



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA Y GENES DE VIRULENCIA DE
Escherichia coli ENTEROPATÓGENA AISLADA DE DIARREA INFANTIL
Y SU RELACIÓN CON EL CONTENIDO DEL ANTÍGENO COMÚN DE LAS
ENTEROBACTERIAS.**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO DE ALIMENTOS

PRESENTA:

ALFREDO ESQUIVEL LÓPEZ



MÉXICO, D.F.

2015



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesora: Olga del Carmen Velázquez Madrazo

VOCAL: Profesora: Martha Giles Gómez

SECRETARIO: Profesor: Armando Navarro Ocaña

1er. SUPLENTE: Profesora: Norma Angélica Camacho de la Rosa

2° SUPLENTE: Profesora: Beatriz Ruiz Villafán

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

LABORATORIO DE SALUD PÚBLICA. TERCER PISO DEL EDIFICIO DE INVESTIGACIÓN.

FACULTAD DE MEDICINA.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO.

ASESOR DEL TEMA: M. EN C. ARMANDO NAVARRO OCAÑA

SUSTENTANTE: ALFREDO ESQUIVEL LÓPEZ

ÍNDICE.

Índice de figuras.	i
Índice de cuadros.	ii
I. RESUMEN.	1
II. INTRODUCCIÓN.	2
1. Causas de mortalidad en menores de 5 años: Enfermedades diarreicas.	2
2. Situación en México. Agentes etiológicos: <i>Escherichia coli</i> .	3
III. ANTECEDENTES.	3
1. Familia <i>Enterobacteriaceae</i> .	3
2. <i>E. coli</i> .	4
2.1 Historia.	4
2.2 Características bioquímicas.	4
2.3 Bacteria comensal y patógena.	5
2.4 Grupos patógenos.	5
3. EPEC.	9
3.1 Definición.	10
3.2 Patogénesis.	10
3.2.1 Adherencia localizada.	11
3.2.2 Transducción de señales.	12
3.2.3 Adherencia íntima.	13
3.2.4 Otros factores de virulencia: EspC y EspP.	14
3.3 Serogrupos (O) y serotipos (O:H).	15
4. Grupos filogenéticos.	16
5. Antígeno común de las enterobacterias.	18
IV. JUSTIFICACIÓN.	20
V. HIPÓTESIS.	21
VI. OBJETIVOS.	21
1. General.	21

2. Particulares.	21
VII. METODOLOGÍA.	22
1. Cepas bacterianas.	23
2. Confirmación bioquímica.	23
3. Caracterización antigénica de los cultivos de <i>E. coli</i> .	23
3.1 Antígeno somático (O).	24
3.2 Antígeno flagelar (H).	25
4. Obtención del ADN.	26
5. Genes de virulencia y grupos filogenéticos.	27
5.1 Condiciones para la PCR.	27
6. Sensibilidad al desoxicolato de sodio (DOC).	29
7. Antígeno común de las enterobacterias (ECA).	30
7.1 Extracción del ECA.	30
7.2 Titulación del suero contra el ECA de <i>E. coli</i> O14:K7:NM por el ensayo de hemaglutinación.	30
7.3 Ensayo de inhibición de la hemaglutinación para determinar el contenido del ECA.	31
8. Análisis de χ^2 de proporciones.	32
VIII. RESULTADOS.	33
1. Serotipificación.	33
2. Clasificación de las cepas de <i>E. coli</i> en subtipos tEPEC y aEPEC.	37
3. Grupos filogenéticos.	42
4. Resistencia al 1% de desoxicolato de sodio (DOC).	47
5. Relación entre resistencia DOC y el contenido del antígeno común de las enterobacterias (ECA) en cepas de <i>E. coli</i> .	49
IX. DISCUSIÓN.	53
X. CONCLUSIONES.	61
XI. PERSPECTIVAS.	62
XII. BIBLIOGRAFÍA.	63

ÍNDICE DE FIGURAS.

Figura 1. Micrografías electrónicas ilustrando la lesión A/E. _____	11
Figura 2. Esquema del sistema de secreción tipo III. _____	13
Figura 3. Esquema de la adherencia de EPEC por la intimina y su receptor Tir. _____	14
Figura 4. Árbol de decisión dicotómico para la determinación de grupos filogenéticos de <i>E. coli</i> . _____	18
Figura 5. Esquema general de la metodología del estudio. _____	22
Figura 6. Distribución de los serotipos identificados en 66 cepas aisladas de diarrea infantil en el Estado de Morelos. _____	34
Figura 7. Serotipos identificados en cepas de <i>E. coli</i> aislada en el Instituto Nacional de Pediatría (INP). _____	35
Figura 8. Serotipificación de cepas de <i>E. coli</i> aislada en el Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS). _____	36
Figura 9. Serotipos determinados en las 36 cepas aisladas en la región de Bangladesh. _____	37
Figura 10. Electroferograma de los amplicones del gen <i>eae</i> (864 pb). _____	39
Figura 11. Electroferograma de los amplicones del gen <i>eaf</i> (397 pb). _____	39
Figura 12. Electroferograma de los amplicones del gen <i>bfp</i> (326 pb). _____	40
Figura 13. Distribución de EPEC típicas y atípicas en las cepas de las diferentes regiones geográficas del estudio. _____	41
Figura 14. Electroferograma de los amplicones de los genes <i>espC</i> (301 pb) y <i>espP</i> (547 pb). _____	41
Figura 15. Electroferograma de los amplicones de los genes <i>chuA</i> (279 pb), <i>yjaA</i> (211 pb) y TspE4.C2 (152 pb) para determinar grupos filogenéticos de las muestras. _____	44
Figura 16. Resistencia y sensibilidad a 1 % de DOC. _____	48
Figura 17. Hemaglutinación de las cepas utilizadas como control. _____	50
Figura 18. Inhibición de la hemaglutinación. _____	50

ÍNDICE DE CUADROS.

Cuadro 1. Serotipos mayormente encontrados en las cepas típicas y atípicas de EPEC. _____	15
Cuadro 2. Secuencia de los iniciadores utilizados. _____	27
Cuadro 3. Reactivos utilizados en cada PCR. Cantidades por cada tubo de reacción. _____	28
Cuadro 4. Condiciones del termociclador y porcentaje del gel de agarosa utilizado en cada gen determinado. _____	28
Cuadro 5. Comparación de los principales serogrupos encontrados en las diferentes áreas de aislamiento. _____	38
Cuadro 6. Grupos filogenéticos y serotipos en cepas de <i>E. coli</i> aislada en México. _____	43
Cuadro 7. Serotipos y grupos filogenéticos en cepas de <i>E. coli</i> de Bangladesh. _____	45
Cuadro 8. Clasificación de cepas tEPEC y aEPEC en grupos filogenéticos. _____	46
Cuadro 9. Comparación de los grupos filogenéticos de EPEC de acuerdo al subtipo de cepas y la zona geográfica de aislamiento. _____	47
Cuadro 10. Sensibilidad de las cepas de <i>E. coli</i> a DOC. _____	49
Cuadro 11. Títulos del ECA en las cepas sensibles o resistentes al 1% de DOC en el subtipo tEPEC. _____	51
Cuadro 12. Contenido del ECA y su relación con la sensibilidad o resistencia al 1% de DOC en las cepas aEPEC de diferentes zonas. _____	52

I. RESUMEN.

Uno de los agentes etiológicos de las enfermedades diarreicas es *E. coli* enteropatógena (EPEC), la cual ha mostrado una mayor presencia en uno de sus subtipos alrededor del mundo en casos de diarrea en menores de 5 años. Este estudio se diseñó para realizar la caracterización de cepas de EPEC aisladas de casos de diarrea infantil para definir el subtipo al que pertenecen, agruparlas en sus grupos filogenéticos y observar la relación entre la presencia del antígeno común de las Enterobacterias (ECA) y los subtipos de EPEC. Se estudiaron 164 cepas de *E. coli*, 128 (78 %) de México aisladas de 96 niños y 36 (22 %) de Bangladesh aisladas de 26 niños. Los serotipos se identificaron con sueros contra los antígenos somáticos (O) y flagelar (H). Por PCR se analizó la presencia de los genes *eae*, *bfp*, *eaf*, *espC*, *espP* de EPEC; y *chuA*, *yjaA* y TspE4.C2 para los grupos filogenéticos. En las cepas de México se identificaron 58 serotipos y 23 en las de Bangladesh, los serotipos más frecuentes fueron O111ab:H-, O119:H6 y O86:H-; O114:H2 y O127:H6. El 75 % de las cepas de México fueron aEPEC; con relación a las cepas de Bangladesh, 56 % fueron tEPEC. Se mostró que en las cepas típicas de México y Bangladesh hay mayor prevalencia del gen *espC*. El 59 % de las cepas mexicanas tEPEC así como el 68 % de las aEPEC se incluyeron en los grupos A y B1. En las cepas de Bangladesh, 65 % de tEPEC fueron del grupo B2, en cuanto a las aEPEC se mostró que el 75% fueron de los grupos A y B1. Con respecto a la sensibilidad/resistencia a 1 % de DOC, fue en las cepas atípicas en donde se encontró una mayor proporción de cepas sensibles. Por último, con ensayos de inhibición de la hemaglutinación se determinó el contenido del ECA, los títulos más frecuentes en ambos subtipos de EPEC fueron 1:64 y 1:128. Las cepas EPEC aisladas en México y Bangladesh presentaron gran diversidad de serotipos que pertenecen indistintamente a los subtipos aEPEC y tEPEC; aunque las cepas corresponden principalmente a los grupos comensales A y B1, se observó presencia importante de cepas virulentas (B2 y D). Los resultados muestran que en México también se observa la actual tendencia de mayor prevalencia del subtipo de aEPEC en casos de diarrea en menores de 5 años con la presencia importante de cepas tEPEC.

II. INTRODUCCIÓN.

1. Causas de mortalidad en menores de 5 años: Enfermedades diarreicas.

De acuerdo con las estimaciones realizadas por Bryce y col. (1), las principales causas de muerte en niños menores de 5 años de edad fueron: muerte neonatal (36 %), neumonía (19 %), diarrea (17 %), malaria (8 %), sarampión (4 %), VIH/SIDA y accidentes (3 % cada una) y otras causas (10 %).

Las enfermedades diarreicas presentan un gran impacto alrededor del mundo, especialmente en los países en vías de desarrollo, y desafortunadamente alrededor del 90 % de las muertes relacionadas con la diarrea suceden en niños menores de 5 años. De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS) (2), cada año se producen alrededor de 1,700 millones de casos de enfermedades diarreicas en todo el mundo, de los cuales, aproximadamente 760,000 casos terminan siendo mortales en niños menores de 5 años.

A pesar de que el índice de mortalidad por diarrea aún continua siendo alto, este ha mostrado una disminución a razón de 4 % al año y a una tasa menor ha ido decreciendo el índice de morbilidad de la enfermedad (3).

La OMS define a la diarrea como la evacuación de heces, sueltas o líquidas, en tres o más veces al día o con una frecuencia mayor que la normal para la persona. La evacuación frecuente de heces normales (de consistencia sólida) no es diarrea, ni tampoco la deposición de heces de consistencia suelta y “pastosa” por bebés amamantados al seno materno.

Muchos de los factores de riesgo que contribuyen para contraer una enfermedad diarreica están asociados con condiciones socioeconómicas bajas que están relacionadas con un difícil acceso de agua potable para consumo humano de buena calidad así como a malas prácticas de higiene personal y por consecuencia a malas prácticas en la preparación de los alimentos (4).

2. Situación en México. Agentes etiológicos: *Escherichia coli*.

En México, al igual que en otras partes del mundo con situaciones socio-económicas similares y de acuerdo con el Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica (5), las enfermedades diarreicas ocupan uno de los primeros lugares como causa de morbilidad en población menor de cinco años de edad, generando el 20 % de la demanda de consulta en los servicios de salud y el 10 % de las hospitalizaciones pediátricas. Este grupo de edad presenta entre 2 y 4 episodios diarreicos al año.

Las enfermedades gastrointestinales infecciosas son causadas por bacterias (principalmente grupos patógenos diarreicos de *E. coli*, *Salmonella* y *Shigella*), parásitos (*Giardia lamblia* y amibas), y virus (Rotavirus y virus Norwalk) (6).

III. ANTECEDENTES.

1. Familia *Enterobacteriaceae*.

El nombre *Enterobacteriaceae* fue propuesto por Rahn en 1937. Dicho nombre es derivado del latín “enterobacterium” cuyo significado es bacteria intestinal. Los miembros de esta familia se caracterizan generalmente por ser bacilos cortos Gram-negativos, negativos a la prueba oxidasa, no formadores de esporas, anaerobios facultativos y pueden ser inmóviles o móviles por medio de la formación de flagelos peritricos (7) (8).

Inicialmente esta familia comprendía un solo género llamado *Enterobacter* y numerosas bacterias que compartían la habilidad de fermentar glucosa con la producción de gas, mismas que pertenecen a los géneros *Erwinia*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, *Serratia* y *Shigella*. Actualmente la familia *Enterobacteriaceae* comprende al menos 34 géneros, 149 especies y 21 subespecies. El género tipo de la Familia *Enterobacteriaceae* es *Escherichia* (7) (8).

2. *E. coli*.

2.1 Historia.

E. coli fue identificada por primera vez en 1885 y nombrada *Bacterium coli commune* por el pediatra alemán Theodor Escherich por medio de estudios de la microbiota intestinal de infantes. Tiempo después, en 1894, se encontró que la bacteria poseía propiedades patogénicas que involucraban infecciones extraintestinales.

Fue hasta 1919, que el nombre *Bacterium coli* fue ampliamente utilizado y entonces Castellani y Chalmers definieron el género *Escherichia* y establecieron su especie tipo *E. coli* (9).

2.2 Características bioquímicas.

E. coli es una bacteria Gram-negativa, en forma de bastón (2.0 - 6.0 μm de longitud y 1.1 - 1.5 μm de ancho), no formadora de esporas y en los casos que es móvil, es debido a la formación de flagelos peritricos.

Es un microorganismo anaerobio facultativo con un tipo de metabolismo fermentativo, es versátil y muy bien adaptable a sus hábitats específicos; no necesita factores de crecimiento especiales para su cultivo en el laboratorio (9) (10).

Produce gas de la fermentación de carbohidratos, así como ácido y gas de la utilización de la glucosa. La reacción de rojo de metilo es positiva para esta bacteria indicando producción de ácido de la fermentación de la glucosa, la reacción de Voges-Proskauer (producción de acetoina) es negativa; tiene la capacidad de producir indol pero no es capaz de hidrolizar la urea.

Cuando la bacteria se cultiva en medio de agar hierro triple azúcar (TSI) o agar de Kligler la producción de ácido sulfhídrico no es evidente al igual que no utiliza el citrato de sodio cuando es la única fuente de carbono en el medio citrato de Simmons (9).

2.3 Bacteria comensal y patógena.

La microbiota comensal intestinal consiste de aquellos microorganismos que interactúan con las células epiteliales y son expuestas al ambiente externo. *E. coli* es parte de la microbiota comensal intestinal inofensiva que juega un papel importante del funcionamiento normal de la fisiología intestinal de los humanos, sin embargo, es el bacilo más frecuentemente aislado en infecciones en humanos (10) (11).

Este microorganismo coloniza el tracto gastrointestinal de humanos típicamente pocas horas después del nacimiento. Dichas cepas comensales raramente causan enfermedades excepto en hospederos inmunocomprometidos o en donde las barreras normales gastrointestinales se encuentran dañadas (12).

Este comensal normalmente inofensivo solo necesita adquirir una combinación de factores de virulencia que actúan en conjunto para evitar las defensas del hospedero y permitirse dañar al mismo mediante toda una variedad de mecanismos, por ejemplo, adhesinas, cápsula de composición polisacárida, toxinas proteicas, proteínas promotoras de la invasión, sistemas de adquisición de hierro (sideróforos), lipopolisacárido (LPS), etc. (10) (13).

Los anteriores ejemplos son codificados por genes que se localizan en elementos genéticamente transferibles como plásmidos, bacteriófagos, transposones e islas de patogenicidad (10).

2.4 Grupos patógenos.

Sólo las más exitosas combinaciones de factores de virulencia han persistido para convertirse en grupos patógenos de *E. coli* que son capaces de causar enfermedades. Las cepas de este microorganismo que causan infecciones entéricas se clasifican como DEC, por otro lado, se encuentran las *E. coli* causantes de infecciones extraintestinales (ExPEC) (14).

Las infecciones por ExPEC son principalmente en el tracto urinario a causa de la *E. coli* uropatógena (UPEC) y la sepsis/meningitis causada por *E. coli* meningitis neonatal (NMEC) (12) (14).

Por otro lado, las DEC son tradicionalmente divididas en 6 patotipos con base en sus perfiles de patogenicidad: *E. coli* enteropatógena (**EPEC**); *E. coli* productora de la toxina tipo Shiga (**STEC**); *E. coli* enteroinvasiva (**EIEC**); *E. coli* enteroagregativa (**EAEC** o **EAggEC**); *E. coli* enterotoxigénica (**ETEC**) y *E. coli* adherente difusa (**DAEC**) (12).

Actualmente, han surgido otros dos patotipos: *E. coli* adherente invasiva (AIEC) que se piensa está relacionada con la enfermedad de Crohn (15) y *E. coli* enteroagregativa productora de la toxina Shiga (STEAEC) responsable del brote de Síndrome Urémico Hemolítico (SUH) en 2011 en Alemania (14).

Las cepas de **ETEC** fueron descritas por primera vez en la década de los años 50 en casos severos de diarrea acuosa, parecida al cólera; causan diarrea acuosa que va desde leve hasta casos severos, sin vómito ni fiebre en general, que tienen una presentación clínica muy similar al cólera y puede llevar rápidamente a la deshidratación.

La duración del cuadro clínico va desde los 3 hasta los 5 días pudiendo haber casos en los cuales se prolongue la duración hasta por una semana (11) (16). Este agente se transmite por la vía fecal-oral a través de portadores asintomáticos con condiciones deficientes de higiene así como con la ingestión de alimentos y agua potable contaminados (16).

ETEC es la causa principal de diarrea infantil en países en vías de desarrollo así como de la diarrea del viajero, todo esto gracias a su capacidad de producir enterotoxinas, la enterotoxina lábil al calentamiento (LT) y estable al calor (ST).

Otro aspecto que le permite a este patotipo llevar a cabo su patología es que hay al menos 25 diferentes factores de colonización (CF) proteicos designados como CFA (antígeno factor de colonización), CS (antígeno de superficie de coli) o PCF

(factor de colonización putativo) que han sido identificados en estas cepas (11) (12) (14) (17).

A pesar de que la asociación entre ciertas cepas de *E. coli* aisladas de niños con diarrea y la producción de citotoxinas ha sido reportada desde los años 70, la importancia de **STEC** como patógeno humano adquirió relevancia a partir del año 1982 en el que se presentaron dos brotes de colitis hemorrágica en los Estados Unidos de Norteamérica (18) (19).

Estas cepas se identifican por la presencia del gen de la toxina tipo Shiga 1 (*stx*₁ o *stx*₂), típicamente adquirido por medio de un bacteriófago λ. Existen cuatro clones distintas de STEC: EHEC1, EHEC2, STEC1 y STEC2 (16).

Las cepas de *E. coli* enterohemorrágica (**EHEC**) son un subgrupo de las STEC originalmente descritas por su relación con la colitis hemorrágica. Generalmente, EHEC cuenta con una isla de patogenicidad denominada LEE (Locus de borrado del enterocito; LEE por sus siglas en inglés) y forma la lesión de adherencia/borrado (A/E) del enterocito. El serotipo mayormente asociado a este subgrupo de cepas es el serotipo (fórmula antigénica O:H) O157:H7.

STEC presenta un cuadro clínico que va desde una diarrea acuosa leve hasta diarrea con sangre y presenta un riesgo para el desarrollo del síndrome urémico hemolítico. Además de las toxinas que es capaz de sintetizar, STEC, tienen un amplio número de factores de virulencia como la toxina distensora citoletal (CDT), *cdtABC*, la hemolisina de EHEC, EHEC-*hlyA* o *ehx*, proteasas de serina autotransportadas, *espP*, etc. (12) (20).

La transmisión de STEC es a través de la vía fecal-oral y se cree que la dosis infecciosa es muy baja, < 100 bacterias. Los bovinos son ampliamente conocidos por ser los mayores reservorios para STEC además de los alimentos y agua contaminada con materia fecal de los mismos animales (12) (16). A principios de los años 70, cepas de *E. coli* fueron aisladas de pacientes con un cuadro clínico de disentería; tales cepas fueron designadas **EIEC** mismas que se conocen por tener un comportamiento estrechamente parecido con *Shigella spp.* (11).

EIEC comprende 21 serotipos principales cuyos antígenos O son idénticos o estrechamente relacionados con los antígenos O de *Shigella*; a diferencia de la mayoría de las cepas de *E. coli*, EIEC no es móvil y es incapaz de fermentar lactosa (9) (16).

EIEC puede causar una colitis inflamatoria invasiva y ocasionalmente disentería bacilar, pero en la mayoría de los casos, desarrolla una diarrea acuosa indistinguible de la causada por otros grupos patógenos de *E. coli*. Su infección también se caracteriza por el influjo de leucocitos polimorfonucleares en la lámina propia de la mucosa intestinal afectada (11) (12).

El desarrollo de la enfermedad consiste en una primera fase de internalización por medio de una vacuola endocítica misma que la bacteria lisa una vez que penetra la célula hospedera, ya internalizada, sigue una multiplicación intracelular. Posteriormente, por medio de polimerización de actina celular en forma de cola en un polo de la bacteria, esta se mueve para lograr la invasión de las células eucariotas adyacentes (12).

La mayoría de los efectos patogénicos de EIEC son mediados a través de un sistema de secreción tipo 3 (T3SS) que se encuentra codificado en un plásmido de 140 MDa presente tanto en este microorganismo como en *Shigella* (11) (13).

Las cepas **EAEC** son definidas por su adherencia agregativa o en forma de ladrillos apilados en cultivos de células HEp-2 mientras que en la mucosa intestinal estas cepas forman una biopelícula con la bacteria embebida en una capa gruesa de moco.

Para llevar a cabo la colonización requiere de fimbrias de adhesión agregativa (AAF) así como de otras adhesinas conocidas como proteínas de membrana externa asociadas con la adherencia agregativa (14) (16). Este microorganismo también tiene la capacidad de sintetizar tanto citotoxinas como enterotoxinas relacionadas con su patogénesis, dentro de las cuales se encuentran la toxina codificada en plásmido (Pet, por sus siglas en inglés) y la enterotoxina estable al calor de EAEC (EAST) (11).

Muchos de los factores de virulencia están bajo la regulación de un gen denominado *aggR*, mismo que no todas las cepas de este patotipo lo contienen derivando en una clasificación de cepas EAEC típicas, contrario a las cepas EAEC atípicas que no tienen dicho regulador (20).

La capacidad de presentar una adherencia difusa en cultivo de células HEp-2 (Carcinoma epidermoide de laringe humano) se atribuye a las cepas **DAEC** por la acción de adhesinas afimbriales (Afa) o fimbriales (Dr), de las cuales, las Dr son las mejor descritas por permitirle a DAEC unirse a una gran diversidad de proteínas de la superficie celular incluyendo al factor de decaimiento acelerado (DAF) y una vez unida la bacteria al DAF se desarrolla un rearrreglo del citoesqueleto celular por una transducción de señales que provocan la formación de extensiones celulares largas alrededor de la bacteria adherida (12) (13) (14).

3. EPEC.

Fue en la década de los 40 cuando diversos grupos de investigadores alrededor del mundo encontraron ciertas cepas de *E. coli* involucradas en diarrea infantil. El más reconocido es el trabajo de Bray y col. (21), que en 1943 aisló cepas de *E. coli* serológicamente homogéneas que denominó *Bacterium coli napolitanum* de casos de diarrea infantil en Inglaterra, el serogrupo que encontró ahora se conoce como O111 (20).

En 1946 un grupo de investigadores mexicanos liderados por Gerardo Varela aisló una cepa de *E. coli* en un caso de diarrea mortal en una niña de 2 meses de edad que compartía su antígeno somático con uno de los pertenecientes a *Salmonella adalaida* (O35) lo que condujo a denominar a la cepa aislada como *E. coli-gomez* cuyo serotipo más adelante se determinó como O111:B4 (20) (22) (23).

El término *E. coli* enteropatógena (EPEC) se acuñó por primera vez en el año de 1955 por Neter (24) (25) y desde entonces se han identificado distintos serogrupos y serotipos característicos de dicho patotipo mediante esquemas de tipificación serológica, con el paso del tiempo, ha sido necesario implementar una gran diversidad de técnicas para conocer con mayor precisión las características de

estos microorganismos y mejorar el entendimiento de la maquinaria que les permite desarrollar su patología.

3.1 Definición.

Son muchos los textos que se encuentran en la literatura acerca de este patotipo en los cuales se incluyen todas sus características, y en este caso, vamos a partir de la definición aceptada durante el segundo simposio internacional sobre EPEC de 1995 en São Paulo, Brasil; tomado de Trabulsi, 2002:

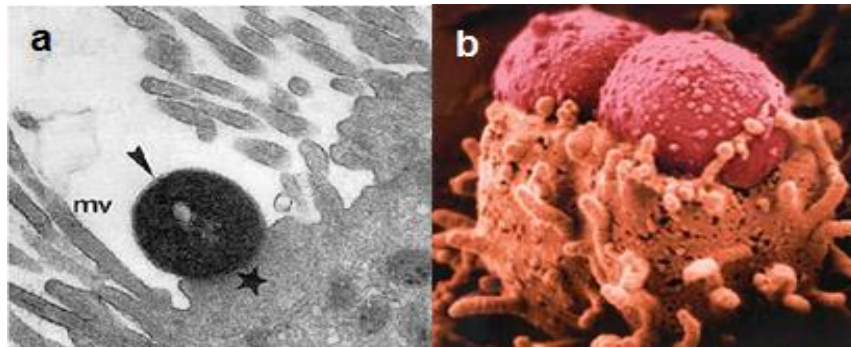
“EPEC son *E. coli* diarreogénicas que producen una lesión característica conocida como Adherencia y Borrado (A/E por sus siglas en inglés) sobre las células intestinales y que no producen toxinas tipo Shiga. Las EPEC típicas, de origen humano, poseen un plásmido de virulencia conocido como Factor de Adherencia de EPEC (EAF), mismo que codifica la adherencia localizada por medio de los Pili en Forma de Rizo (BFP por sus siglas en inglés), mientras que las cepas atípicas no poseen dicho plásmido. La mayoría de las cepas típicas caen dentro de ciertos serotipos muy bien reconocidos.”

A partir de lo anterior, a continuación se describirán los principales mecanismos de los que el microorganismo se vale para desarrollar su patología y otros aspectos involucrados en el entendimiento del mismo.

3.2 Patogénesis.

El mecanismo central de la patogénesis de EPEC es la lesión A/E (Figura 1). Esta se caracteriza por la adherencia íntima del microorganismo con la membrana plasmática apical del enterocito causando el borrado de las microvellosidades del intestino provocando también una distorsión en esta estructura apical formándose una estructura tipo pedestal por la polimerización de actina intracelular (26) (27).

Figura 1. Micrografías electrónicas ilustrando la lesión A/E.



En ambos casos se observa la formación de la estructura tipo pedestal además de la destrucción de las microvellosidades del enterocito. a) Flecha: EPEC; Estrella: Estructura tipo pedestal en la zona apical del enterocito; mv: microvellosidades. Tomada de Trabulsi, 2002. b) Tomada de Kaper, 2004.

Un modelo de tres etapas ha sido propuesto para describir la patogénesis de EPEC. Primero, el desarrollo de la adherencia localizada; segundo, una transducción de señales y por último, la adherencia íntima (16) (24).

3.2.1 Adherencia localizada.

EPEC se adhiere a células HEp-2, HeLa (Adenocarcinoma de cérvix humano) y otras líneas celulares, además de cultivo en órganos “in vitro”, de una manera distintiva en grupos de microcolonias tridimensionales. Esta forma de adhesión también se ha encontrado en tejido de biopsias de infantes infectados con EPEC y por ser una vía de adherencia tan característica de este patotipo, se ha utilizado como herramienta de diagnóstico (16) (28).

Esta adherencia es mediada en gran medida por los Pili de tipo IV denominados BFP (Pili en forma de Rizo; BFP por sus siglas en inglés), que se une a receptores superficiales específicos de la célula hospedera (N-acetil-lactosamina), además, forma parte del enlace de una bacteria con otra permitiendo formar las microcolonias clásicas de esta vía de adherencia promoviendo y estabilizando las interconexiones bacterianas dentro de las mismas (16) (28) (29).

El BFP de EPEC existe como rizos que van de 50 – 500 nm de ancho y con una longitud de 14 – 20 μ m. Los pili de tipo IV fueron inicialmente clasificados por su

localización polar y su asociación con la movilidad por contracciones, todos poseen características estructurales similares y tienen un extremo N-terminal altamente conservado (27).

El operón *bfp* se encuentra en un plásmido denominado EAF (EPEC Adherence Factor) de 50 – 70 MDa. Dicho operón es un grupo de 14 genes que son necesarios para llevar a cabo la biogénesis de BFP que está compuesto por subunidades repetidas de bundlina, monómeros de pilina codificados por el gen *bfpA*, que es el primer gen en el operón (28).

3.2.2 Transducción de señales.

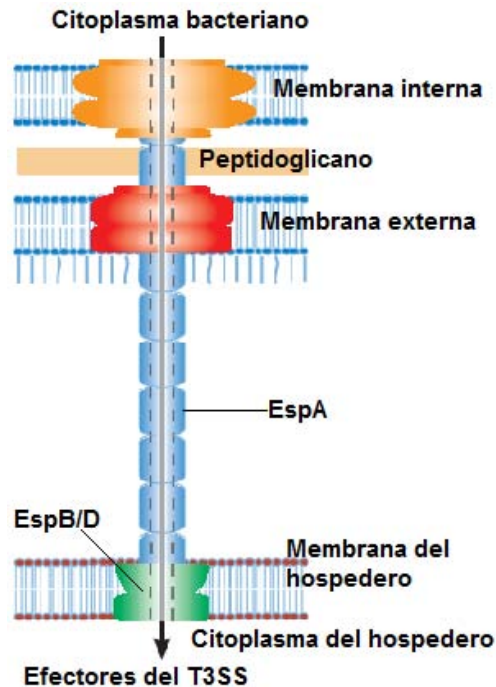
Los genes requeridos para la transducción de señales y la realización de la distintiva lesión A/E se encuentran en la conservada isla de patogenicidad de 35 kb denominada LEE (Locus de borrado del enterocito; LEE por sus siglas en inglés). LEE contiene 41 marcos de lectura abierta (ORF) de más de 50 aminoácidos acomodados en 5 operones policistrónicos llamados LEE1 – LEE5 (24).

Estos, están distribuidos en tres dominios funcionales. Una región que contiene los genes *eae* y *tir*, que codifican para una proteína llamada intimina de aproximadamente 94 kDa y su receptor Tir (Translocated intimin receptor) respectivamente. Otra región que codifica para las proteínas secretadas por *E. coli* (*esp*) y por último, la región que codifica para la síntesis del sistema de secreción o inyector tipo 3 (T3SS) (24).

La función principal de LEE es la formación del T3SS que permite a la bacteria el transporte de proteínas denominadas efectores a través de sus membranas citoplasmática y externa, incluyendo la capa de peptidoglicano, además de la membrana citoplasmática del hospedero (28). El T3SS es una estructura compleja compuesta de aproximadamente 20 proteínas bacterianas estructurales. De manera general, el aparato T3SS consiste de dos anillos que proveen una vía continua a través de las membranas mencionadas en donde el anillo de la membrana interna es el más grande de los dos anillos coaxiales (Figura 2).

Una estructura en forma de aguja está asociada con el anillo de la membrana externa y se proyecta desde la superficie bacteriana por donde los efectores son translocados dentro de la célula hospedera a través de poros formados en la membrana del hospedero por las proteínas translocadoras (EspA, EspB y EspD) (28) (30).

Figura 2. Esquema del sistema de secreción tipo III. Tomado de Coburn, 2007.



EspA es el componente de una estructura filamentosa prominente que conecta a EPEC con la célula hospedera en forma de envoltura alrededor de la estructura tipo aguja. EspB/D se localizan ambas en la membrana de la célula hospedera después de la adhesión de la bacteria y ambas forman el poro de translocación para los efectores proteicos (24) (27) (28) (31).

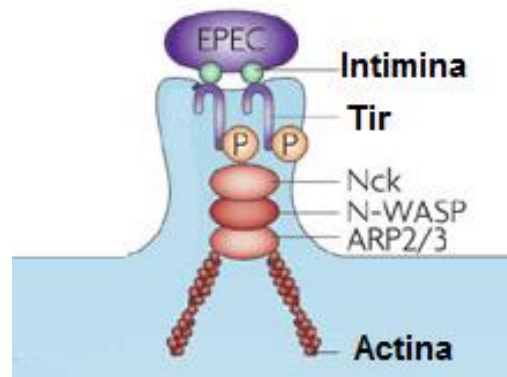
3.2.3 Adherencia íntima.

Esta etapa de la infección es mediada por la intimina y su proteína receptora Tir, la intimina es necesaria para la adherencia íntima de la bacteria a las células epiteliales del intestino y el rearrreglo del citoesqueleto de la célula hospedera. Tiene una alta variabilidad en la composición de aminoácidos en su extremo Carboxilo terminal en contraste al extremo amino terminal altamente conservado.

Este último, es insertado en la membrana externa bacteriana mientras que el extremo carboxilo terminal es expuesto al ambiente extracelular (29).

El dominio de la intimina expuesto conecta a su receptor Tir que es translocado dentro de la célula eucariótica gracias al sistema T3SS. Tir tiene dos dominios transmembranales que permiten que los extremos carboxilo y amino sean orientados hacia el citosol de la célula hospedera con una región en forma de bucle entre los dos dominios que es la porción de Tir que se une a la intimina. Es en el extremo del carboxilo terminal en donde se encuentra un residuo de tirosina (Y474) que es fosforilado una vez que se encuentra dentro del citosol eucariótico y que es la clave para iniciar con la polimerización de actina (Figura 3) (29) (31).

Figura 3. Esquema de la adherencia de EPEC por la intimina y su receptor Tir. Se aprecia el extremo carboxilo con residuo de tirosina fosforilado y otros factores que llevan a la polimerización de actina formando la estructura tipo pedestal. Tomada y modificada de Croxen, 2010.



3.2.4 Otros factores de virulencia: EspC y EspP.

EspC (EPEC secreted protein C) y EspP (extracelullar serine protease plasmid-encoded) forman parte de las serina proteasas autotransportadas por las enterobacterias (SPATE) y son secretadas por un mecanismo cooperativo del T3SS y el sistema de secreción tipo 5 (T5SS) (16).

Estas proteínas están compuestas por tres dominios: 1) Una secuencia señal en el extremo amino terminal que promueve la secreción a través de la membrana interna; 2) Un extremo carboxilo terminal que forma un poro en forma de barril en

la membrana externa y 3) un dominio central de la proteína que está al alcance de la superficie de la célula bacteriana (28) (32).

EspC es una proteína de 110 kDa que se encuentra codificada dentro de una isla de patogenicidad distinta a LEE y es la SPATE que se encuentra con mayor frecuencia en las cepas EPEC, por otro lado, EspP se ha encontrado principalmente en cepas de STEC; sin embargo, diferentes estudios han encontrado a EspP en cepas de aEPEC (27) (33) (34). A estas dos SPATE's se les asocian efectos citotóxicos, daño a la espectrina, pepsina y al factor V de coagulación humano (33).

3.3 Serogrupos (O) y serotipos (O:H).

Durante muchos años la clasificación de cepas de *E. coli* como patógenas se basaba solo en las características serológicas de las mismas, considerando los antígenos somáticos (O) y flagelares (H), fórmula antigénica que constituye los serotipos. En 1987 la OMS reconoció que EPEC, tanto atípicas como típicas, comprende 12 serogrupos: O26, O55, O86, O111, O114, O119, O125, O126, O127, O128, O142 y O158 (26) (35). Además con el paso de los años se han identificado serotipos específicos para las cepas típicas y atípicas (Cuadro 1), sin embargo, no son los únicos que se han descrito.

Cuadro 1. Serotipos mayormente encontrados en las cepas típicas y atípicas de EPEC. Tomado y modificado de Trabulsi, 2002.

Cepas	Serotipos
tEPEC	O55:H6, O86:H34, O111:H2, O114:H2, O119:H6, O127:H6, O142:H6, O142:H34
aEPEC	O26:H11, O55:H7, O55:H34, O86:H8, O111ac:H8, O111:H9, O111:H25, O119:H2, O125ac:H6, O128:H2

Los serogrupos y serotipos mencionados se encuentran en cepas denominadas lisas (S por su sigla en inglés) además de que existe otro tipo de cepas denominadas rugosas (R por su sigla en inglés). En principio, las cepas S desarrollan una morfología lisa y bordes definidos en el medio de cultivo además de que muestran suspensiones estables en caldo bacteriológico o solución salina

isotónica. Al contrario de las cepas S, las cepas R, desarrollan colonias con morfología rugosa y bordes irregulares incluyendo suspensiones inestables (precipita el cultivo) en caldo bacteriológico o solución salina isotónica (36).

La diferencia entre las cepas S y R, es la tipificación del polisacárido O específica y mientras que en las cepas rugosas se dificulta, en las cepas lisas no sucede así; además las diferencias no solo se basan en la morfología que presenta la cepa en el medio de cultivo, ésta se basa en la composición específica de uno de los componentes del lipopolisacárido (LPS por sus siglas en inglés) de la bacteria, la cadena lateral de carbohidratos del polisacárido O.

En el caso de las cepas S, estas si presentan tal polisacárido O específico por lo que se les puede determinar un serogrupo característico en tanto que las cepas R no cuentan con dichas cadenas laterales lo que impide se les determine un serogrupo característico y se les denomine OR (37).

4. Grupos filogenéticos.

En 1973, Milkman (38) comenzó los estudios genéticos cuantitativos de poblaciones de *E. coli* midiendo las variaciones de la movilidad electroforética de enzimas. Esto llevo a la hipótesis de que en grandes poblaciones bacterianas debía haber muchas variantes electroforéticas de una enzima si sus diferentes alelos eran selectivamente neutros (17).

Dichos estudios llevaron a la adopción del método de electroforesis de enzimas multilocus (MLEE) para el estudio de la diversidad bacteriana y basados en los resultados del ensayo MLEE, Ochman y Selander (39) establecieron una colección estándar de cepas de referencia de 72 cepas de *E. coli* (ECOR) (17).

Una agrupación inicial fue obtenida a través de analizar un grupo de 35 enzimas por Selander y col. (40), definiendo así, seis grandes grupos filogenéticos denominados como A, B1, B2, C, D y E (17).

Un estudio posterior llevado a cabo por Herzer y col. (41) analizó los datos de 38 enzimas utilizando el algoritmo neighbor-joining que arrojó evidencia de cuatro

grandes grupos A, B1, B2 y D con algunas secuencias no clasificadas y que en algunas ocasiones se refieren como grupo E. Las cepas que pertenecían al grupo C fueron reclasificadas siendo los cuatro grupos antes mencionados los más referidos en la diversidad bacteriana de *E. coli* (17).

Desde entonces los cuatro grandes grupos filogenéticos identificados por MLEE han sido consistentemente soportados por diferentes estudios. Adicionalmente, se han desarrollado metodologías que buscan dicha agrupación de una manera eficiente y más rápida. Un ejemplo es el trabajo de Clermont y col. cuyo desarrollo de una PCR triple permite la rápida clasificación filogenética de cepas de estudio en un 99 % (17) (42).

Otro aspecto que resalta en la clasificación es la distribución de los principales grupos filogenéticos de acuerdo con el hospedero del cual fueron aisladas las cepas de estudio sumado a la relación de los grupos filogenéticos con cepas comensales o patógenas.

Como ejemplo de lo antes mencionado, se encuentra el trabajo de Picard y col. (43) demostraron por primera vez, a través de un modelo en ratones, la relación de cepas patógenas con los grupos B2 y D principalmente, en contraste, encontraron que las cepas comensales, carentes de factores de virulencia, se relacionaban con mayor frecuencia con los grupos A y B1.

Los trabajos de Escobar-Páramo (44) y Carlos (45) son ejemplos de cómo se distribuyen los grupos filogenéticos entre diferentes hospederos como los humanos, animales domesticados y sin domesticar, animales de granja etc., además tomaron en cuenta factores de alimentación y regiones geográficas de donde se obtuvieron los aislamientos.

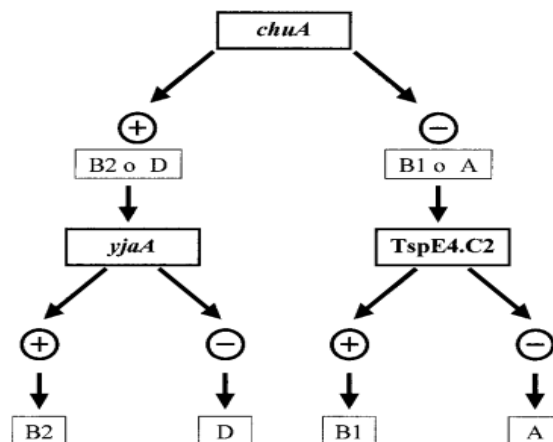
El grupo de trabajo de Clermont (42) propuso agrupar las cepas de *E. coli* en sus 4 grupos filogenéticos (A, B1, B2 y D) con base en los genes *chuA*, *yjaA* y un fragmento de DNA denominado TSPE4.C2 utilizando una PCR múltiple.

Los genes empleados por Clermont tienen la siguiente función, *chuA*, requerido para el transporte de hierro en *E. coli* O157:H7; *yjaA* identificado en la secuencia completa del genoma de la cepa de *E. coli* K-12 y TSPE4.C2 es un fragmento de DNA relacionado con una lipasa.

Derivado de su investigación, se obtuvo que el 99 % de las cepas que estudiaron, pertenecían a los mismos grupos filogenéticos determinados por otras técnicas de referencia como MLEE o ribotipificación. En consecuencia, construyeron un árbol de decisión dicotómico (Figura 4) con los tres marcadores genéticos para determinar el grupo filogenético por medio de una PCR múltiple.

En resumen, los patrones para designar las cepas del estudio dentro de los diferentes grupos filogenéticos son: grupo A (*chuA*-/*TspE4C2*-); grupo B1 (*chuA*-/*TspE4C2*+); grupo B2 (*chuA*+/*yjaA*+) y el grupo D (*chuA*+/*yjaA*-).

Figura 4. Árbol de decisión dicotómico para la determinación de grupos filogenéticos de *E. coli*. Tomado de Clermont, 2000.



5. Antígeno común de las enterobacterias.

El antígeno común de las enterobacterias, ECA, fue encontrado por Kunin en 1962 durante un estudio de cepas de *E. coli* causantes de infecciones en vías urinarias. En dicho estudio se utilizó la hemaglutinación indirecta para determinar el grado de reacciones cruzadas que presentaban los extractos de 145 cepas de *E. coli*,

mismos que representaban la mayoría de los serogrupos conocidos hasta entonces (46).

Dichos extractos presentaron la habilidad de sensibilizar eritrocitos para aglutinar no solo con su anti-suero homólogo, sino que también con anti-sueros heterólogos. Dentro de dichos sueros heterólogos se encontró al suero anti-*E. coli* O14 cuya propiedad de reactividad cruzada pudo ser removida por su absorción con el extracto de otra cepa de *E. coli* manteniendo su capacidad para hemaglutinar eritrocitos sensibilizados con los extractos de diferentes cepas demostrando que dicho suero posee anticuerpos para un antígeno común encontrado en todas las cepas de *E. coli*, que posteriormente, se encontró en otras especies dentro de la familia *Enterobacteriaceae*. Otros sueros que mostraron la misma habilidad pero con menor grado son los obtenidos con cepas O56 y O144 (46).

Con el paso de los años e investigaciones posteriores se ha logrado identificar la composición de dicho antígeno, la cual está dada por un trímero repetitivo lineal de $\rightarrow 3) \alpha\text{-D-Fuc4NAc}-(1 \rightarrow 4)\text{-}\beta\text{-D-ManNAcA}-(1 \rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-D-GlcNAc}-(1 \rightarrow$ en donde Fuc4NAc es 4-acetamido-4,6-dideoxi-D-galactosa, ManNAcA es ácido N-acetil-D-manosaminurónico y GlcNAc es N-acetil-D-glucosamina (47) (48).

De acuerdo con Ramos-Morales (48), el ECA juega un papel importante en la resistencia a sales biliares, desoxicolato de sodio (DOC), por parte de cepas de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, se mostró una relación a la resistencia a DOC con el contenido del ECA que presentan las mismas por medio de la prueba de la inhibición de la hemaglutinación o hemaglutinación pasiva.

IV. JUSTIFICACIÓN.

En México las infecciones intestinales continúan siendo un problema de salud pública sobre todo en las poblaciones de niños menores de cinco años y adultos mayores. Al respecto, son escasos los estudios epidemiológicos que proporcionan información sobre la distribución de EPEC como causante de episodios diarreicos en dichas poblaciones. Similarmente, algunos estudios realizados sobre la etiología de las enfermedades intestinales refieren la presencia de cepas EPEC, sin mencionar la identidad antigénica y determinación de serotipos prevalentes en la población de estudio. Adicionalmente, los trabajos relacionados con el ECA y su papel potencial como factor de virulencia en las bacterias entéricas no se ha esclarecido por completo ni su relación con algunos factores presentes en el hospedero que proporcionan una protección inespecífica como son las sales biliares que se secretan en el sistema gástrico.

Por tales motivos, este trabajo aborda la caracterización fenotípica y genotípica de cepas de *E. coli* aislada en niños menores de cinco años de diferentes zonas geográficas para establecer primero si dichas cepas son EPEC y su clasificación en subtipos típicas y atípicas, conociendo además, mediante métodos serológicos, su identidad antigénica.

Los dos aspectos mencionados anteriormente son importantes porque nos permitirá conocer la prevalencia de serotipos de *E. coli* en la población del estudio y su clasificación en subtipos de EPEC típicas y atípicas, además de cómo se ubican los subtipos de EPEC en grupos filogenéticos.

Adicionalmente, nos hemos planteado la pregunta si en los subtipos de EPEC, el contenido del ECA tiene una relación con las sales biliares que pudiera ser un factor que esté relacionado con la capacidad de resistencia a las barreras inespecíficas del hospedero y por lo tanto favorecer la incidencia de uno u otro subtipo de EPEC en la población de estudio.

V. HIPÓTESIS.

Si existe una relación entre el contenido del antígeno común de las enterobacterias (ECA) con los subtipos de EPEC, típica y atípica, entonces el ECA pudiera ser un factor de virulencia que se encuentre con más frecuencia en uno de subtipos de EPEC.

VI. OBJETIVOS.

1. General.

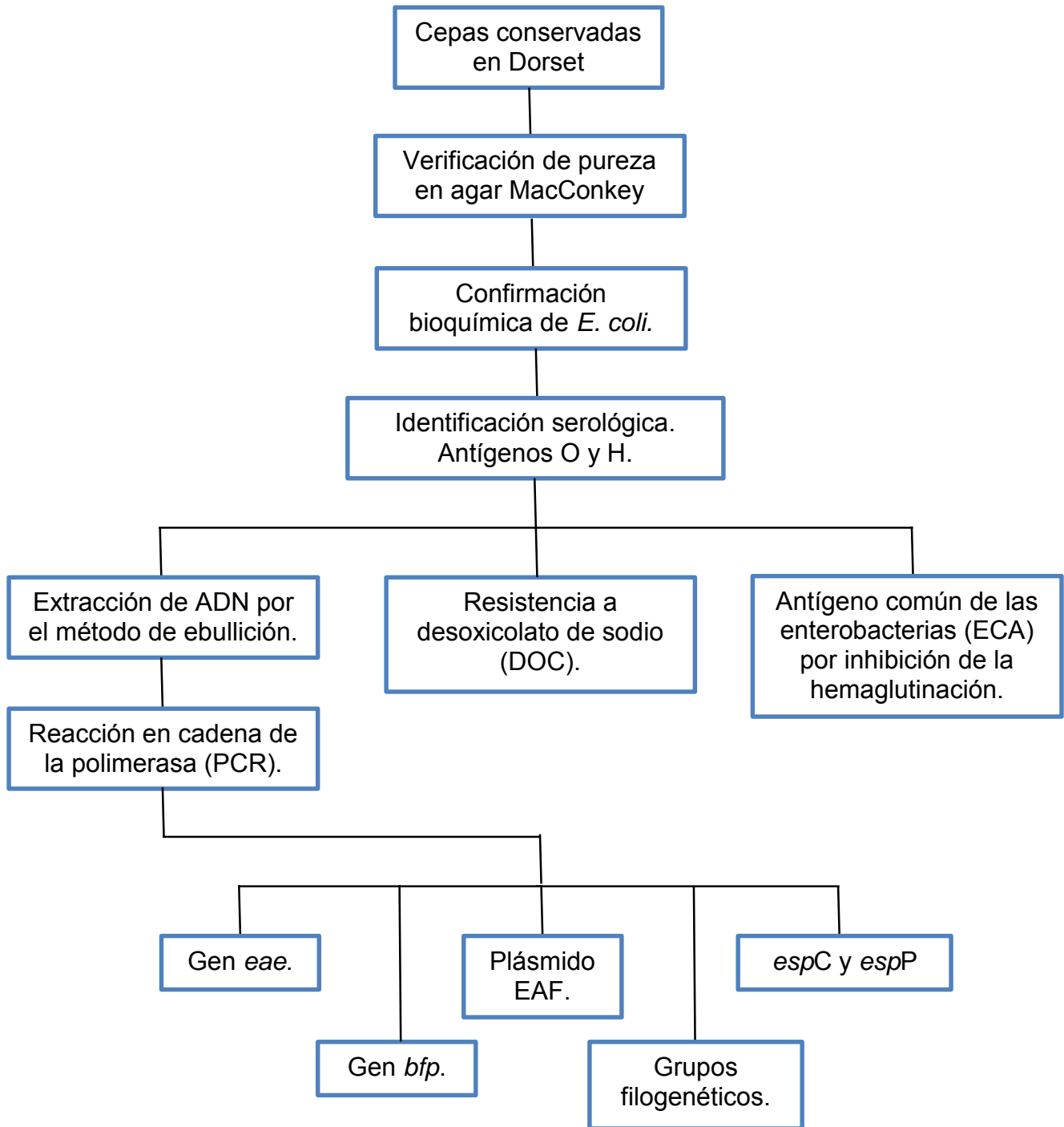
Mediante el uso de las propiedades fenotípicas y genotípicas caracterizar cepas de *E. coli* enteropatógena.

2. Particulares.

- Por medio de un esquema antigénico de sueros contra los antígenos somático y flagelar, determinar los serotipos de las cepas en estudio.
- Determinar genes *eae*, *bfp* y *eaf*, utilizando la PCR, para clasificar las cepas bacterianas dentro del patotipo EPEC y a su vez dentro del mismo clasificarlas como cepas típicas o atípicas.
- Realizar una PCR múltiple con el propósito de encontrar el grupo filogenético al cual pertenecen las muestras con ayuda de los marcadores genéticos *chuA*, *yjaA* y TspE4C2.
- Con iniciadores específicos y una PCR doble conocer la presencia de los genes *espC* y *espP* en las cepas del estudio para determinar si son factores de virulencia en las cepas de *E. coli* del estudio.
- Definir la resistencia o sensibilidad de las muestras al 1 % de DOC.
- Determinar el contenido de ECA mediante ensayos de inhibición de la hemaglutinación para conocer su relación con la resistencia/sensibilidad al 1.0 % de DOC.

VII. METODOLOGÍA.

Figura 5. Esquema general de la metodología del estudio.



1. Cepas bacterianas.

En este estudio fueron incluidas 164 cepas de *E. coli* aisladas de casos de diarrea de 125 niños menores a 5 años con la siguiente distribución: 96 (77 %) fueron de México y 29 (23 %) de Bangladesh. De los niños de México fueron obtenidas 128 cepas, de estas, 66 (52 %) fueron aisladas de 36 niños entre 1985 - 1987 en el Municipio de Tlaltizapan, Morelos; 24 (19 %) cepas fueron de 23 niños en el Instituto Nacional de Pediatría (INP) en 1987; 38 (30 %) cepas aisladas de 37 niños de un estudio de diarrea aguda en el Centro Médico Nacional del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) entre 1996 - 2003.

Con relación a los niños de Bangladesh fueron aisladas 36 cepas de *E. coli* en 2009 en el Centro Internacional para la Investigación de la Enfermedad Diarreica, Bangladesh (**icddr,b**; por sus siglas en inglés) y proporcionadas por su entonces director ejecutivo el Dr. Alejandro Cravioto.

2. Confirmación bioquímica.

Las cepas identificadas como *E. coli* se analizaron para confirmar su pureza e identidad bioquímica, debido a que 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 inoculándolas en agar MacConkey (Difco, MI), las placas se incubaron a 37 °C durante 18-24 h. Posteriormente se confirmó la identidad fenotípica de los aislamientos de *E. coli* utilizando métodos estándares de acuerdo con Barrow, 1993 (49) con diferentes substratos para la identificación de bacterias Gram-Negativas en las que se incluyeron agar Kligler, agar urea, medio SIM (sulfhídrico, indol y movilidad), caldo rojo de metilo y Voges-Proskauer, caldo malonato-fenilalanina y ácido glucónico.

3. Caracterización antigénica de los cultivos de *E. coli*.

En la tipificación serológica de las cepas de *E. coli* se utilizaron 187 sueros contra los antígenos O y 53 sueros (ambos SERUNAM) contra los antígenos H del esquema antigénico de *E. coli* de acuerdo a la metodología reportada por Orskov y

Orskov (50). Estos sueros se obtuvieron previamente en conejo utilizando cepas de *E. coli* de referencia de la NCTC (National Collection of Type Cultures) y empleando un esquema de inmunización propuesto por Ewing (36).

3.1 Antígeno somático (O).

La obtención del antígeno somático se realizó inoculando las cepas de *E. coli* en 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 agregaron 10 mL de solución salina (0.9 %), se cubrieron con papel parafilm y se mezclaron hasta desprender todo el crecimiento bacteriano para obtener una suspensión bacteriana, la cual se transfirió a otro tubo y se colocó a 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 de NaCl con 0.6 % de formaldehído).

Por otra parte, 50 µL de cada uno de los 187 sueros diluidos 1:100 contra el antígeno somático fueron distribuidos en microplacas de 96 pozos fondo en U (Costar) utilizando un dispensador semi-automático (Dynatech Laboratories, Quick Spense Controller). En cada uno de los pozos que contenían los anti-sueros mencionados se distribuyó 50 µL del antígeno somático y las placas se incubaron a 50 °C durante 18 – 24 h.

Después de la incubación, se leyeron y registraron las reacciones de aglutinación de los antisueros con los antígenos O. Una vez registradas las aglutinaciones, se procedió a realizar diluciones seriadas al doble de cada anti-suero iniciando con una dilución de 1:100 y finalizando con 1:12800 y a cada dilución se agregaron 50 µL del antígeno O y las microplacas se incubaron a 50 °C durante 18 – 24 h.

Posterior a la incubación, se registraron las aglutinaciones y se determinaron los títulos, que se consideró como la última dilución del suero a la cual se registró una reacción de aglutinación con el antígeno O de las cepas. Para establecer el serogrupo se comparó el título del suero determinado con el antígeno O del cultivo con el título del suero con su antígeno homólogo.

En el caso en que los sueros presentaron títulos similares se realizó el procedimiento descrito en el párrafo anterior empleando anti-sueros específicos iniciando con una dilución de 1:50 y hasta 1:6400.

3.2 Antígeno flagelar (H).

El antígeno flagelar de cada una de las cepas se obtuvo al inocular el cultivo por picadura en agar semisólido en tubos de Craigie y se incubaron a 30 °C durante 3 días, se revisó que cada muestra tuviera crecimiento bacteriano en la superficie. Una vez desarrollado el flagelo de las cepas, se tomó un inóculo del agar semisólido y se sembró en caldo biotriptasa al 2.0 % para después incubarlos a 30 °C durante 18-24 h. Al final de la incubación a cada tubo con biotriptasa se le agregaron 10 mL de formalina al 0.6%.

En placas de pozos fondo en U (Costar) se distribuyeron 50 µL de cada uno de los 53 sueros (1:100) contra los antígenos H y se agregaron 50 µL de antígeno flagelar de cada cepa para después incubar a 50 °C por 2 h. Pasado el tiempo de incubación, se registraron las aglutinaciones de los sueros con los antígenos H. Una vez registradas las reacciones de aglutinación de los sueros con cada antígeno, se procedió a realizar diluciones seriadas al doble de 1:100 hasta 1:12800 y se agregaron 50 µL del antígeno H, se incubaron a 50 °C durante 2 h.

Después de la incubación, se registraron los títulos hasta los cuales hubo reacción positiva con el antígeno flagelar de las cepas, para establecer el serotipo el título de los sueros anti-H con su antígeno homólogo se comparó con el título del suero determinado con el antígeno H de las cepas.

Sin embargo, si los anti-sueros mostraron títulos semejantes, se realizó el mismo procedimiento de diluciones seriadas al doble previamente descrito pero con los sueros específicos anti-antígeno flagelar desde una dilución de 1:50 hasta 1:6400, si el anti-suero presentó un título similar al título homólogo fue el que se consideró para determinar el antígenos H de la cepa.

Cabe señalar que el procedimiento anterior fue para las cepas que presentaron movilidad en el agar semisólido, para las cepas que no presentaron movilidad en el medio semisólido se les registró como no móviles (H-).

4. Obtención del ADN.

En la obtención del ADN de las cepas de *E. coli* se utilizó el método de ebullición previamente reportado por Islam y col. (51). Los cultivos identificados como *E. coli* fueron inoculados en 2 mL de caldo Luria-Bertain (LB, Difco) e incubados a 37 °C durante 18-24 h, del crecimiento bacteriano en LB se tomó 1 mL y fue colocado en un microtubo de centrifuga el cual se centrifugó a 13000 rpm durante 5 min. Después de la centrifugación, el sobrenadante se decantó y a los tubos se les quito el exceso de agua con papel secante. Posteriormente, a los tubos se les adicionó 200 µL de agua ultra pura y el pellet se resuspendió por agitación con vortex.

Los tubos bien tapados se sometieron a ebullición durante 10 min, pasado el tiempo fueron colocados rápidamente en hielo por 5 min, la suspensión anterior se homogenizó con vortex, se centrifugó a 13000 rpm durante 10 min y por último se tomaron 100 µL del sobrenadante y fueron congelados a -20 °C hasta su uso.

Para observar el ADN que se obtuvo, se mezclaron 2 µL de azul de bromofenol con 8 µL del sobrenadante que contenía el ADN, la suspensión anterior se distribuyó en pozos de un gel de agarosa al 1.0 % dentro de una cámara para electroforesis (BIO•RAD) con buffer de Tris Borato Etilendiamino-tetra acético (TBE) 0.5X y se aplicó corriente de 100 V durante 60 minutos.

Finalmente, el gel se tiñó con el colorante Red gel (Biotium, BioLabs New England) durante 20 minutos y al término del tiempo se tomó una fotografía con un documentador de imágenes (Biosens SC805 Gel Imagine Systems), visualizando el DNA con un transiluminador de UV.

5. Genes de virulencia y grupos filogenéticos.

Mediante el ensayo de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se determinaron los genes de virulencia y grupos filogenéticos. Se utilizaron iniciadores previamente reportados por diferentes autores (Cuadro 2). En el caso específico de los grupos filogenéticos este se realizó de acuerdo al procedimiento reportado por Clermont (42) y se utilizó la combinación de genes (*chuA*, *yjaA* y TSP E4.C2) para establecer los grupos filogenéticos A, B1, B2 y D de las cepas de *E. coli*.

Cuadro 2. Secuencia de los iniciadores utilizados.

Genes	Secuencia de iniciadores 5' a 3'	Peso del amplicón (pb)	Referencia
<i>eae</i>	CCGAATICGGCACAAGCATAAGC CCCGGATCCGTCTCGCCAGTATTC	864	Schmidt H, 1994 (52)
<i>bfp</i>	AATGGTGCTTGCGCTTGCTGC GCCGCTTTATCCAACCTGGTA	326	Gunzburg T S, 1995 (53)
<i>eaf</i>	CAGGGTAAAAGAAAGATGATAA TATGGGGACCATGTATTATCA	397	Franke J, 1994 (54)
<i>chuA</i>	ATGGTACCGGACGAACCAAC TGCCGCCAGTACCAAAGACA	279	
<i>yjaA</i>	CAAACGTGAAGTGTCAGGAG AATGCGTTCCTCAACCTGTG	211	Clermont O, 2000 (42)
TspE4.C2	CACTATTCGTAAGGTCATCC AGTTTATCGCTGCGGGTCGC	152	
<i>espC</i>	TAGTGCAAGTGCAGAAAGCAGTT AGTTTTCTGTTGCTGTATGCC	301	Abreu A, 2013 (33)
<i>espP</i>	GTCCATGCAGGGACATGCCA TCACATCAGCACCGTTCTCTAT	547	

5.1 Condiciones para la PCR.

Para cada gen, la reacción de PCR se llevó a cabo en microtubos de centrifuga de 200 μ L, en este tubo se colocó una suspensión que contenía agua ultra pura, amortiguadores, dNTP's, iniciadores, Taq-polimerasa y ADN (Cuadro 3), en cada ensayo se utilizó como control positivo una cepa de *E. coli* de referencia, además se colocó un control negativo en el cual contenía todos los reactivos excepto ADN.

Una vez preparada la mezcla de reacción, los microtubos se colocaron en un termociclador (Axygen) y se establecieron las condiciones para 30 ciclos en la fase de extensión, alineamiento y elongación (Cuadro 4).

Cuadro 3. Reactivos utilizados en cada PCR. Cantidades por cada tubo de reacción.

Reactivo (Invitrogen)	Genes				
	<i>eae</i>	<i>bfp</i>	<i>eaf</i>	Grupo filogenético. ¹	<i>espC/espP</i> ²
	(μL)				
Agua ultra pura libre de RNA y DNA	15.35	17.35	13.85	13.20	15.55
Buffer PCR 10X	2.50	2.50	2.50	2.50	2.5
MgCl ₂ 50 mM	1.50	1.50	1.50	0.75	0.75
dNTP's	2.50	0.50	5.00	2.50	1.00
Iniciador forward	1.00	1.00	0.50	0.80 ⁺	1.00†
Iniciador reverso	1.00	1.00	0.50	0.80 ⁺	1.00†
Taq DNA polimerasa recombinante	0.15	0.15	0.15	0.25	0.20
DNA muestra	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
TOTAL	25.00	25.00	25.00	25.00	25.00
Control positivo	EPEC*	EPEC*	EPEC*	UPEC**	EPEC*/ ³ EHEC

¹PCR múltiple para tres genes. +Cada uno de los 3 iniciadores forward y 3 iniciadores reverse se agregan en la cantidad señalada.

²PCR múltiple para dos genes. †Cada uno de los 2 iniciadores forward y los 2 iniciadores reverse se agregan en la cantidad señalada.

³*E. coli* O157:H7 (108287)

**E. coli* O127:H6 (E2348/69).

** *E. coli* O6:H1 (CFT 073).

Cuadro 4. Condiciones del termociclador y porcentaje del gel de agarosa utilizado en cada gen determinado.

Fase	Gen a determinar				
	<i>eae</i>	<i>bfp</i>	<i>eaf</i>	Grupo filogenético	<i>espC/espP</i>
	T (°C) / t (min.)				
Desnaturalización inicial	94 / 5	95 / 5	95 / 5	94 / 4	95 / 5
Extensión	94 / 0.5	72 / 2	96 / 0.6	94 / 0.5	95 / 1
Alineamiento	55 / 1	94 / 0.5	57 / 1	59 / 0.5	59 / 1
Elongación	72 / 2	56 / 1	72 / 0.7	72 / 0.5	72 / 1.3
Extensión final	72 / 5	72 / 8	72 / 10	72 / 5	72 / 10
% Agarosa	1.0	1.2	1.2	1.5	1.2

Al final de los treinta ciclos se tomaron 8 μL de los amplicones obtenidos, se mezclaron con 2 μL de azul de bromofenol y en los pozos de un gel de agarosa fueron distribuidos, el gel fue colocado en una cámara de electroforesis (BIO•RAD) con solución amortiguadora TBE 0.5X y se aplicó corriente de 100 V durante 70 minutos, en cada gel además de los amplicones se colocó un marcador de peso molecular. El gel se tiñó con colorante Red gel (BioLabs New England) durante 20 min y al finalizar se tomó una fotografía con un documentador de imágenes (Biosens SC805 Gel Imagine Systems), visualizando el producto amplificado con un transiluminador de UV.

6. Sensibilidad al desoxicolato de sodio (DOC).

Primeramente se determinó la concentración mínima inhibitoria (MIC) en las cepas de *E. coli* O127:H6 (E2348/69 lisa), *E. coli* E2348/69 rugosa, *S. Typhimurium* Ra y la cepa mutante de *S. Typhimurium* Rd que se usaron como controles en la sensibilidad al DOC, para realizar los ensayos de MIC se utilizaron las siguientes concentraciones porcentuales de DOC (p/v): 0.1, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5 y 4.0 dichas concentraciones fueron distribuidas en placas de agar LB, además se utilizó una placa de agar LB sin DOC como control de crecimiento (48).

De cada una de las cepas controles se hizo un ajuste al tubo 0.5 (1.5×10^8 UFC/mL) del nefelómetro de McFarland, posteriormente se hicieron diluciones para tener una concentración bacteriana de 10^6 , 10^4 y 10^2 UFC/mL, de cada suspensión bacteriana ajustada se tomaron 5 μL para inocularlos en las placas de agar LB con las concentraciones de DOC mencionadas, como control de crecimiento se usó una placa LB sin DOC.

Para realizar el ensayo con DOC en las cepas de *E. coli* cada una de las cepas fue inoculada en agar TSA para obtener cultivo fresco, se ajustó con solución salina al tubo 0.5 del Nefelómetro de McFarland y se realizaron diluciones para obtener una concentración bacteriana de 10^4 UFC/mL. De cada tubo a la concentración mencionada se tomaron 5 μL que se colocaron en agar LB con 1% de DOC al igual que en agar LB sin DOC, por último las pacas de agar LB fueron

incubadas a 37 °C durante 24 h. Al día siguiente se registraron los resultados considerando el criterio de si había crecimiento de colonias en LB con DOC se registraba como resistente (R) y si no había crecimiento del microorganismo se registraba como sensible (S) a DOC.

7. Antígeno común de las enterobacterias (ECA).

7.1 Extracción del ECA.

La extracción del ECA de cada una de las cepas de *E. coli* se realizó conforme a la metodología descrita por Hojyo y col. (55). Se sembraron masivamente por estría cerrada en cajas Petri con agar de soya-tripticaseína (TSA) y se incubaron a 37 °C, 18 – 24 h.

Después de la incubación, cada cultivo se recuperó con 10 mL de solución salina (0.9%) estéril. La cantidad de cultivo recuperado de la caja Petri fue una suspensión con una concentración del tubo 5 del Nefelómetro de McFarland (15×10^8 UFC/mL), concentración necesaria para la extracción de ECA.

El siguiente paso después de la obtención de la suspensión bacteriana fue colocarla en tubos de ensaye previamente esterilizados y sometidos a ebullición con vapor fluente durante 2 h, 110 °C.

Posterior a la ebullición, las suspensiones se transfirieron a tubos de centrifuga estériles y fueron centrifugados (Sorvall RC500) a 7500 rpm durante 10 minutos. Después de la centrifugación, se tomaron 5 mL del sobrenadante y se colocaron en tubos de ensaye con tapón de rosca. En dicho sobrenadante era donde se encontraba el ECA y para su conservación los tubos se colocan en refrigeración (4 °C) hasta su uso.

7.2 Titulación del suero contra el ECA de *E. coli* O14:K7:NM por el ensayo de hemaglutinación.

El ensayo de hemaglutinación se realizó con sangre de carnero desfibrinada con solución de Alsever (Dibico), con modificaciones de la metodología descrita por Suzuki (56). Primero, se procedió con el lavado de los eritrocitos de carnero, para esto se tomaron 5 mL y se colocaron en un tubo para centrifuga, se centrifugó a

3000 rpm por 3 minutos; pasado el tiempo, el sobrenadante se descartó y al pellet de eritrocitos se agregaron 5 mL de solución salina (0.9 %) estéril reconstituyéndolo cuidadosamente para centrifugar nuevamente a 3000 rpm por 3 min, el procedimiento anterior se repitió tres veces hasta obtener un sobrenadante totalmente transparente.

Como segundo paso del ensayo, los eritrocitos lavados fueron sensibilizados con el extracto del ECA de cada una de las cepas que se utilizaron como controles de los ensayos, dichas cepas fueron: *E. coli* O14:K7:NM, *S. Typhimurium* (ECA), *S. Typhimurium* LT2, *Citrobacter freundii* (E9750) y *E. coli* O18ab.

La sensibilización de los eritrocitos consistió en colocar en un tubo de ensaye 100 μ L de eritrocitos lavados y 100 μ L del ECA de cada una de las cepas control para después incubarlos a 37 °C durante 30 minutos en un baño serológico. Al final de la incubación, los eritrocitos sensibilizados fueron lavados tres veces de la manera antes descrita para eliminar el exceso de ECA.

Por otra parte, en microplacas de 96 pozos fondo en U (Costar) nuevas, se hicieron las diluciones seriadas al doble de un suero anti-ECA O14 (SERUNAM) previamente preparado en conejos contra la cepa de *E. coli* O14:K7:NM en el que se utilizó un esquema de inmunización propuesto por Ewing (36).

Se realizaron diluciones seriadas al doble del suero anti-ECA O14 desde 1:12.5 hasta una dilución 1:6400. Adicionalmente se utilizó un pozo como control de los ensayos de hemaglutinación el cual no contenía dilución del suero anti-ECA. Una vez hechas las diluciones del suero a los pozos de la microplaca se agregan 10 μ L de una solución al 1 % de los eritrocitos sensibilizados lavados. Subsecuentemente, las placas se incubaron a 37 °C durante 30 minutos.

7.3 Ensayo de inhibición de la hemaglutinación para determinar el contenido del ECA.

De forma similar que el ensayo de hemaglutinación, (56), se utilizaron eritrocitos lavados y sensibilizados con el ECA de *S. Typhimurium*. En este ensayo, se

prepararon diluciones seriadas al doble de los ECA de cada una de las cepas del estudio y de los controles.

Para cada cepa se realizó una serie de 10 de diluciones de cada ECA, la primera dilución fue 1:2 (50 μ L) y la última dilución 1:1024. Después de realizar las diluciones de los ECA's de las muestras a cada dilución se agregó 50 μ L del suero anti-ECA O14 diluido 1:200. Las suspensiones preparadas anteriormente se incubaron a 37 ° C durante 30 min.

Simultáneamente se preparó una solución al 1 % con los eritrocitos sensibilizados con el ECA de *S. Typhimurium* (ECA), de esta solución se distribuyeron 10 μ L en los pozos que contenían la suspensión suero anti-ECA O14 más las diluciones de ECA de las muestras, nuevamente las microplacas fueron incubadas a 37 °C durante 30 min.

Finalmente la inhibición de la hemaglutinación se leyó y el título de ECA se consideró como la dilución a la cual se detectaba la reacción de hemaglutinación.

8. Análisis de χ^2 de proporciones.

Para la comparación de la proporción entre cepas tEPEC y aEPEC en las distintas zonas geográficas; entre subtipos tEPEC y aEPEC, en los grupos filogenéticos determinados; en los genes de las serina-proteasa; en las cepas sensibles y resistentes a DOC y el contenido de ECA entre las diferentes muestras y su relación con la sensibilidad a DOC; se utilizó la prueba χ^2 (Chi cuadrada) con del programa Epi-Info 6 del Centro para el Control de Enfermedades y Prevención (CDC) con un nivel de significancia (α) de 0.05.

VIII. RESULTADOS.

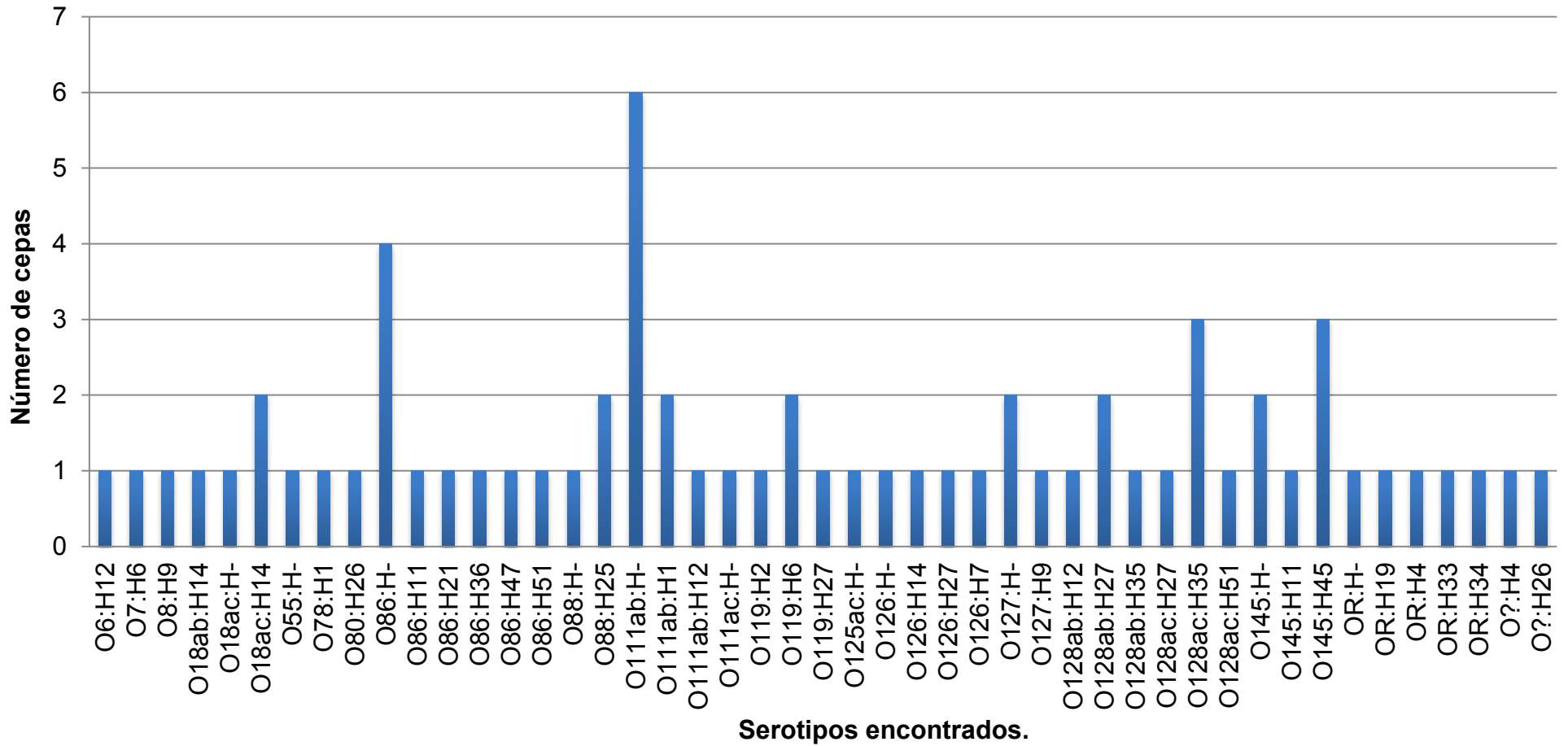
1. Serotipificación.

Cepas de *E. coli* aislada de diarrea infantil del Estado de Morelos.

El análisis de serogrupos de 66 cepas de *E. coli* mostró 19 serogrupos, entre ellos O111ab, O86, O145, O128ac, O119, O126, O128ab, O127, O18ac, O88, O111ac, O125ac, O18ab, O6, O55, O7, O78, O8, O80, un antígeno somático rugoso (OR) y un antígeno no tipificable (O?) (Figura 6). Los serogrupos identificados con más frecuencia fueron O111ab y O86 con 9 cepas (13.6 %), los serogrupos O145 y O128ac en 6 (9.1 %) y 5 (7.6 %) cepas respectivamente.

En relación a los serotipos, se identificaron 47 diferentes, los más frecuentes fueron O111ab:H- en 6 cepas (9.1 %), el serotipo O86:H- se determinó en 4 cepas (6.1 %), los siguientes serotipos O128ac:H35 y O145:H45 en 3 cepas cada uno (4.5 %). Por último, en 2 cepas (3.0 %) cada uno de los siguientes serotipos O18ac:H14, O88:H25, O111ab:H-, O119:H6, O127:H-, O128ab:H27 y O145:H- (Figura 6).

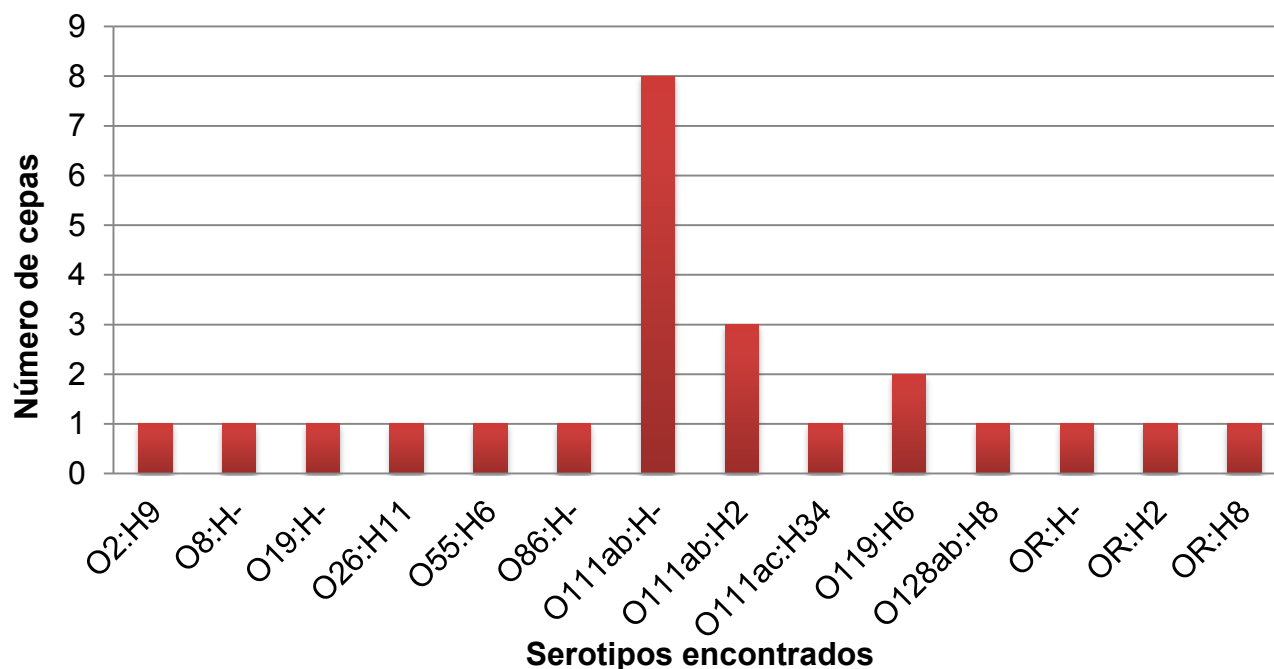
Figura 6. Distribución de los serotipos identificados en 66 cepas aisladas de diarrea infantil en el Estado de Morelos.



Cepas de *E. coli* aislada en el Instituto Nacional de Pediatría.

En 24 cepas de *E. coli* se identificaron 10 serogrupos O111ab, O119, O111ac, O128ab, O26, O19, O2, O55, O8, O86 y OR (Figura 7). En estas cepas el serogrupo con mayor frecuencia fue O111ab con 11 cepas (45.8 %). Los serotipos que se determinaron en esta cepas fueron O111ab:H- en 8 cepas (33.3 %) y los serotipos O111ab:H2 y O119:H6 se identificaron en 3 (12.5 %) y 2 (8.3 %) cepas cada uno.

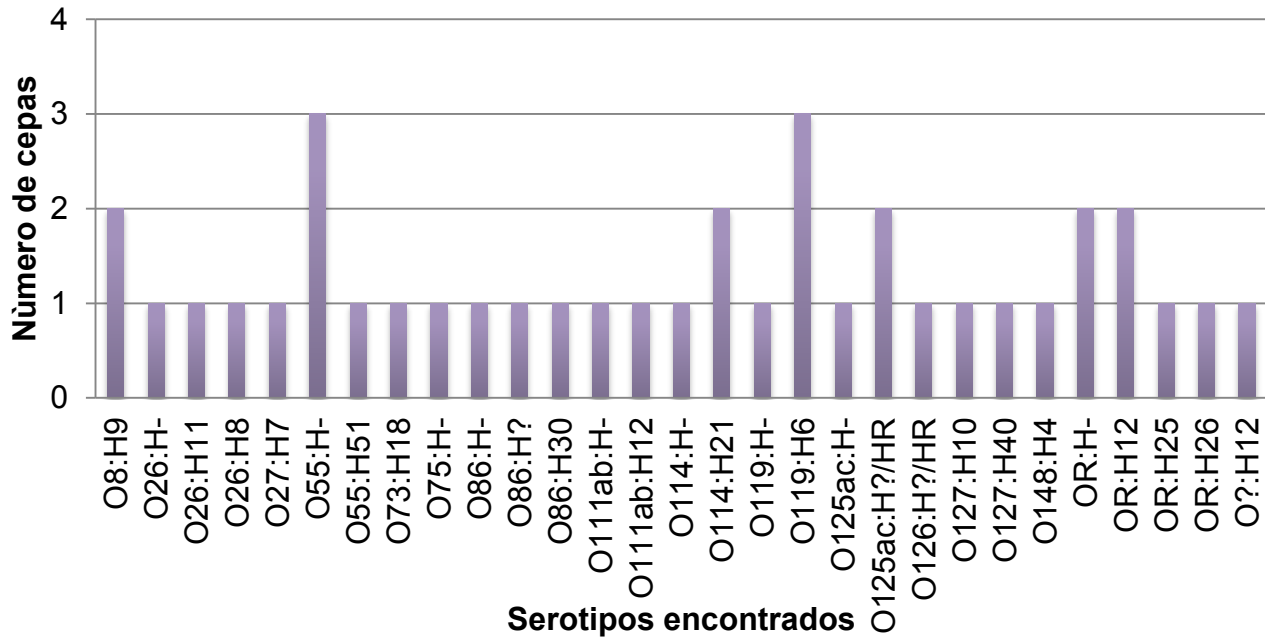
Figura 7. Serotipos identificados en cepas de *E. coli* aislada en el Instituto Nacional de Pediatría (INP).



Cepas de *E. coli* aislada en el Instituto Mexicano del Seguros Social IMSS.

Los serogrupos de *E. coli* identificados en 38 cepas fueron O119, O55, O114, O125ac, O26, O86, O111ab, O127, O8, O126, O148, O27, O73, O75, OR y O?. De estos, los serogrupos con mayor número de cepas fueron O119 y O55 con 4 cepas (10.5 %) cada uno. En el análisis de la distribución de los diferentes serotipos obtenidos fueron 3 cepas (7.9 %) de los serotipos O55:H- y O119:H6 mientras que los serotipos O8:H9, O114:H21, O125ac:H?, OR:H- y OR:H12 fueron identificados en 2 cepas (5.3 %) cada uno (Figura 8).

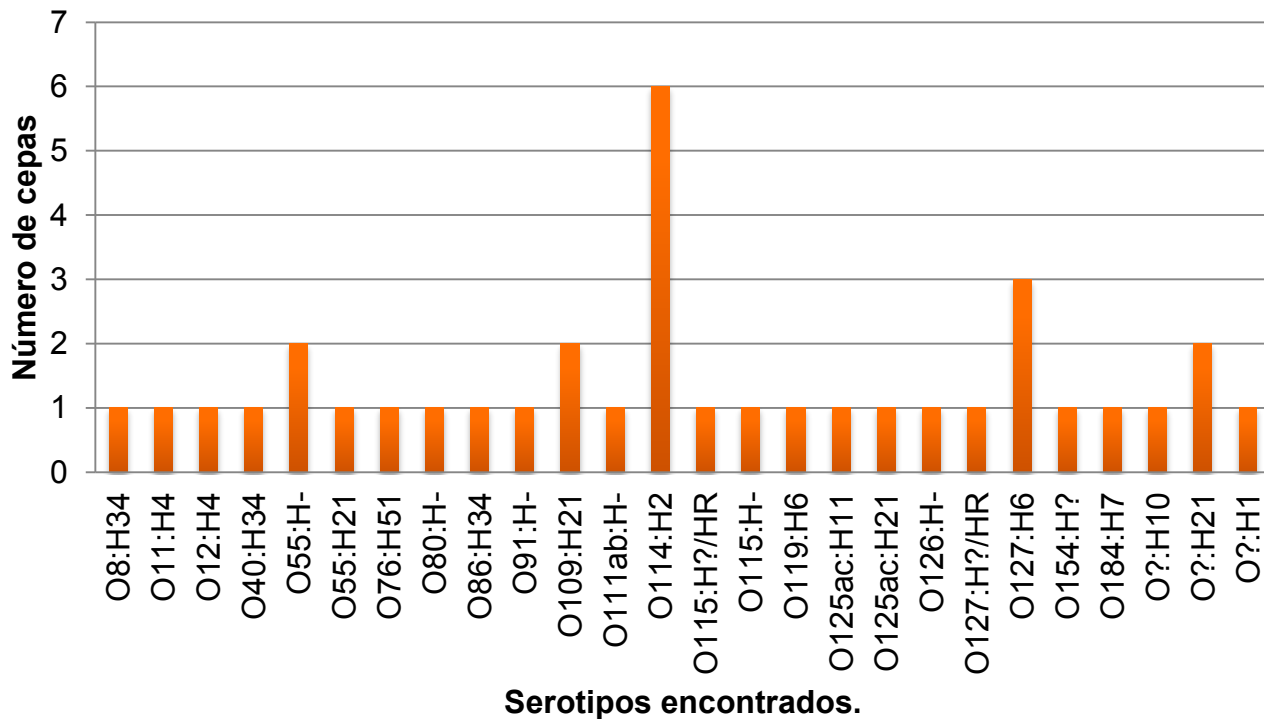
Figura 8. Serotipificación de cepas de *E. coli* aislada en el Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS).



Cepas de *E. coli* aislada en Bangladesh.

Los serogrupos que se identificaron en 36 cepas fueron O114, O127, O55, O109, O115, O125ac, O11, O111ab, O119, O12, O126, O154, O184, O40, O76, O8, O80, O86, O91, además cepas O? (Figura 9). Los serogrupos con mayor prevalencia fueron O114 y O127 con 6 (16.7 %) y 4 cepas (11.1 %) respectivamente. De forma similar que en los serogrupos, los serotipos más frecuentemente identificados fueron O114:H2 en 6 cepas (16.7 %), O127:H6 en 3 cepas (8.3 %) y en 2 cepas (5.6 %) cada uno de los serotipos O55:H-, O109:H21 y O?:H21.

Figura 9. Serotipos determinados en las 36 cepas aisladas en la región de Bangladesh.



2. Clasificación de las cepas de *E. coli* en subtipos tEPEC y aEPEC.

La clasificación de las cepas de *E. coli* en los subtipos **tEPEC** y **aEPEC**, se basó en la presencia y/o ausencia de la combinación de genes específicos de EPEC (*eae/bfp/eaf*). Para establecer el subtipo **tEPEC** se consideró la presencia de los mencionados genes (*eae+/bfp+/eaf+*), por otro lado, para el subtipo **aEPEC** se consideró solo la presencia de *eae+* con ausencia de los genes *bfp-* y *eaf-*, todos estos productos de PCR se pueden observar en las siguientes figuras.

Cuadro 5. Comparación de los principales serogrupos encontrados en las diferentes áreas de aislamiento.

Serogrupo	Morelos (N)	Serogrupo	IMSS (N)	Serogrupo	INP (N)	Serogrupo	Bangladesh (N)
O111ab ¹	9	OR ²	6	O111ab ³	11	O114 ⁴	6
O86 ¹	9	O119	4	OR	3	O127	4
O145	6	O55	4	O119	2	O?	4
O128ac	5	O114	3			O55	3
O119	4	O125ac	3			O109	2
O126	4	O26	3			O115	2
O128ab	4	O86	3			O125ac	2
OR	4	O111ab	2				
O?	3	O127	2				
O127	3	O8	2				
O18ac	3						
O88	3						

¹Los serotipos más comunes para el serogrupo O111ab fueron O111ab:H-; H1; H2. En el serogrupo O86 fueron O86:H-; H11; H21; H36; H47; H51.

²En las cepas rugosas (OR) se encontraron como más frecuentes los serotipos OR:H-; H12; H25; H26.

³Los serotipos más frecuentes en el serogrupo O111ab fueron O111ab:H-; H2.

⁴En el serogrupo O114 el serotipo más encontrado fue el O114:H2.

En el Cuadro 5 se puede observar cuales fueron los serogrupos más comunes encontrados en las cepas del estudio. Cabe hacer notar que los serogrupos con mayor número de cepas corresponden a los clásicos de EPEC descritos en la literatura, sin embargo, algunos de los serotipos encontrados en cada uno no corresponde a los clásicos de EPEC. También se hallaron serogrupos no clásicos de EPEC (letras en negritas).

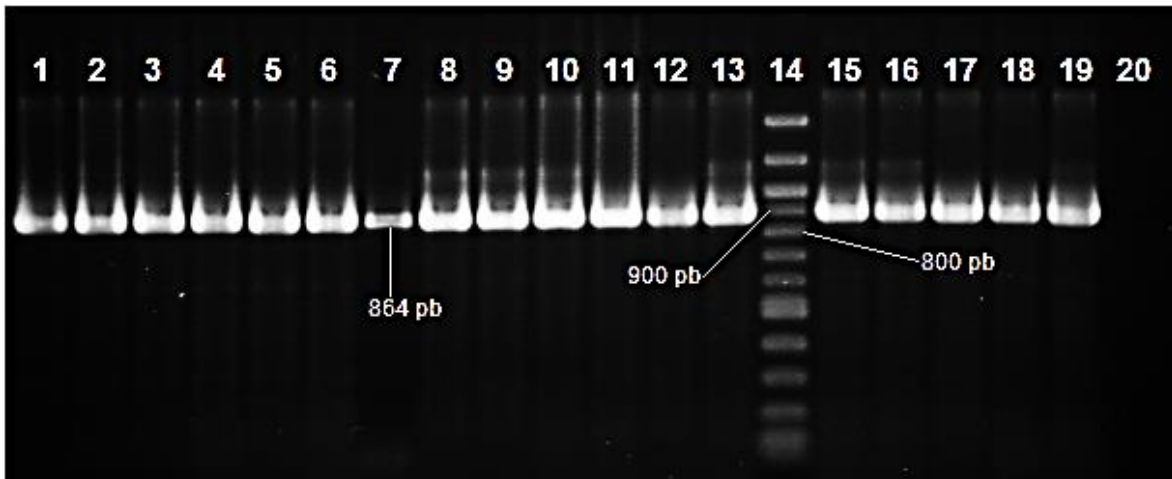


Figura 10. Electroferograma de los amplicones del gen *eae* (864 pb). Carriles 1 – 6, 8 – 13 y 15 – 19, con muestras positivas para el gen *eae*. Carril 7, control positivo *E. coli* O127:H6 (E2348/69); carril 14, marcador de peso molecular (New England, BioLabs. Quick-Load, 100 pb); carril 20, con el control negativo.

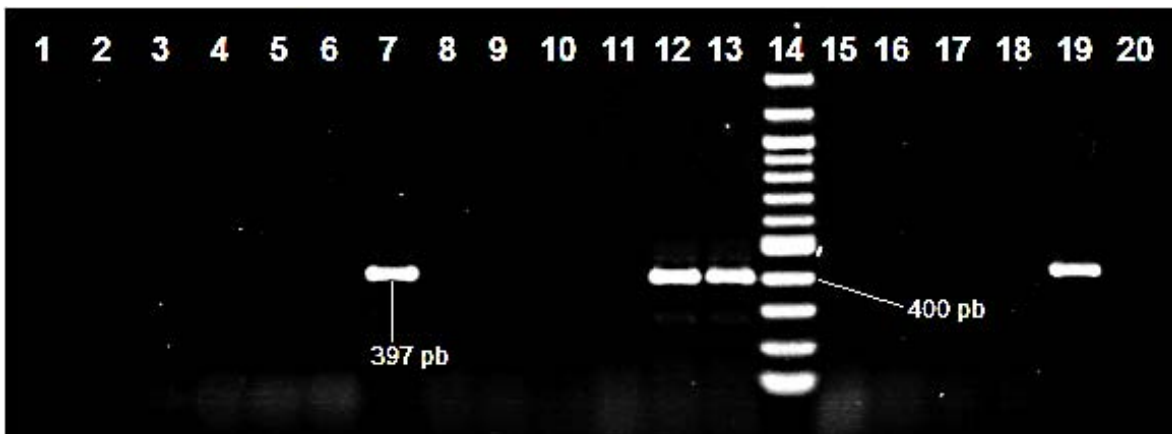


Figura 11. Electroferograma de los amplicones del gen *eaf* (397 pb). Carriles 1 – 6, 8 – 11 y 15 – 18, con muestras negativas para el gen *eaf* y carriles 12, 13 y 19, con cepas positivas para el gen *eaf*. Carril 7, control positivo cepa *E. coli* O127:H6 (E2348/69); carril 14, marcador de peso molecular (New England, BioLabs. Quick-Load, 100 pb); carril 20, control negativo.

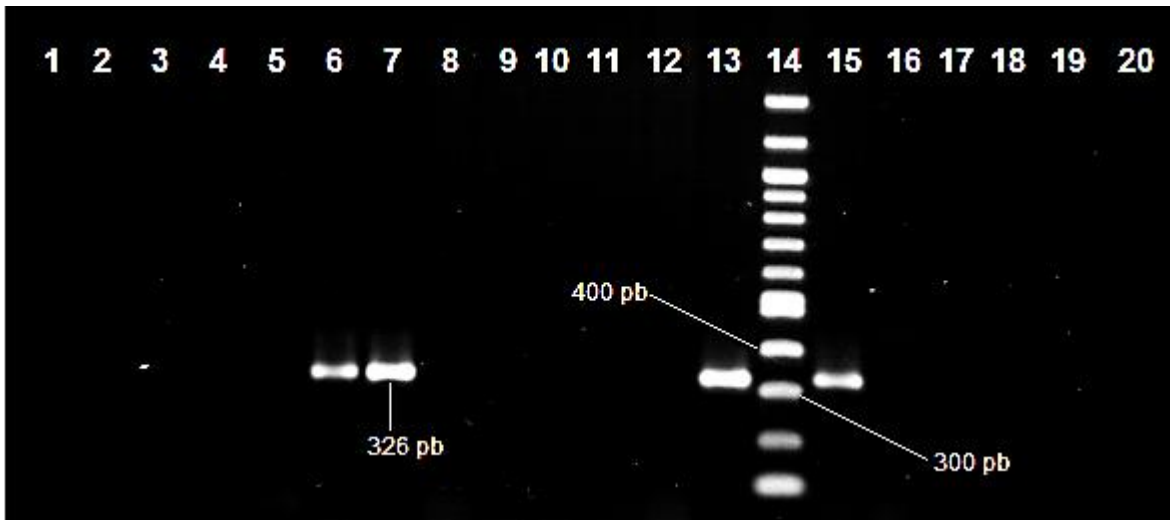


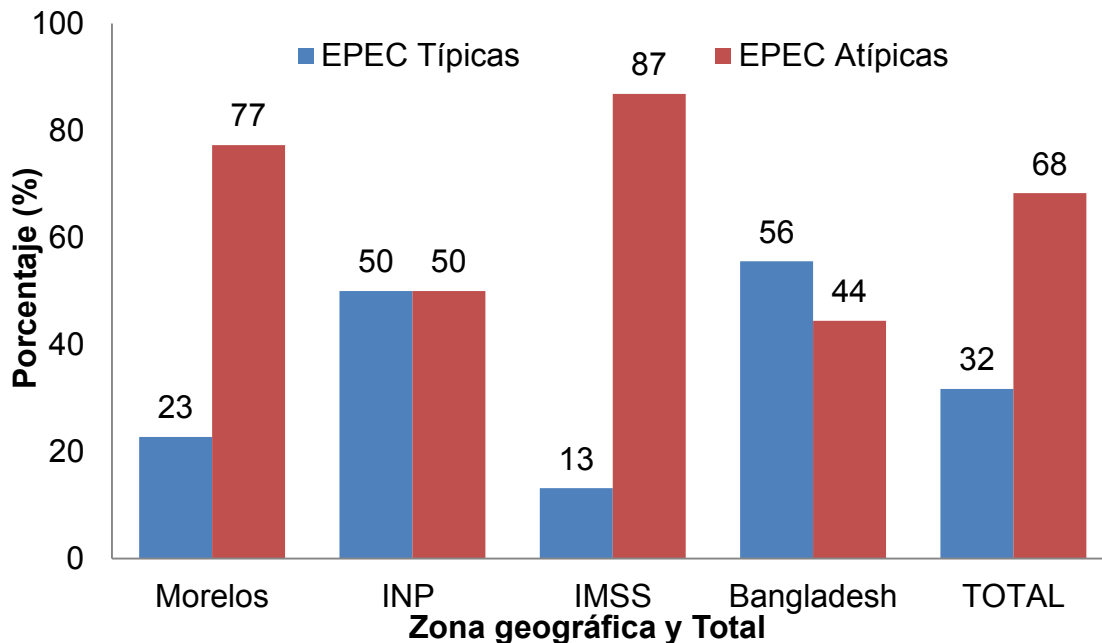
Figura 12. Electroferograma de los amplicones del gen *bfp* (326 pb). Carriles 1 – 5, 8 – 12 y 16 – 19, muestras negativas para el gen *bfp* y carriles 5, 13 y 15 muestras positivas para el gen *bfp*. Carril 7, control positivo cepa *E. coli* O127:H6 (E2348/69); carril 14, marcador de peso molecular (New England, BioLabs. Quick-Load, 100 pb); carril 20, control negativo.

El análisis de la distribución de las cepas de estudio de cada zona geográfica en los grupos tEPEC y aEPEC mostró los siguientes resultados: primero en las cepas de México y Bangladesh, 52 (32 %) fueron clasificadas como típicas y 112 (68 %) cepas fueron consideradas como atípicas, el análisis estadístico mostró diferencias significativas ($p < 0.05$).

El mismo análisis se realizó para cada una de las zonas geográficas, en el caso de México se encontró lo siguiente: con respecto a las 66 cepas pertenecientes al estado de Morelos, 15 (23 %) cepas fueron tEPEC, en tanto que 51 cepas (77 %) pertenecen al grupo aEPEC (Figura 13). En el grupo de 24 cepas aisladas en el INP, en cada uno de los subgrupos (tEPEC y aEPEC) presentaron 12 (50 %) cepas, sin diferencias significativas ($p > 0.05$).

La distribución de 38 cepas del IMSS fue: 5 cepas (13 %) del grupo tEPEC y por otro lado 33 cepas (87 %) correspondieron al grupo aEPEC, el análisis estadístico mostró diferencias significativa ($p < 0.05$). La última zona geográfica, Bangladesh, con 36 cepas, de las cuales 20 cepas (56 %) se clasificaron como tEPEC y 16 cepas (44 %) se denominaron aEPEC, sin diferencias significativas ($p > 0.05$).

Figura 13. Distribución de EPEC típicas y atípicas en las cepas de las diferentes regiones geográficas del estudio.



En las cepas de *E. coli* de Morelos, IMSS y el total de las cepas mostraron diferencias significativas ($p < 0.05$). En cepas del INP y Bangladesh no se encontraron diferencias significativas ($p > 0.05$).

En las cepas de estudio también se determinaron genes relacionados con factores de virulencia, en específico, genes que codifican para las SPATE's.



Figura 14. Electroferograma de los amplicones de los genes *espC* (301 pb) y *espP* (547 pb). Carriles 11 y 14 con muestras positivas para el gen *espC* y carril 19 con muestra positiva para gen *espP*. Carril 5, control positivo para el gen *espC* cepa *E. coli* O127:H6 (E2348/69); carril 10, control positivo para el gen *espP*, cepa *E. coli* O157:H7 (108287); carril 15, marcador de peso molecular (New England, BioLabs. Quick-Load, 100 pb); carril 20, control negativo.

Con respecto al subtipo **tEPEC** (*eae+/bfp+/eaf+*) y la presencia las serina-proteasas **espC** y **espP**, estas se encontraron en 18 (35 %) y 5 cepas (10 %) respectivamente. El mismo análisis se realizó con el subtipo **aEPEC** (*eae+*, *bfp-* y *eaf-*) en donde se encontró que **espC** y **espP** se hallaron en 8 (7 %) y 13 cepas (12 %) respectivamente. El análisis estadístico mostró en las cepas típicas de México y Bangladesh mayor prevalencia del gen *espC* ($p < 0.05$).

Sin embargo, entre ambos subtipos de EPEC, las proporciones del gen *espP* no fueron significativamente diferentes ($p > 0.05$). Por último, solo en una cepa (1 %) aEPEC, aislada en el IMSS, se presentaron los dos genes de las serina-proteasas analizadas. En la Figura 14 se muestran muestras positivas y negativas para los genes de las SPATE's.

3. Grupos filogenéticos.

Distribución de serotipos en los grupos filogenéticos de cepas de *E. coli* aislada en México. El análisis de resultados de grupos filogenéticos mostró que en las cepas de Morelos, IMSS e INP los grupos A y B1 fueron los más frecuentes con 84 (66 %) cepas y en B2 y D con 44 (34 %) cepas (Cuadro 6). En la Figura 15 se pueden apreciar los resultados de la PCR de los grupos filogenéticos.

En las cepas de Morelos, en el grupo A, los serotipos que se determinaron con más frecuencia fueron O18ac:H14, O127:H-, en dos cepas (3 %) cada uno; en el grupo B1 se colocaron los serotipos O111ab:H-, O128ac:H35, con 5 (8 %) y 3 (5 %) cepas, respectivamente, y con 2 (3 %) cepas cada uno de los serotipos O88:H25, O111ab:H y O128ab:H27. En B2 se ubicó el serotipo O145:H45 con 3 cepas (5 %) y en el grupo D los serotipos O86:H- y O145:H- con dos (3 %) y tres (5 %) cada uno (Cuadro 6). Con respecto a las cepas del IMSS, los serotipos más frecuentes fueron O114:H21 con dos cepas (5 %) en A, los serotipos O119:H6 y O55:H- con tres (8 %) cepas cada uno en los grupos B2 y D. Finalmente en las cepas de INP, los serotipos más frecuentes fueron O111ab:H- y O111ab:H2 del grupo B1 con 8 (33%) y 2 (8 %) cepas respectivamente y O119:H6 con dos (8 %) cepas en el grupo B2.

Cuadro 6. Grupos filogenéticos y serotipos en cepas de *E. coli* aislada en México.

Serotipo	N	Grupo	Serotipo	N	Grupo	Serotipo	N	Grupo
MORELOS			IMSS			INP		
O8:H9	1		O111ab:H12	1		O111ab:H2	1	
O18ab:H14	1		O8:H9	1		O19:H-	1	A
O18ac:H-	1		O26:H-	1		O111ac:H34	1	
O18ac:H14	2		O75:H-	1		O111ab:H-	8	
O80:H26	1		O86:H-	1		O111ab:H2	2	
O86:H-	1		O111ab:H-	1		OR:H2	1	B1
O88:H-	1		O114:H-	1		O26:H11	1	
O111ab:H12	1	A	O114:H21	2	A	O128ab:H8	1	
O126:H27	1		O119:H-	1		OR:H8	1	
O127:H-	2		O125ac:H-	1		O119:H6	2	B2
O127:H9	1		O127:H10	1		O55:H6	1	
OR:H4	1		O127:H40	1		OR:H-	1	
O?:H4	1		OR:H-	2		O2:H9	1	D
O?:H26	1		O?:H12	1		O8:H-	1	
OR:H33	1		OR:H26	1		O86:H-	1	
OR:H19	1		O26:H8	1				
O111ab:H-	5		O26:H11	1				
O111ab:H1	2		O27:H7	1	B1			
O78:H1	1		O86:H?	1				
O86:H51	1		OR:H12	2				
O88:H25	2		OR:H25	1				
O111ac:H-	1		O55:H51	1				
O119:H2	1		O119:H6	3				
O119:H27	1	B1	O8:H9	1	B2			
O126:H-	1		O125ac:H?/HR	2				
O126:H7	1		O126:H?/HR	1				
O128ab:H12	1		O148:H4	1				
O128ab:H27	2		O55:H-	3				
O128ab:H35	1		O73:H18	1	D			
O128ac:H51	1		O86:H30	1				
O128ac:H27	1							
O128ac:H35	3							
O119:H6	2							
O125ac:H-	1							
O145:H11	1	B2						
O145:H45	3							
O6:H12	1							
O111ab:H-	1							
O7:H6	1							
O55:H-	1							
O86:H-	3							
O86:H11	1							
O86:H21	1							
O86:H36	1	D						
O86:H47	1							
O126:H14	1							
O145:H-	2							
OR:H34	1							
OR:H-	1							

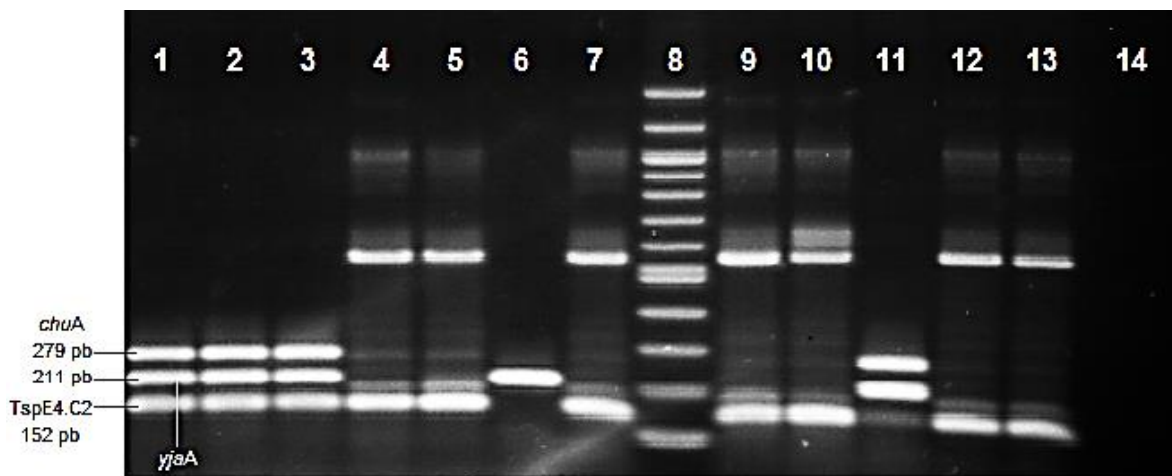


Figura 15. Electroferograma de los amplicones de los genes *chuA* (279 pb), *yjaA* (211 pb) y TspE4.C2 (152 pb) para determinar grupos filogenéticos de las muestras. Carril 1, control positivo *E. coli* O6:H1 (CFT 073); carril 8 con el marcador de peso molecular (New England, BioLabs. Quick-Load, 100 pb); carril 14, control negativo. Carriles 2 y 3, muestras positivas para los tres genes; carril 11, con muestra positiva para los genes *chuA* y *yjaA*; carril 6, muestra positiva para el gen *yjaA* y carriles 4, 5, 7, 9, 10, 12 y 13 con muestras positivas para el gen TspE4.C2.

Grupos filogenéticos y serotipos en las cepas de Bangladesh.

En este grupo de cepas, en los grupos A y B1 se ubicaron 19 (53 %) y en B2 17 (47 %) cepas (Cuadro 7).

Los serotipos que se determinaron con más frecuencia en el grupo B1 fueron O114:H2, con 6 (17 %) cepas, los serotipos O109:H21 y O115:H- en 2 (6 %) cepas cada uno, y en el grupo B2 se clasificaron los serotipos O127:H6 y O55:H- con 3 (8 %) y 2 (6 %) cepas. En la zona de Bangladesh no se encontraron cepas del grupo D.

Cuadro 7. Serotipos y Grupos filogenéticos en cepas de *E. coli* de Bangladesh.

Serotipo	N	Grupo
BANGLADESH		
O80:H-	1	
O154:H?	1	A
O?:H10	1	
O114:H2	6	
O126:H-	1	
O55:H21	1	
O109:H21	2	B1
O111ab:H-	1	
O115:H-	2	
O184:H7	1	
O?:H21	2	
O8:H34	1	
O12:H4	1	
O?:H1	1	
O55:H-	2	
O86:H34	1	
O119:H6	1	
O125ac:H11	1	B2
O125ac:H21	1	
O127:H?/HR	1	
O127:H6	3	
O11:H4	1	
O40:H34	1	
O76:H51	1	
O91:H-	1	
Total	36	

Grupos filogenéticos en cepas de *E. coli* y subtipos de tEPEC y aEPEC.

Con respecto a las cepas aisladas en México, dentro del subtipo tEPEC (32 cepas) se determinó una cepa (3 %) correspondiente al grupo A en cada uno de los lugares de aislamiento: Morelos, INP e IMSS. Dentro del grupo B1 se ubicaron 6 (19 %) y 10 cepas (31 %) de Morelos e INP respectivamente, en contraste, no se ubicó cepa en el grupo B1 procedente del área del IMSS.

Se asignaron como B2 a 7 (22 %), 4 (13 %) y 1 cepa (3 %) de las áreas de Morelos, IMSS e INP correspondientemente. Mientras tanto, solo una cepa (3 %)

del estado de Morelos se clasificó en el grupo D. En el mismo subtipo, tEPEC, para las cepas de Bangladesh (20 cepas) solo se obtuvieron resultados positivos para el grupo B2 y B1 con 13 (65 %) y 7 cepas (35 %) respectivamente (Cuadro 8).

Cuadro 8. Clasificación de cepas tEPEC y aEPEC en grupos filogenéticos.

Zona	Grupo Filogenético							
	EPEC típicas				EPEC atípicas			
	A	B1	B2	D	A	B1	B2	D
Morelos	1	6	7	1	17	19	2	13
INP	1	10	1	0	2	4	3	3
IMSS	1	0	4	0	16	7	5	5
Bangladesh	0	7	13	0	3	9	4	0
TOTAL N (%)	3 (6)	23 (44)	25 (48)	1 (2)	38 (34)	39 (35)	14 (12)	21 (19)

Por otro lado, para el subtipo aEPEC y con referencia a las cepas aisladas en México (96 cepas), 17 (18 %) y 16 cepas (17 %) correspondientes a Morelos e IMSS se ubicaron en el grupo A al igual que 2 cepas (2 %) del INP. En el grupo B1 se determinaron 19 (20 %), 7 (7 %) y 4 cepas (4 %) aisladas en Morelos, IMSS e INP.

Formando parte del grupo B2 se encontró a 5 (5 %), 3 (3 %) y 2 cepas (2 %) de las correspondientes áreas del IMSS, INP y Morelos. Las cepas del estado de Morelos tuvieron mayor presencia en el grupo D con 13 cepas (14 %) mientras que las cepas de las áreas IMSS e INP tuvieron 5 (5 %) y 3 cepas (3 %) dentro del mismo grupo.

Ahora con respecto a las cepas de la región de Bangladesh, subtipo aEPEC (16 cepas), la distribución de las mismas dentro de los grupos B1, B2 y A fue la siguiente: 9 (56 %), 4 (25 %) y 3 cepas (19 %) respectivamente, siendo que dentro del grupo D hubo ausencia de cepas pertenecientes a dicha región geográfica (Cuadro 8).

Considerando la prevalencia de los grupos considerados como comensales (A+B1) y patógenos (B2+D) se realizó un análisis estadístico para cada grupo de cepas de las diferentes zonas geográficas. Dicho análisis mostró lo siguiente, para las cepas tEPEC de México no se encontraron diferencias significativas ($p > 0.05$), en las muestras atípicas, se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) prevaleciendo las cepas comensales.

Con respecto a las cepas de Bangladesh, en las cepas típicas no se encontraron diferencias significativas; mientras que en las cepas atípicas se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) prevaleciendo las cepas comensales (Cuadro 9).

Cuadro 9. Comparación de los grupos filogenéticos de EPEC de acuerdo al subtipo de cepas y la zona geográfica de aislamiento.

Zona	EPEC Típicas		EPEC Atípicas	
	Grupos	N (%)	Grupos	N (%)
México	A+B1	19 (59)	A+B1	65 (68)
	B2+D	13 (41)	B2+D	31 (32)
Total	32 (100)		96 (100)	
Valor p	> 0.05		< 0.05	
Bangladesh	A+B1	7 (35)	A+B1	12 (75)
	B2+D	13 (65)	B2+D	4 (25)
Total	20 (100)		16 (100)	
Valor p	> 0.05		< 0.05	

4. Resistencia al 1% de desoxicolato de sodio (DOC).

Las cepas de *E. coli* O127:H6 (E2348/69) lisa y la cepa mutante de *S. Typhimurium* Rd fueron resistentes a 1% de DOC, mientras que las cepas de *E. coli* E2348/69 rugosa y la cepa mutante de *S. Typhimurium* Ra mostraron sensibilidad al mismo porcentaje de DOC, por lo que estas cuatro cepas fueron las seleccionadas para utilizarlas como controles de resistencia y sensibilidad en los ensayos con 1% de DOC empleando una dilución 10^4 UFC/mL. En la Figura 16 se muestra un ejemplo de placas utilizadas para el ensayo de DOC.

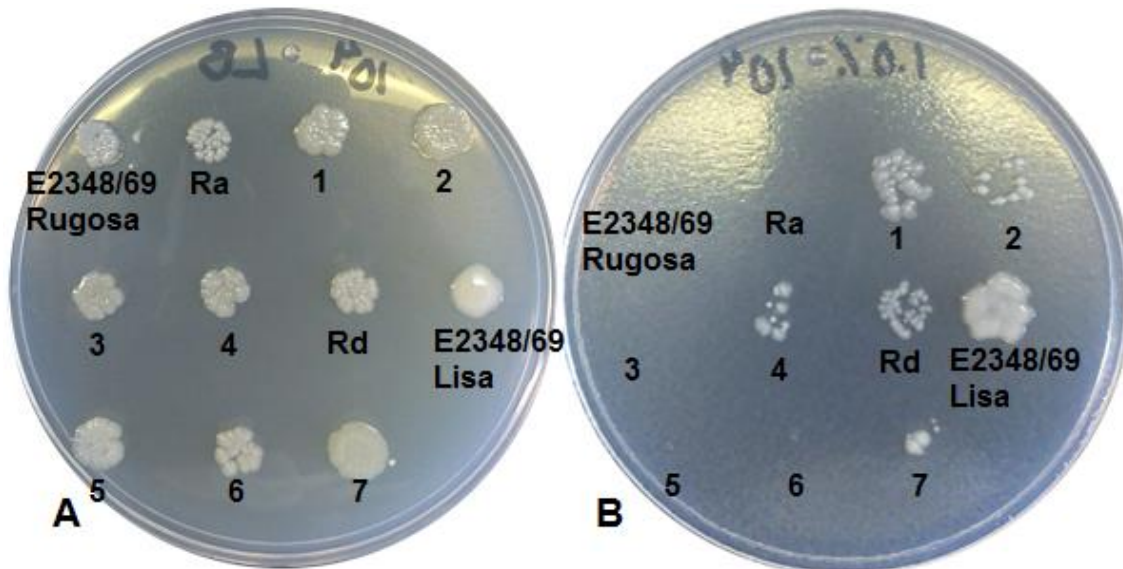


Figura 16. Resistencia y sensibilidad a 1 % de DOC. En A se muestra una placa de agar LB sin DOC, para control de crecimiento de las muestras, inoculada con 5 μ L de cada uno de los cultivos en una dilución 10^4 bacterias/mL. En B se presenta una placa de agar LB con 1% de DOC inoculada con las muestras en las mismas condiciones que en la placa sin DOC. Se observa como las cepas E2348/69 Rugosa, Ra, 3, 5 y 6 fueron sensibles a dicha concentración de DOC, por el contrario, las cepas Rd, E2348/69, 1, 2, 4 y 7 presentaron resistencia a DOC.

De manera general, en 52 (32 %) cepas del subtipo tEPEC la frecuencia de cepas sensibles fue de 22 (13 %) y de resistentes de 30 cepas (18 %), en cambio, la distribución de las 112 (68 %) cepas aEPEC como sensibles o resistentes al DOC fue de 65 (40 %) y 47 (29 %) cepas respectivamente (Cuadro 10).

El análisis estadístico de las proporciones de cepas sensibles comparadas con las cepas resistentes a DOC, dentro de cada subtipo EPEC, mostró que en el subtipo tEPEC las proporciones no presentaron diferencias significativas ($p > 0.05$) al contrario del subtipo aEPEC, en el cual la proporción de cepas sensibles a DOC fueron mayoría ($p < 0.05$).

Cuadro 10. Sensibilidad de las cepas de *E. coli* a DOC.

Subtipo de cepas	tEPEC			aEPEC		
	Sensibles	Resistentes	p	Sensibles	Resistentes	p
Lugar			N (%)			
Morelos	7	8		30	21	
INP	6	6		7	5	
IMSS	2	3		20	13	
Bangladesh	7	13		8	8	
Total	22 (13)	30 (18)	> 0.05	65 (40)	47 (29)	< 0.05

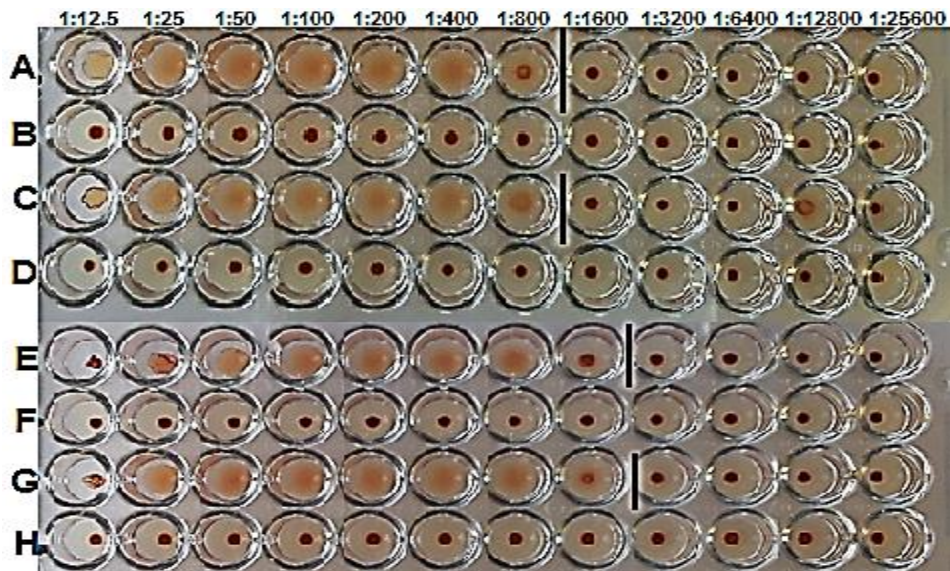
5. Relación entre resistencia DOC y el contenido del antígeno común de las enterobacterias (ECA) en cepas de *E. coli*.

En este ensayo primero se realizó una curva de titulación del ECA de cepas control *E. coli* O14:K7:NM y *S. Typhimurium*, el título obtenido fue el de 1:800 en ambos casos (Figura 17). Los títulos mencionadas significan que hasta estas diluciones el suero anti-ECA O14 tuvo la capacidad de hemaglutinar con el ECA.

Por lo tanto, se decidió que para el ensayo de inhibición de la hemaglutinación para determinar el contenido de ECA de las cepas de *E. coli* del estudio utilizar el suero anti-ECA O14 a una dilución 1:200 (Figura 18).

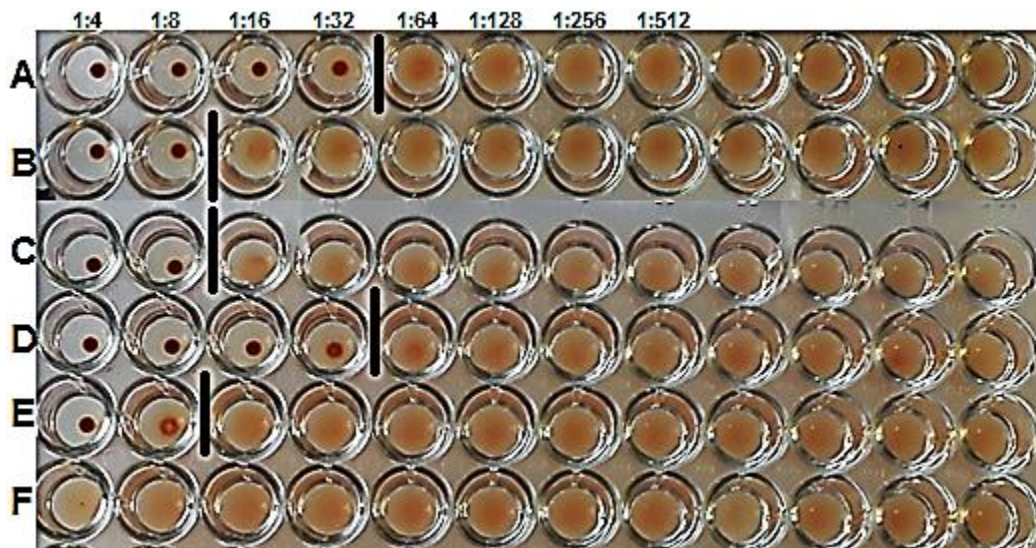
Considerando los resultados de resistencia al 1 % de DOC, se realizó un análisis de los títulos obtenidos del ECA en las muestras con respecto al subtipo tEPEC y aEPEC, y en cada subtipo con respecto a la sensibilidad o resistencia que mostraron.

Figura 17. Hemaglutinación de las cepas utilizadas como control.



Placa de 96 pozos en donde se muestran los títulos del suero anti-ECA O14 de cada uno de los controles. Las líneas negras marcan el pozo hasta el cual se presentó hemaglutinación. A: *E. coli* O14:K7:NM (1:800); C: *E. coli* O18ab (1:800); E: *S. Typhimurium* (ECA) (1:1600); G: *S. Typhimurium* LT2 (1:1600). B, D, F y H son los controles negativos para cada uno de los controles mencionados.

Figura 18. Inhibición de la hemaglutinación.



Placa en donde se observan los títulos del ECA de muestras. Las líneas negras marcan el último pozo en el que se presentó la reacción de inhibición. Filas A y D con muestras cuyo título fue 1:32; filas B, C y E con muestras cuyo título fue 1:8 y fila F es el control negativo.

El análisis de 52 cepas de tEPEC, 22 (42 %) fueron sensibles a DOC, los títulos con mayor número de cepas fueron 1:64 y 1:128 con 11 (21 %) y 9 cepas (17 %) respectivamente; sólo 2 muestras (4 %) del INP presentaron un título de 1:32, se encontró además una cepa (2 %) con el título 1:8 y otra con el título 1:256 (Cuadro 11).

Por lo que en este subtipo de EPEC, en las cepas sensibles a DOC, hubo mayor frecuencia de cepas con un título de 1:64 (21 %), y en el caso de las cepas resistentes a DOC prevaleció el título de 1:128 (42 %).

Cuadro 11. Títulos del ECA en las cepas sensibles o resistentes al 1% de DOC en el subtipo tEPEC.

	EPEC Típicas							
	Sensible			Resistente				
Lugar	1:32	1:64	1:128	1:8	1:64	1:128	1:256	1:512
Morelos	-	4	3	-	2	5	1	-
INP	2	3	1	1	-	5	-	-
IMSS	-	1	1	-	-	3	-	-
Bangladesh	-	3	4	-	1	9	2	1
TOTAL	2 (4)	11 (21)	9 (17)	1 (2)	3 (6)	22 (42)	3 (6)	1 (2)

Un análisis similar al anterior se realizó en las 112 cepas del subtipo aEPEC, en este grupo de cepas 33 (30 %) fueron las que tuvieron mayor frecuencia con un título de 1:64, precedido por las cepas con el título 1:128 con 24 (21 %) cepas. Por otro lado, en las cepas aEPEC resistentes, los títulos 1:64 y 1:128 tuvieron 28 (25 %) y 13 cepas (12 %) respectivamente (Cuadro 12).

Cuadro 12. Contenido del ECA y su relación con la sensibilidad o resistencia al 1% de DOC en las cepas aEPEC de diferentes zonas.

	EPEC atípicas						
	Sensible			Resistente			
Lugar	1:32	1:64	1:128	1:32	1:64	1:128	1:256
Morelos	4	11	13	3	14	4	-
INP	-	5	2	-	5	-	-
IMSS	-	13	7	-	6	5	1
Bangladesh	-	4	2	-	3	4	1
TOTAL	4 (4)	33 (30)	24 (21)	3 (3)	28 (25)	13 (12)	2 (2)

Con los títulos 1:16 y 1:256 se encontró una cepa (1 %) sensible y con el título 1:8 se encontró una cepa (1 %) resistente. Con el título 1:256 se registró una cepa (1 %) sensible y una cepa (1 %) resistente con el título 1:512.

Para realizar la comparación entre las cepas sensibles y resistentes a DOC con el contenido de ECA se tomaron en cuenta el total de cepas de cada subtipo, de ambas regiones. Además, solo se compararon las proporciones de los títulos 1:64 y 1:128 en ambos subtipos ya que estos fueron los que mostraron mayor prevalencia entre las cepas de estudio.

El análisis estadístico de proporciones de cepas sensibles o resistentes a 1 % de DOC con títulos 1:64 y 1:128 en el subtipo tEPEC, mostró que en las cepas sensibles prevalece de mayor manera el título 1:64 mientras que en las cepas resistentes el título con la mayor proporción es el 1:128 ($p < 0.05$).

En contraste, en las cepas aEPEC sensibles o resistentes a 1 % de DOC con títulos 1:64 y 1:128, se determinó que en las muestras sensibles predomina el título 1:128 ($p < 0.05$) y con respecto al título 1:64 no se encontró diferencia significativa entre cepas sensibles o resistentes ($p > 0.05$).

IX. DISCUSIÓN.

Aunque se han hecho esfuerzos para disminuir la incidencia de las infecciones intestinales, las diarreas en la población menor a cinco años continua siendo un problema importante de salud pública, anualmente en México se presentan alrededor de 1,343,681 casos (57).

Al respecto de los agentes etiológicos, las enterobacterias, en particular el subtipo aEPEC, recientemente ha emergido como un patógeno importante a nivel mundial en la población infantil (26) (35) (58). En este estudio se abordó la caracterización fenotípica y genotípica de cepas de *E. coli* aislada en niños menores de cinco años de diferentes zonas geográficas y de diferentes años para establecer primero sí dichas cepas eran EPEC y su clasificación en subtipos típicas y atípicas, conociendo además, su identidad antigénica mediante métodos serológicos.

Desde los inicios en que se relacionó a *E. coli* con las enfermedades diarreicas, la tipificación serológica ha jugado un papel muy importante dentro del diagnóstico clínico relacionando serogrupos y serotipos característicos a grupos patógenos específicos de esta bacteria.

Como parte de la identificación y caracterización de las cepas en estudio, se utilizó la serología logrando encontrar serogrupos y serotipos característicos de EPEC. Para ambas zonas geográficas (México y Bangladesh) se encontraron muestras de los serogrupos clásicos definidos por la OMS (59) (O26, O55, O86, O111, O114, O119, O125, O126, O127, O128, O142 y O158) pertenecientes a EPEC.

En México, el serogrupo encontrado con más frecuencia fue O111ab en 22/128 cepas (17 %), seguido por el serogrupo O86 en 13/128 cepas (10 %) y el serogrupo O119 en 10/128 cepas (8 %). Los serogrupos anteriores también fueron identificados en un estudio prospectivo de una cohorte de niños mexicanos rurales realizado por Cravioto y col. (60). En dicho estudio se encontraron los serogrupos O26, O55, O86, O111, O114, O119 y O128 durante los dos primeros años de vida de los niños en estudio, confirmando los anteriores serogrupos como parte de cepas EPEC.

De manera similar, en Bangladesh, se hallaron serogrupos pertenecientes a cepas EPEC pero los más encontrados en 6/36 cepas (17 %) y 4/36 cepas (11 %) fueron el O114 y el O127 respectivamente. Cabe hacer notar que ambos serogrupos también se detectaron de manera prevalente en un estudio realizado por Ansaruzzaman (61) en el cual las muestras fueron tomadas de estudios epidemiológicos que encontraron a EPEC como principal agente causal de diarrea en infantes.

En este estudio se encontraron serotipos que previamente se han reportado como cepas típicas o atípicas de EPEC (Cuadro 1), en México, con respecto a los serotipos, se ubicó al O111ab:H- como el más frecuente en 15/128 cepas (12 %), mismo que no se encuentra descrito en la referencia mencionada, sin embargo, los serotipos O55:H6, O111ab:H2 y O119:H6, también de México, están descritos como parte de las cepas tEPEC al contrario de los serotipos O26:H11 y O119:H2, encontrados en esta región, como parte de las aEPEC. Se encontraron de igual manera serotipos no clásicos dentro de EPEC en las cepas de estudio pero que se ha demostrado su pertenencia a dicho grupo, tal es el caso del serotipo O88:H25 (62).

Con respecto a Bangladesh el serotipo O114:H2 se halló en 6/36 cepas (17 %) mismas que, con base en el serotipo, se pueden inferir como parte de cepas tEPEC al igual que los serotipos O86:H34, O114:H2, O119:H6 y O127:H6 también encontrados entre las cepas de dicha zona.

Para ambas regiones geográficas se encontraron serogrupos que no pertenecen a los clásicos de EPEC, por un lado en México, fueron los serogrupos O2, O6, O7, O8, O18ab, O18ac, O19, O27, O73, O75, O78, O80, O145 y el O148. Por otra parte, en Bangladesh, los serogrupos no clásicos de EPEC fueron O8, O11, O12, O40, O76, O80, O91, O109, O115, O154 y el O184.

El hecho de que los serogrupos antes mencionados no estén dentro de los clásicos descritos para EPEC, significa la amplia distribución de los genes de EPEC debida a la transferencia horizontal del material genético bacteriano (10), de

la misma manera, se ha encontrado que los serogrupos y serotipos que se encuentran dentro de los típicos de EPEC no garantizan que tales muestras sean estrictamente EPEC, por lo que se tiene que confirmar por la presencia de los genes que definen a este grupo patógeno.

Un ejemplo de lo antes mencionado es el estudio realizado por Campos y col. (63), que en 2004 analizaron cepas pertenecientes a los serogrupos tradicionales de EPEC encontrando, en efecto, que la mayoría de las muestras correspondían a EPEC pero que también había cierta proporción de cepas EAEC, ETEC y EHEC.

Como paso siguiente, en este estudio se demostró que los 164 cultivos de ambas zonas pertenecen al grupo patógeno EPEC y a su vez se clasificaron en cepas típicas y atípicas de este grupo. Nos basamos en la presencia de los genes *eae+/eaf+/bfp+* para denominar a las cepas como tEPEC asignando dentro de este subtipo a 32/128 cepas (25 %) en la zona de México, por el contrario, para denominar como aEPEC a 96/128 cepas (75 %) de la misma zona, nos basamos en la presencia/ausencia de los genes mencionados *eae+/eaf-/bfp-*, por lo que los datos anteriores conducen a la conclusión de la prevalencia de cepas atípicas de EPEC sobre las típicas.

Siguiendo el mismo perfil de genes, en Bangladesh, se denominaron como tEPEC a 20/36 cepas (56 %) y a 16/36 cepas (44 %) se les agrupo como aEPEC sin presentar diferencias significativas entre ambos subtipos ($p > 0.05$). Estos resultados concuerdan en la prevalencia del subtipo tEPEC con los resultados publicados en 2004 por Campos en Brasil (63).

La importancia de los genes determinados deriva en que son parte importante de la fisiopatología tan característica de EPEC, en específico *eaf* y *bfp* participan en la adherencia localizada del microorganismo mientras que *eae* codifica para la proteína íntima que participa en la adherencia íntima del microorganismo al enterocito.

De manera global en México se encontró una prevalencia de los grupos aEPEC en comparación con el subtipo tEPEC ($p < 0.05$). Sin embargo, analizando cada una

de las tres áreas de las cuales se aislaron las cepas de México, se encontró que en las muestras del INP no hubo evidencia significativa para determinar la prevalencia de uno de los subtipos mencionados ($p > 0.05$).

Conforme ha avanzado el tiempo, las investigaciones han mostrado a aEPEC como patógeno emergente ya no solo en países desarrollados como Inglaterra y Australia (64) (65) sino de manera global incluyendo países en vías de desarrollo como Brasil y México (26) (58) (66).

Con este estudio se demuestra de igual manera la actual tendencia en aumento de las cepas aEPEC asociados a casos de diarrea, estos resultados coinciden con los obtenidos en el estudio realizado por Estrada-García y col. (66), en una zona urbana de la Ciudad de México determinando una alta prevalencia del mencionado subtipo en esa área además de relacionarlo con la enfermedad diarreica aguda. También relacionaron los episodios diarreicos debido a aEPEC con la etapa del año, siendo que en la etapa lluviosa (Mayo-Junio), se encontraron con mayor frecuencia estas cepas.

Con ayuda de los resultados de la identificación de genes por la PCR se demostró, de una manera complementaria a los resultados de la identificación serológica, la pertenencia de las cepas de estudio al grupo patógeno EPEC y a su vez a uno de sus dos subtipos.

Otro aspecto importante dentro de la clasificación de microorganismos patógenos es la agrupación en grupos filogenéticos mediante el cual se puede obtener información acerca de la procedencia de las cepas así como información del tipo de cepas a las que pertenecen, comensales o patógenas.

En primera instancia, se buscó clasificar las cepas de estudio dentro de los cuatro principales grupos filogenéticos descritos para *E. coli* y los relacionamos con los serotipos encontrados observando una amplia variedad en la distribución de los mismos dentro de los grupos filogenéticos determinando que en la zona de México los serotipos no clásicos de EPEC predominaron en mayor medida dentro de los

grupos filogenéticos en contraste con los serotipos típicos encontrados en Bangladesh.

En la literatura y en diferentes investigaciones se hace referencia a que las cepas comensales de *E. coli* presentan menos factores de virulencia y pertenecen en mayor medida a los grupos A y B1, en contraste, las cepas mayormente patógenas, o con mayor número de factores de virulencia, se encuentran principalmente en los grupos B2 y D (17) (42) (43) (45).

Por esta razón, en el presente estudio se determinó la proporción de cada subtipo EPEC dentro de los grupos filogenéticos y se compararon las sumas de las proporciones de las cepas de cada subtipo dentro de los grupos A+B1 y B2+D para establecer si existe mayor número de cepas dentro de grupos comensales o patógenos.

De esta manera, en México y Bangladesh, se obtuvo suficiente evidencia estadística para establecer que en las cepas atípicas los grupos A+B1 son los predominantes en comparación con el subtipo de cepas típicas ($p < 0.05$), por el contrario, las proporciones de los grupos B2+D no son significativamente diferentes entre ambos subtipos de cepas ($p > 0.05$).

Con base en los resultados mencionados, pudimos determinar que en las cepas atípicas de México y Bangladesh prevalecen principalmente los grupos A+B1 indicando un mayor número de cepas comensales.

Se ha mencionado con anterioridad la amplia distribución que tienen los grupos filogenéticos entre cepas originarias de diferentes hospederos. Aquí se muestra que hay una tendencia de grupos filogenéticos A y B1 en las muestras que son de origen humano, estos grupos también se observaron en mayor medida en el estudio de Escobar-Páramo y col. (44) en las cepas de origen humano.

Los factores de virulencia juegan un papel importante en la patogénesis de los microorganismos. Con respecto a estos, en EPEC, se han determinado genes que codifican para la secreción de SPATE's (Serina Proteasas Autotransportadas por

las Enterobacterias; SPATE por sus siglas en inglés) tales como EspC y EspP. En el caso de EPEC, EspC, es muy frecuente al contrario de EspP, que esta mayormente relacionada con cepas de STEC (32). Sin embargo, la presencia de EspP se ha relacionado en diferentes investigaciones con cepas atípicas de EPEC (33) (34).

En consecuencia, nos propusimos determinar ambos factores de virulencia para observar si hay mayor prevalencia de estos en uno de los dos subtipos así como encontrar si en las cepas atípicas se encuentra en mayor frecuencia EspP como en investigaciones previas.

Tomando en cuenta el total de cepas del estudio, 119/164 cepas (73 %) no presentaron los genes de las SPATE's. Con respecto a los subtipos, en ambas zonas geográficas, determinamos que en las tEPEC predominan en mayor proporción las cepas con el gen *espC*. Para las muestras de México, se encontró que las proporciones del gen *espP* no son significativamente diferentes entre los subtipos y en las cepas de Bangladesh solo se halló dicho gen en las cepas atípicas. Por último, en una cepa de México se encontraron ambos genes, dicha cepa corresponde al serotipo O55:H- dentro de las cepas atípicas.

Determinar la presencia de *espC* y *espP* en las cepas de estudio nos ayuda a conocer si estas cepas podrían ser más virulentas y provocar cuadros clínicos más severos ya que se les han asociado diversos efectos patológicos. Por ejemplo, la proteína EspC se ha asociado a daño en células *in vitro*, juega un papel como enterotoxina además de tener capacidad proteolítica en pepsina, factor V de coagulación y la espectrina, sumado a su capacidad de degradar la hemoglobina para la utilización del hierro en el crecimiento bacteriano (67).

Con respecto a la proteína EspP, también se ha asociado un papel proteolítico sobre el factor V de coagulación humano además de dañar proteínas que causan la inactivación del complemento propiciando de mejor manera la colonización del hospedero (68).

Los mecanismos por los cuales las bacterias resisten o se adaptan a condiciones que el hospedero desarrolla en contra de ellos siguen hasta ahora sin ser esclarecidos completamente. La presencia o ausencia del ECA (Antígeno Común de las Enterobacterias) en cepas de *S. enterica* demostró tener efectos en la resistencia o sensibilidad al 1 % de DOC (48). De acuerdo con lo anterior, decidimos mostrar si la resistencia o sensibilidad al 1% de DOC se relaciona o no con el contenido del ECA que algunas cepas expresan.

Se observó que en las cepas atípicas prevalecen principalmente las cepas sensibles al 1 % de DOC mientras que en las cepas típicas las proporciones de sensibles o resistentes no son estadísticamente diferentes.

Con respecto al contenido del ECA y el total de las cepas, los títulos 1:64 y 1:128 fueron los más comunes en 94/164 (57 %) y 49/164 cepas (30 %). Se realizó un análisis estadístico para comparar las proporciones de estos principales títulos entre las cepas sensibles y resistentes dentro de los subtipos de EPEC para ambas zonas geográficas.

Con dicho análisis logramos determinar que hubo diferencia significativa entre las proporciones de los títulos en las cepas típicas sensibles donde predominó el título 1:64 y en las cepas resistentes fue 1:128. Por otro lado en el subtipo aEPEC, sólo en las muestras sensibles a 1 % de DOC predominó el título 1:128.

Con todo lo anterior mostramos la prevalencia de cepas aEPEC sensibles con título de 1:128, este título es alto e indica la presencia del ECA en las cepas y de esta manera los resultados son contrarios a los encontrados por Ramos-Morales (48) en el cual las muestras con presencia de ECA eran resistentes a DOC y no sensibles como en este estudio.

Además, los resultados del contenido del ECA obtenidos en este estudio se compararon con los obtenidos por Hashimoto y col. (69), en donde se determinó el contenido del ECA en cepas de *E. coli* aisladas de niños recién nacidos prematuros antes, durante y posterior al cuadro diarreico. En dicho estudio los

resultados mostraron que el contenido del ECA era mayor (títulos altos) durante las fases pre y post-diarrea, y menores (títulos bajos) durante el episodio diarreico.

Posteriormente, Hojyo y col. (55) establecieron los títulos 1:128 y 1:256 como títulos altos mientras que al título 1:8 como título bajo. En el presente estudio, se obtuvieron resultados contrarios a los obtenidos por los anteriores investigadores ya que en este trabajo se estudiaron cepas provenientes de episodios diarreicos y la mayoría (87 %) presento títulos de 1:64 y 1:128 además de que hubo casos en los que se presentaron cepas con títulos de 1:512.

Con base en estos resultados, proponemos hacer un estudio de seguimiento de los aislamientos, abordando los periodos pre-diarrea, diarrea y convalecencia para poder demostrar el fenómeno que proponen estudios previos que durante los episodios de diarrea el contenido de ECA es menor que en el periodo de convalecencia.

Así mismo se sugiere un comportamiento distinto en las cepas aisladas en ambas zonas geográficas ya que en investigaciones previas, las cepas, no presentaron títulos altos cuando provenían del estado convaleciente del cuadro clínico.

X. CONCLUSIONES.

Este trabajo logró caracterizar fenotípica y genotípicamente cepas aisladas de episodios diarreicos en niños menores de 5 años de dos regiones geográficas distintas, logrando así, clasificar dichas cepas dentro del grupo patógeno EPEC.

Por medio de la caracterización fenotípica se logró obtener una representación acerca de la distribución serológica que tienen las cepas EPEC, incluyendo a los serotipos clásicos del mismo y encontrando que gran parte de estas muestras pertenecen también a una gran diversidad de serogrupos y serotipos no clásicos.

Además, con la identificación de genes por la PCR, se clasificaron las cepas como típicas o atípicas, se mostró que las últimas tuvieron mayor prevalencia en las cepas de México confirmando que este subtipo de EPEC cada vez tiene mayor presencia en casos de enfermedades diarreicas en infantes al igual que en diversas partes del mundo.

Las muestras también se agruparon dentro de los principales grupos filogenéticos de *E. coli* logrando establecer que en las cepas atípicas prevalecen más las de tipo comensal. Adicionalmente se determinaron los factores de virulencia de las SPATE's (Serina Proteasas Autotransportadas por las Enterobacterias; SPATE por sus siglas en inglés) en donde se observó, como en otras investigaciones, que en las cepas atípicas se encuentra presente el gen *espP* lo que suma evidencia de la relación estrecha entre las cepas aEPEC y las cepas del grupo patógeno STEC.

Se encontró evidencia de un comportamiento distinto por parte de las muestras en comparación con investigaciones anteriores relacionada con el contenido del ECA y la etapa del cuadro infeccioso del que fueron aisladas.

Este estudio aporta evidencia que ayuda a conocer, de manera más detallada, a uno de los principales agentes etiológicos de la diarrea en la población infantil. Proporciona también, resultados que muestran la distribución antigénica y genética de las cepas que puede ayudar en estudios epidemiológicos posteriores.

XI. PERSPECTIVAS.

- Establecer la adherencia que presentan las cepas tEPEC y aEPEC en cultivos celulares (HEp-2) y compararlos con los encontrados en investigaciones previas.
- Confirmar la agrupación de los grupos filogenéticos mediante la nueva PCR múltiple reportada por Clermont y col. (70).
- Conocer sí en modelo animal la inmunización con cepas de *E. coli* con un contenido alto de ECA o el ECA purificado puede ser un factor que confiera protección contra el reto de cepas de *E. coli* con factores de virulencia conocidos.
- Profundizar en el ensayo de la cuantificación del contenido de ECA de las cepas de *E. coli* con respecto a la etapa del cuadro clínico para corroborar lo que reportaron previamente diferentes autores, de que un menor contenido de ECA está asociado a la etapa de cuadro de diarrea además de buscar la posibilidad de aislar cepas de cuadros clínicos recientes.

XII. BIBLIOGRAFÍA.

1. Bryce J, Boschi-Pinto C, Shibuya K, Black RE, WHO Child Health Epidemiology Reference Group. WHO estimates of the causes of death in children. *Lancet*. 2005; 365: p. 1147-1152.
2. Organización Mundial de la Salud. [Nota descriptiva 330]; 2014 [citado 2014 Noviembre 28]. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs330/es/>.
3. Kotloff KL, Blackwelder WC, Nasrin D, Nataro JP, Farag TH, van Eijk A, et al. The Global Enteric Multicenter Study (GEMS) of Diarrheal Disease in Infants and Young Children in Developing Countries: Epidemiologic and Clinical Methods of the Case/Control Study. *Clin Infect Dis*. 2012; 55(S4): p. S232-245.
4. Ahs JW, Tao W, Löfgren J, Forsbeg BC. Diarrheal Diseases in Low- and Middle-Income Countries: Incidence, Prevention and Management. *The Open Infect Dis J*. 2010; 4: p. 113-124.
5. Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica. DGdE. Perfil Epidemiológico de las Enfermedades Infecciosas Intestinales. Monografía. Ciudad de México. Secretaría de Salud, Subsecretaría de Prevención y Promoción de la Salud; 2012.
6. Hernández Cortés C, Aguilera Arreola G, Castro Escarpulli G. Situación de las enfermedades gastrointestinales en México. *Enf Inf Microbiol*. 2011; 31(4): p. 137-151.
7. Cordier JL. *Enterobacteriaceae*. En Motarjemi Y, Adams M, editores. *Emerging foodborne pathogens*. Florida: Woodhead Publishing Limiting y CRC Press LLC; 2006. p. 450-475.
8. Baylis CL. *Enterobacteriaceae*. En Blackbourn CdW, editor. *Food Spoilage Microorganisms*. Boca Raton: Woodhead Publishing Ltd y CRC Press LLC; 2006. p. 624-667.
9. Percival SL, Williams DW. *Escherichia coli*. En Percival L, Yates MV, Williams DW, Chalmers RM, Gray NF. *Microbiology of Waterborne Diseases*.: Elsevier; 2013. p. 89-117.
10. Torres AG, Arenas-Hernández MMP, Martínez-Laguna Y. Overview of *Escherichia coli*. En Torres AG, editor. *Pathogenic Escherichia coli in Latin America*.: Bentham Science Publishers; 2010. p. 1-7.
11. Velarde J, Levine MM, Nataro JP. *Escherichia coli Diarrhea*. En Magill AJ, Ryan ET, Hill DR, Solomon T. *Hunter's Tropical Medicine and Emerging Infectious Diseases*.: Saunders. Elsevier; 2013. p. 442-447.
12. Kaper JB, Nataro JP, Mobley HLT. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol*. 2004 Febrero; 2(2): p. 123-140.
13. Estrada-Garcia T, Hodges K, Hecht GA, Tarr PI. *Escherichia coli*. En Morris JG, Potter ME, editores. *Foodborne Infections and Intoxications*.: Elsevier; 2013. p. 129-164.
14. Clements A, Young JC, Constantinou N, Frankel G. Infection strategies of enteric pathogenic *Escherichia coli*. *Gut Microbes*. 2012 Marzo; 3(2): p. 71-87.
15. Darfeuille-Michaud A. Adherent-invasive *Escherichia coli*: a putative new *E. coli* pathotype associated with Crohn's disease. *Int J Med Microbiol*. 2002; 292: p. 185-193.

16. Croxen MA, Law RJ, Scholz R, Keeney KM, Wlodarska M, Finlay BB. Recent Advances in Understanding Enteric Pathogenic *Escherichia coli*. Clin Microbiol Rev. 2013; 26(4): p. 822-880.
17. Chaudhuri RR, Henderson IR. The evolution of the *Escherichia coli* phylogeny. Infect Genet Evol. 2012 Enero; 12(2): p. 214-226.
18. Vanaja SK, Jandhyala DM, Mallick EM, Leong JM, Balasubramanian S. Enterohemorrhagic and other Shigatoxin-producing *Escherichia coli*. En Sonnenberg MS, editor. *Escherichia coli*. Pathotypes and Principles of Pathogenesis.: Elsevier; 2013. p. 121-182.
19. Guth BEC, Prado V, Rivas M. Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli*. En Torres AG, editor. Pathogenic *Escherichia coli* in Latin America.: Bentham Science Publishers Ltd; 2010. p. 65-83.
20. O'Ryan ML, Nataro JP, Cleary TG. Microorganisms responsible for neonatal diarrhea. En Remington JS, Klein JO, Wilson CB, Nizet V, Maldonado YA, editores. Infectious Diseases of the Fetus and Newborn Infant.: Elsevier; 2011. p. 359-418.
21. Bray J. Isolation of antigenically homogenous strains of *Bact. coli neopolitanum* from summer diarrhea of infants. J Pathol Bacteriol. 1945; 57(2): p. 239-247.
22. Varela G, Aguirre A, Carrillo J. *Escherichia coli-gomez*, nueva especie aislada de un caso mortal de diarrea. Bol Med Hosp Infant Mex. 1946 Noviembre; 3(5): p. 623-627.
23. Olarte J, Varela G. A complete somatic antigen common to *Salmonella adelaide*, *Escherichia coli-gomez*, and *Escherichia coli* 0111:B4. J Lab Clin Med. 1952 Agosto; 40(2): p. 252-254.
24. Chen HD, Frankel G. Enteropathogenic *Escherichia coli*: unravelling pathogenesis. FEMS Microbiol Rev. 2005 Enero; 29(1): p. 83-98.
25. Neter E, Westphal O, Luderitz O, Needel MH. Demonstration of antibodies against enteropathogenic *Escherichia coli* in sera of children of various ages. Pediatrics. 1955; 16: p. 801-808.
26. Trabulsi LR, Keller R, Tardelli Gomes TT. Typical and Atypical Enteropathogenic *Escherichia coli*. Emerg Infect Dis. 2002 Mayo; 8(5): p. 508-513.
27. Clarke SC, Haigh RD, Freestone PPE, Williams PH. Virulence of Enteropathogenic *Escherichia coli*, a Global Pathogen. Clin Microbiol Rev. 2003 Julio; 16(3): p. 365-378.
28. Nisa S, Scanlon KM, Sonnenberg MS. Enteropathogenic *Escherichia coli*. En Sonnenberg MS, editor. *Escherichia coli*. Pathotypes and Principles of pathogenesis.: Elsevier; 2013. p. 75-119.
29. Gomes AT, González-Pedrajo B. Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC). En Torres AG, editor. Pathogenic *Escherichia coli* in Latin America.: Bentham Science Publishers Ltd.; 2010. p. 25-47.
30. Coburn B, Sekirov I, Finlay BB. Type III Secretion Systems and Disease. Clin Microbiol Rev. 2007 Octubre; 20(4): p. 535-549.
31. Goosney DL, Gruenheid S, Finlay BB. Gut feelings: Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) Interactions with the Host. Annu Rev Cell Dev Biol. 2000; 16: p. 173-189.

32. Dautin N. Serine Protease Autotransporters of Enterobacteriaceae (SPATEs): Biogenesis and Function. *Toxins*. 2010 Junio; 2(6): p. 1179-1206.
33. Abreu AG, Bueris V, Porangaba TM, Sircili MP, Navarro-García F, Elias WP. Autotransporter Protein-Encoding Genes of Diarrheagenic *Escherichia coli* Are Found in both Typical and Atypical Enteropathogenic *E. coli* Strains. *Appl Environ Microbiol* 2013; 79(1): p. 411-414.
34. Cookson AL, Bennet J, Nicol C, Thomson-Carter F, Atwood GT. Molecular Subtyping and Distribution of the Serine Protease from Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* among Atypical Enteropathogenic *E. coli* Strains. *Appl Environ Microbiol*. 2009 Abril; 75(7): p. 2246-2249.
35. Hernandez RT, Elias WP, Vieira MAM, Gomes TAT. An overview of atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett*. 2009 Agosto; 297(2): p. 137-149.
36. Ewing WH. Edwards and Ewing's Identification of *Enterobacteriaceae*. 4th ed. New York: Elsevier Science Publishing Co. Inc.; 1986.
37. Luderitz O, Staub AM, Westphal O. Immunochemistry of O and R Antigens of *Salmonella* and Related *Enterobacteriaceae*. *Bacteriol Rev*. 1966; 30(1): p. 192-255.
38. Milkman R. Electrophoretic variation in *Escherichia coli* from natural sources. *Science*. 1973; 182: p. 1024-1026.
39. Ochman H, Selander RK. Standard Reference Strains of *Escherichia coli* from Natural Populations. *J Bacteriol*. 1984; 157(2): p. 690-693.
40. Selander RK, Caugant DA, Whittam TS. Genetic Structure and Variation in Natural Populations of *Escherichia coli*. En Ingraham JL, Magasanik B, Low KB, Schaechter M, Umberger HE, editores. *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. Cellular and molecular biology. Washington, D.C.: American Society for Microbiology; 1987. p. 1625-1648.
41. Herzer PJ, Inouye S, Inouye M, Whittam TS. Phylogenetic Distribution of Branched RNA-Linked Multicopy Single-Stranded DNA Among Natural Isolates of *Escherichia coli*. *J Bacteriol*. 1990; 172(11): p. 6175-6181.
42. Clermont O, Bonacorsi S, Bingen E. Rapid and Simple Determination of the *Escherichia coli* Phylogenetic Group. *Appl Environ Microbiol*. 2000 Octubre; 66(10): p. 4555-4558.
43. Picard B, Garcia JS, Gouriou S, Duriez P, Brahimi N, Bingen E, et al. The Link between Phylogeny and Virulence in *Escherichia coli* Extraintestinal Infection. *Infect Immun*. 1999 Febrero; 67(2): p. 546-553.
44. Escobar-Páramo P, Le Menac'h A, Le Gall T, Amorin C, Gouriou S, Picard B, et al. Identification of forces shaping the commensal *Escherichia coli* genetic structure by comparing animal and human isolates. *Environ Microbiol*. 2006; 8(11): p. 1975-1984.
45. Carlos C, Pires MM, Stoppe NC, Hachich EM, Sato MI, Gomes TA, et al. *Escherichia coli* phylogenetic group determination and its application in the identification of the major animal source of fecal contamination. *BMC Microbiol*. 2010; 10(161): p. 1-10.

46. Makela PH, Mayer H. Enterobacterial Common Antigen. *Bacteriol Rev.* 1976 Septiembre; 40(3): p. 591-632.
47. Rick PD, Silver RP. Enterobacterial Common Antigen and Capsular Polysaccharides. En Ingraham JL, Low KB, Magasanik B, Schaechter M, Umberger HE, editores. *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* : Cellular and molecular biology. Washington: American Society of Microbiology; c1987. p. 104-122.
48. Ramos-Morales F, Prieto AI, Beuzón CR, Holden DW, Casadesús J. Role for *Salmonella enterica* Enterobacterial Common Antigen in Bile Resistance and Virulence. *J Bacteriol.* 2003 Septiembre; 185(17): p. 5328-5332.
49. Barrow GI, Feltham RKA. *Cowan and Steel's Manual for the Identification of Medical Bacteria* Cambridge: University Press; 1993.
50. Orskov F, Orskov I. Serotyping of *Escherichia coli*. *Methods Microbiol.* 1984; 14: p. 43-112.
51. Islam MA, Heuvelink AE, Talukder KA, Zwietering MH, De Bor E. Evaluation of Immunomagnetic Separation and PCR for the Detection of *Escherichia coli* O157 in Animal Feces and Meats. *J Food Protect.* 2006; 69: p. 2865-2869.
52. Schmidt H, Plaschke B, Franke S, Russmann H, Schwarzkopf A, Heesemann J, et al. Differentiation in virulence patterns of *Escherichia coli* possessing *eae* genes. *Med Microbiol Immunol.* 1994 Febrero; 183(1): p. 23-31.
53. Gunzburg ST, Tornieporth NG, Riley LW. Identification of enteropathogenic *Escherichia coli* by PCR-based detection of the bundle-forming pilus gene. *J Clin Microbiol.* 1995 Mayo; 33(5): p. 1375-1377.
54. 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 PCR for rapid detection of EPEC harboring virulence plasmids. *J Clin Microbiol.* 1994 Octubre; 32(10): p. 2460-2463.
55. Hojyo K, Miranda Flores L, Kumate J, Carrillo J. Efectos enteropatogénicos de *Escherichia coli* en asas ileales de conejo y su relación con el contenido en antígeno heterogénico. *Bol Med Hosp Infant Mex.* 1969; 26(1): p. 15-20.
56. Suzuki T, Gorzynski EA, Neter E. Separation by ethanol of common and somatic antigens of *Enterobacteriaceae*. *J Bacteriol.* 1964 Noviembre; 88(5): p. 1240-1243.
57. Dirección General de Epidemiología. Anuarios de morbilidad. [En línea].; 2015 [citado 2015 Febrero 27]. Disponible en: <http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/anuario/html/anuarios.html>.
58. Gomes TAT, Irino K, Girao DM, Girao VBC, Guth BEC, Vaz TMI, et al. Emerging Enteropathogenic *Escherichia coli* Strains? *Emerg Infect Dis.* 2004; 10(10): p. 1851-1855.
59. World Health Organization. Programme for control of diarrhoeal diseases. Manual for laboratory investigations of acute enteric infections. 1987.
60. Cravioto A, Reyes RE, Ortega R, Fernández G, Hernández R, López D. Prospective study of diarrhoeal disease in a cohort of rural Mexican children: incidence and isolated pathogens during the first two years of life. *Epidem Inf.* 1988; 101(1): p. 123-134.

61. Ansaruzzaman M, Albert MJ, Nahar S, Byun R, Katouli M, Kuhn I, et al. Clonal groups of enteropathogenic *Escherichia coli* isolated in case-control studies of diarrhoea in Bangladesh. *J Med Microbiol*. 2000; 49(2): p. 177-185.
62. Navarro A, Estrada-Garcia T. Epidemiology of Diarrheagenic *Escherichia coli* Pathotypes in Mexico, Past and Present. En Torres AG, editor. *Pathogenic Escherichia coli in Latin America.*: Bentham Science Publishers Ltd; 2010. p. 191-208.
63. Campos LC, Franzolin MR, Trabulsi LR. Diarrheagenic *Escherichia coli* Categories among the Traditional Enteropathogenic *E. coli* O Serogroups - A Review. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2004; 99(6): p. 545-552.
64. Robins-Browne RM, Bordun AM, Tauschek M, Bennett-Wood VR, Russell J, Oppedisano F, et al. *Escherichia coli* and Community-acquired Gastroenteritis, Melbourne, Australia. *Emerg Infect Dis*. 2004; 10(10): p. 1797-1805.
65. Sakkejha H, Byrne L, Lawson AJ, Jenkins C. An update on the microbiology and epidemiology of enteropathogenic *Escherichia coli* in England 2010 – 2012. *J Med Microbiol*. 2013; 62: p. 1531-1534.
66. Estrada-García T, Lopez-Saucedo C, Thompson-Bonilla R, Abonce M, Lopez-Hernandez D, Santos JI, et al. Association of Diarrheagenic *Escherichia coli* Pathotypes with Infection and Diarrhea among Mexican Children and Association of Atypical Enteropathogenic *E. coli* with Acute Diarrhea. *J Clin Microbiol*. 2009; 47(1): p. 93-98.
67. Drago-Serrano ME, Gavilanes Parra S, Manjarrez-Hernández HA. EspC, an autotransporter protein secreted by enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC), displays protease activity on human hemoglobin. *FEMS Microbiol Lett*. 2006; 265(1): p. 35 - 40.
68. Orth D, Ehrlenbach S, Brockmeyer J, Basit Khan A, Huber G, Karch H, et al. EspP, a Serine Protease of Enterohemorrhagic *Escherichia coli*, Impairs Complement Activation by Cleaving Complement Factors C3/C3b and C5. *Infect Immun*. 2010; 78(10): p. 4294 - 4301.
69. Hashimoto B, Kumate J, Carrillo J, Alvarez-de los Cobos J. El contenido del antígeno heterogénico como índice de patogenicidad en *Escherichia coli*. *Bol Med Hosp Infant Mex*. 1968; 25(1): p. 345-350.
70. 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(1): p. 58 - 65.