmento tóxico A escinde a las moléculas de ARNr, impidiendo la síntesis proteica de las células humanas a nivel de la traducción; es el principal factor de patogenicidad de STEC. La familia de las toxinas Stx contiene 2 miembros principales los cuales no cruzan inmunológicamente, denominados Stx1 y Stx2; una misma cepa puede sintetizar una de ellas o ambas, e inclusive múltiples variantes de Stx2. [O'Brien, 1987; Scheutz, 2012]. La Stx1 es idéntica a la toxina producida por *Shigella dysenteriae* tipo 1, excepto en algunos casos donde se aprecia un residuo de diferencia; los prototipos de Stx1 y Stx2 manifiestan una identidad de solo 55 y 57 % en las subunidades A y B, respectivamente [Jackson, 1987].

El grupo de la Stx2 es un grupo muy heterogéneo, hasta ahora se han descrito hasta 7 subtipos diferentes que se identifican con una letra arábiga minúscula, Stx2a, Stx2b, hasta Stx2f, donde se encontraron 30 variedades para Stx2a, 24 para Stx2c y 26 para Stx2d, mientras que para Stx1 existen los subtipos Stx1a, Stx1c y Stx1d [Scheutz, 2012]. La estructura A-B se encuentra conservada en toda la familia Stx, formada por una subunidad A y 5 subunidades B, la subunidad única puede ser escindida proteolíticamente, produciendo un fragmento A1 de 28 kDa, y otro A2 de 4 kDa, las cuales permanecen unidas a través de un

punto de disulfuro. El péptido A1 posee la actividad enzimática, en tanto que, A2, es el responsable de la unión con el pentámero que integra la subunidad B; dicho pentámero es la molécula ligando, que se fija a la célula “blanca”, particularmente a su receptor específico que es el glucolípido globotriacilceramida (Gb3), presente en las células eucariotas [Nataro, 1998]

Cuando la toxina se une a su receptor, esta es endocitada y transportada al aparato de Golgi y, posteriormente, hasta el retículo endoplásmico rugoso [Brüssow, 2014]. Finalmente, la subunidad A pasa al citoplasma de la célula eucariota, en donde ejerce su acción sobre la unidad ribosomal 60 S; específicamente, el péptido A1 corresponde a una N-glucosamina que elimina un solo residuo de adenina del ARN 28S de los ribosomas, con lo cual inhibe la síntesis proteica. Evidentemente, el bloqueo de la síntesis proteica produce la muerte de las células endoteliales del riñón, de las células epiteliales del intestino y de células HeLa que provienen de células de cáncer cérvico uterino humano, Vero (células de riñón de mono verde) u otras células con su receptor específico [Nataro, 1998].

Ambas toxinas se encuentran codificadas por bacteriófagos insertados en el cromosoma de la bacteria y permanecen en estado lisogénico, los bacteriófagos han tenido un papel importante en la evolución de muchas bacterias, ya que cuando se integran en el genoma bacteriano y se establece la lisogenia, pueden modificar las propiedades de la célula huésped, este proceso se conoce como conversión fágica. Además de esta manera la bacteria se vuelve inmune a la infección por otro bacteriófago del mismo tipo. La presencia de genes que codifican factores de virulencia en el genoma de estos bacteriófagos constituye un mecanismo eficaz de diseminación de los mismos entre diferentes especies bacterianas. Este mecanismo pudo haber provocado la dispersión de los genes *stx* que se ha producido en diferentes especies bacterianas; se han encontrado estos genes un número muy variados de serotipos, e incluso

en otras especies bacterianas diferentes de *E. coli*, como *Citrobacter freundii* y *Enterobacter cloacae* [Vázquez, 2008]. La Stx es citotóxica –*in vitro* e *in vivo*- para las células endoteliales del riñón humano, la típica histopatología renal incluye edema en las células del endotelio glomerular y el establecimiento de plaquetas y fibrina dentro del glomérulo, lo que conduce al estrechamiento de la luz de los capilares y a la oclusión de los vasos glomerulares, a continuación aparecen dos signos característicos del HUS: la reducción en el grado de filtración glomerular ocasiona la falla renal y la mayor fricción de los eritrocitos con las paredes vasculares ocluidas genera la fragmentación de dichas células rojas [Nataro, 1998].

II.3.2. *E. coli* Enterohemorrágica (EHEC). El término EHEC fue acuñado para denotar cepas que causan CH y SUH, expresan Stx, causan lesiones del tipo A/E en células epiteliales y además poseen el plásmido de 60-MDa. Por lo tanto, el patotipo EHEC representa un subgrupo de STEC. El factor de virulencia implicado en esta patogénesis es la enterohemolisina, codificada por el gen *ehxA*, este se encuentra en un plásmido de 60-MDa identificado en cepas de *E. coli* O157:H7. El gen *ehxA*, podría desempeñar algún papel en la lisis de los enterocitos, a fin de que estos liberen los grupos hemo y la hemoglobina, ya que se ha comprobado que esta clase de moléculas mejora el crecimiento del serotipo O157:H7 [Nataro, 1998].

Plásmido pO157. Prácticamente todas las cepas O157:H7 poseen este plásmido de 92 a 104 kb, uno de sus fragmentos de 3.4 kb codifica para la enterohemolisina [Schmidt, 1995], este plásmido contiene los pares de bases necesarios para codificar una proteasa denominada *EspP*, para una catalasa-peroxidasa, este plásmido también regula la producción de proteínas de membrana externa (OMP) que actúan como factores de adhesión [Nataro, 1998; Fratamico, 1993; Clements, 2012].

II.4. *E. coli* Enteroagregativa (EAEC).

EAEC es uno de los principales agentes etiológicos en la diarrea del viajero, únicamente seguido de ETEC en personas que visitan México y otras regiones del mundo [Navarro & Estrada-García, 2010]. La patogénesis de la diarrea producida por EAEC ahora se está definiendo y se relaciona con propiedades específicas del hospedero y el patógeno. Un obstáculo importante en la identificación del mecanismo patógeno de esta bacteria radica en la heterogeneidad de los perfiles de genes de las cepas EAEC. Aunque muchos genes de virulencia presuntivos han sido identificados para EAEC, la confusión en cuanto a su papel en enfermos de diarrea aguda deriva de la falta de mecanismos claros y factores de virulencia implicados [Huang, 2007]. En la actualidad EAEC se define como *E. coli* que no secreta LT o ST y que se adhiere células epiteliales HEp-2 con un patrón muy comúnmente conocido como autoagregativo en el que las bacterias se adhieren una a otra en una configuración que produce una apariencia de ladrillos apilados “*stacked brick*” (Figura 2). Es probable que esta definición abarca clonas tanto patógenas y no patógenas [Kaper, 2004].

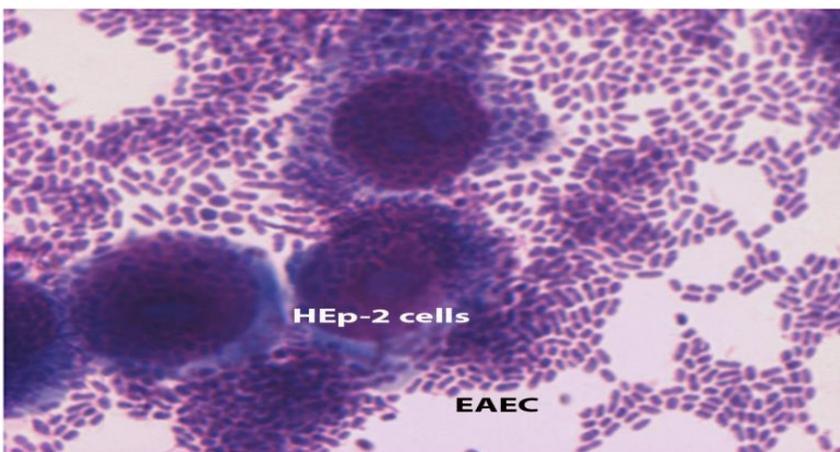


Figura 2. Patrón de adherencia de *E. coli* enteroagregativa en células HEp-2. EAEC se adhiere formando un patrón definido como auto-agregativo, en el cual las bacterias se adhieren una con otra formando una configuración de ladrillos apilados. [Navarro-García, 2010]

La estrategia básica de la infección por EAEC parece comprender la colonización de la mucosa intestinal, probablemente predominante en el colon, seguido por la secreción de enterotoxinas y citotoxinas. Estudios sobre biopsias intestinales en humanos muestran la inducción de un daño leve, pero significativo en la mucosa, estos efectos son más graves en la sección del colon [Kaper, 2004]. La adherencia a la mucosa intestinal de EAEC, se caracteriza por la formación de un grueso biofilm mucoide, el cual promueve el exceso de producción de moco y causa la colonización persistente e infección [Nataro, 1998; Nishi, 2003]. A nivel molecular los determinantes del fenotipo agregativo están contenidos en un plásmido (*pAA*) que contiene un número importante de genes de virulencia bajo el control de un activador transcripcional denominado *aggR* [Nishi, 2003].

II.4.1. Factores de virulencia de EAEC:

*El gen **aggR*** es un miembro de la familia de activadores transcripcionales AraC/XylS que a su vez son proteínas de unión de ADN. Diferentes estudios epidemiológicos sugieren que si la cepa expresa *aggR* es más probable que sea causante de diarrea, que aquellas que no la expresan, por lo que se propone el término “EAEC típica” para aquellas cepas que expresan este gen [Morin, 2012]. Además este gen activador transcripcional es requerido para la expresión de los factores de virulencia conocidos como AAFI/AAFII, *aap*, *aat* y varias entero toxinas, pero también está presente en un gran porcentaje de EAEC que no expresan ningún tipo de AAF identificada. [Huang, 2007; Nishi, 2003].

AAFI (Fimbria de Adherencia Agregativa I). Nataro [1994] encontró una estructura flexible formadora de haces de 2 a 3 nm de diámetro que media la adherencia a células HEp-2 y hemaglutinación con eritrocitos humanos. Esta fimbria es codificada por el gen *aggA*, que

se encuentra en el plásmido *pAA* de 60 MDa [Nataro, 1998]. *AAF/II* en la cepa 042 (O44:H18), mide 5 nm de diámetro y le confiere la adherencia agregativa a la bacteria. Esta fimbria esta codificada por el gen *aafA* (*pAA* 60 MDa); sin embargo no todas las EAEC presentan estas fimbrias [Clements, 2012].

Dispersina (AAP). Es una proteína de bajo peso molecular (10.2 kDa), recientemente se ha descrito que esta proteína forma una capa asociada libremente a la superficie de las cepas EAEC y parece que contrarresta los efectos de agregación de la adhesina AAF, de tal manera que facilita y promueve la propagación de la bacteria a través de la superficie de la mucosa intestinal o la penetración de la capa de mucosa [Kaper, 2004; Huang 2007].

***aatA*.** Este gen expresa un sistema de secreción tipo 1, el cual es un mecanismo de secreción para proteínas pequeñas contenido en una región del plásmido *pAA2*, *aatA* es un regulador necesario para transportar la dispersina a la superficie de la bacteria. Los resultados de Nishi [2003] sugieren que la dispersina alcanza el periplasma independientemente de cualquier otra proteína, ellos observaron que *aatA* está localizado en el exterior de la membrana, y proponen que esta inserción funciona como un canal, es decir que *aatA* funciona como un poro para la translocación de *aap* [Nishi, 2003].

Flagelina. Induce la liberación de IL-8. Esta citosina puede estimular la migración de neutrófilos a través del epitelio, lo que puede conducir a la ruptura del tejido y la secreción de fluidos [Kaper, 2004].

EAST-1 (Enteraggretive E. coli Stable Toxin) es la toxina termoestable 1 de EAEC, codificada por el gen *astA*, esta proteína pesa 4.1 kDa. Esta toxina es comparada con la

enterotoxina STa de ETEC [Huang, 2007]. Produce un incremento en la secreción de iones, actúa a nivel de la enzima guanilato-ciclasa [Clements, 2012].

Pic (proteasa con actividad de autotransportador, relacionada con la colonización intestinal). Es una toxina de 116 kDa codificada en el cromosoma de EAEC 042 y de *Shigella flexneri* 2457T, ha sido demostrada una alta homología en la secuencia amino terminal con la mucinasa de *Shigella* codificada en el gen *she*, es clasificada como una *SPATE* (Serine Protease Autotransporter of Enterobacterease) de clase II, esta proteasa tiene una función hemaglutinante y mucinolítica la cual permite a EAEC penetrar la capa mucosa de los enterocitos y residir en ese lugar [Clements, 2012].

Pet (plasmid-encode toxin) es una enterotoxina autotransportadora de clase I con un peso molecular de 108 kDa codificada por un plásmido de 65-MDa relacionado con la adherencia de EAEC, caracterizado por que conserva la presencia de un dominio C-terminal, el cual forma un poro en la membrana externa de la bacteria y a través del cual la proteína madura es transportada. Esta toxina contiene un sistema de secreción tipo V, el cual tiene efecto citopático en células HEp-2, caracterizado por redondeamiento y desprendimiento de las células así como contracción del citoesqueleto y pérdida de fibras de actina, Pet conserva un alto grado de homología con la proteasa EspP de EHEC, y con EspC de EPEC [Eslava, 1998; Clements, 2012].

II.5. Grupos filogenéticos.

En la actualidad el grupo filogenético de una cepa puede asignarse aplicando diversas metodologías como son la ribotipificación, la secuenciación del multilocus, electroforesis de

enzimas multilocus, estas técnicas tienen la desventaja de ser muy complejas y que consumen mucho tiempo con respecto al PCR triplex descrito por Clermont [2000].

En el sistema propuesto por Clermont se utilizaron 3 marcadores: *chuA* es un gen que codifica para una proteína de membrana externa que requiere la EHEC O157 para transportar el grupo hemo, *yjaA* es un gen identificado en la secuencia del genoma completo de *E. coli* K-12 que codifica para una proteína de membrana externa no caracterizada y un fragmento anónimo denominado TspE4.C2, dicho gen codifica para una lipasa-esterasa.

El método utilizado para una caracterización filogenética debe cumplir con diferentes criterios para su uso, como son:

- El gen debe haber sido adquirido o eliminado cuando el grupo característico emerge.
- El gen debe haber sido “estabilizado”, lo que excluye su posterior eliminación o transferencia horizontal entre otras bacterias de otros grupos filogenéticos.
- El gen no debe estar dirigido por la selección natural, ya que esto provoca nuevas recombinaciones genéticas. [Clermont, 2000]

II.6. Mecanismos de acción de los antimicrobianos.

Antibióticos β -lactámicos: entran a la célula a través de poros de la membrana externa, en las células susceptibles, las moléculas β -lactámicas se unen a las proteínas de unión de penicilina (PBPs); enzimas implicadas en la síntesis de la pared celular. La unión de las moléculas beta-lactámicas a las PBPs, ubicadas en la superficie de la membrana citoplásmica, bloquea su función. Esto produce paredes celulares debilitadas o defectuosas y conduce a lisis celular y muerte.

Antibióticos que interfieren la síntesis de proteínas mediante el enlace a la subunidad ribosómica 30S: Las tetraciclinas (ej. tetraciclina, minociclina y doxiciclina) se unen a la subunidad 30S del ribosoma y bloquean la adherencia del ARN de transferencia (ARNt). Puesto que no se pueden agregar más aminoácidos a la cadena de proteínas que está en crecimiento, la síntesis de proteínas es inhibida.

Los aminoglucósidos (ej. gentamicina, amikacina, y estreptomicina) también se unen a la subunidad 30S del ribosoma y pueden bloquear la síntesis de proteínas. En primer lugar estos se pueden adherir a la subunidad 30S del ribosoma y prevenir que la subunidad 30S se adhiera al ARN mensajero (ARNm). Segundo, la presencia del aminoglucósido en el ribosoma podría provocar la lectura errada del ARNm. Esto resulta en la inserción de aminoácidos erróneos en la proteína o en la interferencia de la capacidad de los aminoácidos para conectarse unos con otros.

Antibióticos que interfieren con la síntesis de ácido nucleico: causada por fluoroquinolonas (ej. ácido nalidíxico, ciprofloxacina, levofloxacina) interfieren con la síntesis de ADN bloqueando la enzima ADN girasa. La ADN girasa ayuda a enrollar y desenrollar el ADN durante la replicación de ADN. La enzima se adhiere al ADN e introduce rupturas dobles en las cadenas que permiten al ADN desenrollarse. Las fluoroquinolonas se unen al complejo ADN girasa-ADN y permiten a las cadenas de ADN rotas liberarse dentro de la célula lo que conduce a la muerte celular.

Antibióticos que inhiben de la ruta metabólica de la síntesis de ácido fólico: causada por sulfonamidas y trimetoprima. Para muchos organismos el ácido para-amino benzoico (PABA) es un metabolito esencial y está involucrado en la síntesis de ácido fólico, un importante

precursor para la síntesis de ácidos nucleicos. Las sulfonamidas son estructuras análogas del PABA y compiten con el PABA por la enzima dihidropteroato sintetasa. La trimetoprima actúa en la ruta de síntesis del ácido fólico en un punto posterior al de las sulfonamidas. Este inhibe la enzima dihidrofolato reductasa. Cuando se usan en conjunto producen un bloqueo secuencial de la ruta de síntesis del ácido fólico y tienen un efecto sinérgico, ambas son bacteriostáticas. [Mycek, 2004]

II.6.1. Mecanismos de resistencia a antimicrobianos.

Inactivación del antibiótico. Dentro de los mecanismos de resistencia a los antimicrobianos se encuentra la producción de enzimas denominadas β -lactamasas. En las bacterias Gram-negativas los medicamentos β -lactámicos entran en la célula a través de las porinas y encuentran a las β -lactamasas en el espacio periplásmico. Las β -lactamasas destruyen las moléculas β -lactámicas antes de que éstas tengan la oportunidad de alcanzar sus PBP blancos.

Enzimas que modifican los aminoglucósidos: Las bacterias Gram-negativas pueden producir enzimas adenilantes, fosforilantes o acetilantes que modifican un aminoglucósido para inactivarlo.

Impermeabilidad de la Membrana Bacteriana Externa. Las bacterias Gram-negativas pueden volverse resistentes a los antibióticos β -lactámicos mediante el desarrollo de barreras de permeabilidad. Esto es usualmente provocado por porinas alteradas en la membrana externa que no permiten la entrada y el tránsito de las moléculas del antibiótico dentro de la célula.

Alteración de los Blancos.

- Las PBP tanto en bacterias Gram-positivas como en Gram-negativas pueden ser alteradas mediante mutación de manera que los β -lactámicos no puedan unirse a ellas.
- La metilación del ARN ribosómico confiere resistencia a los macrólidos.
- Mutaciones en los genes cromosómicos de ADN girasa y topoisomerasa IV confieren resistencia a las quinolonas.

Bombas de eflujo. Una amplia variedad de bombas de eflujo proveen resistencia antimicrobiana a bacterias Gram-positivas y Gram-negativas. El eflujo activo de antibióticos es mediado por proteínas trans-membranales insertadas en la membrana citoplásmica y, en el caso de los organismos Gram-negativos involucra también componentes en la membrana externa y periplasma. Estas proteínas forman canales que exportan activamente a un agente antimicrobiano fuera de la célula tan rápido como entra.

Alteración de Rutas Metabólicas. Algunos microorganismos desarrollan una ruta metabólica alterada que elude la reacción inhibida por el antimicrobiano. Mutaciones que inactivan la timidilato sintetasa que bloquean la conversión de deoxiuridilato a timidilato. Estos mutantes requieren timina o timidina exógena para la síntesis de ADN y por ende son resistentes a los antagonistas de la ruta del folato como las sulfonamidas y trimetoprima [Stephen, 2005; Molina, 2011].

II.6.2. β -lactamasas de Espectro Extendido (BLEE).

Los genes que codifican para la producción de Beta Lactamasas de Amplio Espectro en la Familia *Enterobacteriaceae* son conocidos como TEM-1, TEM-2 y SHV (*Klebsiella pneumoniae*) las siglas TEM provienen de las iniciales del 1er paciente en que fue aislada una *E. coli* productora de β -lactamasas. TEM-1 es responsable por la resistencia a la ampicilina y cefalosporinas de 1ª generación de *E. coli* y otras *Enterobacteriaceae*. Algunos de estos genes sufren mutaciones cambiando la secuencia de los aminoácidos de las enzimas, estas nuevas enzimas son conocidas como β -lactamasas de Espectro Extendido (BLEEs). Estas enzimas hidrolizan todas las penicilinas, Aztreonam y todas las cefalosporinas (pero no las cefamicinas, ej. Cefotaxima y cefotetan). Los genes de BLEE se encuentran comúnmente en plásmidos transmisibles que por lo general codifican otros determinantes de resistencia por ejemplo a Aminoglucósidos o Trimetoprim/sulfametoxazol, estas BLEE son inhibidas por el ácido clavulónico (inhibidor de la β -lactamasas) pero en un grado mucho menor que la β -lactamasa original.

Los tipos de BLEEs reconocidos hasta el 2004 en *E. coli* son:

- TEM: Hay aproximadamente 150 tipos de BLEEs TEM.
- CTX-M: Las enzimas CTX-M codificadas por plásmidos son similares a las enzimas K1 (β -lactamasas de *K. pneumoniae*), se han encontrado en *E. coli*, y en una variedad de otras *Enterobacteriaceae*. Para poder identificar potencial productoras de BLEE se usan los límites de difusión en disco y la concentración mínima inhibitoria (CIM) para los siguientes antibióticos: aztreonam, cefotaxima, cefpodoxima, ceftazidima y ceftriaxona.

III. ANTECEDENTES

La diarrea es una de las principales causas de muertes en niños menores de 5 años en países en vías de desarrollo. En México no es la excepción, las enfermedades diarreicas siguen siendo un problema de salud pública, *E. coli* es la segunda causante de muerte en la infancia superado solo por rotavirus. Las reducciones sustanciales de muertes y complicaciones diarreicas se produjeron desde 1990 hasta 2002 como consecuencia de la mejora del saneamiento y el agua potable, la promoción de la lactancia materna, la rehidratación oral, y la suplementación con mega dosis de vitamina A [Navarro & Estrada-García, 2010]. No obstante, las tasas de morbilidad por diarrea en niños menores de 5 años de edad no han cambiado en los últimos años en México. Un poco de disminución se observó en 2009 con 15,835 casos por cada 100, 000 niños \leq 5 años de edad, en comparación con 2008 (17,378 por cada 100, 000 niños), pero parece que no es significativo, ya que el número de niños en este grupo de edad también se ha reducido en la misma proporción 2008-2009 [<http://www.dgepi.salud.gpb.mx/sinave/index.html>].

A finales de Abril y durante el mes de Mayo del año 2011, se reportó la aparición de un brote de diarrea con cuadros de colitis hemorrágica y síndrome urémico hemolítico en la región noroeste de Alemania [Frank, 2011]. La población afectada incluía niños menores de 5 años de edad, además en este brote el 87 % de los pacientes fueron adultos mayores de 20 años, un aspecto importante fue el hecho de que 68 % de los afectados fueron del sexo femenino [ECDC Mayo 27, 2011]. Al realizar la búsqueda del agente responsable del brote se identificó una cepa de *E. coli* STEC del serotipo O104:H4, el análisis genético de la bacteria mostró la presencia de los genes *aatA*, *aggR*, *aap*, *agg*, *aggC* así como de *stx2* [ECDC Mayo 27, 2011]. El brote se extendió y países como Austria, Dinamarca, Alemania, Holanda, Noruega, España,

Suecia, Suiza e Inglaterra, en estos casos los individuos tenían el antecedente de haber viajado previamente a la región de Alemania en la que se originó el brote referido. Además fueron reportados casos en los Estados Unidos de América y Canadá, en estos también existía el antecedente de haber viajado días antes a Alemania. El informe global más reciente de la OMS [WHO, 07/07/2011] señala que fueron 15 países Europeos afectados y Estados Unidos, entre los cuales se presentaron un total de 3941 casos y 52 fueron casos fatales. De los 3941 casos 909 fueron casos graves de SUH y 3032 pacientes presentaron una infección menos severa, la mayoría de los casos correspondieron a Alemania donde se registraron 859 cuadros de SUH, 2945 de diarrea con sangre y 40 defunciones. Como fuente del brote epidémico causado por *E. coli* O104:H4 se ha implicado a coles, tomates, ensalada de vegetales y pepinos de consumo crudo [Frank, 2011]. Por las características de la bacteria responsable del brote, ésta corresponde a una cepa del grupo enteroagregativo EAEC, lo cual fue confirmado al identificar la presencia de los genes *aatA*, *aggR*, *aap*, *agg*, *aggC*. Sin embargo, en esta clona se identificó además la presencia del gen *stx2*, actualmente se propone el término STEAEC para este tipo de cepas [Clement, 2012] o bien se propone el término EAHEC para cepas que además de contener estos genes, son LEE positivos [Croxen, 2013]. La emergencia de esta bacteria híbrida plantea un evento de recombinación genética poco común, aunque, desde 1997 existen reportes de la participación de cepas EAEC en casos de síndrome urémico hemolítico incluidas algunas del serogrupo O104 [Feng, 2001]. En México no existen reportes que señalen la incidencia de SUH o CH relacionada con *E. coli* O104, sin embargo, ante el evento epidemiológico que se presentó en Europa, es necesario conocer cuáles son las características del serogrupo O104 aislado en nuestro país y así definir la importancia epidemiológica del mismo.

IV. JUSTIFICACIÓN

Ante la emergencia de los eventos presentados recientemente en Alemania nos dimos a la tarea de realizar revisión retrospectiva de los aislamientos del serotipo de *E. coli* O104:H4 en el cepario del Laboratorio de Salud Pública UNAM, los resultados mostraron la existencia de 18 cepas del serogrupo O104 aisladas entre 1985 a 2013 de muestras de heces humanas con y sin diarrea, de estas cepas 7 se aislaron en México, y las restantes en Argentina (4), Egipto (4) y Bangladesh (3). De la misma manera *E. coli* O104 se detectó en muestras rectales de 3 vacas de un hato de 45 vacas lecheras. Una observación interesante de la tipificación serológica de las cepas *E. coli* O104 utilizando 187 sueros obtenidos en conejo del esquema antigénico de *E. coli*, fue que las cepas de este serogrupo presentaron reactividad antigénica con el suero anti-*E. coli* O9 a títulos altos. En un análisis de frecuencia de aislamiento de *E. coli* realizado en el Laboratorio, de más de 1600 aislamientos de la bacteria se encontró que los patotipos más frecuentes eran ETEC, EPEC y EAEC [Navarro, 2010]. Entre los serogrupos identificados en este análisis encontramos 96 aislamientos de *E. coli* O9 pertenecientes a diferentes fuentes, entre los que se incluían aislamientos de casos de diarrea y sin diarrea de estudios epidemiológicos de diarrea infantil. Adicionalmente se identificaron cepas O9 en 12 vacas lecheras del hato de 45 vacas lecheras. Al respecto diversos estudios previos reportan que el lipopolisacárido (LPS) de *E. coli* O104, presenta una similitud estructural con el antígeno capsular K9 de *E. coli* O9:K9 [Kogan, 1992; Wang, 2001]. Esto es importante porque el serotipo O104:H4 está relacionado con los brotes epidémicos de SUH y CH recientemente reportados. Con base a la detección de la reactividad antigénica cruzada y a la similitud estructural en los antígenos de superficie es que este estudio propone establecer sí la reactividad observada del suero O9 con el antígeno de *E. coli* O104 está relacionada con

la existencia de epitopos compartidos entre ambos grupos de bacterias, para definir si existe una relación antigénica y filogenética entre ambos serogrupos y conocer si presentan factores de virulencia similares.

V. OBJETIVO GENERAL

Caracterizar cepas de los serogrupos de *E. coli* O9 y O104 aisladas de diferentes fuentes, identificando la presencia de genes de virulencia de los patotipos STEC y EAEC en ellas, su relación filogenética y sus patrones de resistencia a β -lactámicos y fluoroquinolonas.

V.1 Objetivos específicos

- 1) Corroborar por medio de pruebas bioquímicas y serológicas la identidad fenotípica de la cepas de *E. coli* de este estudio.
- 2) Determinar las reacciones antigénicas cruzadas entre *E. coli* O9 y O104 utilizando métodos tradicionales de aglutinación de los antígenos somáticos y establecer sus relaciones antigénicas.
- 3) Identificar epitopos en los serogrupos de *E. coli* O9 y O104 empleando ensayos de absorción de sueros con antígenos homólogos y heterólogos para conocer si estos son comunes en ambos serogrupos.
- 4) Establecer la filogenia de las cepas de *E. coli* O9 y O104 mediante la reacción en cadena polimerasa (PCR) multiplex de los genes *chuA*, *yjaA* y un fragmento anónimo designado como TSPE4, para definir los grupos filogenéticos en los que se ubican.
- 5) Evaluar la sensibilidad a antimicrobianos de los aislamientos de *E. coli* O9 y O104 utilizando el método de Kirby-Bauer (difusión en agar), para comparar los patrones de resistencia a β -lactámicos y fluoroquinolonas.
- 6) Identificar si las cepas de *E. coli* O9 y O104 del estudio presentan factores de virulencia del patotipo STEC (*eae*, *stx1* y *stx2*) y del patotipo EAEC (*aatA*, *aggR*, *aap*) utilizando la PCR con iniciadores específicos para establecer si pertenecen a estos patotipos.

VI. METODOLOGÍA

VI.1. Cepas bacterianas. Las cepas con identificación de *E. coli* O9 y O104 se analizaron para confirmar su pureza e identidad fenotípica, por el hecho de que estas cepas se conservan en medio de Dorset en el cepario del Laboratorio de Salud Pública, Facultad de Medicina UNAM. La pureza de las cepas se determinó inoculando en agar MacConkey (DIFCO, MI) y se incubaron a 37 °C durante 18-24 h.

VI.2. Identificación bioquímica. Para confirmar la identidad fenotípica de las cepas se utilizaron pruebas bioquímicas preparadas en el laboratorio las que incluyeron agar Kligler (KIA), Sulfhídrico, Indol y Motilidad (SIM), caldo Rojo de Metilo-Vogues Proskauer (RM-VP), caldo Malonato-fenilalanina, agar urea de Christensen y caldo gluconato.

VI.3. Serotipificación: caracterización antigénica de los cultivos de *E. coli*. La tipificación serológica de las cepas de *E. coli* se realizó utilizando 187 sueros dirigidos contra los antígenos somáticos (O) y 53 contra los flagelares (H) del esquema antigénico de *E. coli* de acuerdo a la metodología reportada previamente [Orskov, 1984]. Estos sueros se obtuvieron previamente en conejo (SERUNAM) utilizando cepas de referencia de *E. coli* de acuerdo a lo propuesto por Ewing [1986]. La obtención del antígeno somático se realizó utilizando agar de soya tripticaseína (TSA) inclinado, el cual se inoculó por estría cerrada, se incubó a 37 °C durante 18-24 h. Al crecimiento bacteriano se agregó 10 mL de solución salina (0.15 M NaCl), se cubrió con papel parafilm y se mezcló hasta resuspender el crecimiento bacteriano, la suspensión bacteriana obtenida se transfirió a un tubo limpio, este se colocó a una temperatura de ebullición con vapor fluente durante 1 h. Después de la ebullición se agregaron 10 mL de formalina al 0.6 % (solución salina 0.15 M con 0.6 % de formaldehído).

VI.4. Identificación del serotipo de las cepas por reacciones de microaglutinación. En placas de 96 pozos (NUNC) con fondo en U se colocaron 50 μ L de cada uno de los 187 antisueros (diluidos 1:100), utilizando un dispensador multicanales automático, posteriormente con una micropipeta multicanales Eppendorf se colocaron 50 μ L/pozo de cada solución de antígeno somático, la suspensión se homogenizó y se cubrieron con plástico adherente, estas placas se incubaron a 50 °C durante 18-24 h. Una vez transcurrido este tiempo se identificaron las reacciones de aglutinación con ayuda de una lámpara de laboratorio, evaluando así la intensidad de la reacción.

VI.5. Ensayos de absorción de suero de conejo anti *E. coli* O104 y anti *E. coli* O9. Para evaluar la relación antigénica entre *E. coli* O104 y *E. coli* O9 se realizaron ensayos de absorción de acuerdo al método descrito por Ewing [1986]. Las bacterias de *E. coli* O104 y *E. coli* O9 se inocularon en placas de agar de soya tripticaseína (TSA). Las placas de TSA se incubaron a 37 °C durante 18-24 h, posteriormente se recuperó el crecimiento bacteriano con 10 mL de solución salina 0.15 M. La suspensión bacteriana se colectó en un tubo estéril y se sometió a ebullición (100 °C) durante 1 h (vapor fluente), finalmente la turbidez se ajustó al tubo número 10 del Nefelómetro de McFarland (9×10^8 bacteria/mL). La suspensión de bacterias se centrifugó a 6000 X g durante 10 min a 4°C y el paquete se mezcló con 1.0 mL de las muestras de suero anti *E. coli* O104 y anti-*E. coli* O9, posteriormente la suspensión bacterias/suero se incubó a 50 °C durante 2 h [Ewing 1986]. Después de incubar las muestras se centrifugaron a 6000 X g durante 10 min a 4 °C para separar el suero y con este se procedió a realizar los ensayos de aglutinación contra los diferentes antígenos somáticos de *E. coli* O104 y *E. coli* O9.

VI.6. Serología de antígeno flagelar H. En placas de 96 pozos (NUNC) con fondo en U se colocaron 50 μ L de cada uno de los 53 antisueros H de *E. coli* (diluciones 1:100), utilizando un dispensador multicanales automático, posteriormente con una micropipeta (Eppendorf) de 12 canales se colocaron 50 μ L/pozo de cada solución de antígeno flagelar, la suspensión se homogenizo y se envolvieron con plástico adherente, estas placas se incubaron a 50 °C durante 2 h.

VI.7. Extracción de ADN. La obtención del ADN se realizó por ebullición de acuerdo a la metodología reportada previamente [Islam, 2006]. Los cultivos identificados como *E. coli* O9 y O104 se inocularon en 2 mL de caldo Luria-Bertain (LB, Difco) estos se incubaron a 37 °C durante 18-24 h. Del crecimiento bacteriano en LB se tomó 1 mL, se colocó en un tubo Eppendorf y se centrifugo a 13,000 X *g* durante 5 min a 4 °C. Después el sobrenadante se decantó y se escurrió bien con papel secante o absorbente. Posteriormente se adicionaron 200 μ L de agua ultra pura, el pellet se agito y re-suspendió muy bien con vortex. Estos tubos bien tapados se hirvieron durante 10 min. La suspensión anterior se colocó rápidamente sobre hielo durante 5 min y resuspendió nuevamente con vortex durante 1 min, después se colocó en hielo y posteriormente se centrifugó a 13,000 X *g* durante 10 min a 4 °C. Finalmente se pasaron 100 μ L del sobrenadante a otro tubo nuevo y se congelo a 4 °C hasta su uso.

VI.7. Grupos filogenéticos y factores de virulencia. Se realizo mediante el análisis de la presencia de los genes *chuA*, *yjaA* y un fragmento anónimo designado como TspE4.C2 de acuerdo a la metodología e iniciadores previamente reportados por Clermont [2000], para definir el o los grupos filogenéticos en los que se ubican las cepas de *E. coli* O104 y O9.

Los factores de virulencia de los cultivos de los aislamientos de *E. coli* O104 y O9 se determinaron mediante el ensayo de la reacción de la polimerasa (PCR). Se utilizaron iniciadores de PCR reportados previamente (Cuadro 1), para determinar la presencia del gen *eae* que codifica para la proteína denominada intimina [Karch, 1993], el gen que codifica para el factor de adherencia de EPEC (*eafA*) presente en el plásmido EAF [Franke, 1994], el gen que codifica para el pilus formador de haces *bfpA* [Gunzburg, 1995]. La presencia de los genes que codifican para la toxinas *stx 1* y *stx 2* [Scheutz, 2012]. Los factores de virulencia de EAEC, *aggR*, *aap*, *aatA*, [Huang, 2007; Nishi, 2003]. Para validar los ensayos de la PCR se utilizó un control positivo y un blanco que no contenía muestra de ADN en cada ensayo realizado.

Cuadro 1. Secuencia de iniciadores utilizados para la identificación de grupos filogenéticos y genes de virulencia.

Genes	Secuencia de nucleótidos 5' —————> 3'	Factor de virulencia	Referencia
ChuA	F – GAC GAA CCA ACG GTC AGC AT R – TGC CGC CAG TAC CAA AGA CA	Proteína de membrana externa que requiere EHEC para transportar el grupo hemo.	Clermont [2000]
YjaA	F – TGA AG TGT CAG GAG ACG CTG R – ATG GAG AAT GCG TTC CTC AAC	Proteína de membrana externa no caracterizada identificada en la secuencia del genoma de <i>E. coli</i> K-12	Clermont [2000]
TspE4.C2	F – GAG TAA TGT CGG GGC ATT CA R – CGC GCC AAC AAA GTA TTA CG	Codifica para una lipasa-esterasa.	Clermont [2000]
eeae universal	F – CCGAATICGGCACAAGCATAAGC R – CCCGGATCCGTCTCGCCAGTATTC	Proteína de membrana externa denominada intimina	Schmidt [1994]
eafA	F – CAG GGT AAA AGA AAG ATG ATA A R – TAT GGG GAC CAT GTA TTA TCA	Plásmido del factor de adherencia de EPEC	Franke [1994]
bfpA	F – AAT GGT GCT TGC GCT TGC TGC R – GCC GCT TTA TCC AAC CTG GTA	Pilus formador de haces	Gunzburg [1995]
stx1	F – GTA CGG GGA TGC AGA ATC GC R – AGC AGT CAT TAC ATA AGA ACG Y CCA CT	Toxina Shiga tipo 1	Scheutz [2012]
stx2	F4 – GGC ACTGTCTGAACCTGCTCCTGT R1 – AATAAACTGCACTTCAGCAAATCC F4-f – CGCTGTCTGAGGCATCTCCGCT R1e/f – TAAACTTCACCTGGGCAAAGCC	Toxina Shiga tipo 2	Scheutz [2012]
aggR	F – AGC GGT GTC CCA GTA TGT ATG C R – TTA TGT TCC CGC TGC TGT CGT	Adherencia agregativa	Huang [2007]
aap	F – CTT TTC TGG CAT CTT GGG T R – GTA AC AAC CCC TTT GGA AGT	Dispersina o proteína antiagregativa de EAEC	Huang [2007]
aatA	F – ATG TTA CCA GAT ATA AAT ATA G R – CAT TTC CCC TGT ATT GGA AAT G	Sistema transportador de dispersina	Nishi [2003]

El volumen de la mezcla de reacción para la PCR de cada una de las muestras de ADN de las cepas fue de 25 µL, esta mezcla de reacción consistió de los iniciadores específicos para cada gen, agua ultrapura libre de ADN y ARN, buffer 10 X, desoxirribonucleótidos trifosfato (DNTP's), MgCl₂ 50 mM y Taq polimerasa recombinante, todos estos reactivos pertenecen a un kit para PCR de la marca invitrogen™, excepto los iniciadores (Cuadro 2).

Cuadro 2. Mezclas de reacción para la amplificación de genes de virulencia y de filogrupos.

Componentes	Genes a determinar								
	Grupo Filogenético ¹	<i>eae</i>	<i>eafA</i>	<i>bfpA</i>	<i>stx1</i>	<i>stx2</i> [†]	<i>aggR</i>	<i>aap</i>	<i>aatA</i>
	Cantidades en μ L								
Agua ultrapura	13.2	12.7	13.85	17.35	16.7	10.7	13.05	13.05	17.55
Buffer 10 X	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
MgCl₂ 50 mM	0.75	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	0.75	0.75	0.75
DNTP's	2.5	5	5	0.5	1	5	2.5	2.5	1
Iniciador Forward	0.8	1	0.5	1	1	1	2.5	2.5	1
Iniciador Reverse	0.8	1	0.5	1	1	1	2.5	2.5	1
Taq invitrogen™	0.25	0.3	0.15	0.15	0.3	0.3	0.2	0.2	0.2
ADN	1	1	1	1	1	1	1	1	1

¹PCR múltiple para tres genes. Cada uno de los 3 iniciadores forward y los 3 iniciadores reverse contenían esta cantidad. [†] PCR dúplex. Cada uno de los 2 iniciadores forward y reverse contenían esta cantidad.

La PCR para cada gen se realizó bajo diferentes condiciones de temperatura de desnaturalización, alineamiento y extensión (Cuadro 3). Los productos o amplicones obtenidos se mezclaron con 1 μ L de azul de bromotimol y se cargaron en los pozos de un gel de agarosa preparados a diferentes concentraciones para ser separados adecuadamente ya que esto dependió del tamaño del amplicon (Cuadro 3). El gel se colocó en una cámara de electroforesis (BIO-RAD™) con buffer de corrida Tris-Borato-EDTA (TBE) en las condiciones de 100 Volts, 34 mAmp y 3 Watts por un período de 1 h aproximadamente. Los geles fueron teñidos con el colorante Gelred (BioLabs™) durante 25 minutos aproximadamente, posteriormente se revelaron utilizando un transiluminador de luz UV y para finalizar se tomó una fotografía con ayuda de un documentador de imágenes (Biosens SC805 Gel Image Systems).

Cuadro 3. Condiciones del termociclador y concentraciones utilizadas para cada PCR.

Etapa	Genes a determinar								
	<i>chuA</i> , <i>yjaA</i> , <i>TspE4</i>	<i>eae</i>	<i>eafA</i>	<i>bfpA</i>	<i>stx1</i>	<i>stx2</i>	<i>aggR</i>	<i>aap</i>	<i>aatA</i>
Desnaturalización Inicial*	94 °C / 4 min	94 °C / 5 min	95 °C / 5 min	94 °C / 5 min	94 °C / 5 min	94 °C / 5 min			
Ciclos	30	30	30	30	35	35	30	30	30
Desnaturalización	94 °C / 30 s	94 °C / 30 s	96 °C / 40 s	96 °C / 2 min	94 °C / 50 s	94 °C / 50 s	94 °C / 1 min	94 °C / 1 min	94 °C / 30 s
Alineación	59 °C / 30 s	55 °C / 1 min	57 °C / 1 min	56 °C / 30 s	56 °C / 40 s	56 °C / 40 s	42 °C / 1 min	52 °C / 1 min	52 °C / 40 s
Extensión	72 °C / 30 s	72 °C / 2 min	72 °C / 45 s	72 °C / 1 min	72 °C / 60 s	72 °C / 60 s	72 °C / 1 min	72 °C / 1 min	72 °C / 1min
Ultima extensión	72 °C / 5 min	72 °C / 5 min	57 °C / 10min	72 °C / 1 min	72 °C / 3 min	72 °C / 3 min	72 °C / 7 min	72 °C / 7 min	72 °C / 10min
Tamaño del amplicon (Pares de Bases)	279 211 152	864	397	326	209	625 627	308	232	1064
Concentración del gel de agarosa	1.5 %	1 %	1.2 %	1.2 %	1.5 %	1 %	1.5 %	1.2 %	0.8 %

Todos los PCR se corrieron en el termociclador Axigen Maxigen®, y después de terminada la última extensión de la cadena de ADN se espera a que el termociclador baje a una Temperatura de 4 °C.* Esta desnaturalización se recomienda por el método utilizado para la extracción del ADN.

VI.8. Determinación de patrones de resistencia a antimicrobianos mediante pruebas de

difusión en agar. Se utilizó la metodología basada en recomendaciones propuestas por el manual del Clinical and Laboratory Standard Institute 10th Ed., para la determinación de los patrones de resistencia de las cepas de *E. coli* del estudio. Después de corroborar la pureza y viabilidad de las cepas. Los cultivos se inocularon en una placa de agar nutritivo (TSA) y se incubaron a 37 °C durante 24h. Después de la incubación, del cultivo en agar nutritivo se tomó un inóculo para preparar una suspensión en un tubo de ensayo de 10 X 75 mm con 1.8 mL de solución salina fisiológica estéril (0.15 M). La suspensión bacteriana se ajustó al tubo 0.5 del nefelómetro de McFarland (1.5×10^8 bacterias/mL). En esta suspensión, en un plazo no mayor a 15 min se sumergió un hisopo de algodón estéril, girando el hisopo varias veces contra la pared del tubo para retirar el exceso de líquido y se sembró por triplicado en 2 placas de agar Mueller-Hinton por cepa, posteriormente se colocaron los sensibilizadores BBL Sensi Disc

BD® previamente seleccionados con ayuda de unas pinzas estériles teniendo cuidado de que el centro de los discos tuvieran una distancia mínima de 24 mm entre ellos, utilizando los siguientes antimicrobianos. Cefalosporinas de 2ª generación: cefoxitina (FOX) 30 µg, cefalosporinas de 3ª generación: ceftriaxona (CRO) 30 µg, ceftazidima (CAZ) 30 µg, cefotaxima (CTX) 30 µg, cefalosporinas de 4ª generación: cefepima (FEP) 30 µg, quinolonas: ofloxacina (OFX) 5 µg, norfloxacin (NOR) 10 µg, ácido nalidíxico (NA) 30 µg, ciprofloxacina (CIP) 5 µg, imipenem (IPM) 10 µg, aztreonam (ATM) 30 µg, trimetoprim/sulfametoxazol (STX) 1.25/23.75 µg y tetraciclina (TE) 30 µg. Estas placas se incubaron a 37 °C durante un periodo de 16-18 h, transcurrido este tiempo se tomó la lectura de los halos de inhibición con ayuda de un vernier y se registraron los resultados. En el Cuadro 4 se presentan los diámetros de inhibición recomendados por la CLSI para considerar el ensayo como resistente, intermedio o sensible.

Cuadro 4. Interpretación por el diámetro inhibición.

Agente antimicrobiano	Código	Concentración del disco	Diámetro Interpretativo (mm)		
			Resistente	Intermedio	Sensible
Cefoxitina	FOX	30 µg	≤ 14	15-17	≥ 18
Ceftriaxona	CRO	30 µg	≤ 13	14-20	≥ 21
Ceftazidima	CAZ	30 µg	≤ 14	15-17	≥ 18
Cefotaxima	CTX	30 µg	≤ 14	15-122	≥ 23
Cefepima	FEP	30 µg	≤ 14	15-17	≥ 18
Imipenem	IPM	10 µg	≤ 13	14-15	≥ 16
Aztreonam	ATZ	30 µg	≤ 15	16-21	≥ 22
Ofloxacina	OFX	5 µg	≤ 12	13-15	≥ 16
Norfloxacin	NOR	10 µg	≤ 12	13-16	≥ 17
Ciprofloxacina	CIP	5 µg	≤ 15	16-20	≥ 21
Ac. Nalidíxico	NA	30 µg	≤ 12	13-16	≥ 17
Trimetoprim/Sulfametoxazol	STX	1.25/23.75 µg	≤ 12	13-16	≥ 17
Tetraciclina	TE	30 µg	≤ 12	13-16	≥ 17

Fragmento extraído del manual M100 S21 (M2). "Disk diffusion supplemental tables".

VII. Resultados.

Datos epidemiológicos de cepas de *E. coli* O9 aislada de niños menores de dos años.

En este estudio se analizaron 73 cepas aisladas de 42 niños, de distintos estudios epidemiológicos realizados entre 1985 y 2010, de estas 73 cepas, 66 (90 %) fueron de México, 4 (6 %) de Egipto y 3 (4 %) de Argentina (Cuadro 5). Respecto a las cepas de origen Mexicano, 2 (3 %) fueron aisladas en el año de 1985, 20 (27 %) pertenecen al año 1986 y 7 (10 %) al año 1987, estas cepas se obtuvieron a partir de un estudio epidemiológico realizado en Tlaltizapan Morelos. La otra parte de las cepas fueron obtenidas de muestras de heces de niños menores de 2 años con diarrea aguda en el Hospital General del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), 17 (23 %) en el año 1996, en 1998 se obtuvo un (1 %) aislamiento, en 1999 se identificaron 11 (15 %) aislamientos, en el año 2000 se aislaron 7 (10 %) cepas, y por último un (1 %) aislamiento en 2010 del Estado de Puebla (Cuadro 5).

Cuadro 5. Origen y año de aislamiento de cepas *E. coli* O9 de niños menores de 2 años.

Año de aislamiento	Lugar del aislamiento	Numero de cepas (%)	Número de niños
1985	Tlaltizapan Morelos	2 (3)	2
1986	Tlaltizapan Morelos	20 (27)	16
1987	Tlaltizapan Morelos	7 (10)	5
1996	IMSS	17 (23)	7
1997	Egipto	1 (2)	1
1998	IMSS	1 (1)	1
1999	IMSS	11 (15)	5
1999	Egipto	3 (4)	3
2000	IMSS	7 (10)	1
2003	Argentina	3 (4)	3
2010	Puebla	1 (1)	1
		Total = 73 (100%)	Total = 42

Datos epidemiológicos de cepas de *E. coli* O9 aisladas de animales (bovinos y aves). Se analizaron 25 cepas aisladas de animales, de estas cepas, 6 (24 %) fueron aisladas de aves en 1997 del Distrito Federal y 19 (76 %) de muestras rectales de vacas lecheras de los Estados de México, Jalisco y Sinaloa. De las cepas aisladas de vacas, 3 (12 %) fueron aisladas en 1997, una (4 %) cepa se aisló en 2005, 2 (8 %) cepas fueron aisladas en 2006 y 13 (52 %) cepas se obtuvieron 2007 (Cuadro 6). Se incluyeron 3 cepas de referencia como control y comparación de los ensayos de tipificación serológica, dos proporcionadas por el Laboratorio con los códigos del cepario de la Facultad de Medicina UNAM (FMU), FMU 98695, FMU 94207 y una cepa de la colección ECOR (cepas de referencia estándar de *E. coli* aisladas de poblaciones naturales) [Ochman, 1984] .

Cuadro 6. Cepas de *E. coli* O9 aislada de animales.

Año de aislamiento	Numero de cepas (%)	Número de Vacas o aves
1997	3 (12)	3
2005	1 (4)	1
2006	2 (8)	1
2007	13 (52)	8
1997	6(27)	6
	Total = 25	Total = 19

Datos epidemiológicos de cepas de *E. coli* O104 aisladas de niños menores de dos años. En este estudio se analizaron 18 cepas de *E. coli* aisladas de muestras de heces de 15 niños, de diferentes zonas geográficas, entre los años de 1985 y 2013, 7 (39 %) cepas fueron de México, 4 (22 %) de Egipto, 4 (22 %) de Argentina y 3 (17 %) de Bangladesh. De la cepas

de México, una (6 %) se aisló en el año de 1985, una (6 %) en 1997, una (6 %) en 1998, 3 (17 %) en el año 2003, y una (6 %) en el año 2013. De las cepas de Egipto, 3 (17 %) se aislaron en 1998 y una (6 %) en 1996. Todas las cepas de Argentina se aislaron en 2003, y las cepas de Bangladesh corresponden al año 2009 (Cuadro 7).

Cuadro 7. Cepas de *E. coli* O104 aisladas de muestras de heces de niños menores de dos años de diferentes zonas geográficas.

Año de aislamiento	Lugar del aislamiento	Numero de cepas (%)	Número de niños
1985	México	1 (6)	1
1997	México	1 (6)	1
1998	México	1 (6)	1
2003	México	3 (17)	1
2013	México	1 (6)	1
1996	Egipto	1 (6)	1
1998	Egipto	3 (17)	3
2003	Argentina	4 (22)	4
2009	Bangladesh	3 (17)	2
		Total = 18 (100)	Total = 15

Datos epidemiológicos de cepas del serotipo *E. coli* O104 aisladas de bovinos. Se analizaron 5 cepas que fueron aisladas de muestras rectales de un hato de 45 vacas lecheras del Estado de Sonora, en 2005.

Tipificación serológica de cepas de *E. coli* O104. Se identificaron 23 aislamientos de cepas *E. coli* del serogrupo O104, de estas 18 (78 %) fueron obtenidas de muestras de heces de 15 niños menores de dos años, 5 (22 %) cepas fueron aisladas de 3 muestras rectales de vacas. Además se incluyeron 5 cepas de referencia de la colección ECOR y 2 cepas (7 %) de referencia internacional proporcionadas por el cepario de la Facultad de Medicina con los códigos FMU 98788 y FMU 117033 respectivamente. En estas cepas se identificaron 4 serotipos diferentes, los más frecuentes fueron O104:H4 con 8 (35 %) aislamientos, O104:H12 con 7 (30 %), O104:NM presentó 2 (9 %) aislamientos, mientras que el serotipo O104:H7 presentó un (4 %) aislamiento. Los 5 (22 %) aislamientos de 3 muestras rectales de vacas fueron del serotipo O104:H12. En las cepas de referencia ECOR se identificó el serotipo O104:H21, por último las 2 cepas de referencia de la FMU fueron del serotipo O9:H12 (Cuadro 8).

Tipificación serológica de *E. coli* O9 de origen humano. En este grupo de cepas se identificaron 14 serotipos, el serotipo más frecuente fue O9:NM con 29 (30 %) aislamientos, seguido de O9:H25 con 19 (19 %) aislamientos, O9:H33 con 5 (5 %) aislamientos; O9:H4 y O9:H9 presentaron 4 (4 %) aislamientos cada uno, O9:H31 con 3 (3 %) aislamientos, O9:H11 con 2 (2 %) aislamientos, O9:H21 con 2 (2 %) aislamientos, por último los serotipos O9:H10, O9:H19, O9:H7, O9:H? y O9:H34 presentaron un (1 %) aislamiento cada uno. Las 2 cepas de referencia proporcionadas por el laboratorio (94207, 98695) fueron de los serotipos O9:H19 y O9:K9:H12, en la cepa de referencia ECOR se identificó el serotipo O9:H19 (Cuadro 8).

Cuadro 8. Serotipos identificados en cepas de *E. coli* O9 y O104 aisladas de diferentes fuentes.

No. De aislamientos (%)	Origen	Serotipos de las cepas de <i>E. coli</i> O104		No. De aislamientos (%)	Origen	Serotipos de las cepas de <i>E. coli</i> O9
7(30)	Humano	O104:H12		29 (30)	Humano	O9:NM
8 (35)	Humano	O104:H4		19 (19)	Humano	O9:H25
2 (9)	Humano	O104:NM		4 (4)	Humano	O9:H4
1 (4)	Humano	O104:H7		5 (5)	Humano	O9:H33
5(22)	Bovino	O104:H12		2 (2)	Humano	O9:H21
				4 (4)	Humano	O9:H9
				3 (3)	Humano	O9:H31
				2 (2)	Humano	O9:H11
				1(1)	Humano	O9:H10
				1 (1)	Humano	O9:H19
				2 (2)	Humano	O9:H?
				1 (1)	Humano	O9:H7
				1 (1)	Humano	O9:H34
				11 (11)	Bovino	O9:NM
				4(4)	Aves	O9:H11
				2 (2)	Bovino	O9:H4
				2 (2)	Bovino	O9:H21
				2 (2)	Bovino	O9:H54
				1 (1)	Bovino	O9:H25
				1 (1)	Aves	O9:H25
				1(1)	Aves	O9:H21
Total = 23 (100)				Total = 98 (100)		

Tipificación serológica de *E. coli* O9 de origen animal. En este grupo de cepas se identificaron 7 serotipos, el más frecuente fue O9:NM con 11 (11 %) aislamientos de origen bovino, O9:H25 presento 1 (1 %) de origen bovino, y uno (1 %) de aves, de O9:H11 se obtuvieron 4 (4 %) cepas de aves, O9:H54 presento 2 (2 %) aislamientos de origen bovino, el serotipo O9:H21 con 2 (2 %) aislamientos de bovino y uno (1 %) de aves, O9:H4 presento 2 (2 %) aislamientos de bovino, por último se encontró un aislamiento (1 %) del serotipo O9:H? de origen bovino (Cuadro 8).

Epitopos comunes entre *E. coli* O9 y O104. Para este análisis primero se determinaron los títulos de los sueros anti-*E. coli* O9 y anti-*E. coli* O104 sin absorber con los antígenos homólogos y heterólogos, en el caso del suero anti- *E. coli* O9 el título determinado con los antígenos O9 y O104 fueron de 1:1600 y 1:400 respectivamente (Cuadro 9). Por lo que respecta al suero anti-*E. coli* O104, presento reactividad con el antígeno homólogo O104 a un título de 1:800. Con respecto a los resultados de la reactividad de los sueros absorbidos (específicos) anti-*E. coli* O9 y anti-*E. coli* O104 contra los antígenos heterólogos, estos mostraron lo siguiente, en el caso del suero específico anti-*E. coli* O9 contra el antígeno O104 la reactividad del suero contra dicho antígeno se eliminó. En el caso del suero específico anti-*E. coli* O104 el título disminuyó de 1:800 a 1:400 (Cuadro 9).

Cuadro 9. Títulos de aglutinación de sueros anti-*E. coli* O9 y anti-*E. coli* O104 sin absorber y absorbidos.

Antígeno de <i>E. coli</i> ¹	Títulos de los sueros sin absorber		Títulos de los sueros absorbidos con cultivos hervidos	
	Anti- <i>E. coli</i> O9	Anti- <i>E. coli</i> O104	Anti- <i>E. coli</i> O9 Absorbido con O104	Anti- <i>E. coli</i> O104 Absorbido con O9
O9	1:1600	-	1:800	-
O104	1:400	1:800	-	1:400

¹Antígeno preparado calentando en cultivo bacteriano a 100 °C durante 1h.

Reactividad antigénica cruzada en cepas de *E. coli* O104 con sueros anti-*E. coli* O9 y anti-*E. coli* O104. Las cepas pertenecientes al serogrupo O104 presentaron una reacción de aglutinación con los sueros anti-*E. coli* O9 y O104. Con el suero anti-*E. coli* O9 sin absorber en 27 (90 %) cepas se determinó un título de 1:400, en 2 (7 %) cepas un título 1:100 y en una (3 %) un título de 1:200. Por lo que respecta a los títulos con el suero anti-*E. coli* O104, en 24 (80 %) cepas O104 se determinó un título de 1:800 con el suero anti-*E. coli* O104 sin absorber, con este mismo suero, 4 (13 %) muestras el título fue de 1:1600 y 2 cepas (7 %) presentaron el título de 1:100 (Cuadro 10). Estos resultados fueron similares a los obtenidos con los antígenos homólogos.

Reactividad de las cepas de *E. coli* O104 con el suero específico anti *E. coli*-O104. De 30 cepas de *E. coli* O104, 19 (63 %) presentaron un título de 1:200, 7 (23 %) de las cepas quedaron con un título de 1:400, 2 (7 %) cepas con un título de 1:100, una (3 %) cepa con el título 1:50, y una con un título 1:800 (Cuadro 10).

Cuadro 10. Títulos de aglutinación de sueros anti-*E. coli* O9 y anti-*E. coli* O104 sin absorber y absorbidos contra cepas de *E. coli* O104.

Título	Sueros sin absorber		Sueros absorbidos con cultivos hervidos	
	Anti- <i>E. coli</i> O9	Anti- <i>E. coli</i> O104	Anti- <i>E. coli</i> O9 Absorbido con O104 ¹	Anti- <i>E. coli</i> O104 Absorbido con O9
1:50	-	-	-	1 (3)
1:100	2 (7)	2 (7)	-	2 (7)
1:200	1 (3)	-	-	19 (63)
1:400	27 (90)	-	-	7 (23)
1:800	-	24 (80)	-	1 (3)
1:1600	-	4 (13)	-	-
N=30 antígenos	30 (100)	26 (100)	-	30

¹La absorción de los sueros se realizó incubado a 50 ° C durante 2 h los sueros con el antígeno heterólogo (cultivo calentado a 100 ° durante 1 h).

Títulos de aglutinación de sueros anti-*E. coli* O9 y anti-*E. coli* O104 sin absorber y absorbidos contra cepas de *E. coli* O9. A diferencia de las cepas de *E. coli* O104, las cepas del serogrupo O9 solo presentaron reacción de aglutinación con el suero anti-*E. coli* O9. De los 101 aislamientos de *E. coli* O9, 79 (78 %) presentaron un título de 1:400, en 12 (12 %) se determinó un título 1:200, 9 (9%) presentaron el título de 1:800 y una sola cepa con un título de 1:100 (Cuadro 11). Ninguna cepa *E. coli* O9 presento reacción cruzada con el suero específico anti-*E. coli* O104.

Cuadro 11. Títulos de aglutinación de sueros anti-*E. coli* O9 y anti-*E. coli* O104 sin absorber contra cepas de *E. coli* O9.

Título	Sueros sin absorber	
	Anti- <i>E. coli</i> O9	Anti- <i>E. coli</i> O104
1:100	1 (1)	-
1:200	12 (12)	-
1:400	79 (78)	-
1:800	9 (9)	-
Total	101	-

*El título homólogo para el suero anti-*E. coli* O9 fue la dilución 1:400 y para el suero anti-*E. coli* O104 la dilución 1:800.*

Grupos filogenéticos y factores de virulencia de cepas del serogrupo *E. coli* O9.

Considerado el árbol de decisión dicotómica de Clermont (Figura 3), las cepas de *E. coli* se agruparon en tres grupos filogenéticos, A (*chuA*-, *yjaA*+, TspE4.C2), B1 (*chuA*-, *yjaA*-, TspE4.C2+) y D (*chuA*+, *yjaA*-, TspE4.C2+). Los amplicones de los genes *chuA*, *yjaA* y TspE4.C2 presentaron un peso molecular de 239, 211 y 152 pb respectivamente (Figura 4). Los resultados de los grupos filogenéticos mostraron que 43 (59 %) de 73 cepas del serogrupo O9 se ubicaron en el grupo filogenético A, 28 (38 %) en el grupo B1 y 2 (3 %) se ubicaron el grupo D1 (Cuadro 12). El análisis por grupos filogenéticos y su relación con los

serotipos mostró que en el grupo filogenético A se identificaron 21 cepas (29 %) del serotipo O9:NM, 4 (6 %) del serotipo O9:H4, 4 (6 %) al serotipo O9:H33, 3 (4 %) cepas de serotipo O9:H9, para los serotipos O9:H11 y O9:H21 dos (3 %) cepas cada uno, finalmente los serotipos O9:H10, O9.H34, O9:H?, O9:H9, O9.H7, O9:H19 y O9:H33 cada uno con una cepa (1 %). El análisis del grupo filogenético B1 mostró que 19 (26 %) de las cepas fueron del serotipo O9:H25, 4 (6 %) aislamientos del serotipo O9:NM, 2 (3 %) cepas del serotipo O9:H11, y de los serotipos O9:H21, O9:H19 y O9:H7 se obtuvo un aislamiento de cada uno (1 %). Por último solo 2 (3 %) de los aislamientos se ubicaron en el grupo filogenético D1, uno del serotipo O9:NM y otro del serotipo O9:H21 (Cuadro 12).

La distribución de factores de virulencia en las 73 cepas analizadas en este estudio fue la siguiente: 19 (26 %) contienen el gen *stx1*, 7 (10 %) presentaron el gen *eae*, 2 (3 %) el gen *bfp*, 23 (32 %) cepas el gen *aggR* (Figura 5), 11 (15 %) contienen el gen *aap* (Figura 6), 3 (4 %) contienen el gen *aatA*, solo 8 (10 %) cepas resultaron no contener ninguno de estos factores de virulencia. De acuerdo a los factores de virulencia que contenían este grupo de cepas se pudieron clasificar: 10 cepas (14 %) dentro del patotipo STEC, 16 cepas (22 %) como EAEC, dos cepas (3 %) se agruparon dentro del patotipo EHEC, cinco cepas (7 %) fueron clasificadas como EPEC atípica y un grupo con 7 cepas (3 %) ubicadas en un grupo híbrido STEC/EAEC (Cuadro 12).

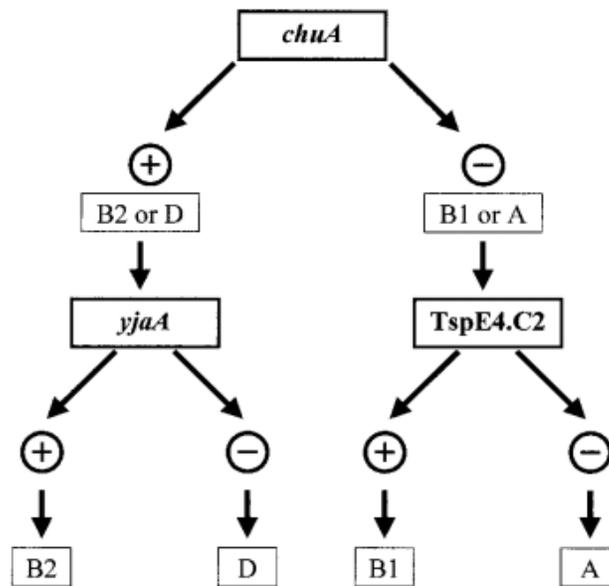


Figura 3. Árbol de decisión dicotómico de Clermont [2000].

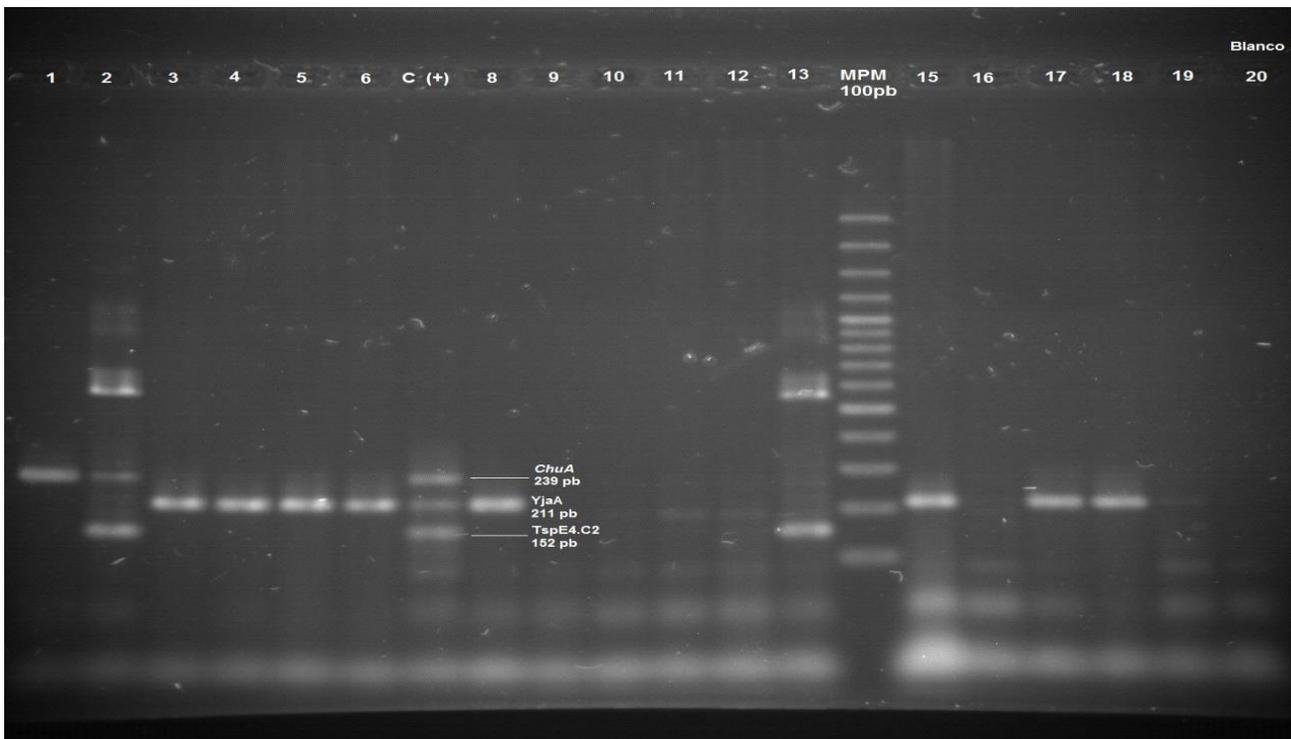


Figura 4. Electroforesis de genes utilizados para la agrupación filogenética en gel de agarosa al 1.5 %. En el carril 1 una muestra positiva para el gen *chuA* (Grupo D), carril 2 muestra positiva para los genes *ChuA* y *TspE4.C2* (Grupo D2), carriles 3-6, 8, 15, 17 y 18 muestras positivas para el gen *YjaA* (Grupo A), carril 7 control positivo para los 3 genes, carriles 9-12, 16 y 19 muestras negativas a la amplificación de los 3 genes (Grupo A0), carril 13 muestra positiva para el gen *TspE4.C2* (Grupo B1), carril 14 Marcador de Peso Molecular (Fermentas™) de 100 pb en 100 pb y carril 20 Blanco.

Cuadro 12. Relación de grupos filogenéticos, factores de virulencia y patotipos en cepas de *E. coli* O9 aisladas de niños menores de 2 años de diferentes zonas geográficas.

País	Serotipo	No. cepas	Grupo Filogenético			Factores de virulencia			Patotipo				
			A	B1	D1	<i>stx1</i>	<i>aggR</i>	<i>eae</i>	STEC	EAEC	STEC/EAEC	EHEC	EPEC atípica
N (%)													
México	O9:NM	26	21	4	1	9	3		8	2	1		
	O9:H4	4	4			3	3		1	1	2		
	O9:H9	3	3			1	2			1	1		
	O9:H10	1	1				1			1			
	O9:H11	2		2		1			1				
	O9:H21	2		1	1								
	O9:H25	19		19		2	9			7	2		
	O9:H31	3	3				1			1			
	O9:H33	4	4			2		4				2	2
	O9:H34	1	1					1					1
O9:H?	1	1											
Egipto	O9:NM	3	2	1		1	3			2	1		
	O9:H9	1	1				1			1			
	O9:H7	1		1									
Argentina	O9:H19	1	1					1					1
	O9:H33	1	1					1					1
Total		73 (100)	43 (59)	28 (38)	2 (3)	19 (26)	23 (32)	7 (10)	10 (14)	16 (22)	7 (10)	2 (3)	5 (7)

La cepas de referencia FMU 98695 y FMU 94207 pertenecen al grupo filogenético A y no contenían factores de virulencia.

Grupos filogenéticos de cepas del serotipo de *E. coli* O9 aisladas de animales (vacas y aves). Los grupos filogenéticos de las aves y bovinos, mostraron que 12 (48 %) de 25 cepas se ubicaron en el grupo filogenético A, 12 (48 %) en el grupo filogenético B1 y 1 (4 %) en el grupo D1. El análisis de los grupo filogenéticos y su relación con serotipos O9, mostró que en el grupo filogenético A se identificaron 9 (36 %) cepas del serotipo O9:NM, los serotipos O9:H4, O9:H21 y O9:H? con un aislamiento (12 %) cada uno. En relación al grupo filogenético B1, el análisis reveló que 4 (16 %) cepas fueron del serotipo O9:H11 y los serotipos O9:NM, O9:H25, O9:H21 y O9:H54 con 2 aislamientos (32 %) cada uno. Finalmente solo una cepa (4 %) del serotipo O9:H4 se colocó en el grupo filogenético D1 (Cuadro 13).

Distribución de genes de virulencia en cepas *E. coli* O9 aisladas de animales. La distribución de los genes de virulencia en las cepas de origen animal fue la siguiente: 3 (12 %) cepas contienen el gen *stx1*, el gen *eae* está presente en 4 (16 %) cepas, el gen *aggR* se identificó en 2 (8 %) cepas, el gen *aap* solo se identificó en una cepa (Cuadro 13). Mientras que para los genes *stx2*, *eafA*, *bfp* y *aatA*, se obtuvo un resultado negativo en todas las cepas.

Cuadro 13. Relación de grupos filogenéticos con los serotipos de cepas de *E. coli* O9 aislada de muestras de bovinos y aves.

Serotipos	Grupos filogenéticos	Número de cepas (%)	Factores de virulencia				Patotipos
			<i>stx1</i>	<i>eae</i>	<i>aggR</i>	<i>aap</i>	
O9:NM	A	9 (36)	2	3	-	1	2 EHEC/ 1 EPEC-A
	B1	2 (8)	-	-	-	-	-
O9:H25	B1	2 (8)	-	-	1	-	EAEC
O9:H4	A	1 (4)	-	-	-	-	-
	D1	1 (4)	1	-	-	-	STEC
O9:H11	B1	4 (16)	-	-	1	-	EAEC
O9:H21	A	1 (4)	-	-	-	-	-
	B1	2 (8)	-	-	-	-	-
O9:H54	B1	2(8)	-	1	-	-	EPEC-A
O9:H?	A	1 (4)	-	-	-	-	-
	Total	25 (100)	3	4	2	1	

La cepa de referencia ECOR pertenece al grupo filogenético A1.

Grupos filogenéticos de cepas del serotipo de *E. coli* O104 aislada de niños menores de dos años y de bovinos. Los resultados de los grupos filogenéticos mostraron que de 18 cepas del serogrupo O104, 15 cepas (83 %) se ubicaron en el grupo filogenético A, y 3 cepas (17 %) en el grupo B1 (Cuadro 14). El análisis por grupos filogenéticos y su relación con los serotipos mostró que en el grupo filogenético A se identificaron 8 (44 %) cepas pertenecientes al serotipo O104:H12, 4 (22 %) al serotipo O104:H4, para el serotipo O104:NM se encontraron 2 (11 %) y se identificó una cepa (6 %) del serotipo O104:H7 dentro de este filogrupo.

El análisis del grupo filogenético B1 mostró que los 2 aislamientos (11 %) pertenecen al serotipo O104:H4. Por otra parte los 5 aislamientos correspondientes a las muestras rectales de vacas se ubicaron dentro del grupo filogenético A1 y todas fueron del serotipo O104:H12.

La distribución de los factores de virulencia en las cepas aisladas de niños menores de dos años fue la siguiente: 14 (78 %) cepas fueron positivas para la presencia del gen *stx1*, 8 (44 %) cepas el gen *eae*, 7 (39 %) cepas contienen los genes *aggR*, *aatA*, y *aap*. Siendo todas negativas para la amplificación de los genes *stx2*, *eafA* y *bfp*.

Distribución de genes de virulencia en cepas *E. coli* O104 aislada de bovinos.

La distribución de los genes de virulencia en las cepas aisladas a partir de bovino mostró que 4 (80 %) de estas contenían el gen *eae*, además 2 de ellas contenían el gen *stx1*, y una de ellas adicionalmente presentaba el gen *aatA*. Por lo tanto 2 de estas cepas pertenecen al patotipo EPEC-A, mientras que 2 cepas al patotipo EHEC, aunque una de las últimas adicionalmente contiene el gen *aatA*, el cual es característico de EAEC.

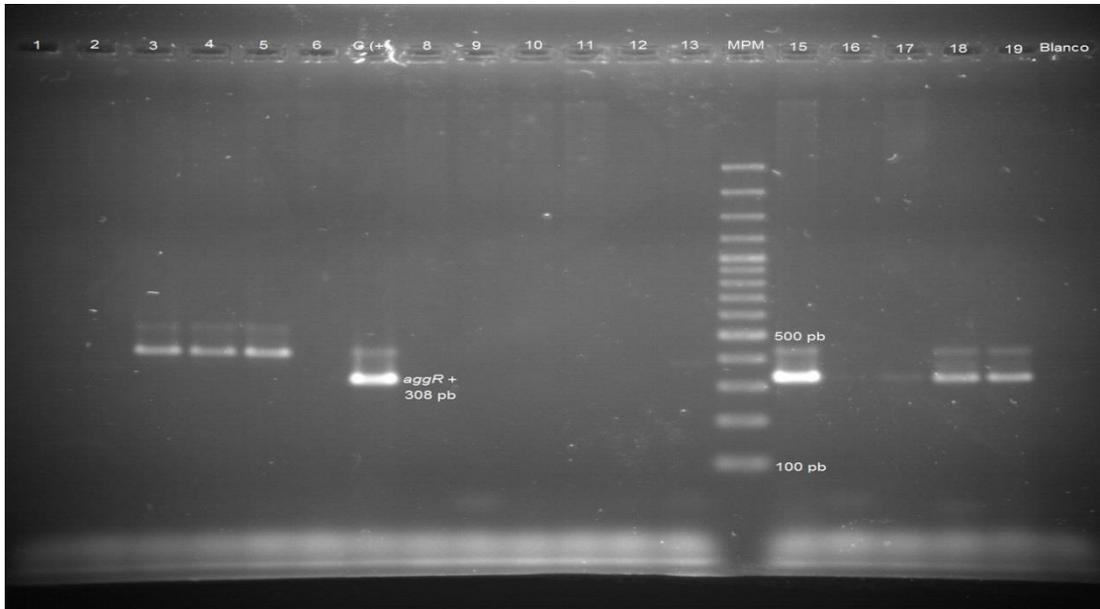


Figura 5. Electroforesis de gen *aggR* en gel de agarosa al 1.5 %. Carril 7 control positivo, carril 14 MPM (Fermentas™), carriles 15, 18 y 19 muestras positivas, carril 20 blanco.

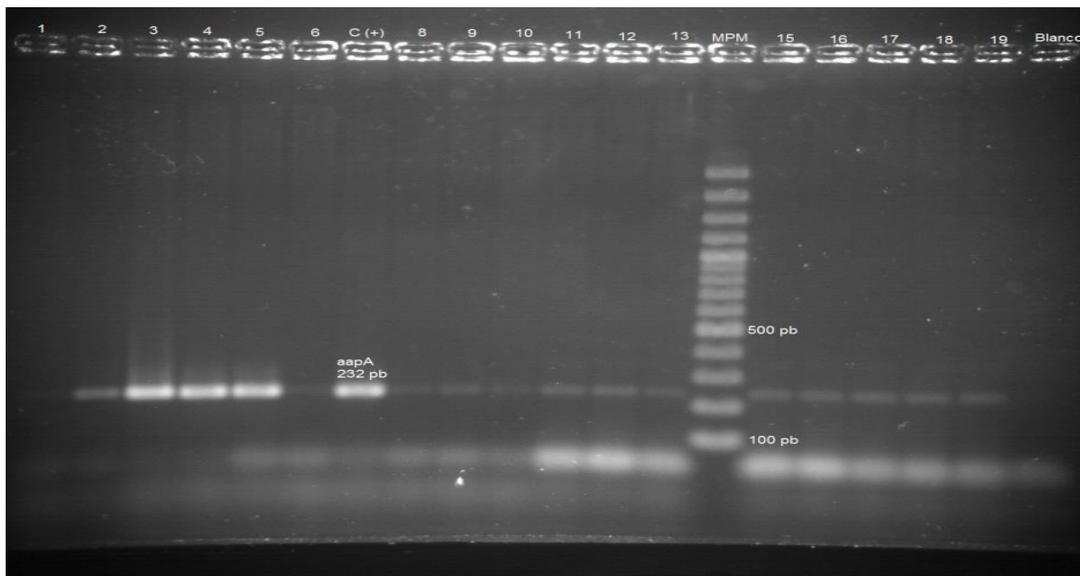


Figura 6. Electroforesis de gen *aap* en gel de agarosa al 1.5 %. Carriles 1 y 6 muestras negativas, carriles 2-5, 8-13 y 15-19 muestras positivas, carril 14 MPM (Fermentas™), carril 20 blanco.

Cuadro 14. Relación de grupos filogenéticos, factores de virulencia y patotipos de cepas de *E. coli* O104 aisladas de casos de diarrea infantil de diferentes zonas geográficas.

País	Año	Serotipo	Número de Cepas	Grupo filogenético	<i>eae</i>	<i>stx1</i>	<i>aggR</i>	<i>aap</i>	<i>aatA</i>	Patotipo
					N (%)					
México	1985	O104:NM	1	A		1				STEC
	1997	O104:H12	1	A		1				STEC
	1998	O104:H4	1	B1			1	1	1	EAEC
	2003	O104:H7	1	A						
	2003	O104:H12	3	A		2				STEC
Egipto	1996	O104:H4	1	A	1	1				EHEC
	1998	O104:NM	1	A	1	1	1	1	1	EHEC/EAEC
	1998	O104:H4	2	A	2	2	2	2	2	EHEC/EAEC
Argentina	2003	O104:H12	1	A		1				STEC
	2003	O104:H12	1	A	1	1				EHEC
	2003	O104:H12	1	A	1					EPEC-A
	2003	O104:H4	1	A		1				STEC
Bangladesh	2009	O104:H4	1	A		1	1	1	1	STEC/EAEC
	2009	O104:H4	1	B1	1	1	1	1	1	EHEC/EAEC
	2009	O104:H12	1	A	1	1	1	1	1	EHEC/EAEC
Total			18		8 (44)	14 (78)	7 (39)	7 (39)	7 (39)	

Las cepas de referencia: 98788 y 117033, y cinco cepas referencia ECOR se ubicaron en el grupo filogenético A.

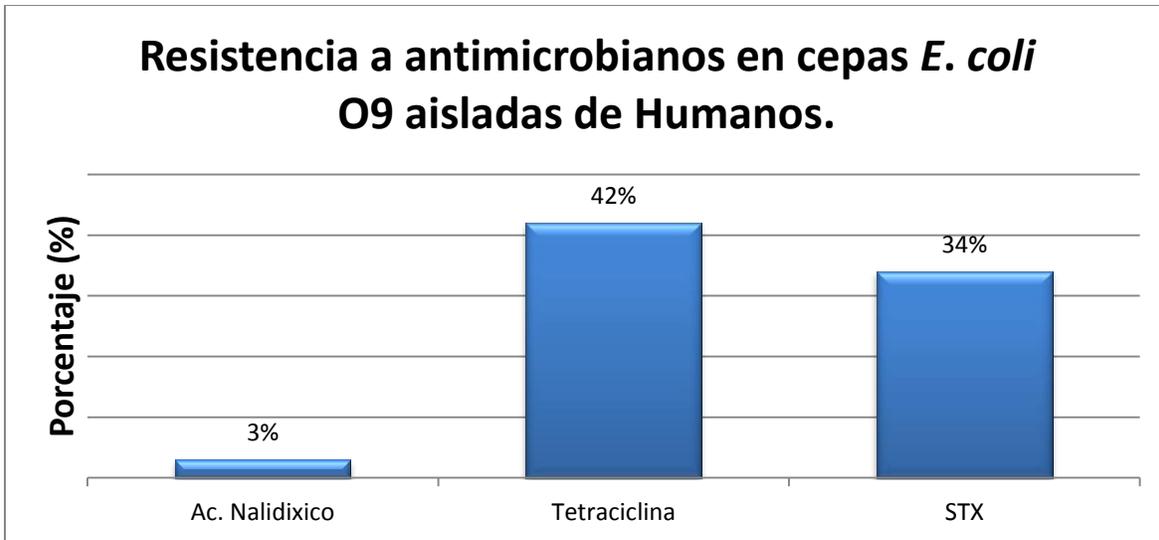
Patrones de resistencia a antimicrobianos mediante pruebas de difusión en agar.

En la cepa *E. coli* ATCC 25922 utilizada en los ensayos de sensibilidad a los antimicrobianos se obtuvieron los halos de inhibición esperados para esta cepa (Cuadro 15).

Cuadro 15. Halos de inhibición obtenidos en la cepa control *E. coli* ATCC 25922.

Agente antimicrobiano	Código	Potencia del disco	Halos obtenidos (mm)
Cefoxitina	FOX	30 µg	29.0
Ceftriaxona	CRO	30 µg	34.5
Ceftazidima	CAZ	30 µg	29.0
Cefotaxima	CTX	30 µg	34.0
Cefepima	FEP	30 µg	32.8
Imipenem	IPM	10 µg	26.3
Aztreonam	ATZ	30 µg	30.4
Ofloxacina	OFX	5 µg	33.0
Norfloxacina	NOR	10 µg	33.2
Ciprofloxacina	CIP	5 µg	36.0
Ac. Nalidíxico	NA	30 µg	28.0
Trimetoprim/Sulfametoxazol	STX	1.25/23.75 µg	25.6
Tetraciclina	TE	30 µg	24.5

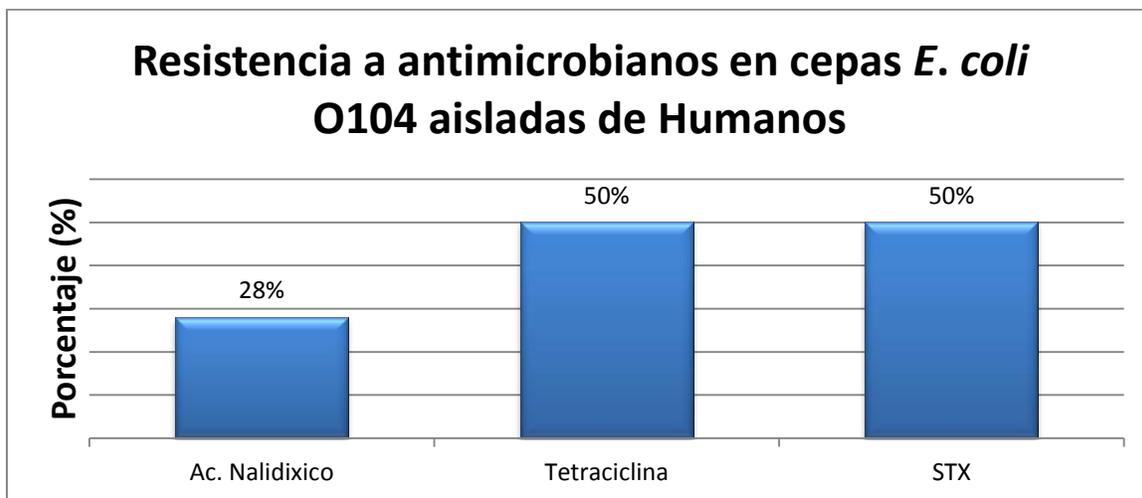
Resultados de resistencia a antimicrobianos en cepas *E. coli* O9 de humanos. De las 73 cepas de este grupo solo 2 (3 %) fueron resistentes a NA, 31 (42 %) cepas resistentes a tetraciclina, y 25 (34 %) a STX, las demás cepas resultaron ser 100 % sensibles a los demás antibióticos probados (Gráfica 1).



Gráfica 1. Porcentajes de resistencia a antimicrobianos en cepas *E. coli* O9 aisladas de humanos.

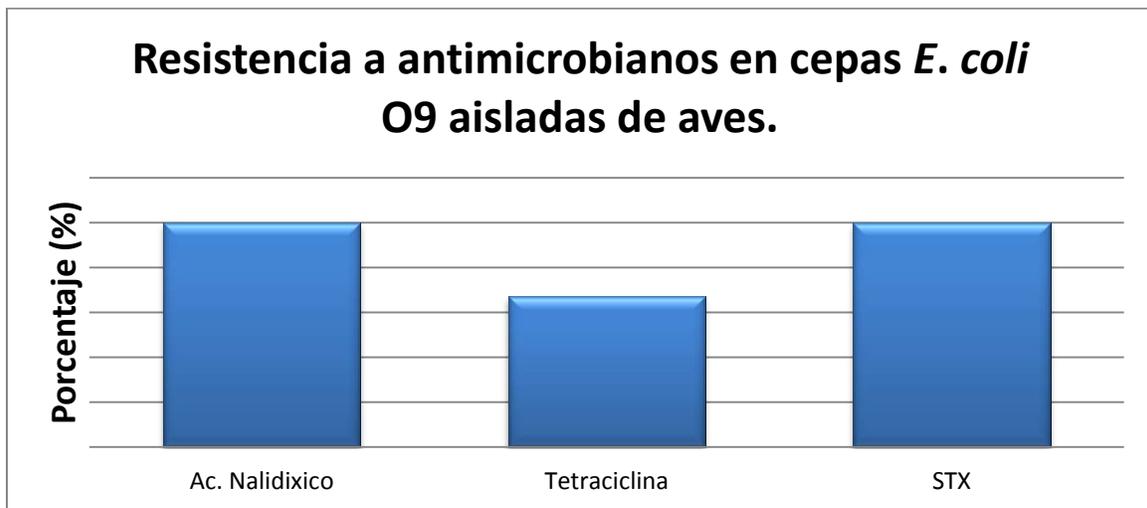
Resultados de resistencia a antimicrobianos en cepas *E. coli* O104 aislada de humanos.

Las 18 cepas del serogrupo O104 de este estudio fueron 100 % sensibles a todas las cefalosporinas utilizadas, siendo sensibles también a Ofloxacina, Norfloxacina, Ciprofloxacina (Fluoroquinolonas). Sin embargo presentaron un 50 % de resistencia a Tetraciclina, un 50 % de resistencia a STX, y un 28 % de resistencia a Ácido Nalidíxico (Gráfica 2).



Gráfica 2. Porcentajes de resistencia a antimicrobianos en cepas *E. coli* O104 aisladas de humanos.

Resultados de resistencia a antimicrobianos en cepas *E. coli* O9 aisladas de aves. Las 6 cepas pertenecientes a este grupo resultaron ser 100 % resistentes a ácido nalidíxico y a trimetoprim sulfametoxazol, 4 (67 %) cepas de estas también resistían el efecto de la tetraciclina, mientras que con los demás antibióticos el resultado fue de un 100 % de sensibilidad (Gráfica 3).

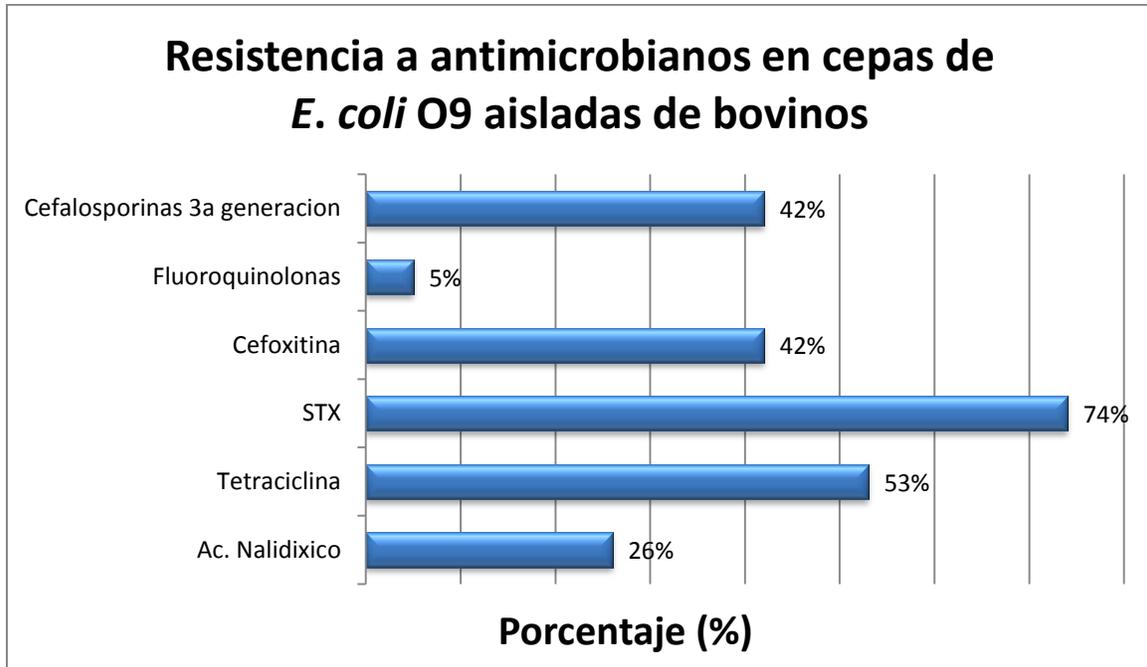


Gráfica 3. Porcentajes de resistencia a antimicrobianos en cepas *E. coli* O9 aisladas de aves.

Resultados de resistencia a antimicrobianos en cepas *E. coli* O9 aisladas de bovinos.

Las 20 cepas aisladas a partir de muestras rectales tomadas en vacas lecheras del Estado de Sonora resultaron presentar una mayor resistencia a los antibióticos utilizados para estos antibiogramas que las demás cepas analizadas. Se obtuvieron los siguientes resultados; 42 % de las cepas aisladas fueron resistentes a cefoxitina (FOX), 5 % resistentes a las fluoroquinolonas, presentaron 26 % de resistencia a NA, además se encontró una marcada resistencia a tetraciclina (53 %) y a STX (74 %), resultando ser 100 % sensibles solo a FEP e IPM, sin embargo 42 % de estas cepas resultaron tener un halo de inhibición intermedio para

todas las cefalosporinas de 3^a generación utilizadas en este estudio, además de que también presentaron estos mismos resultados de inhibición intermedia a aztreonam (Gráfica 4).



Grafica 4. Porcentajes de resistencia a antimicrobianos en cepas *E. coli* O9 aisladas de bovinos.

Resultados de resistencia a antimicrobianos en cepas *E. coli* O104 aisladas de bovinos.

De las 5 cepas O104:H12 aisladas a partir de vacas solo un par de ellas presentaron un halo de inhibición intermedio para STX. Resultaron ser 100% sensibles a todos los demás antibióticos usados en este trabajo.

VIII. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.

Los resultados obtenidos en este estudio retrospectivo que comprende un periodo de 1985 hasta el año 2013 contribuyen a establecer la relación antigénica entre cepas *E. coli* de los serogrupos O9 y O104, la cual se debe a la existencia de epitopos compartidos entre ambos microorganismos. Lo anterior se puede asegurar por ensayos de aglutinación realizados con sueros policlonales anti-*E. coli* O9 y anti-*E. coli* O104 obtenidos a partir de un esquema de inmunización en conejo. Los 25 antígenos O preparados a partir de las cepas del serogrupo O104 presentaron una reacción de aglutinación positiva con ambos sueros a títulos de 1:400 y 1:800. Sin embargo cuando los sueros anti-*E. coli* O9 absorbidos (específicos) fueron titulados con los mismos antígenos la reacción de aglutinación se eliminó, observando que el suero anti-*E. coli* O104 conservó su reactividad contra el antígeno O104. Estos resultados tienen correlación con diversos estudios previos que reportan que el LPS de *E. coli* O104 presenta una similitud estructural con el antígeno capsular K9 de *E. coli* O9:K9 [Orskov, 1984; Kogan, 1992]. La estructura primaria del polisacárido capsular K9 contiene ácido α N-acetilmurámico (NeuNAc), N-acetil galactosamina (GalNAc), galactosa (Gal) y acetato (Ac) en una proporción molar de 1:1:2:1, idéntico al LPS de O104 [Kogan G, 1992]. Por otra parte una secuenciación previa de los genes responsables de la síntesis del antígeno somático de *E. coli* O104 mostraron ser idénticos a los genes responsables de la síntesis del antígeno capsular en *E. coli* O9:K9, contienen un gen que codifica para la polimerasa del antígeno O (*wzy*), uno que codifica para flipasa (*wzx*), 3 genes más que codifican para 3 enzimas catalizadoras para la formación de citidin monofosfato (CMP)-NeuNAc a partir de N-Acetil-Glucosamina (GlcNAc), 3 genes de transferencia denominados: *WbwA* une a α -NeuNAc-(2,3)- β Gal, *WbwB* forma el enlace α -Gal-(1,4)- α -NeuNAc, *WbwC* forma el enlace

β -Gal-(1,3)- β -GalNAc-(1,4) [Wang L, 2001]. Otro hecho interesante observado en la reactividad de los sueros anti-O9 y anti-O104 fue que los serotipos identificados del serogrupo O9 no presentaron reacción con el suero O104, esto pudiera indicar que antígeno K9 permanece en forma soluble en la suspensión o bien que las cepas del serogrupo O9 analizadas en este trabajo carecen del antígeno K9 relacionado con la reactividad antigénica cruzada con el LPS O104.

La serotipificación es un importante complemento de la identificación bioquímica y desde el punto de vista epidemiológico permite asociar algunos serotipos con el agente etiológico de los brotes de infecciones intestinales o bien determinar la prevalencia de una serovariedad en distintas zonas geográficas, en este trabajo la serotipificación nos permitió conocer los serotipos de mayor prevalencia en la población del estudio. En 25 cepas de *E. coli* O104 fueron identificados cuatro serotipos, O104:H4 (35 %), O104:H12 (30 %), O104:NM (9 %), O104:H7 (4 %) y O104:H12 (22 %) estas últimas son de origen bovino. De acuerdo con los resultados obtenidos respecto a las 73 cepas de *E. coli* O9 de origen humano se identificaron trece serotipos, siendo los más frecuentes O9:NM (30 %), O9:H25 (19 %) y O9:H33 (5 %) de los aislamientos. Sin embargo la serotipificación no provee una identificación completa de patotipos, ya que puede haber serotipos que pertenezcan a dos patotipos a la vez como O26:H11, estas cepas pueden ser considerada algunas veces del patotipo EHEC y otras como EPEC dependiendo de los genes de virulencia que presenten.

Los resultados obtenidos en la búsqueda de genes de virulencia nos ayudaron a definir el patotipo al cual pertenecen las cepas del estudio, buscamos la presencia de genes característicos del patotipo STEC (*Stx1*, *Stx2*), del patotipo EAEC (*aggR*, *aatA*, *aap*) y del patotipo EPEC (*eae*, *bfp*, *eafA*) y en general podemos decir que tomando en cuenta ambos

serogrupos O9 y O104, aisladas de animales o de humanos los porcentajes más altos de cepas pertenecen a los patotipos STEC (14 cepas) y EAEC (23 cepas) ya que contienen el gen *aggR* el cual es un activador transcripcional, involucrado en la producción de toxinas y diferentes factores de virulencia de adherencia [Huang, 2006; Croxen, 2013] o bien se identificó en ellas la presencia del gen *stx1*. Al momento de analizar si existía una relación entre el grupo filogenético al que pertenecen las cepas con un patotipo específico no se encontró dicha relación, ya que se presentan cepas del grupo A que contienen cepas tanto de los patotipo STEC, EAEC, EPEC-A, EHEC, como cepas híbridas, las cuales se pueden clasificar como STEC/EAEC y EHEC/EAEC [Clement, 2012; Croxen, 2013]. Sin embargo encontramos relación en cuanto al país de procedencia del aislamiento, en el caso de las cepas de México los serotipos O104 se definieron como STEC y EAEC, los serotipos de Egipto como EHEC y EAEC/EHEC, los de Argentina como STEC, EHEC y EPEC atípica, y finalmente las de Bangladesh como STEC/EAEC y EHEC/EAEC. Una situación similar a la de los serotipos de *E. coli* O104 fue observado con los serotipos de *E. coli* O9, en donde los serotipos aislados en México fueron del patotipo STEC y EAEC y en menor proporción STEC/EAEC, las cepas de Egipto se agruparon en los patotipos EAEC y STEC/EAEC, finalmente los serotipos aislados en Argentina se agruparon como EPEC atípica.

Aunque las cepas de *E. coli* O104 del estudio no presentaron genes *stx2* en combinación con los genes del patotipo EAEC como las cepas de *E. coli* O104:H4 aisladas en el brote epidémico (*stx2*, *aatA*, *aggR*, *aap*, *aggA* y *aggC*) que se presentó en países Europeos en el 2011 [WHO, 2011; Bielaszewska, 2011; Frank, 2011], del cual aún se mantiene la incógnita de la fuente de contaminación de las coles identificadas como la principal fuente de infección, e incluso se mantiene abierta la posibilidad de que los seres humanos tengan un papel como

reservorio de esta bacteria, de hecho este tipo de cepas no se han aislado en vacas por ejemplo, consideradas como reservorio natural de STEC [Buchholz, 2011; Croxen, 2013]. Una característica muy interesante encontrada en las cepas de *E. coli* del estudio que fueron aisladas de diferentes lugares geográficos fue el contenido de genes de virulencia de varios patotipos en estos microorganismos, esto indica la presencia de una gran plasticidad genética y otros factores como la transferencia horizontal de genes, así como la capacidad de recombinación de estos microorganismos para incorporar en su genoma material genético de otros microorganismos [Gogarten, 2002; Schubert, 2009]. Por ejemplo identificamos la presencia de genes como el *eae* (+) relacionado con la isla de patogenicidad *LEE*, *aggR* (+) contenido en el plásmido de adherencia agregativa (*pAA*); y *stx1* (+) adquirido a través de un bacteriófago en un conjunto de 6 cepas del serogrupo O104 que son definidas como comensales de acuerdo al grupo filogenético al que pertenecen, y un total de 7 cepas fueron del patotipo STEC/EAEC. Estos contextos ilustran como el proceso de recombinación puede jugar un papel muy importante en la evolución adaptativa [Gorgaten JP, 2002; Ochman 2000]. Esto nos habla de la importancia de monitorear cualquier brote epidemiológico relacionado con *E. coli* O104 diarreogénica ya que como sabemos es un patógeno emergente el cual en la mayoría de las veces no es buscado rutinariamente en muestras de heces en los laboratorios clínicos de todo el mundo, debido a que hacen falta técnicas de diagnóstico rápidas y sensibles capaces de identificar correctamente estos patotipos, por lo tanto se propone la técnica de PCR como una herramienta biotecnológica que permita hacer un diagnóstico de laboratorio oportuno en conjunto con sueros específicos como los utilizados en este estudio. En lo que se refiere al análisis de grupos filogenéticos, en las cepas *E. coli* O9 de origen humano encontramos 59 %, 38 % y 3 % para los grupos A, B1 y D1 respectivamente.

Mientras que en las cepas *E. coli* O104 de origen humano se ubicaron 15 cepas (83 %) en el grupo A, y 3 cepas (17 %) en el grupo B1, estos resultados coinciden con estudios previos en los cuales las cepas que forman parte de la microbiota del intestino de niños menores de dos años pertenecen principalmente a los grupos filogenéticos A y B1 [Parijat, 2013].

De las 25 cepas *E. coli* O9 de origen animal 48 % se ubicaron en el grupo A, 48 % en el grupo B1 y solo 4 % en el grupo B2, mientras que las 5 cepas *E. coli* O104 aisladas a partir de vacas pertenecen al grupo A1, esto contrasta con estudios previos, tales estudios refieren que los mamíferos omnívoros presentan una mayor diversidad de microbiota, a diferencia de mamíferos herbívoros que presentan una menor diversidad [Carlos, 2010], sin embargo este mismo autor reporta que las cepas del grupo A se adaptan mejor a omnívoros, lo cual coincide con los resultados obtenidos durante este trabajo. También indica que las cepas B1 se adaptan mejor a herbívoros, en nuestro caso la agrupación filogenética entre cepas de origen animal no mostraron esta tendencia. Si bien la mayoría de las cepas en estudio se ubicaron dentro de los grupos filogenéticos A y B1, definidos como bacterias comensales que forman parte de la microbiota normal del intestino de humanos, de cerdos y bovinos, estas presentaron genes de virulencia de patotipos considerados como diarreogénicos en diferentes combinaciones.

En la actualidad existen diversos estudios que reportan un incremento en la incidencia de resistencia tanto a cefalosporinas, como a fluoroquinolonas en cepas de *E. coli* uropatógenas (UPEC) emergentes, por ejemplo la cepa O25-ST121 descrita por Molina [2011] fue el serotipo predominante de un total de 119 casos de Infecciones del Tracto Urinario (ITU's) aislados entre el periodo 2004-2007 en diferentes hospitales del Distrito Federal, esta cepa presentó un 87.3 % de resistencia a penicilina, 55.5-60.6 % de resistencia a fluoroquinolonas,

y un 56.4 % de resistencia a STX , en este mismo estudio se reporta una relación entre las cepas multirresistentes y el grupo filogenético al que pertenecen, ya que la gran mayoría pertenecen al grupo B2 clasificado como cepas causantes de infecciones extraintestinales (ExPEC), en nuestro trabajo no encontramos ninguna relación entre cepas resistentes y su agrupación filogenética, sin embargo las cepas *E. coli* O104:H4 que fueron causantes del brote epidemiológico que apareció en Alemania en Mayo del 2011 también presentaban la característica de producir enzimas denominadas β -lactamasas de espectro extendido (BLEE's), esta resistencia se debía a la adquisición del plásmido CTX-M-15 [Bielaszewska, 2011], por esta razón propusimos evaluar los perfiles de resistencia de las cepas utilizadas en este estudio para establecer si nuestras cepas O104 presentaban alguna similitud con las cepas O104 aisladas en Europa.

Los resultados de la resistencia a los antibióticos utilizados en este trabajo mostraron que las cepas presentaron un alto porcentaje de resistencia a trimetoprim sulfametoxazol (STX), 74 % en cepas *E. coli* O9 de origen animal, 34 % en cepas O9 de origen humano, 100 % en cepas O9 de aves y 50 % en cepas *E. coli* O104 de humanos. Lo cual concuerda con estudios previamente realizados [Huang D, 2006], en dichos estudios se ha demostrado un incremento de resistencia a este antibiótico debido a su uso indiscriminado como tratamiento de elección para pacientes pediátricos no solo en México sino en varias regiones del mundo. Por ejemplo en un estudio realizado por Estrada-García en 2005 en donde se muestrearon un total de 430 niños que presentaban un cuadro de diarrea aguda hospitalizados en el IMSS, 75 % de estos resultaron ser resistentes a STX, en este mismo estudio 85 % de los pacientes resultaron ser resistentes a tetraciclina, lo cual también tiene correlación con el presente trabajo donde encontramos la presencia de un 65 % de resistencia a tetraciclina en cepas *E. coli* O9 de

origen bovino, 42 % en cepas O9 de humanos, 67 % en cepas aisladas a partir de aves, y un 50 % en cepas *E. coli* O104 aislada de niños menores de dos años. Por otra parte todas las cepas de origen humano analizadas resultaron ser 100 % sensibles a las fluoroquinolonas, imipenem, aztreonam y cefalosporinas probadas, sin embargo este tipo de antibióticos no son aprobados como tratamiento en pacientes pediátricos debido al riesgo que hay de dañar articulaciones inmaduras, y en cuanto a las cefalosporinas parenterales de tercera generación estas son únicamente administradas intrahospitalariamente [Estrada-García, 2005]. Este tipo de antibióticos tienen éxito al ser elegidos como tratamiento contra infecciones causadas por EAEC, sin embargo debido a perfil genético encontrado en muchas cepas que contienen el gen *stx* no es recomendable el uso de antibióticos ya que estos pueden causar el incremento de la liberación de la toxina Shiga por parte de la bacteria y por lo tanto incrementar el riesgo de producir patologías como el SUH, otros factores de riesgo que han sido identificados para desarrollar esta patología son el vómito, la presencia de sangre en heces y la cuenta alta de leucocitos en las muestra de heces [Wong, 2013]. En el brote del 2011 se utilizó azitromicina, meropenem y rifaximina, estos antibióticos reprimen la expresión de *stx in vitro*, en general una infección causada por STEC se limita a una semana, este tipo de infecciones son tratadas por lo general con una rehidratación oral adecuada, en cuanto a la elección del antibiótico también se deben tomar en cuenta la región del mundo donde la infección fue adquirida y por lo tanto los diferentes patrones sensibilidad que se presentan en cada región geográfica [Croxen, 2013].

IX. CONCLUSIONES

- Se corroboró la identidad fenotípica de las cepas de *E. coli* O9 y O104 con ayuda de pruebas bioquímicas y serológicas.
- El presente trabajo contribuye a establecer la relación antigénica entre ambos serogrupos ya que *E. coli* O104 presenta epitopos compartidos con *E. coli* O9.
- La mayoría de las cepas pertenecen a los grupos filogenéticos A y B1 definidos principalmente como cepas comensales aunque presentan genes de virulencia de los patotipos asociados con diarrea.
- Los elevados porcentajes de resistencia a trimetoprim/sulfametoxazol encontrados en este estudio sugieren que se deben administrar otros antibióticos como tratamiento de primera elección frente a estas patologías.
- Conforme con los resultados obtenidos encontramos principalmente la presencia de los factores de virulencia *aggR* y *stx1*, esto nos ayudó ubicar las cepas dentro de los patotipos EAEC, STEC, EPEC-A, EHEC/EAEC y STEC/EAHEC.
- La técnica de PCR triplex descrita por Clermont [2000] es un método confiable para asignar grupo filogenético, con buena sensibilidad y especificidad.
- La técnica de PCR en la práctica clínica se puede utilizar como un método que permita identificar cepas patógenas, además de que sirve como un complemento de la identificación serológica.

X. Referencias Bibliográficas

1. Afset JE, Bevanger L, Romundstad P, Bergh K. Association of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) with prolonged diarrhea. J Med Microbiol. 2004; 53: 1137-1144.
2. Baldini MM, Kaper JB, Levine MM, Candy DC, Moon HW. Plasmid-mediated adhesion in enteropathogenic *Escherichia coli* J Pediatr Gastroenterol Nutr. 1983; 2: 534–538.
3. Barrow GI, and Feltham R K A (Eds). Cowan and Steel's. Manual for the identification of Medical Bacteria. Third Edition. Cambridge: University Press; 1993.
4. Bielazewska M, Mellman A, Wenlan Z, Köck R, Fruth A, Fruth A, et al. Characterisation of the *Escherichia coli* strain associated with an outbreak of haemolytic uraemic syndrome in Germany, 2011: a microbiological study. Lancet Infect Dis. 2011; 11: 671-676.
5. Brüssow H, Batt CA, Tortorello ML (Eds). Enteropathogenic *E. coli*. Encyclopedia of Food Microbiology, vol 1. Elsevier Ltd, Academic Press; 2014: 722-727.
6. Buchholz U, Bernard H, Werber D, Böhmer MM, Renschmidt C, Wilking H, et al. German outbreak of *Escherichia coli* O104:H4 associated with sprouts. N Engl J Med. 2011; 365:1763–1770.
7. Campellone KG, Leong JM. Tails of two tirs actin pedestal formation by enteropathogenic *E. coli*. Curr Opin Microbiol. 2003; 6(1):82.
8. Carlos C, Pires M, Stoppe N, et al. *Escherichia coli* phylogenetic group determination and its application in the identification of the major animal source of fecal contamination. BMC Microbiology. 2010; 10: 161.

9. Clements A, Young JC, Constantinou N, Frankel G. Infection strategies of enteric pathogenic *Escherichia coli*. *Gut microbes*. 2012; 3 (2): 71-87.
10. Clermont O, Bonacorsi S, Bingen E. Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. *Appl Environ Microbiol*. 2000; 66: 4555-4558.
11. Clermont O, Christenson JK, Denamur E, Gordon DM. The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylo-groups. *Environ Microbiol Rep*. 2013; 5: 58-65.
12. Clinical and Laboratory Standard Institute. 2009. Approved standard M2-A10. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility test, 10th ed. CLSI, Wayne, Pa.
13. Clinical and Laboratory Standard Institute. 2011. M100-S21 (M2). Disk Diffusion Supplemental Tables, CLSI, Wayne Pa.
14. 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.
15. Croxen MA, Law RJ, Scholz R, Keeney K M, Wlodarska M, Finlay B. Recent advances in Understanding Enteric Pathogenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev*. 2013; 26 (4): 822.
16. ECDC RAPID RISK ASSESSMENT. Outbreak of Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC) in Germany 27 May 2011.
17. Eslava C, Navarro-García F, Czeczulin JR, Henderson IR, Cravioto A, Nataro JP. Pet, an autotransporter enterotoxin from enteroaggregative *Escherichia coli*. *Infect Immun*. 1998; 66: 3155-63; PMID: 9632580.

18. Estrada-García T, Cerna JF, Pacheco-Gil L, Velázquez RF, Ochoa T, Dupont JT. Drug-resistant diarrheogenic *Escherichia coli*, México. *Emerg Infect Dis*. 2005; 11: 1306-08.
19. Ewing WH. *Edwards and Ewing's Identification of Enterobacteriaceae*. Elsevier Science Publishing Inc., New York. 1986.
20. Feng P, Weagant SD, Steven R, Monday SR. Genetic analysis for virulence factors in *Escherichia coli* O104:H21 that was implicated in an outbreak of hemorrhagic colitis. *J Clin Microbiol*. 2001; 39: 24-28.
21. Foubister V, Rosenshine I, Sonnenberg MS, Finlay B. The *eaeB* Gene of Enteropathogenic *Escherichia coli* is Necessary for Signal Transduction in Epithelial Cells. *Infect Immun*. 1994; 67 (7): 3038-3040.
22. Frank C, Faber MS, Askar M, Bernard H, Fruth A, Gilsdorf A, *et al*. HUS investigation team. Large and ongoing outbreak of haemolytic uraemic syndrome, Germany, May 2011. *Euro Surveill*. 2011; 16 (21): pii=19878. Available from: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=19878>.
23. Franke J, Franke S, Schmidt H, Schwarzkopf A, Wieler LH, Baljer G, *et al*. Nucleotide sequence analysis of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) adherence factor probe and development of EPEC harboring virulence plasmids. *J Clin Microbiol*. 1994; 32 (10): 2460-2463.
24. Fratamico PM, Sackitey SK, Wiedmann M, Deng MY. Detection of *Escherichia coli* O157:H7 by multiplex PCR. *J Clin Microbiol*. 1995; 33: 2188-2191.
25. Fratamico PM, Bhaduri & Buchanan R L. Studies on *Escherichia coli* serotype O157:H7 strains containing a 60-MDa plasmid and on 60-MDa plasmid cured derivatives. *J Med Microbiol*. 1993; 39: 371-381.

26. Gefen O and Balaban NQ. The importance of being persistent: heterogeneity of bacterial populations under antibiotic stress. *FEMS Microbiol Rev.* 2008; 1-14.
27. Girón JA, Ho ASY, and Schoolnik GK. An inducible bundle-forming pilus of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Science.* 1991; 254: 710–713.
28. Gorgaten JP, Ford W, Lawrence JG. Prokaryotic Evolution in Light of Gene Transfer. *Mol Biol Evol.* 2002; 19 (12): 2226-2238.
29. Gunzburg ST, Tornieporth NG and Riley LW. Identification of Enteropathogenic *Escherichia coli* by PCR-Based Detection of the Bundle-Forming Pilus Gene. *J Clin Microbiol.* 1995; 33 (5): 1375-1377.
30. Huang DB, Mohanty A, DuPont HL, *et al.* A review of an emerging enteric pathogen: enteroaggregative *Escherichia coli*. *J Med Microbiol.* 2006; 55, 1303-1311.
31. Huang DB, Mohamed JA, Nataro JP, DuPont HL, Jiang ZD, Okhuysen PC. Virulence characteristics and the molecular epidemiology of enteroaggregative *Escherichia coli* isolates from travellers to developing countries. *J Med Microbiol.* 2007; 56 (10): 1386-1392.
32. Islam MA, Heuvelink AE, Talukder KA, Zwietering MH, and De Boer E. Evaluation of Immunomagnetic Separation and PCR for the Detection of *Escherichia coli* O157 in Animal Feces and Meats. *J Food Protect.* 2006; 69: 2865–2869.
33. Jackson MP, Newland JW, Holmes RK. and O'Brien AD. Nucleotide sequence analysis of the structural genes for Shiga-like toxin I encoded by bacteriophage 933J from *Escherichia coli*. *Microb Path.* 1987; 2 (2):147-153.
34. Kaper JB, Nataro JP, and Mobley HLT. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Rev. Microbiol.* 2004; 2: 123-140.

35. Kogan G, Jann B, and Jann K. Structure of the *Escherichia coli* O104 polysaccharide and its identity with the capsular K9 polysaccharide. *FEMS Microbiol Letters*. 1992; 91: 135-140.
36. Louie M, Azavedo JC, Handelsman MY, Clark CG, Ally B, Dytoc *et al*. Expression and Characterization of the *eaeA* Gene product of *Escherichia coli* Serotype O157:H7. *Infect Immun*. 1993; 61 (10): 4085-4092.
37. MacFaddin J. Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. [Traductor. Irma Lorenzo] 1ª reimpression. México D.F: Editorial panamericana; 1998. pp. 39-44, 138-140, 154, 158, 207-209, 227, 365-367.
38. Molina-López J, Aparicio-Ozores G, Ribas-Aparicio RM, Gavilanes-Parra S, Chávez-Berrocal ME, Hernández-Castro R, and Manjarrez-Hernández HÁ. Drug resistance, serotypes, and phylogenetic groups among uropathogenic *Escherichia coli* including O25-ST131 in Mexico City. *J Infect Dev Ctries* 2011; 5 (12): 840-849.
39. Molina-López J. Papel de plásmidos e integrones en la multirresistencia a antimicrobianos en cepas de *Escherichia coli* uropatógenas y su posible asociación con adherencia e invasividad en células cultivadas. [Tesis Doctoral] México Distrito Federal. Instituto Politécnico Nacional, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas; 2011.
40. Morin N, Santiago AE, Ernst RK, Guillot SJ and Nataro JP. Characterization of the AggR Regulon in Enterohaggative *Escherichia coli*. *Infect Immun*. 2012; 81 (1): 122-132. DOI:10.1128/IAI.00676-12.
41. Mycek, Mary J. Harvey, Richard A. "*Farmacología*". 2ª ed. Mc Graw Hill interamericana: 2004. pp. 333-343.

42. Nataro JP, Kaper JB. Diarrheagenic *Escherichia coli*. Clin Microbiol Rev. 1998; 11: 142-01.
43. Nataro JP, Yikang D, Yinkang D, Walker K. AggR, a Transcriptional Activator of Aggregative Adherence Fimbria I Expression in Enteroaggregative *Escherichia coli*. J Bacteriol. 1994; 176 (15): 4691-4699.
44. Navarro A and Estrada-García. Epidemiology of diarrheagenic *Escherichia coli* pathotypes in Mexico, past and present. In: Pathogenic *Escherichia coli* in Latin America. Ed Alfredo G. Torres. Bentham E-Book. eISBN: 978-1-60805-192-202, 2010.
45. Navarro A, Eslava C, García de la Torre G, León LA, Licona D, León L, Zarco LA, and Cravioto A. Common Epitopes in Lipopolysaccharides of Different Enterobacteriaceae are Associated with an Immune Response against *Escherichia coli* O157 in Bovine Serum Samples. J Med Microbiol 2007; 56:1447-1454.
46. Navarro-García F, Waldir PE, Flores J and Okhuysen PC. Enteroaggregative *Escherichia coli*. In: Pathogenic *Escherichia coli* in Latin America. Ed Alfredo G. Torres. Bentham E-Book. eISBN: 978-1-60805-192-202, 2010.
47. Nishi J, Sheikh J, Mizuguchi K, Luisi B, Burland V, Boutin A, and Nataro JP. The export of coat protein from enteroaggregative *Escherichia coli* by a specific ATP-binding cassette transporter system. J Biol Chem. 2003; 278 (46): 45680-45689.
48. O'Brien AD, Holmes RK. Shiga and Shiga-like toxins. Microbiol Rev. 1987; 51: 206–220.
49. Ochman H, Selander RK. Standard reference strains of *Escherichia coli* from natural populations. J Bacteriol. 1984; 157: 690–693.

50. Ochman H, Lawrence JG, Grolsman EA. Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation. *Nature* 2000; 405:209-303.
51. Orskov F, and Orskov I. Serotyping of *Escherichia coli*. In T. Bergan (Ed). *Methods in Microbiology*. Academic Press Ltd, London. 1984; 14: 43-112.
52. Orskov F, and Orskov I. *Escherichia coli* serotyping and disease in man and animals. *Can J microbial*. 1992; 38 (7): 699-704.
53. Parijat D, Singh K, Mukherjee S, Rajendran K, Saha DR, Koley H, *et al*. Composition of *Escherichia coli* population in the neonatal gut: Phylogroups and virulence determinants. *J Med Microbiol*. 2013; 62:1680-1687.
54. Scaletsky IC, Silva ML, Trabulsi LR. Distinctive patterns of adherence of enteropathogenic *Escherichia coli* to HeLa cells. *Infect Immun*. 1984; 45 (2) :534.
55. Scheutz F, Teel LD, Beutin L, Piérard D, Buvens G, Karch H *et al*. Multicenter Evaluation of a Sequence-Based Protocol for Subtyping Shiga Toxins and Standardizing Stx Nomenclature. *J Clin Microbiol* 2012; 50 (9): 2951.
56. Schubert S, Darlu P, Clermont O, Wieser A, Magistro G, Hoffman C, *et al*. Role of Intraspeceis Recombination in the Spread of Pathogenicity Islands within the *Escherichia coli* Species. *PLoS Pathog*. 2009; 5 (1): e1000257.
57. Schmidt H., Schwarzkopf A., Heesemann J., Karch H. Differentiation in virulence patterns of *Escherichia coli* possessing *eae* genes. *Med Microbiol immunol*. 1994; 183: 23 – 31
58. Schmidt H, Beutin L, Karch H. Molecular Analysys of the Plasmid-Encoded Hemolysin of *Escherichia coli* O157:H7 Strain EDL 933. *Infect Immun*. 1995; 63 (3): 1055-1061.

59. Stephen J *et al.* Manual de pruebas de susceptibilidad antimicrobiana. American Society for Microbiology. 2005. Seattle, Washington.
60. Trabulsi LR, Keller R, Tardelli TA. Typical and Atypical Enteropathogenic *Escherichia coli*. *Emerg Infect Dis.* 2012; 8 (5): 508-513.
61. Vázquez Borja CI. Aislamiento y caracterización patogénica de cepas de *E. coli* productoras de toxina semejante a Shiga de cerdo con enfermedad del edema. [Tesis]. Cuautitlan Izcalli, Estado de México. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, 2012.
62. Wang L, Briggs CE, Rothmund D, Fratamico P, Luchansky JB, *et al.* Sequence of the *E. coli* O104 antigen gene cluster and identification of O104 specific genes. *Gene.* 2001; 270: 231-236.
63. Wong CS, Mooney JC, Brandt JR, Staples AO, Jelacic S, Boster DR, Watkins SL, Tarr PI. Risk factors for the hemolytic uremic syndrome in children infected with *Escherichia coli* O157:H7: a multivariable analysis. *Clin Infect Dis.* 2012; 55:33– 41.
64. WHO. Informe del 10 de Junio de la OMS con la declaración conjunta del Instituto Robert Koch (RKI), el Instituto Federal de Evaluación de Riesgo (BfR) y la Oficina Federal de Protección al Consumidor y Seguridad Alimentaria. Información consultada en internet [Actualizado Mayo 2010; citado 10 Septiembre 2013] disponible en: <http://www.euro.who.int/en/countries/germany/news/news/2011/06/ehec-outbreak-update-13>.