



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**COEXISTENCIA DE SUBTIPOS DE *Escherichia coli* O111
ENTEROPATÓGENA (EPEC) AISLADA DE DIARREA INFANTIL
DE DIFERENTES ZONAS GEOGRÁFICAS**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA DE ALIMENTOS**

PRESENTA

ALEXIS OTERO GARCÍA



MÉXICO, D.F.

AÑO 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: ADRIANA GUADALUPE MEJÍA CHÁVEZ
VOCAL: AURORA IRMA ORTEGÓN ÁVILA
SECRETARIO: ARMANDO NAVARRO OCAÑA
1er. SUPLENTE: NORMA ANGÉLICA CAMACHO DE LA ROSA
2° SUPLENTE: 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: ALEXIS OTERO GARCÍA

ÍNDICE

	Página
Resumen	7
1. MARCO TEÓRICO	8
1.1 Enfermedades diarreicas: una epidemia mundial	8
1.1.2 Situación en México	8
1.2 Etiología de la diarrea infantil.....	9
1.3 <i>Escherichia coli</i>	9
1.3.1 Generalidades	10
1.3.2 De bacteria comensal a patógena	10
1.3.3 Clasificación.....	12
1.4 <i>E. coli</i> diarreogénica (DEC)	12
1.5 <i>E. coli</i> enteropatógena (EPEC).....	13
1.5.1 Mecanismos de patogenicidad	14
1.6 Importancia del serogrupo O111 como agente etiológico de la diarrea	17
1.7 <i>E. coli</i> productora de la toxina Shiga (STEC).....	19
1.7.1 Mecanismos de patogenicidad	20
1.8 <i>E. coli</i> enteropatógena y productora de la toxina Shiga: modelo de patogénesis	21
1.9 Grupos filogenéticos	22
1.10 Antígeno común de las enterobacterias (ECA).....	24
1.11 Mecanismos de acción de agentes antimicrobianos.....	24
1.12 Mecanismos de resistencia a antimicrobianos.....	25
2. JUSTIFICACIÓN	27
3. HIPÓTESIS	28
4. OBJETIVO GENERAL	28
5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	28
6. METODOLOGÍA	30
6.1 Origen de las cepas	30
6.2 Aislamiento y purificación	30
6.3 Confirmación bioquímica de <i>E. coli</i>	30
6.4 Obtención de los antígenos somático (O) y flagelar (H)	31
6.5 Identificación serológica.....	32

6.6 Extracción de ADN	32
6.7 Determinación de factores de virulencia y grupos filogenéticos mediante PCR	33
6.7.1 Electroforesis en gel de agarosa	34
6.8 Extracción del antígeno común de las enterobacterias (ECA)	34
6.8.1 Titulación del suero anti <i>E. coli</i> O14 mediante ensayos de hemaglutinación.....	34
6.8.2 Determinación del contenido de ECA mediante ensayos de inhibición de la hemaglutinación	35
6.9 Determinación de patrones de resistencia a antimicrobianos mediante pruebas de difusión en agar (Kirby-Bauer)	36
6.10 Análisis estadístico	37
7. RESULTADOS	39
7.1 Origen de las cepas	39
7.2 Identificación bioquímica	40
7.3 Identificación de serotipos de <i>E. coli</i> O111	40
7.4 Genes de virulencia y subtipos EPEC (tEPEC y aEPEC) en <i>E. coli</i> O111 aislada de casos de diarrea infantil en México y otros países	42
7.5 Grupos filogenéticos y subtipos EPEC en <i>E. coli</i> O111 aislada de casos de diarrea infantil en México y otros países	46
7.6 Subtipos de EPEC y grupos filogenéticos en <i>E. coli</i> O111 aislada de bovinos.....	48
7.7 Contenido de ECA en <i>E. coli</i> O111 aislada de casos de diarrea infantil en México y otros países.	50
7.8 Contenido de ECA en <i>E. coli</i> O111 aislada de bovinos.	51
7.9 Sensibilidad a antimicrobianos.	51
8. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	53
9. CONCLUSIONES	60
10. PERSPECTIVAS	61
11. APÉNDICE.....	62
12. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	65

ÍNDICE DE CUADROS

Página

Cuadro 1. <i>E. coli</i> aislada de casos de diarrea infantil en cuatro áreas geográficas	39
Cuadro 2. Serotipos de <i>E. coli</i> O111 aislada de casos de diarrea infantil en México.	41
Cuadro 3. Serotipos de <i>E. coli</i> O111 aislada de casos de diarrea infantil en diferentes países	42
Cuadro 4. Caracterización genotípica de <i>E. coli</i> O111 aislada de casos de diarrea infantil en México.....	45
Cuadro 5. Caracterización genotípica de <i>E. coli</i> O111 aislada de casos de diarrea infantil en otros países	46
Cuadro 6. Distribución de grupos filogenéticos en cepas tEPEC y aEPEC aisladas de casos de diarrea infantil en México y otros países.....	48
Cuadro 7. Caracterización genotípica de <i>E. coli</i> O111 aislada de ganado bovino.....	49
Cuadro 8. Contenido de ECA en cepas de <i>E. coli</i> O111 aislada de casos de diarrea infantil en México y el extranjero por el método de inhibición de la hemaglutinación	50
Cuadro 9. Contenido de ECA en cepas de <i>E. coli</i> O111 aislada de bovinos por el método de inhibición de la hemaglutinación.....	51

ÍNDICE DE FIGURAS

Página

Figura 1. Modelo esquemático de la patogénesis de EPEC.....	15
Figura 2. Patrones de adherencia exhibidos por aEPEC en células HEp-2 en cultivo	16
Figura 3. Lesión de adherencia y esfacelamiento (A/E).....	22
Figura 4. Árbol dicotómico de decisión para la asignación de los grupos de <i>E. coli</i> mediante el genotipo obtenido a través de la amplificación de los genes <i>arpA</i> , <i>chuA</i> , <i>yjaA</i> y TspE4.C2 ...	23
Figura 5. Metodología experimental empleada	38
Figura 6. Electroferograma de productos amplificados del gen <i>eae</i> de <i>E. coli</i> O111 en gel de agarosa al 1.0 %.....	43
Figura 7. Electroferograma de productos amplificados del gen <i>eafA</i> de <i>E. coli</i> O111 en gel de agarosa al 1.2 %.....	44
Figura 8. Electroferograma de productos amplificados del gen <i>bfp</i> de <i>E. coli</i> O111 en gel de agarosa al 1.2 %.....	44
Figura 9. Electroferograma de productos amplificados de los genes <i>arpA</i> , <i>chuA</i> , <i>yjaA</i> y TspE4.C2 de <i>E. coli</i> O111 en gel de agarosa al 2.0 %.....	47
Figura 10. Electroferograma de productos amplificados de los genes <i>espC</i> y <i>espP</i> de <i>E. coli</i> O111 en gel de agarosa al 1.2 %.....	49
Figura 11. Patrones de resistencia en <i>E. coli</i> O111 aislada de bovinos y casos de diarrea infantil en México y en el extranjero.....	52

RESUMEN

Escherichia coli por sus factores de virulencia, el tipo de cuadro clínico que produce y su distribución epidemiológica, se clasifica en seis patotipos designados como: *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* con adherencia difusa (DAEC), *E. coli* productora de la toxina Shiga (STEC) y *E. coli* enteropatógena (EPEC). De acuerdo a los genes de virulencia que presenta este último patotipo se ha clasificado en EPEC típica (tEPEC) y EPEC atípica (aEPEC). **Objetivo:** Caracterizar cepas de *E. coli* O111 obtenidas de diferentes estudios epidemiológicos para; definir su serotipo, perfil de genes de virulencia, el grupo filogenético en el que se ubican, además determinar su contenido de antígeno común de las enterobacterias (ECA) y su patrón de resistencia a antimicrobianos. **Metodología:** Para su estudio se incluyeron 96 cepas de *E. coli* O111, de estas, 77 fueron obtenidas de muestras fecales de niños menores de cinco años y 19 cepas de ganado vacuno, los serotipos se identificaron con sueros anti-O y anti-H obtenidos en conejo (SERUNAM). Con la técnica de PCR múltiple se identificó el grupo filogenético utilizando los iniciadores para los genes *arpA*, *chuA*, *yjaA* y TspE4.C2 con el mismo procedimiento se definió el patotipo buscando la presencia de los genes *eae*, *bfp*, *eafA*, *stx1*, *stx2*, *espC* y *espP*. Por medio de ensayos de inhibición de la hemaglutinación se determinó el contenido de ECA y con el método de difusión en placa (Kirby-Bauer) se evaluó la sensibilidad a antimicrobianos. **Resultados:** Las 77 cepas de *E. coli* fueron aisladas de 61 niños menores de cinco años de diferentes áreas geográficas y estudios epidemiológicos; de estas, 50 (65 %) fueron de México, 13 (17 %) de Tailandia, 5 (6 %) de Egipto, 4 (5%) de Brasil y 5 (6 %) Bangladesh. Con respecto a 19 aislamientos de animales, estos se obtuvieron de un hato de 40 vacas del Estado de México. En ambos grupos de cepas se corroboró la identidad antigénica del serogrupo O111 y se identificaron seis serotipos, O111ab:NM (34 %), O111ac:NM (33 %), O111ab:H12 (10 %), O111ab:H2 (10 %), O111ab:H19 (8 %) y O111ac:H8 (3 %). El análisis de genes mostró que 36 (72 %) cepas de México se clasificaron como tEPEC en virtud a la presencia de los genes *eae*, *eaf* en combinación con *bfp* (tEPEC) y 14 (28 %) como aEPEC debido a que únicamente contenían el gen *eae*. El mismo análisis con las cepas de los otros países mostró principalmente la presencia de aEPEC, en el caso de las cepas de bovinos, presentaron el gen *stx1* en combinación con *eae* por lo que se determinaron como STEC. Con relación a los grupos filogenéticos de ambos tipos de cepas (niños y bovinos), 76 cepas (79 %) se ubicaron en los grupo B1, 12 (13 %) en A, 1 (1 %) cepa en D, 4 (4 %) en F, finalmente en tres (3 %) no se determinó el grupo (ND). Los títulos del contenido de ECA más frecuentes fueron 1:64 (50 %) y 1:32 (43 %). La resistencia a antimicrobianos fue principalmente a tetraciclina (23 %). **Conclusiones.** En México, en las cepas aisladas de niños se observó la coexistencia tEPEC y aEPEC, y en bovinos cepas STEC. En cepas de otros países prevalecieron las cepas aEPEC. Los grupos B1 y A considerados como microorganismos de la microbiota intestinal fueron los más comunes en las diferentes regiones analizadas. El contenido de ECA en ambos grupos de cepas fue alto (1:64). Las cepas *E. coli* O111 obtenidos de casos de diarrea en niños y ganado vacuno fueron susceptibles a β -lactámicos y quinolonas, pero muestran considerable resistencia a tetraciclina.

1. MARCO TEÓRICO

1.1 Enfermedades diarreicas: una epidemia mundial

Aproximadamente el 73% de las muertes en niños menores de 5 años son atribuibles a seis causas principales, la diarrea ocupa la segunda posición solo después de la neumonía (1). La diarrea se define como la evacuación de tres o más veces al día (o con una frecuencia mayor a la normal para la persona) de heces sueltas o líquidas, puede presentarse en tres tipos clínicos; diarrea acuosa aguda (varias horas o días), diarrea con sangre aguda (también llamada diarrea disentérica o disentería) y diarrea persistente (14 días o más) (2). Una estimación mundial sobre la diarrea en niños menores de cinco años que viven en países en vías de desarrollo reportó cerca de 1,900 millones de episodios en 1990 y casi 1, 700 millones en 2010 (3), provocando anualmente entre 1.6-2.5 millones de muertes en estas regiones (4). Aunque se ha observado que la media estimada de muertes a consecuencia de este padecimiento ha descendido de 4.6 millones en 1982 a 3.0 millones en 1992 y 2.5 millones en 2000, la diarrea es causa de alrededor del 21 % de todas las muertes registradas en este grupo de edad (4).

1.1.2 Situación en México

Se ha registrado una sustancial reducción en los índices de mortalidad entre 1990 y 2002 como resultado de la implementación de medidas como la potabilización del agua, la promoción de la lactancia materna, la rehidratación oral y la suplementación con megadosis de Vitamina A (5), sin embargo este padecimiento continúa siendo un problema de salud pública debido a que las tasas de morbilidad han permanecido

prácticamente sin cambio. Según datos de la Dirección General de Epidemiología (DGE) se registraron 6.9 millones de casos en niños menores de cinco años durante 2001, 5.45 millones en 2007 y 6.03 millones en 2011, es decir una incidencia de 5, 521 casos por 100, 000 habitantes y un aumento de 10.6% respecto a 2007 (6), los niños de familias con bajo nivel de ingresos que viven en áreas rurales son los menos favorecidos frente a esta situación. La reducción de las tasas de mortalidad y morbilidad de las enfermedades diarreicas en niños continúa siendo un reto para la salud pública (7).

1.2 Etiología de la diarrea infantil

Se conoce que entre los agentes etiológicos relacionados con las infecciones intestinales se encuentran virus, parásitos y bacterias (8). El rotavirus es la causa más importante de muerte por diarrea en niños alrededor del mundo, causando más de medio millón al año (9). Los parásitos, *G. lamblia* y *Cryptosporidium spp.*, y las bacterias; *Vibrio cholerae* y algunos géneros de la familia *Enterobacteriaceae* como *Shigella spp.*, *Salmonella spp.* y algunas variedades de *E. coli* son los principales agentes involucrados (8).

1.3 *Escherichia coli*

Fue descubierta por el pediatra alemán Theodor Escherich (1857-1911), la denominó "*Bacterium coli commune*" ya que la aisló tanto de individuos sanos como enfermos durante sus estudios sobre la microbiota intestinal de niños, este nombre fue utilizado hasta que el género *Escherichia* y la especie *E. coli* se definieron en 1919 (10).

1.3.1 Generalidades

E. coli es una bacteria Gram negativa, anaerobia facultativa, de forma bacilar (2.0-6.0 μm largo x 1.1-1.5 μm ancho), no forma esporas, y es inmóvil o móvil por flagelos peritricos (10). Pertenece a la familia *Enterobacteriaceae* y durante las primeras horas después del nacimiento coloniza el tracto gastrointestinal de los humanos, estableciendo una larga relación simbiótica con su hospedero (11). Usualmente se encuentra confinado a residir en el colon, sus características metabólicas y fisiológicas lo convierten en un excelente competidor por lo que es uno de los microorganismos más abundantes de la microbiota intestinal de humanos y otros mamíferos (11).

1.3.2 De bacteria comensal a patógena

La primera vez que la presencia de *E. coli* se asoció con infecciones gastrointestinales fue durante la década de 1940. Estudios realizados de manera completamente independiente alrededor del mundo revelaron la existencia de variantes de *E. coli* implicadas en casos severos de diarrea en niños. En México las investigaciones de Varela, Aguirre y Carrillo contribuyeron notablemente al descubrimiento de la propiedad patogénica de *E. coli* (12). Los estudios se iniciaron poco después de la inauguración del Hospital Infantil de México (1943), *E. coli* se volvió la bacteria que con mayor frecuencia era aislada de cadáveres de niños que habían fallecido por diversas causas pero en los que la diarrea había sido la manifestación más importante (12). Julio Carrillo refiere que al inicio —~~los~~ resultados fueron desesperantes” porque no se encontraba ninguna de las bacterias reconocidas como patógenas y nadie en ese momento se atrevía a sospechar que *E. coli* pudiera ser causante de diarrea, era una bacteria comensal e inofensiva que habitaba en el intestino de todos los humanos sanos (12).

Tras las controversiales observaciones, Varela propuso investigar si la *E. coli* aislada en los pacientes poseía los antígenos somáticos de *Salmonella* tal y como Kauffman señalaba en un estudio publicado en 1941. Los primeros experimentos se efectuaron con las muestras tomadas a la niña Rosalía Aguirre de dos años de edad, una de las cepas de *E. coli* aisladas mostró aglutinación intensa y rápida con el suero preparado con antígeno XXXV de *Salmonella adelaide* (13), mediante ensayos de aglutinación se confirmó que la cepa poseía el antígeno somático de esta bacteria altamente patógena, lo cual explicaba que el suero de la niña aglutinara sus propias bacterias en el momento del fallecimiento (13). Los resultados obtenidos fueron publicados en el volumen tres del Boletín Médico del Hospital Infantil de México (14); la nueva cepa aislada fue nombrada *Escherichia coli-gómez*” (en honor al Dr. Federico Gómez, fundador de la Escuela Mexicana de Pediatría). Sin embargo, el hallazgo fue prácticamente ignorado e incluso atacado (13), sin saber que se encontraban casi al nivel de lo comunicado un poco antes por Bray en Gran Bretaña en 1945 (15).

En los años siguientes otros investigadores como Giles en 1947 (16) y Taylor en 1949 (17) informaron eventos similares. Las bacterias aisladas fueron nombradas de diferentes maneras; *Bacterium coli var napolitanum* por Bray, Aberddeen alpha por Giles y D433 por Taylor. Fue hasta 1952 *Escherichia coli-gómez* se identificó como *E. coli* O111:B4 de la clasificación de Kauffman (18), usando este mismo método de tipificación las cepas Aberddeen alpha y D433 fueron reconocidas también con este serotipo (12). Finalmente el término *Escherichia coli enteropatógena*” fue propuesto por Neter (19) para agrupar a todas las cepas asociadas con brotes de diarrea en niños.

Sin duda, la aceptación de *E. coli* como patógeno intestinal fue un evento clave que motivó en las décadas posteriores un interés generalizado en el estudio de esta bacteria, en la actualidad es uno de los microorganismos mejor conocidos y se ha convertido en un modelo de estudio de muchos otros aspectos que van más allá de su capacidad para causar diarrea.

1.3.3 Clasificación

Son escasos los microorganismos tan versátiles como *E. coli* y existen clonas patógenas (patovares o patotipos) altamente adaptadas que han adquirido factores de virulencia que les confieren la habilidad de colonizar nuevos nichos ecológicos, causando una extensa gama de afecciones en sus hospederos (11). Tres síndromes clínicos pueden resultar de la infección con uno de estos patotipos: i) Infecciones intestinales/diarrea, ii) Infecciones genitourinarias y iii) Sepsis/meningitis (20). Las variedades asociadas a infecciones intestinales se conocen como *E. coli* diarreogénica (DEC), mientras que las causantes de afecciones extraintestinales se denominan *E. coli* extraintestinal (ExPEC) (11).

1.4 *E. coli* diarreogénica (DEC)

Por sus factores de virulencia, el tipo de cuadro clínico que produce y su distribución epidemiológica las variedades DEC se han agrupado tradicionalmente en seis patotipos; *E. coli* enteropatógena (EPEC), *E. coli* productora de la toxina Shiga (STEC), *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC) y *E. coli* de adherencia difusa (DAEC) (11). Sin embargo, nuevas formas híbridas han emergido recientemente y dos nuevas categorías han sido propuestas; *E.*

coli adherente invasiva (AIEC) asociada a la enfermedad de Crohn y *E. coli* enteroagregativa/productora de la toxina Shiga (STEAEC) responsable de un brote de colitis hemorrágica (CH) y del síndrome urémico hemolítico (SUH) en Alemania durante 2011 (21).

1. 5 *E. coli* enteropatógena (EPEC)

Se ha reconocido como la principal causante de diarrea en niños menores de dos años que viven en países en vías de desarrollo, en países industrializados es muy poco común (20). En México se presenta de forma endémica hasta en el 6 % de la población y es la causante del 17 a 19 % de los casos de diarrea infantil en diversas regiones del país (22).

Produce un cuadro de diarrea acuosa asociada comúnmente con vómito y puede presentar fiebre, además estar acompañada de moco pero raramente presenta sangre. Generalmente es autolimitada pero es importante corregir la pérdida de fluidos, electrolitos y el desequilibrio nutricional ocasionado (23), el uso de antimicrobianos no se recomienda como tratamiento empírico aunque en el caso de infecciones persistentes puede requerirse (24). La transmisión de EPEC de persona a persona es por la vía fecal-oral, a través del contacto directo con manos e ingestión de agua o alimentos contaminados, se desconoce la dosis requerida para causar infección en condiciones naturales pero en adultos voluntarios es alta, 10^8 a 10^{10} bacterias (20).

Las cepas enteropatógenas no son invasivas y son incapaces de producir toxina Shiga (Stx), actualmente EPEC se ha dividido en dos subtipos con base en la presencia o ausencia de factores de virulencia (23). Las cepas que contienen el plásmido EAF (EPEC Adherence Factor) de 69 kb dentro del cual se encuentran los genes

involucrados en la producción de una fimbria tipo IV denominada BFP (Bundle-forming pili) son nombradas cepas típicas de EPEC (tEPEC), mientras que las cepas que carecen de EAF se denominan cepas atípicas de EPEC (aEPEC) (25). En este plásmido también están codificados los genes del operón *per* (Plasmid-encoded regulator) que regula la síntesis de BFP y otras proteínas secretadas por EPEC cuyo primer gen (*perA*) codifica para el regulador transcripcional PerA (26).

Ambos subtipos poseen la isla de patogenicidad LEE de 35 kb (Locus of Enterocyte Effacement) la cual está organizada en cinco operones policistrónicos (LEE1-LEE5). Los operones LEE1-LEE3 codifican los genes de las proteínas del sistema de secreción tipo III (SSTT), en el LEE4 los genes de las proteínas secretadas mediante SSTT conocidas como Esp (EPEC secreted proteins) y en LEE5 están codificados los genes *eae* y *tir* que codifican para la adhesina intimina (94 kDa) y su receptor Tir (Translocated intimin receptor) respectivamente (22).

1.5.1 Mecanismos de patogenicidad

Después de la infección, EPEC emplea diversos mecanismos que contribuyen al establecimiento de la enfermedad, aunque el mecanismo global de la diarrea aún no está claro, la desregulación de la arquitectura intestinal, el transporte de iones y agua, la alteración de la estructura y función de la barrera epitelial son cambios que derivan en la pérdida de agua con la consecuente producción de diarrea (27). Una de las moléculas implicadas en estos cambios es EspC (110 kDa), una proteína de la familia SPATE (Serine protease autotransporters of the *Enterobacteriaceae*) que induce la salida masiva de iones al espacio extracelular y que además posee actividad enterotóxica y citotóxica (22).

La inducción de la lesión A/E es uno de los mecanismos característicos de la patogénesis de EPEC. A través de un modelo de tres etapas propuesto por Donnenberg y Kaper (28) que incluye: I) Adherencia inicial, II) Transducción de señales y III) Adherencia íntima, puede explicarse la interacción de EPEC con el enterocito (Figura 1).

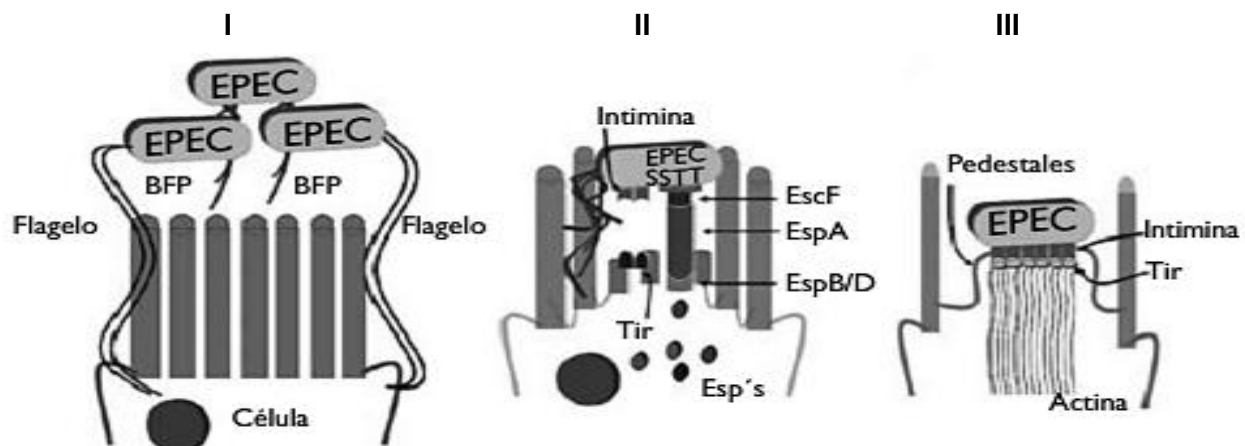


Figura 1. Modelo esquemático de la patogénesis de EPEC. I) La fimbria BFP permite la interacción entre las bacterias para formar microcolonias. II) Inyección de los factores de virulencia mediante SSTT, inserción de Tir en la membrana de la célula hospedera. III) Unión de la intimina con su receptor Tir, el reacomodo del citoesqueleto favorece la formación de los pedestales de actina y la desaparición de las microvellosidades del intestino; histopatología de la lesión A/E. Imagen tomada de Vidal (22).

- I. **Adherencia inicial.** Una vez que EPEC llega al intestino, se produce el primer contacto con las células del huésped. En cepas tEPEC la fimbria BFP media la interacción entre las mismas bacterias promoviendo su disposición en microcolonias, de esta manera se favorece la adhesión a la superficie de las células epiteliales produciendo el fenotipo de adherencia localizada (LA), característico de tEPEC (29). Las cepas aEPEC pueden exhibir diversos patrones de adherencia en células en cultivo (Figura 2), tipo-adherencia

localizada (LAL), adherencia agregativa (AA) y adherencia difusa (DA) (29, 30, 25).

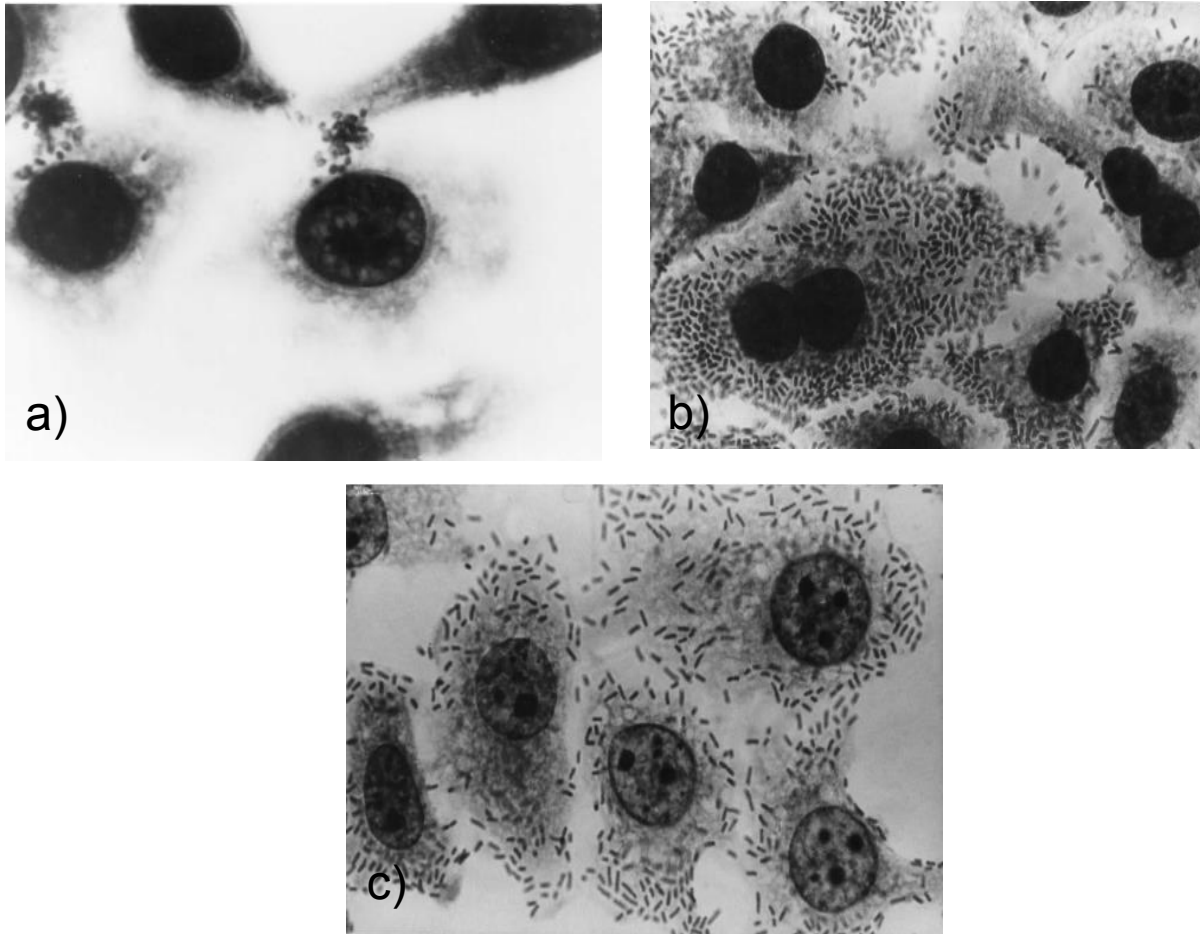


Figura 2. Patrones de adherencia exhibidos por aEPEC en células HEp-2 en cultivo (a) LA, (b) AA (c) DA Imagen proporcionada por el Dr. José Molina, Facultad de Medicina, UNAM.

- II. **Transducción de señales.** Después de la adhesión de la bacteria a la superficie del enterocito; mediante el inyectisoma, estructura característica del SSTT se inicia la translocación de una serie de proteínas efectoras codificadas dentro de LEE (EspF, EspG, EspH, Map, EspZ y Tir) hacia su interior, su función es subvertir las diferentes vías de señalización en la

célula. La primera de ellas, Tir se inserta en la membrana plasmática del hospedero (22).

- III. **Adherencia íntima.** Esta última etapa se caracteriza por la estrecha unión de EPEC a las células del hospedero y la formación de pedestales. La adherencia íntima es consecuencia de la unión de la proteína de membrana externa intimina con su receptor Tir. La estructura de pedestal compuesta principalmente de actina polimerizada se forma por debajo del sitio de adherencia de EPEC, en consecuencia induce la reorganización del citoesqueleto y la alteración de la morfología de la región apical de las células, lo que conlleva finalmente a la destrucción de las microvellosidades intestinales (22).

1.6 Importancia del serogrupo O111 como agente etiológico de la diarrea

La tipificación serológica ocupa una parte central en la historia de *E. coli*, mucho tiempo antes de poder identificar factores de virulencia en DEC el análisis serológico era el principal medio usado para distinguir a las cepas patógenas (20). La importancia histórica del serogrupo O111 ya fue señalada anteriormente, y desde su reconocimiento como causante de diarrea infantil principalmente en hospitales y cuneros durante los 40s, *E. coli* O111 ha estado implicado en diversos brotes y casos esporádicos de diarrea alrededor del mundo.

La considerable heterogeneidad fenotípica y genotípica de este serogrupo deriva en su capacidad para exhibir una amplia variedad de características de virulencia y de mecanismos de patogénesis (31). Desde 1987 la Organización Mundial de la Salud

(OMS) considera al serogrupo O111 dentro de los 12 que ha reconocido como pertenecientes al grupo enteropatógeno, actualmente es uno de los denominados —serogrupos clásicos” de EPEC (32). Además, se han aislado cepas O111 capaces de producir Stx en pacientes con CH y SUH principalmente en países desarrollados, por lo que se considera como uno de los serogrupos STEC de mayor prevalencia (33, 22). En algunos estudios se ha demostrado que cepas aisladas de casos de diarrea infantil de serogrupos tradicionalmente considerados como EPEC también expresan patrones de adherencia agregativa (AA) en células en cultivo, las cepas O111 se consideran como uno de los serogrupos comunes del patotipo EAEC (34).

Su importancia como uno de los serogrupos EPEC con más prevalencia ha sido señalada en estudios epidemiológicos realizados en Latinoamérica. En Brasil las cepas EPEC O111 fueron las mayormente aisladas durante las décadas de los 80s y 90s (35), tan sólo en un estudio realizado en niños menores de dos años con diarrea persistente se reportó como el más frecuente (74.3 %) (36). Asimismo, en Montevideo, Uruguay EPEC O111 y los serogrupos O119 y O55 han dominado la etiología de la diarrea infantil en las últimas tres décadas (37). En Chile además de su alta frecuencia se asoció con los cuadros de diarrea más graves, por el hecho de que la mayor incidencia se presentó en pacientes que debían hospitalizarse a causa de diarrea aguda (38).

Aunque el serotipo STEC de mayor prevalencia es O157:H7, otros serotipos han tenido importancia como agentes causantes de CH y SUH (39, 40), STEC O111 emergió como uno de los más destacados y una gran cantidad de brotes en países de distintos continentes han sido ocasionados por este serogrupo (41-45). Niños y adultos alrededor del mundo han muerto o enfermado gravemente a consecuencia de las infecciones gastrointestinales causadas por las variantes de *E. coli* O111.

1.7 *E. coli* productora de la toxina Shiga (STEC)

La producción de una o más Stx es la característica más notable de este patotipo, aunque con frecuencia los términos STEC y EHEC (*E. coli* enterohemorrágica) son utilizados de manera equivalente existe una clara diferencia, STEC describe a cualquier cepa de *E. coli* que produce Stx, mientras que EHEC hace referencia al subgrupo de cepas *E. coli* productoras de Stx que además poseen el locus LEE, en la actualidad se reconoce como un subtipo de STEC (46). El serotipo O157:H7 es el típico de EHEC y es causante de la mayoría de los brotes de CH y SUH registrados en América del Norte, Japón y partes de Europa (33), pero seis serogrupos más de STEC conocidos como No-O157 se reconocen también como EHEC; O26, O45, O103, O111, O121 y O145, los cuales prevalecen en otras partes del mundo variando en las diferentes regiones (47). El síndrome clínico asociado a la infección por STEC va desde una diarrea acuosa leve hasta la presencia de diarrea con sangre (colitis hemorrágica), las complicaciones adicionales pueden conducir al desarrollo del síndrome urémico hemolítico, cuadro caracterizado por la combinación de insuficiencia renal aguda, trombocitopenia y anemia hemolítica microangiopática (24, 46). El objetivo principal del tratamiento es disminuir la severidad y la duración de los síntomas, además de obstaculizar el desarrollo de las complicaciones sistémicas como el SUH, la intensa rehidratación intravenosa durante la fase de diarrea es vital (48). El uso de antimicrobianos está contraindicado debido a que incrementan el riesgo de desarrollar SUH, los antiinflamatorios no esteroideos y agentes antidiarreicos tampoco son recomendados ya que pueden favorecer la presencia sostenida de STEC en el tracto gastrointestinal y la consecuente expresión de Stx (48).

La transmisión de las cepas STEC al igual que otras categorías DEC es a través de la vía fecal-oral, mediante la ingestión de alimentos contaminados (46). El ganado vacuno, así como otros rumiantes son el principal reservorio de estos patógenos ya que forman parte de la microbiota intestinal generalmente sin causar enfermedad en los animales, la dosis infectiva para los humanos es extremadamente baja, <100 bacterias (20). Los productos no pasteurizados como la leche y sus derivados, jugos de frutas y vegetales son los vehículos de transmisión frecuentemente asociados (49).

1.7.1 Mecanismos de patogenicidad

La isla de patogenicidad LEE en el subtipo EHEC conserva la organización básica descrita anteriormente en EPEC; sin embargo existen diferencias en el tamaño, contenido genético y estructura. Además, el locus LEE de EHEC transloca casi el doble de efectores que la isla de EPEC, aunque la mayoría de las proteínas son redundantes (50).

Stx es una poderosa enterotoxina que inhibe la síntesis de proteínas ya que se une a la subunidad 60s de los ribosomas de las células intestinales o renales del hospedero (24, 50). Se encuentra codificada en un bacteriófago lambda lisogénico insertado en el cromosoma bacteriano y es una toxina del tipo AB₅, es decir, consiste en una subunidad A con actividad enzimática (A₁) y cinco subunidades B que se unen al receptor (B₅) (24, 50). Los receptores específicos en el hospedero a los que se une Stx son globotriaosilceramida (Gb₃), globotetraosilceramida (Gb₄) y otros glucolípidos ubicados en la membrana de las células de Paneth en la mucosa del intestino y en las células epiteliales del riñón (24, 20). La toxina es producida en el colon pero STEC carece de mecanismos para su secreción por lo que la liberación depende de la lisis

mediada por el sistema del fago lambda (24, 50). STEC puede producir dos tipos de toxinas Shiga: Stx1, que es casi idéntica a la Stx de *Shigella dysenteriae* y Stx2 que es más toxica y está principalmente asociada a CH y SUH, de tal manera que existen cepas que sintetizan alguna de las toxinas o ambas (51).

Además de la producción de Stx y el fenómeno de A/E, las cepas STEC poseen otro factor de patogenicidad, el plásmido pO157 (92 kpb) (52). EHEC O157:H7 posee pO157 pero también se ha encontrado en cepas No-O157 con algunas variaciones pero con un contenido genético similar (50). En este plásmido se encuentran codificados factores de virulencia que contribuyen de manera importante a la patogenicidad de esta bacteria, uno de los principales es la proteína autotransportadora EspP (52). Es una serina proteasa cuya función como enzima extracelular es la escisión de la pepsina A y el factor de coagulación V humano, la hemorragia de la mucosa intestinal observada en los pacientes con colitis hemorrágica es atribuida a estos fenómenos (51).

1.8 *E. coli* enteropatógena y productora de la toxina Shiga: modelo de patogénesis

Aunque EPEC y EHEC difieren en su epidemiología y en las manifestaciones clínicas que provocan en sus hospederos, son organismos estrechamente relacionados. Se distinguen de otros patotipos por su habilidad para producir la lesión histopatológica de adherencia y esfacelamiento conocida como A/E (Attaching and Effacing), caracterizada por la destrucción de las microvellosidades intestinales (53). Morfológicamente la lesión causada por estos patógenos es indistinguible y aunque utilizan factores de virulencia altamente similares involucran diferentes vías de señalización para producirla (54).

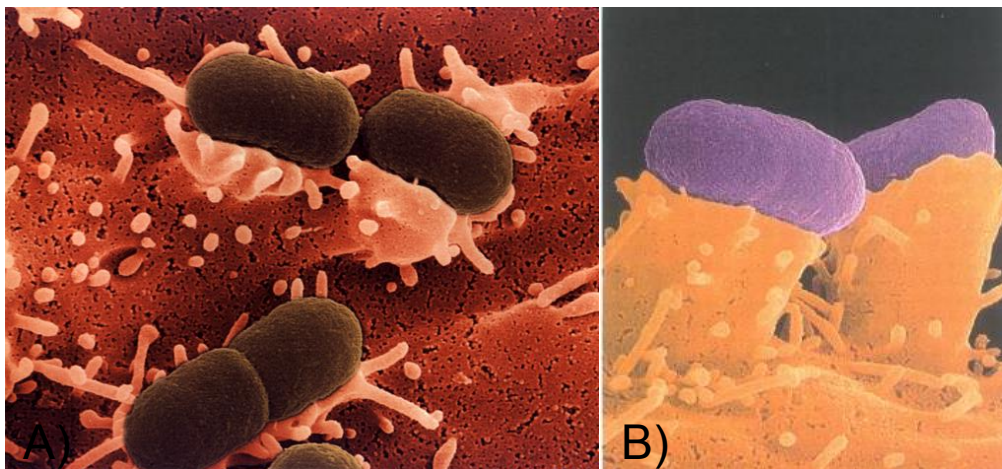


Figura 3. Lesión de adherencia y esfacelamiento (A/E) ocasionada por EPEC y EHEC. La histopatología resulta en la formación de una estructura tipo pedestal que se eleva desde el sitio en la célula epitelial en donde la bacteria se posa. A) EPEC (marrón) adherida a las células intestinales humanas en cultivo (rojo). Imagen tomada del sitio del CMDR, B) EPEC adherida a células HeLa en cultivo. Imagen tomada de Rosenshine (55).

1.9 Grupos filogenéticos

El vínculo entre grupos filogenéticos y virulencia ha sido objeto de estudio y se ha determinado que la mayoría de las cepas ExPEC pertenecen al grupo B2 y en menor proporción a D, mientras que las cepas comensales pertenecen a los grupos A y B1 (56, 57).

La técnica de PCR triplex desarrollada por Clermont en el año 2000 (58), para la determinación de grupos filogenéticos de *E. coli* se basó en el análisis de la presencia de los genes, *chuA* (necesario para el transporte del grupo hemo en EHEC O157:H7), *yjaA* (identificado en *E. coli* K12 sin una función conocida) y un fragmento de DNA llamado TspE4.C2, identificado posteriormente como un gen que codifica para una lipasa estearasa. Este sistema permite la asignación de los aislamientos de *E. coli* a uno de los cuatro grupos: A, B1, B2 o D. Sin embargo, el recientemente reconocimiento de los grupos, C, E y F, y un análisis demostró que sólo entre el 80-85 % de los grupos

filogenéticos asignados eran correctos y que una fracción importante de cepas eran mal clasificadas, impulsaron el desarrollo de un nuevo método. Manteniendo los mismos marcadores genéticos utilizados en la PCR triplex pero con un rediseño de las secuencias iniciadoras y la inclusión del gen *arpA*, en el año 2013 Clermont (59) validó un nuevo método; PCR cuádruplex, a partir del cual es posible la asignación correcta del 95 % de los aislamientos de *E. coli* a ocho grupos filogenéticos (A, B1, B2, C, D, E, F, Clado I).

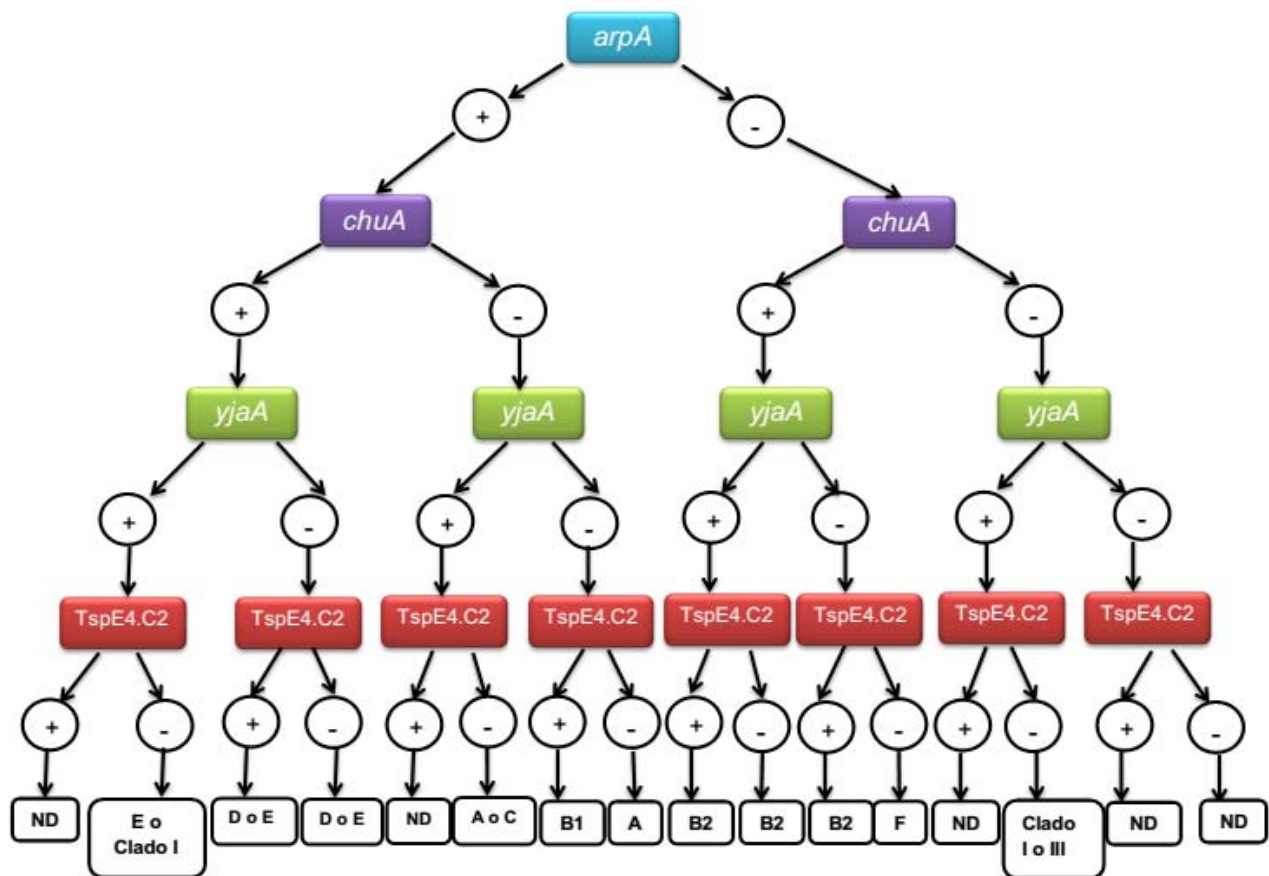


Figura 4. Árbol dicotómico de decisión para la asignación de los grupos de *E. coli* mediante el genotipo obtenido a través de la amplificación de los genes *arpA*, *chuA*, *yjaA* y *TspE4.C2*. Datos obtenidos de Clermont (59).

1.10 Antígeno común de las enterobacterias (ECA)

Este antígeno fue descubierto por Kunin en 1962 (60), durante la caracterización de cepas de *E. coli* causantes de infecciones en vías urinarias en humanos. ECA es un heteropolisacárido formado por unidades repetidas del trisacárido N-acetil-D-glucosamina (GlcNAc), ácido N-acetil-D-manosaminurónico (ManNAcA), y 4-acetamido-4,6-dideoxi-galactosa (Fuc4NAc), sus propiedades inmunogénicas dependen en gran medida de la presencia de las tres diferentes formas en las que existe: ECA_{PG}, ECA_{CYC} y ECA_{LPS} (61). ECA_{PG} es lineal y se encuentra unido a un fosfoglicérido, se ubica en la superficie celular de todas las enterobacterias. ECA_{CYC} se localiza en el periplasma y es de forma cíclica, ECA_{LPS} se caracteriza por su unión covalente al núcleo de un lipopolisacárido (LPS); estas dos últimas formas solo están presentes en algunas bacterias (61). A pesar de su presencia universal el papel que ECA tiene como factor de virulencia es aún desconocido (62), la posibilidad de cuantificarlo mediante ensayos de inhibición de la hemaglutinación ha permitido que su contenido sea examinado en cepas de *E. coli* aisladas de infantes bajo condiciones normales y durante episodios diarreicos (63).

1.11 Mecanismos de acción de agentes antimicrobianos

Los agentes antimicrobianos actúan a través de una serie de mecanismos, diferentes entre ellos y en distintas regiones de la célula bacteriana. Los β -lactámicos (ej. cefalosporinas, carbapenémicos, monobactámicos) entran al interior de las células bacterianas mediante poros situados en la membrana exterior, inhiben la síntesis de la pared celular bacteriana debido a su asociación a las llamadas proteínas de unión a la penicilina (PBP) que catalizan la formación de puentes entre las cadenas de

peptidoglucano, este proceso a su vez activa ciertas autolisinas que degradan la pared celular y originan su destrucción (64). Las quinolonas (ej. ácido nalidíxico, ciprofloxacina, norfloxacina, ofloxacina) inhiben la actividad de las enzimas girasa y topoisomerasa del ADN, las cuales son necesarias para la replicación (64). Las tetraciclinas son agentes bacteriostáticos de amplio espectro que inhiben la síntesis proteica de la bacteria al unirse de forma reversible a la subunidad 30s del ribosoma (64). El trimetoprim en combinación con sulfametoxazol en proporción 1:5 actúa en dos etapas de la síntesis del ácido fólico. Bloquea la producción del ácido tetrahidrofólico inhibiendo la acción de la enzima dihidrofolato reductasa, reprimiendo así la formación de timidina, algunas purinas, metionina y glicina, y además impide la síntesis de esta enzima debido a la competencia por el sitio de unión con el ácido p -aminobenzoico (PABA) (64).

1.12 Mecanismos de resistencia a antimicrobianos

La resistencia de las bacterias a los β -lactámicos puede adquirirse al evitar la interacción entre el antimicrobiano y la molécula diana de PBP, modificando la unión del antimicrobiano mediante las enzimas β -lactamasas o bien hidrolizándolo también mediante estas (64). La resistencia frente a las quinolonas puede presentarse como consecuencia de mutaciones cromosómicas en los genes estructurales que codifican la girasa y topoisomera del ADN, mutaciones en los genes reguladores de la permeabilidad de membrana y la sobreexpresión de bombas de expulsión que conllevan a la eliminación activa del fármaco (64). El mecanismo más frecuente de resistencia a las tetraciclinas es la expulsión de estas moléculas al entorno extracelular, además de la disminución de la penetración de estos al interior de la célula, la

alteración de la diana molecular en el ribosoma y la modificación enzimática del antimicrobiano (64). La resistencia a trimetoprim/sulfametoxazol es resultado de la presencia de barreras de permeabilidad y la disminución de la afinidad de la dihidrofolato reductasa (64).

2. JUSTIFICACIÓN

Las complicaciones asociadas al síndrome diarreico infeccioso infantil provocan severas consecuencias en los niños principalmente de una condición socioeconómica baja, cada episodio diarreico limita al niño de los nutrientes necesarios para su crecimiento y en consecuencia provoca desnutrición, escaso crecimiento y en muchos casos puede ser fatal. La falta de atención médica adecuada y sobre todo inoportuna, convierte a este padecimiento en un factor importante que limita el desarrollo normal de los niños.

Debido a lo anterior, es clara la necesidad de conocer aspectos básicos de los patógenos causantes de diarrea infantil. Aunque desde hace más de 50 años que en México *E. coli* O111 se describió como un patógeno importante en niños menores de dos años (7), son escasos los trabajos que han reportado sobre características de los serotipos, de los patotipos de *E. coli* diarreogénica a la que pertenece el serogrupo O111 y de los grupos filogenéticos. La realización del presente estudio permitirá conocer las características fenotípicas y genotípicas de *E. coli* O111 como agente etiológico importante de la diarrea infantil y con dichas características será posible efectuar un análisis comparativo debido a que este estudio incluye cepas aisladas de diferentes fuentes y zonas geográficas desde hace más de 25 años y de reciente aislamiento.

3. HIPÓTESIS

E. coli O111 es uno de los agentes etiológicos de la diarrea infantil, por lo que las cepas de esta bacteria aisladas de diferentes fuentes y zonas geográficas sí poseen factores de virulencia de uno de los grupos diarreogénicos, por lo tanto se podrán clasificar como patotipos de *E. coli*.

4. OBJETIVO GENERAL

Conocer las características fenotípicas y moleculares de 96 cepas de *E. coli* O111 aisladas casos de diarrea infantil en diferentes zonas geográficas y de bovinos.

5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Mediante reacciones de microaglutinación con 187 sueros anti-antígenos somáticos (O) y 53 sueros anti-antígeno flagelar (H) confirmar el serogrupo e identificar el serotipo de los aislamientos de *E. coli*.
- Con el uso de iniciadores específicos y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) determinar la presencia o ausencia de factores de virulencia (*eae*, *eafA*, *bfp*, *perA* *sxt1*, *sxt2*, *espC* y *espP*) y con ello establecer el patotipo STEC o EPEC (tEPEC o aEPEC) al que pertenecen las cepas de *E. coli* O111. Además analizar la

presencia de los genes *arpA*, *chuA*, *yjaA* y el fragmento TspE4.C2, para establecer el grupo filogenético en el que se ubican las cepas de *E. coli* O111.

- Determinar el contenido del antígeno común de las enterobacterias en *E. coli* O111, mediante ensayos de inhibición de la hemaglutinación para conocer si hay alguna relación entre este y los patotipos de la bacteria.
- Evaluar la sensibilidad y resistencia de *E. coli* O111 a diferentes antimicrobianos mediante el método de difusión en agar (Kirby-Bauer), y con ello determinar el patrón de resistencia a estos agentes.

6. METODOLOGÍA

6.1 Origen de las cepas. En un análisis retrospectivo que se realizó en la base de datos del Laboratorio de Salud Pública de la Facultad de Medicina UNAM se identificaron 96 cepas de *E. coli* del serogrupo O111 obtenidos de dos fuentes; la primera de estudios sobre la etiología de la diarrea en niños menores de cinco años y la segunda de vacas lecheras con un episodio de diarrea. Las cepas aisladas de casos de diarrea infantil se obtuvieron de 61 niños de cinco zonas geográficas durante el periodo de 1986 a 2009, los aislamientos de bovinos fueron de un hato de 40 vacas en Toluca, Estado de México. Para comparación y como control de los diferentes ensayos se utilizaron cepas de referencia de la American Type Culture Collection (ATCC); las características de las cepas se detallan en los experimentos correspondientes.

6.2 Aislamiento y purificación. Las cepas incluidas en este estudio se analizaron para confirmar su viabilidad y pureza debido a que se conservan en medio de Dorset en el cepario del Laboratorio de Salud Pública, Facultad de Medicina UNAM. Se determinó sembrando los cultivos en placas con agar MacConkey (MC, Bioxon) que se incubaron a 37 °C durante 18-24 h.

6.3 Confirmación bioquímica de *E. coli*. De agar MacConkey se eligieron colonias fermentadoras de lactosa características de *E. coli*, las cuales fueron resembradas en tubos con agar TSA (Bioxon) que se incubaron durante 24 h; a partir de este crecimiento se confirmó su identidad fenotípica utilizando métodos estándares con diferentes sustratos para la identificación de bacterias Gram negativas (65). Los sustratos se incluyeron en

las siguientes pruebas bioquímicas: fermentación de glucosa y lactosa con producción de gas y capacidad de producir ácido sulfhídrico (agar de hierro de Kligler, Merck), rojo de metilo y Voges-Proskauer (medio MR/VP, Bioxon), producción de ureasa (base de agar urea, Bioxon) y producción de indol (medio SIM, Merck), utilización de citrato como única fuente de carbono (agar citrato de Simmons, Merck), utilización de malonato como única fuente de carbono y desaminación de la fenilalanina (caldo malonato-fenilalanina, Merck), oxidación de gluconato (caldo gluconato). La batería de pruebas se preparó siguiendo las recomendaciones del fabricante y la interpretación se realizó de acuerdo a lo propuesto por Barrow (65).

6. 4. Obtención de los antígenos somático (O) y flagelar (H). Para la obtención del antígeno somático, los cultivos de *E. coli* se sembraron en tubos con agar soya tripticaseína (TSA, Bioxon) y se incubaron a 37 °C durante 18-24 h. El crecimiento se resuspendió con solución salina fisiológica (NaCl 0.15 M) y la suspensión bacteriana se sometió a ebullición a 110 °C y 5 psi durante 1 h, después de dicho tratamiento se agregaron 10 mL de formalina al 0.6% como conservador (solución salina con 0.6 % de formaldehído).

El antígeno flagelar se obtuvo sembrando los cultivos de *E. coli* en tubos de Craigie con medio semisólido y se incubaron a 30 °C durante 3-5 días. Una vez obtenido el crecimiento bacteriano en la superficie del medio, este se resembró en tubos con caldo Biotriptasa (BT, Bioxon) que se incubaron por 18 h a 37 °C, finalmente se agregaron 10 mL de formalina al 0.6%.

6.5 Identificación serológica. Una vez confirmada la pureza e identidad bioquímica de los cultivos de *E. coli*, se comprobó que pertenecían al serogrupo O111 mediante tipificación serológica, de acuerdo a la metodología descrita por Orskov (66) utilizando 187 sueros obtenidos previamente en conejo (SERUNAM) contra los antígenos somáticos y 53 contra los flagelares del esquema antigénico de *E. coli*. Mediante un dispensador automático se distribuyeron 50 μL de las diluciones (1:100) de cada antisuero en microplacas de 96 pozos con fondo en U (Nunc), posteriormente se agregaron 50 μL del antígeno correspondiente para llevar a cabo las reacciones de aglutinación. Las placas se incubaron a 50 °C durante 18-24 h para la identificación del antígeno somático y 2 h para el antígeno flagelar, después de la incubación se registraron las reacciones de aglutinación. Por la presencia de reacciones cruzadas de algunos antígenos con varios antisueros se procedió a la titulación de los mismos. La titulación de los antisueros se realizó mediante el procedimiento anteriormente descrito pero con diluciones seriadas al doble de los antisueros que presentaron reacciones cruzadas (1:100-1:12,800). En los casos en que seguían presentándose reacciones cruzadas se realizó una evaluación de la aglutinación con los antisueros específicos (1:50-1:6,400). La identificación del antígeno somático y flagelar se definió a partir del suero que presentó un título similar al del suero con su antígeno homólogo.

6.6 Extracción de ADN. Se efectuó utilizando el método de ebullición propuesto por Islam (67). Los cultivos identificados como *E. coli* O111 se crecieron en caldo Luria-Bertain (LB, Invitrogen) a 37 °C durante 18-24 h, del crecimiento bacteriano en LB se tomó 1 mL y se centrifugó a 13,000 rpm durante 5 min en microtubos, se decantó el

sobrenadante y se eliminó con papel absorbente. Se adicionaron 200 μL de agua ultrapura y con agitación vigorosa en vórtex el pellet se resuspendió, los microtubos con la suspensión resultante se sometieron a ebullición durante 10 min y finalizado el tratamiento térmico se colocaron en hielo durante 5 min. En seguida se agitaron nuevamente en vórtex y se centrifugaron a 13,000 rpm durante 10 min, se tomaron 100 μL del sobrenadante y se conservó en congelación en microtubos hasta su uso.

6.7 Determinación de factores de virulencia y grupos filogenéticos mediante PCR.

Se preparó un coctel de reacción que contenía soluciones amortiguadoras, dNTP's, Taq polimerasa, agua ultrapura (Invitrogen), iniciadores y ADN tanto de las muestras como el de un control positivo (Apéndice A1). Todas las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un volumen de 25 μL con 1.0 μL de ADN; tanto los iniciadores como las condiciones de amplificación empleadas fueron las reportadas previamente en la determinación de grupos filogenéticos y factores de virulencia del patotipo EPEC y STEC, en los que se incluyen principalmente los genes: *eae*, *eafA*, *bfp*, *perA*, *espC*, *espP*, *sxt1* y *sxt2* (Apéndice A2 y A3). Mediante el método PCR cuádruplex y en algunos casos reacciones específicas para los grupos filogenéticos C y D, se analizó la presencia de los genes *arpA*, *chuA*, *yjaA* y un fragmento anónimo designado TspE4.C2, de acuerdo a la combinación de estos se estableció el grupo al que pertenecen los aislamientos de *E. coli* O111 (Figura 4).

6.7.1 Electroforesis en gel de agarosa. Para la resolución de los productos de amplificación de PCR (amplicones) se mezclaron 7.0 μL del coctel de reacción de PCR

con 2.0 μ L de azul de bromofenol, la suspensión anterior se distribuyó en pozos de un gel de agarosa inmerso en una cámara de electroforesis con amortiguador de Tris-Borato-EDTA (TBE) incluyendo un pozo con marcador de peso molecular (Quick-Load® 100 bp DNA Ladder, New England BioLabs®). La migración de los productos de reacción se llevó a cabo aplicando corriente de 100 V constantes durante 80 min, el gel de agarosa se tiñó con colorante Red gel (New England BioLabs®) y se visualizó con luz UV a través de un documentador de imágenes (Biosens SC805 Gel Imagine Systems).

6.8 Extracción del antígeno común de las enterobacterias (ECA). Se tomó como referencia la metodología reportada por Hojyo (74), las cepas de *E. coli* O111 del estudio y las cepas *Citrobacter freundii* (NCTC 9750), *Salmonella* Typhimurium LT2 (ATCC® 700720™), *S. Typhimurium*, *E. coli* O18ab:H14:K6 y *E. coli* O14:NM:K7 utilizadas como control se sembraron masivamente en cajas Petri con TSA y se incubaron a 37 °C durante 18-24 h. El crecimiento microbiano se removió con 10 mL de solución salina fisiológica y con asas de plástico desechables (Nunc), la suspensión bacteriana resultante (Tubo 4 del Nefelómetro de McFarland) se transfirió a tubos de plástico para centrifuga, en donde se sometió a calentamiento a 110 °C y 5 psi a vapor fluente durante 2 h. Después del calentamiento la suspensión se centrifugó por 15 min a 3,700 rpm, el sobrenadante se decantó y conservó en refrigeración hasta su uso.

6.8.1 Titulación del suero anti *E. coli* O14 mediante ensayos de hemaglutinación. Se usó como referencia la metodología empleada por Suzuki (74). Para la obtención de los eritrocitos de carnero se tomó 1.5 mL de sangre de carnero desfibrinada con solución de Alsever (Dibico) y por centrifugación se lavaron tres veces a 3,500 rpm

durante 5 min con solución salina fisiológica. Para la sensibilización de eritrocitos se tomó una alícuota de 200 μL de eritrocitos de carnero anteriormente lavados y se mezclaron (v/v) con ECA de las cepas utilizadas como control del ensayo; se incubaron en baño María a 37 °C durante 40 min. Los eritrocitos sensibilizados se lavaron tres veces para eliminar el exceso de ECA centrifugando la suspensión a 3,000 rpm por 3 min con solución salina fisiológica y finalmente la solución de eritrocitos sensibilizados se ajustó al 1.0 %.

Los ensayos de hemaglutinación se realizaron con diluciones seriadas (1:12.5-1:6400) del suero anti *E. coli* O14 en un volumen de 50 μL en microplacas de 96 pozos (Nunc). Se añadieron 15 μL de eritrocitos sensibilizados al 1.0 % (con ECA de cada una de las cepas de referencia) y se incubaron por 40 min a 37 °C, se tomó como título el recíproco de la última dilución que presentó aglutinación de los glóbulos rojos.

6.8.2 Determinación del contenido de ECA mediante ensayos de Inhibición de la hemaglutinación. Se usó la metodología reportada por Suzuki (75). En microplacas de 96 pozos (Nunc) se prepararon diluciones dobles seriadas del antígeno ECA tanto de las cepas *E. coli* O111 como de los controles en un volumen de 50 μL , desde una dilución 1:2 hasta 1:1024. Posteriormente se añadieron 50 μL de suero anti *E. coli* O14 (1:200) y las microplacas se incubaron durante 40 min a 37 °C.

Se lavaron glóbulos rojos de carnero tres veces mediante centrifugación con solución salina fisiológica y se sensibilizaron (v/v) con ECA de *Salmonella* Typhimurium incubándose 40 min a 37 °C. Los eritrocitos sensibilizados se lavaron tres veces para eliminar el exceso de ECA y se ajustaron al 1.0 %, después de la incubación se

agregaron 15 μL de estos eritrocitos y se incubaron bajo las mismas condiciones de la hemaglutinación. Se realizó la lectura y se tomó como título de inhibición de hemaglutinación el recíproco de la última dilución que presentara aglutinación de los eritrocitos.

6.9 Determinación de patrones de resistencia a antimicrobianos mediante pruebas de difusión en agar (Kirby-Bauer). Se empleó como referencia la metodología reportada en la décima edición del manual del Comité Nacional de Normas de Laboratorios Clínicos (CLSI) (76). Las cepas de *E. coli* O111 y *E. coli* ATCC® 25922™ (utilizada como control) se sembraron en placas con agar nutritivo (TSA) y se incubaron a 37 °C durante 24 h, se tomó un inóculo del crecimiento para preparar una suspensión bacteriana en tubos con 1.8 mL de solución salina fisiológica estéril y se ajustó al tubo 0.5 del nefelómetro de McFarland (1.5×10^8 bacterias/mL). En un tiempo no mayor a 15 min después del ajuste, se sumergió un hisopo de algodón estéril, se escurrió el exceso de la suspensión girando el hisopo en las paredes del tubo y se sembraron masivamente dos placas con agar Mueller-Hinton (MH, Bioxon) por cada una de las cepas. Los sensidiscos de cada antimicrobiano (BBL Sensi Disc BD®) se colocaron en las placas con pinzas estériles a una distancia no menor a 24 mm entre ellos.

Se evaluó la sensibilidad a los siguientes antimicrobianos; cefoxitina (FOX) 30 μg (cefalosporinas 2 generación), ceftriaxona (CRO) 30 μg , ceftazidima (CAZ) 30 μg , cefotaxima (CTX) 30 μg (cefalosporinas 3ª generación), cefepima (FEP) 30 μg (cefalosporinas 4ª generación), ofloxacina (OFX) 5 μg , norfloxacina 10 μg (NOR), ácido

nalidíxico (NA) 30 μg , ciprofloxacina (CIP) 5 μg , imipinem (IMP) 10 μg , aztreonam (ATM) 30 μg trimetoprim/sulfametoxazol (STX) 1.25/23.73 μg y tetraciclina (TE) 30 μg . Una vez preparadas las placas con los antimicrobianos se incubaron a 37 °C durante 18-24h, posteriormente con un vernier se tomó la medida del diámetro de los halos de inhibición y se registraron los datos. Se consideraron los diámetros de inhibición reportados por la CLSI para interpretar y definir como resistente, intermedio o sensible la respuesta a cada antimicrobiano (Apéndice A4).

6.10 Análisis estadístico. Los resultados obtenidos en las determinaciones se analizaron mediante pruebas de hipótesis de proporciones con la prueba Chi^2 (χ^2) usando un nivel de significancia de 0.05. Las pruebas se efectuaron en Epi Info™ 6, un programa de dominio público diseñado por el Centro para el Control de Enfermedades de Atlanta (CDC).

La Figura 5 ilustra de manera breve el procedimiento experimental implementado en esta investigación.

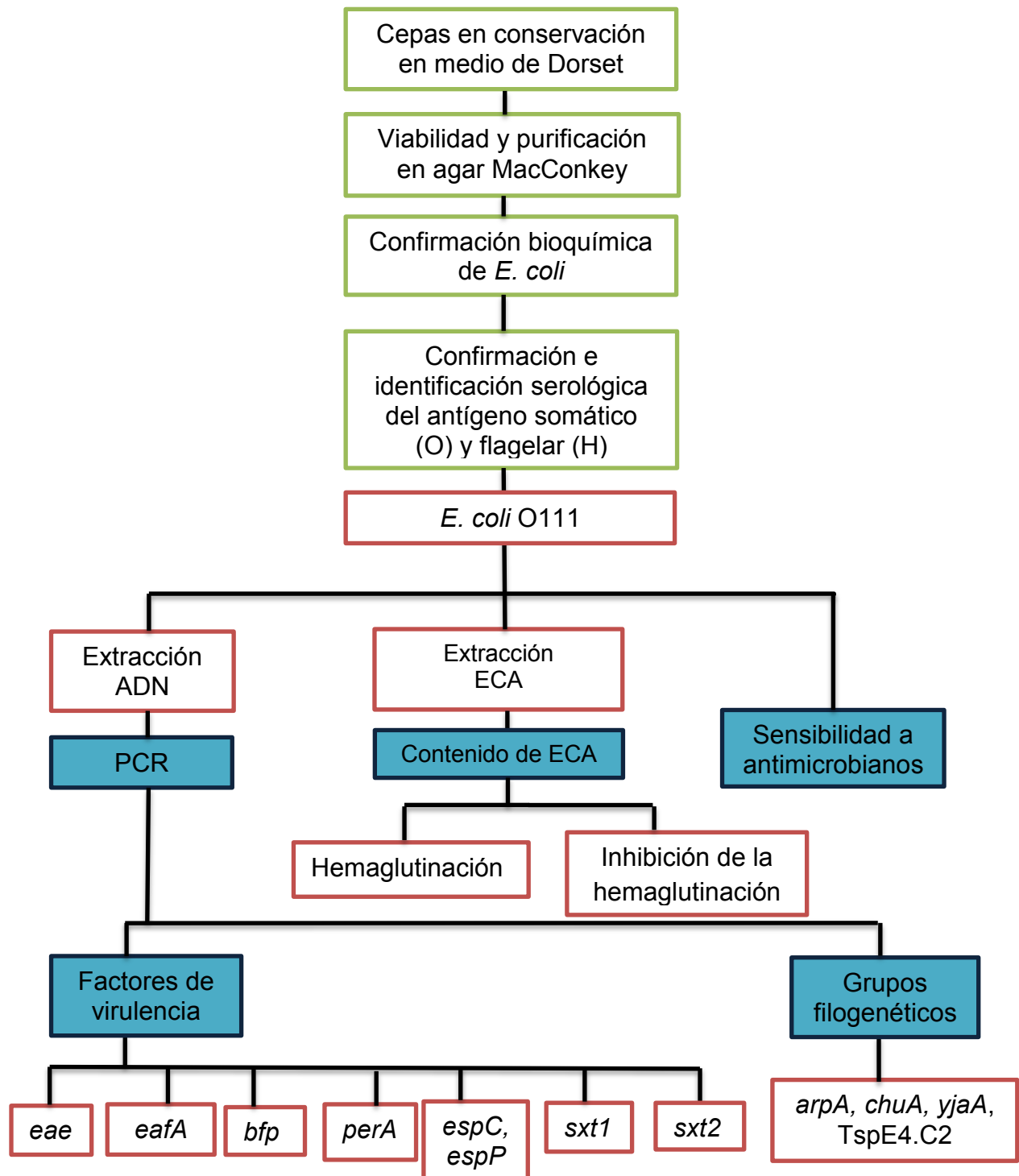


Figura 5. Metodología experimental empleada

7. RESULTADOS

7.1 Origen de las cepas de *E. coli*. En este estudio se incluyeron 77 cepas aisladas de 61 casos de diarrea en niños menores de cinco años de cinco zonas geográficas que incluyeron México, Tailandia, Brasil, Egipto y Bangladesh durante el periodo de 1986 a 2009 (Cuadro 1). De 61 niños incluidos en el estudio, 34 (56 %) fueron de México y 27 (44 %) de los cuatro países mencionados. De 34 niños de México, 11 (32 %) fueron de una cohorte de 72 niños de una zona rural en el Estado de Morelos, 13 (38 %) de Centro Médico Nacional del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) y 10 (30 %) del Instituto Nacional de Pediatría (INP), ambas instituciones en la Ciudad de México. De estos tres grupos de niños se obtuvieron 50 cepas; de estas 12 (24 %) se aislaron en 1986, 26 (52 %) en 1987, 4 (8 %) en 1994, 1 (2 %) en 1996, 5 (10 %) en 2000, 1 (2 %) en 2002 y 1 (2 %) en 2003.

Cuadro 1. *E. coli* aislada de casos de diarrea infantil en cuatro áreas geográficas

País	Localidad	Número de niños	Número de cepas
		N (%)	
México	Morelos	11 (18)	16 (21)
	INP	13 (21)	24 (31)
	IMSS	10 (16)	10 (13)
Tailandia		13 (21)	13 (17)
Brasil		4 (7)	4 (5)
Egipto		5 (8)	5 (6)
Bangladesh		5 (8)	5 (6)
Total		61	77

Con relación a los 27 niños de los cuatro países, se obtuvo igual número de cepas; 13 (48 %) corresponden a Tailandia (1995), 4 (15 %) a Brasil (1996), 5 (18 %) a Egipto (1996 y 1999) y 5 (18 %) a Bangladesh (2009).

Además para comparación entre aislamientos humanos y animales se incluyeron 19 cepas aisladas de vacas lecheras con un episodio de diarrea de un hato del Estado de México, de estas cepas 3/19 (16 %) se obtuvieron en 1995 y 16/19 (84 %) en 1997.

7.2 Identificación bioquímica. Las 96 cepas analizadas mostraron un perfil bioquímico característico de *E. coli* (77), con o sin movilidad, fermentaron glucosa y lactosa, mostraron producción de indol y ácido de la fermentación de glucosa. Además, carecieron de la producción de ureasa, acetil-metilcarbinol (Voges-Proskauer), y ácido sulfhídrico (H₂S), no utilizaron el malonato ni el citrato como fuentes de carbono, y no mostraron desaminación de la fenilalanina ni oxidación del gluconato de sodio.

7.3 Identificación de serotipos de *E. coli* O111. En los ensayos de tipificación serológica se confirmó que 96 cepas de este estudio pertenecen al serogrupo O111, identificándose seis diferentes serotipos los cuales fueron: O111ab:NM 33 (34 %), O111ac:NM 32 (33 %), O111ab:H12 10 (10 %), O111ab:H2 10 (10%), O111ab:H19 8 (8 %) y O111ac:H8 3 (3 %). Específicamente por área geográfica, en el grupo de cepas aisladas de casos de diarrea infantil en México se registraron 32 (64%) cepas del serotipo O111ab:NM, 10 (20 %) O111ab:H2, 4 (8 %) O111ac:NM, 3 (6 %) O111ab:H12 y una (2 %) O111ac:H8 (Cuadro 2).

Cuadro 2. Serotipos de *E. coli* O111 aislada de casos de diarrea infantil en México.

Año	Serotipo	Lugar	No. de cepas (%)
1986	O111ab:NM	Morelos	9 (18)
	O111ac:NM		1 (2)
	O111ab:H2		2 (4)
1987	O111ab:NM		4 (8)
1987	O111ab:NM	INP	10 (20)
	O111ab:H2		7 (14)
2000	O111ab:NM	IMSS	2 (4)
	O111ab:H2		1 (2)
1987	O111ab:NM	INP	3 (6)
	O111ac:NM		1 (2)
	O111ab:H12		1 (2)
1994	O111ab:NM		2 (4)
1994	O111ab:NM	IMSS	1 (2)
	O111ab:H12		1 (2)
1996	O111ab:H12		1 (2)
2000	O111ab:NM		1 (2)
	O111ac:NM		1 (2)
2002	O111ac:NM		1 (2)
2003	O111ac:H8		1 (2)
Total			50 (100)

Respecto a las cepas de *E. coli* de casos de diarrea infantil del extranjero, a diferencia de las cepas de México el serotipo prevalente fue el O111ac:NM con 9 cepas (33 %), 8 (30 %) O111ab:H19, 7 (26 %) O111ab:H12, 2 (7 %) O111ac:H8 (7 %) y una (4 %) O111ab:NM (Cuadro 3).

Cuadro 3. Serotipos de *E. coli* O111 aislada de casos de diarrea infantil en diferentes países

País	Año	Serotipo	No. de cepas (%)
Tailandia	1995	O111ac:NM	4 (15)
		O111ac:NM	1 (4)
		O111ac:H8	1 (4)
		O111ab:H19	7 (26)
Brasil	1996	O111ab:H12	4 (15)
Egipto	1996	O111ac:H8	1 (4)
		O111ab:H12	1 (4)
	1999	O111ab:NM	1 (4)
		O111ab:H12	2 (7)
Bangladesh	2009	O111ac:NM	3 (11)
		O111ac:NM	1 (4)
		O111ab:H19	1 (4)
Total			27 (100)

7.4. Genes de virulencia y subtipos EPEC (tEPEC y aEPEC) en *E. coli* O111 aislada de casos de diarrea infantil en México y otros países. El análisis de la presencia de genes en las cepas de México mostró lo siguiente: los genes *eae* (Figura 6), *eaf* (Figura 7), *bfp* (Figura 8) y *perA*, fueron identificados en 50 (100 %), 36 (72 %) y 14 (28%) cepas respectivamente (Cuadro 4), haciendo notar que en este tipo de cepas no se detectó la presencia de los genes de las serina proteasas autotransportadoras *espC* y *espP*.

Para determinar el subtipo de EPEC de las cepas se tomó en cuenta la presencia de los genes *eae*, *eaf* y *bfp*, para el caso del subtipo de tEPEC, mientras que para el subtipo aEPEC solo la presencia del gene *eae*. Primeramente se estableció de manera global el subtipo EPEC de las cepas de *E. coli* del estudio, con este análisis se determinó que 41 (53 %) de las 77 cepas de *E. coli* O111 aislada de casos de diarrea infantil se agruparon en el subtipo aEPEC y 36 (47 %) en el subtipo tEPEC, sin encontrarse diferencias significativa entre ambas proporciones, $p > 0.05$.

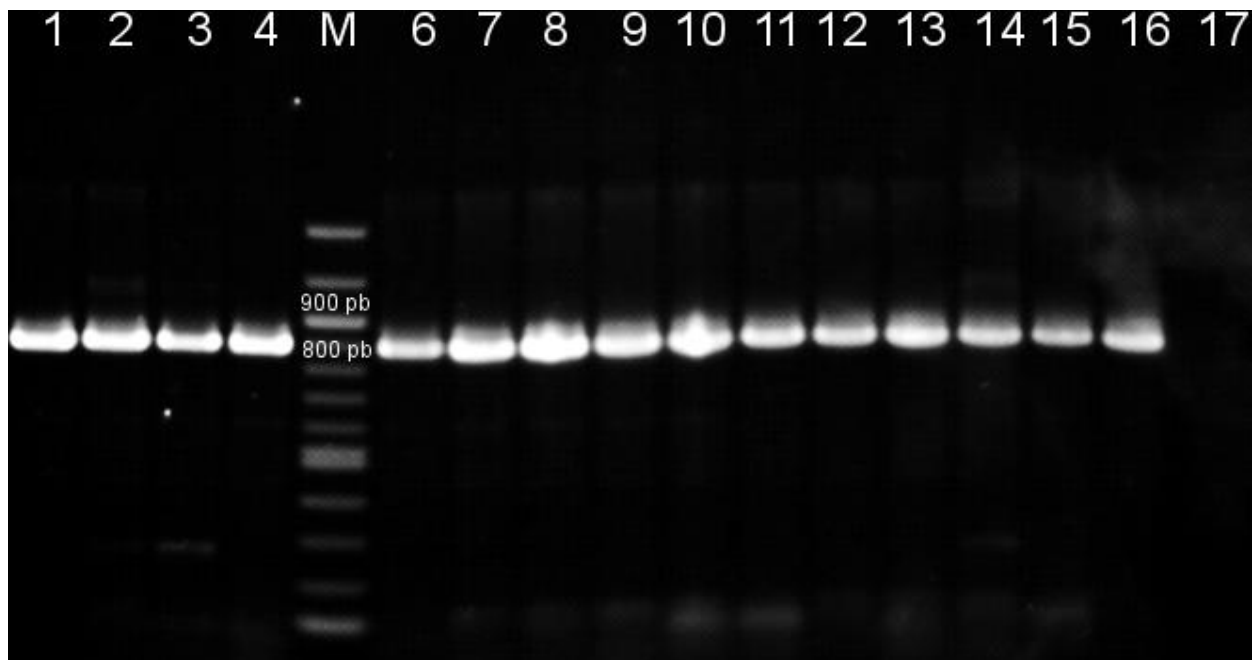


Figura 6. Electroferograma de productos amplificados del gen *eae* de *E. coli* O111 en gel de agarosa al 1.0 %. Carriles 1-4, aislamientos de casos de diarrea infantil; carriles 6-11, 13-17, aislamientos de bovinos; carriles 12, 17 y M; control positivo (*E. coli* O127:H6), control negativo de reactivos (sin ADN) y marcador de peso molecular (100 pb).

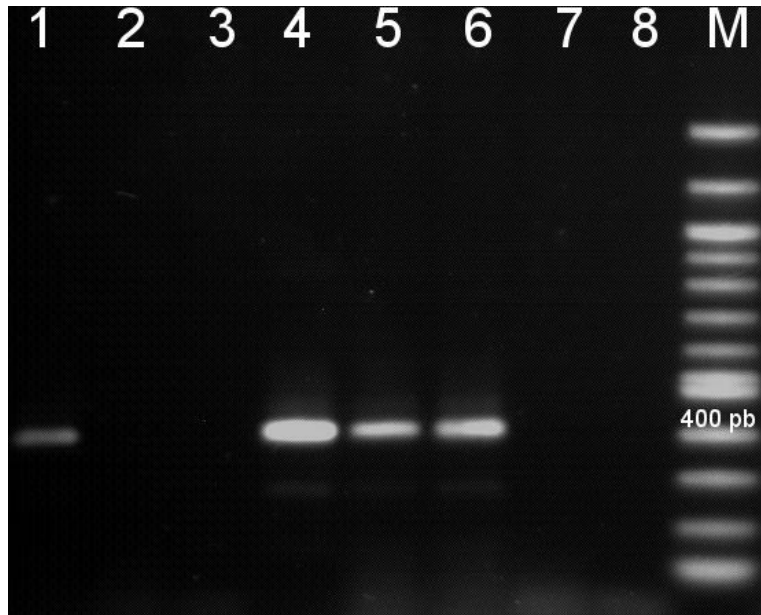


Figura 7. Electroferograma de productos amplificados del gen *eafA* de *E. coli* O111 en gel de agarosa al 1.2 %. Carriles 1-3, 5-6. Aislamientos de casos de diarrea infantil; carril 7, aislamiento de bovinos; carril 4, 8 y M; control positivo (*E. coli* O127:H6), control negativo de reactivos (sin ADN) y marcador de peso molecular (100 pb).

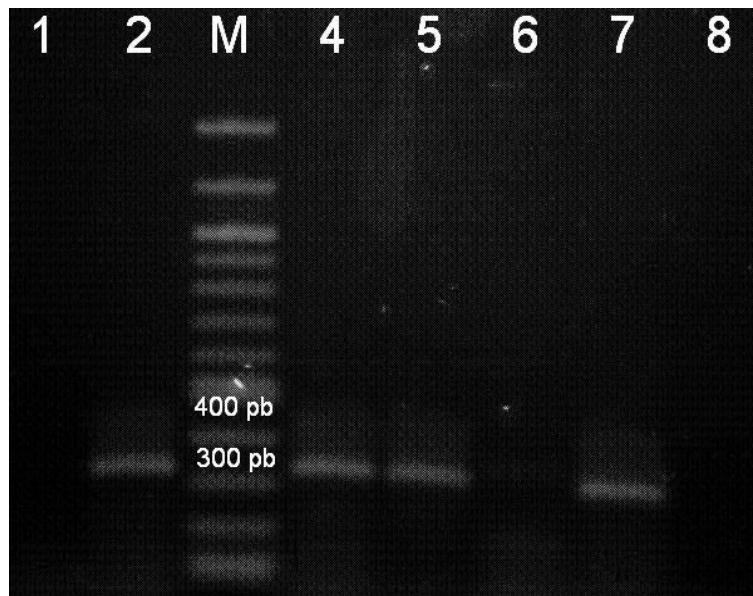


Figura 8. Electroferograma de productos amplificados del gen *bfp* de *E. coli* O111 en gel de agarosa al 1.2 %. Carriles 1, 2, 4, 6, 7, aislamientos de casos de diarrea infantil; carriles 5, 8 y M; control positivo (*E. coli* O127:H6), control negativo de reactivos (sin ADN) y marcador de peso molecular (100 pb).

Cuadro 4. Caracterización genotípica de *E. coli* O111 aislada de casos de diarrea infantil en México

Año	Serotipo	Lugar	No. de cepas (%)	Genotipo				Subtipo EPEC
				<i>eae</i>	<i>eaf</i>	<i>bfp</i>	<i>perA</i>	
				N (%)				
1986	O111ab:NM	Morelos	9 (18)	+	+	+	+	Típica 36 (72)
	O111ac:NM		1 (2)	+	+	+	+	
	O111ab:H2		2 (4)	+	+	+	+	
1987	O111ab:NM		4 (8)	+	+	+	+	
1987	O111ab:NM	INP	10 (20)	+	+	+	+	
	O111ab:H2		7 (14)	+	+	+	+	
2000	O111ab:NM	IMSS	2 (4)	+	+	+	+	
	O111ab:H2		1 (2)	+	+	+	+	
1987	O111ab:NM	INP	3 (6)	+	-	-	-	Atípica 14 (28)
	O111ac:NM		1 (2)	+	-	-	-	
	O111ab:H12		1 (2)	+	-	-	-	
1994	O111ab:NM		2 (4)	+	-	-	-	
1994	O111ab:NM	IMSS	1 (2)	+	-	-	-	
	O111ab:H12		1 (4)	+	-	-	-	
1996	O111ab:H12		1 (2)	+	-	-	-	
2000	O111ab:NM		1 (2)	+	-	-	-	
	O111ac:NM		1 (2)	+	-	-	-	
2002	O111ac:NM		1 (2)	+	-	-	-	
2003	O111ac:H8		1 (2)	+	-	-	-	
Total			50 (100)	50 (100)	36 (72)	36 (72)	36 (72)	

Con el criterio previamente mencionado para la designación del subtipo de EPEC, el análisis mostró que en las cepas de México, 36 (72 %) cepas fueron tEPEC y 14 (28 %) fueron aEPEC, encontrándose diferencia estadística significativa, $p < 0.05$ (Cuadro 4). Una observación interesante de este análisis fue que en las cepas de la zona rural en el Estado de Morelos prevalecieron las del subtipo tEPEC. En contraste en las cepas del IMSS e INP se determinaron ambos subtipos EPEC; en el IMSS 7 (14 %) y 8 (16 %) fueron tEPEC y aEPEC, sin encontrarse diferencia significativa, $p > 0.05$; mientras que en las del INP se identificaron 10 (20 %) y 7 (14 %) respectivamente, sin diferencia estadística significativa, $p > 0.05$.

Por lo que respecta a las cepas del extranjero, las 27 (100 %) presentaron el gen *eae*, en estas cepas no se detectaron los genes de las serinas proteasas *espC* y *espP*. Estas cepas se clasificaron pertenecientes principalmente al subtipo aEPEC (Cuadro 5).

Cuadro 5. Caracterización genotípica de *E. coli* O111 aislada de casos de diarrea infantil en otros países

País	Año	Serotipo	No. de cepas (%)	Genotipo				Subtipo EPEC
				<i>eae</i>	<i>eaf</i>	<i>bfp</i>	<i>perA</i>	
				N (%)				
Tailandia	1995	O111ac:NM	4 (15)	+	-	-	-	Atípica 27 (100)
		O111ac:NM	1 (4)	+	-	-	-	
		O111ac:H8	1 (4)	+	-	-	-	
		O111ab:H19	7 (26)	+	-	-	-	
Brasil	1996	O111ab:H12	4 (15)	+	-	-	-	
Egipto	1996	O111ac:H8	1 (4)	+	-	-	-	
		O111ab:H12	1 (4)	+	-	-	-	
	1999	O111ab:NM	1 (4)	+	-	-	-	
		O111ab:H12	2 (7)	+	-	-	-	
Bangladesh	2009	O111ac:NM	3 (11)	+	-	-	-	
		O111ac:NM	1 (4)	+	-	-	-	
		O111ab:H19	1 (4)	+	-	-	-	
Total			27 (100)	27(100)	27 (100)	-	-	

7.5 Grupos filogenéticos y subtipos EPEC en *E. coli* O111 aislada de casos de diarrea infantil en México y otros países. Para establecer los grupos filogenéticos de las cepas de *E. coli* del estudio se utilizó un esquema de flujo de acuerdo a la presencia de los genes *arpA*, *chuA*, *yjaA* genes y del fragmento TSPE4.C2 (Figura 4) determinado mediante PCR cuádruplex (Figura 9), en algunos casos se realizaron reacciones específicas para los grupos C y D.

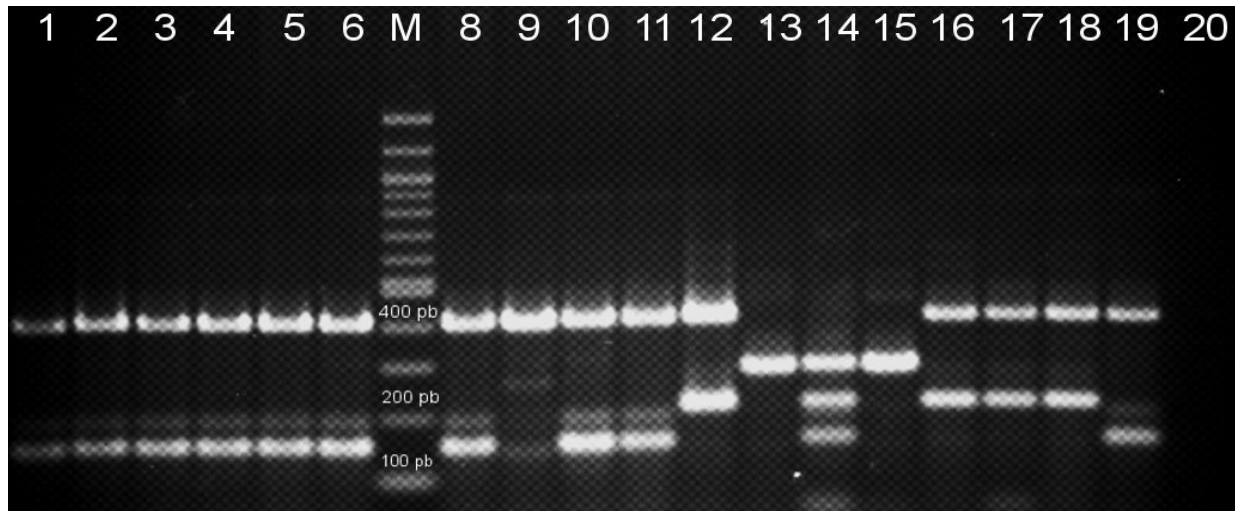


Figura 9. Electroferograma de productos amplificados de los genes de filogenia *arpA*, *chuA*, *yjaA* y TspE4.C2 de *E. coli* O111 en gel de agarosa al 2.0 %. Carriles 1-6, 8-13, 15, 16, 18, 19, aislamientos de casos de diarrea infantil; carriles 14, 17, 20 y M; control positivo *chuA*, *yjaA* y TspE4.C2 (UPEC), control positivo *arpA* y *yjaA* (*E. coli* K12)

La distribución de las cepas aisladas en México en los grupos filogenéticos fue la siguiente: 39 cepas B1 (78 %), 4 cepas A (8 %), 4 cepas F (8 %) y 3 cepas ND (6 %) (Cuadro 6). Con respecto a los aislamientos de casos de diarrea infantil de los cuatro países del extranjero; 18 cepas B1 (66 %), 8 cepas A (30 %), 1 cepa D (4 %) (Cuadro 6). La relación entre los grupos filogenéticos y el subtipo EPEC mostró que el grupo B1 se determinó en el 94 % de aislamientos tEPEC y en el 56 % de aEPEC, el grupo D se determinó en el 2 % aEPEC. El grupo A (30 %) únicamente se determinó en aislamientos del subtipo aEPEC (Cuadro 6).

Cuadro 6. Distribución de grupos filogenéticos en cepas tEPEC y aEPEC aisladas de casos de diarrea infantil en México y otros países

País	Grupo Filogenético						
	EPEC típicas (n=36)		EPEC atípicas (n=41)				
	N (%)						
	B1	ND	A	B1	D	F	ND
México	34 (94)	2 (6)	4 (10)	5 (12)	-	4 (10)	1 (2)
Tailandia	-	-	-	13 (32)	-	-	-
Brasil	-	-	4 (10)	-	-	-	-
Egipto	-	-	4 (10)	1 (2)	-	-	-
Bangladesh	-	-	-	4 (10)	1 (2)	-	-
Total	34 (94)	2 (6)	12 (30)	23 (56)	1 (2)	4 (10)	1 (2)

7.6 Subtipos de EPEC y grupos filogenéticos en *E. coli* O111 aislada de bovinos.

Por lo que respecta al análisis de las 19 cepas de *E. coli* de ganado vacuno se identificó principalmente el serotipo O111ac:NM (Cuadro 7). De los 19 aislamientos de bovinos, 3 (16 %) se clasificaron con el subtipo aEPEC, mientras que 16 (84 %) se identificaron con el patotipo STEC y debido a la presencia del gen *eae* en combinación con el gen *stx1* pueden clasificarse en el subtipo EHEC (Cuadro 7). En estas cepas no se identificaron los genes *eaf*, *bfp* y *perA*, y solo dos (2 %) cepas presentaron los genes de las serina proteasas autotransportadoras *espC* y *espP* (Figura 10). El análisis de grupos filogenéticos mostró que las 19 cepas de *E. coli* se colocaron en el grupo B1.

Cuadro 7. Caracterización genotípica de *E. coli* O111 aislada de ganado bovino

Localidad	Año	Serotipo	No. Cepas (%)	Genes de virulencia				Grupo filogenético	Subtipo
				<i>eae</i>	<i>eaf</i>	<i>bfp</i>	<i>stx1</i>		
				N (%)					
Estado de México	1995	O111ac:NM	1 (5)	+	-	-	-	B1	atípica (16)
		O111ac:NM*	2 (10)	+	-	-	-		
	1997	O111ac:NM	16 (85)	+	-	-	+		16 (84)
		Total (%)	19 (100)	19 (100)	-	-	16 (84)	19 (100)	

**espC*⁺

†Por la presencia del gen *eae* pueden clasificarse como EHEC.

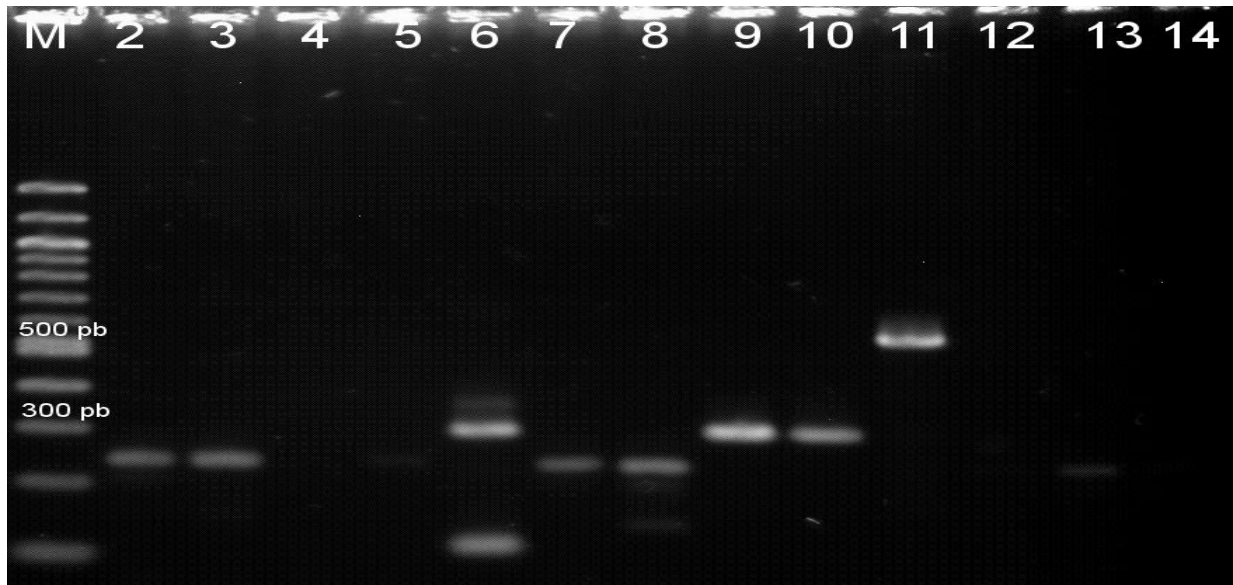


Figura 10. Electroferograma de productos amplificados de los genes *espC* y *espP* de *E. coli* O111 en gel de agarosa al 1.2 %. Carriles 2-5, 7-10, 12, 13, aislamientos de bovinos; carriles 6, 11, 14 y M; control positivo *espC* (*E. coli* O127:H6), control positivo *espP* (*E. coli* O157:H7), control negativo de reactivos (sin ADN) y marcador de peso molecular (100 pb).

7.7 Contenido de ECA en *E. coli* O111 aislada de casos de diarrea infantil en México y otros países. El 56 % de las cepas de México registró el título 64 en los ensayos de hemaglutinación, 38 % en el título 32; no se encontró diferencia significativa entre estas proporciones, $p>0.05$ (Cuadro 8). La situación contraria se presentó en los aislamientos del extranjero, el 56 % registró el título 32 y 29 % el título 64, determinándose que no existe diferencia significativa entre las proporciones obtenidas para estos títulos ($p>0.05$). Además, en este grupo se registró el título más alto alcanzado para esta determinación; 128 con una frecuencia del 11 % (Cuadro 8). Los resultados en conjunto indican que no existe diferencia significativa entre las proporciones de aislamientos de *E. coli* O111 de casos de diarrea infantil con los títulos 32 (44 %) y 64 (47 %) en la determinación del contenido de ECA mediante ensayos de inhibición de la hemaglutinación ($p>0.05$).

Cuadro 8. Contenido de ECA en *E. coli* O111 aislada de casos de diarrea infantil en México y el extranjero por el método de inhibición de la hemaglutinación

País	Serotipo	Título			
		16	32	64	128
		N (%)			
México (n=50)	O111ab:NM	2 (4)	12 (24)	18 (36)	-
	O111ac:NM	1 (2)	3 (6)	-	-
	O111ab:H2	-	3 (6)	7 (14)	-
	O111ab:H12	-	-	3 (6)	-
	O111ac:H8	-	1 (2)	-	-
	Total		3 (6)	19 (38)	28 (56)
Tailandia Brasil	O111ac:NM	1 (4)	4 (15)	-	-
	O111ac:H8	-	1 (4)	-	-
	O111ab:H19	-	5 (19)	2 (7)	-
	O111ab:H12	-	-	2 (7)	2 (7)
	O111ac:H8	-	-	-	1 (4)
Egipto	O111ab:H12	-	2 (7)	1 (4)	-
	O111ab:NM	-	-	1 (4)	-
Bangladesh (n=27)	O111ac:NM	-	3 (11)	1 (4)	-
	O111ab:H19	-	-	1 (4)	-
	Total	1 (4)	15 (56)	8 (29)	3 (11)
Total (n=77)		4 (5)	34 (44)	36 (47)	3 (4)

7.8 Contenido de ECA en *E. coli* O111 aislada de bovinos. El 63 % de estos aislamientos registró el título 64, el restante 37 % el título 32; no se determinó diferencia significativa entre estas proporciones, $p>0.05$ (Cuadro 9).

Cuadro 9. Contenido de ECA en cepas de *E. coli* O111 aislada de bovinos por el método de inhibición de la hemaglutinación

Localidad	Serotipo	Título	
		32	64
		N (%)	
Toluca, México	O111ac:NM	7	12
	Total	7 (37)	12 (63)

7.9 Sensibilidad a antimicrobianos. En los 96 aislamientos de *E. coli* O111 se observó sensibilidad a los siguientes antimicrobianos: CRO, CAZ, CTX, FEP OFX, NOR, NA, CIP, IMP y ATM. Sin embargo, 29 (30%) de 96 cepas mostró resistencia a un antimicrobiano y el 21% (6/29) mostró multiresistencia. Los aislamientos de México fueron resistentes a TE (22 %), TE-STX (6 %), mientras que las del extranjero fueron resistentes a STX (4 %) y TE-STX (7 %). El 53 % de los aislamientos obtenidos en bovinos fue resistente a TE y 11 % a TE-FOX (Figura 11).

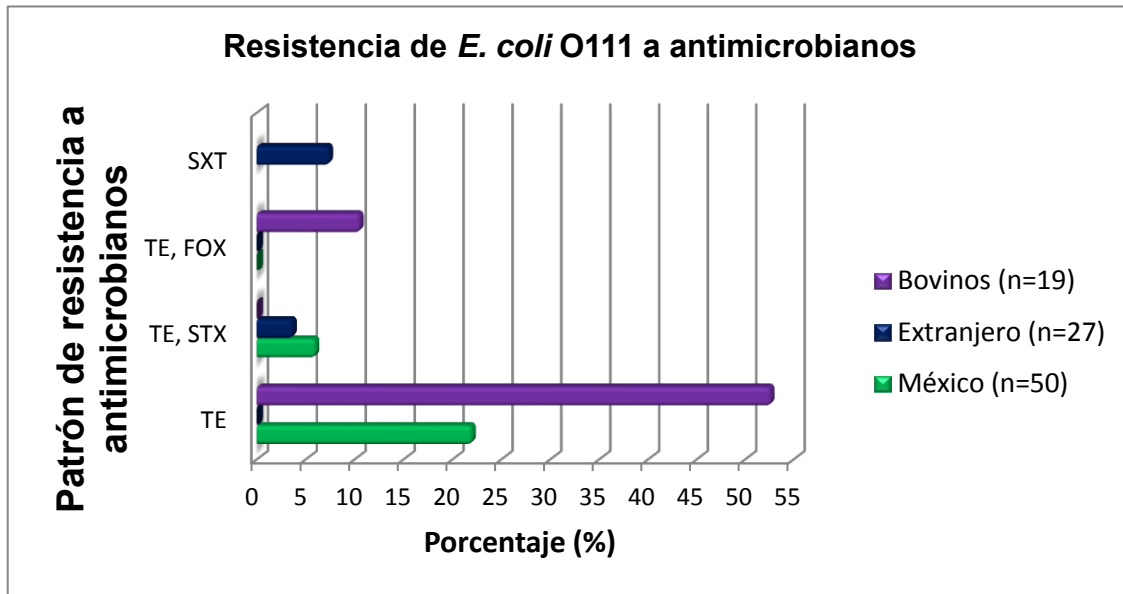


Figura 11. Patrones de resistencia en *E. coli* O111 aislada de bovinos y casos de diarrea infantil en México y en el extranjero

8. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

En la actualidad los casos de diarrea infantil relacionada con cepas EPEC atípicas se han incrementado a nivel mundial incluyendo tanto a países desarrollados como en proceso de desarrollo (78, 79) y afectando a poblaciones con menores recursos como también a las de ingresos económicos altos (80, 81). En este estudio se identificaron cepas de los serotipos de EPEC relacionadas con casos de diarrea infantil de cinco países; México, Tailandia, Brasil, Egipto y Bangladesh.

El análisis de la distribución de los serotipos mostró la identificación de seis serotipos (O111ab:NM, O111ac:NM, O111ab:H12, O111ab:H2, O111ab:H19 y O111ac:H8) de los cuales, O111ab:H2 y O111:H12 se clasificaron en el subtipo tEPEC lo cual es consistente con lo reportado por Trabulsi (25). Es importante hacer notar que las cepas O111ab:H19 y O111ac:H8 fueron aisladas de casos de diarrea infantil de los cuatro países del extranjero, su clasificación como aEPEC contrasta con la información publicada previamente para estos serotipos. El serotipo O111ab:H19 fue identificado por primera vez como un serotipo STEC aislado de bovinos con diarrea (82), mientras que en Texas, Estados Unidos el serotipo STEC O111ac:H8 se relacionó con un brote de CH (83). El resto de los serotipos *E. coli* O111 se han asociado con casos de diarrea infantil en investigaciones realizadas en distintos países (84-87)

En el caso del serogrupo O111 de *E. coli* está compuesto de determinantes antigénicos (carbohidratos) que permiten dividirlos en sub-variedades, estos son designados “a” y “b” cuando son comunes, mientras que los no comunes son “c”, de acuerdo a esto el serogrupo O111 se ha dividido en dos sub-variedades, O111ab y O111ac (88). Aunque

el reconocimiento de las sub-variedades antigénicas de EPEC no se realiza en la mayoría de los laboratorios que llevan a cabo la caracterización de cepas DEC, en el presente estudio se logró identificar los determinantes antigénicos en todas las cepas. Observando que la sub-variedad O111ac se encontró tanto en cepas de casos de diarrea infantil de México como en las cepas del ganado. Este hecho tiene correlación con lo reportado por Ewing (88) en un estudio en donde cepas O111 aisladas de humanos se asociaron principalmente con la sub-variedad ab y las de origen animal con ac.

Por otra parte en el análisis de prevalencia de los subtipos EPEC en las 77 cepas de *E. coli* O111 de casos de diarrea infantil en México y los cuatro países fueron similares, tEPEC (53 %) y aEPEC (47 %) sin observar diferencias significativas ($p > 0.05$). Los datos epidemiológicos más recientes sugieren que aEPEC debe considerarse como un patógeno emergente, incluso se ha propuesto que debido a su creciente detección tanto en zonas desarrolladas como en las que se encuentran en vías de desarrollo ha llegado a desplazar a las cepas tEPEC en las últimas décadas (89). La prevalencia de aEPEC en los aislamientos de otros países confirma lo anteriormente señalado y coincide con estudios realizados en Brasil y Tailandia (90-92). Sin embargo, la mayor proporción de cepas tEPEC en los aislamientos de México ($p < 0.05$), contrasta con lo reportado por Estrada-García (93) en un estudio realizado en niños mexicanos hospitalizados a causa de diarrea entre los años 2000-2004. Un dato importante a considerar en este análisis es que nuestro estudio incluye cepas obtenidas desde 1986 hasta 2003, lo cual podría ser el origen de estas diferencias. Curiosamente durante este análisis se observó que la mayoría de los aislamientos de los años 80s fueron tEPEC, mientras que las obtenidos a partir de los 90s fueron principalmente aEPEC. Una observación interesante fue que

las cepas tEPEC fueron aisladas en 1986-1987 en un estudio epidemiológico longitudinal realizado por Cravioto (94) a una cohorte de 72 niños de Tierra Blanca, una comunidad rural del estado de Morelos, lo cual contrasta con las cepas aisladas en el IMSS e INP en donde se identificaron tanto cepas tEPEC como aEPEC, es decir coexisten.

En nuestras cepas O111 de bovinos se identificó el patotipo STEC (84 %), lo que indica que el ganado es una fuente importante de cepas STEC O111 y que representan un alto riesgo de ser transmitidos entre los hatos, además de la contaminación de los productos derivados del ganado para consumo humano. Por otra parte el subtipo atípico de EPEC (16 %) también identificado en estos animales confirma que estos son un importante reservorio de ambos tipos de DEC, aEPEC y STEC (25).

Cabe destacar que en las cepas del estudio se determinó una baja frecuencia de identificación de los genes *espC* y *espP* (Serina proteasas autotransportadas, *espC* y *espP*), este hallazgo coincide con lo reportado por diferentes autores en estudios donde se analizó la presencia de estos genes en ambos subtipos EPEC aislada de niños con diarrea (72, 95). El haber encontrado el gen *espC* sólo en cepas del patotipo EPEC, tiene relación con lo propuesto por Mellies (96), ya que este factor se considera específico de este patotipo. Por otra parte, pese a que se ha demostrado que la proteína EspC posee actividad enterotóxica y citotóxica (97), se sabe que no está involucrada en la formación de la lesión A/E por lo que desempeña la función de un factor de virulencia accesorio en la patogénesis de EPEC sólo en algunas cepas (98), lo cual explica que no esté presente en todas las cepas que pertenecen a este patotipo. En general, la presencia de *espP* está relacionada estrechamente con STEC y aEPEC, en particular se ha asociado con aislamientos de ganado (99). En un estudio realizado

por Bugarel en 2011 (100) este gen (*espP*) se encontró en 1.4 % de cepas tEPEC, 11.1 % en aEPEC y 57.8% STEC. Las frecuencias en las que ha sido reportado en aislamientos de ganado bovino son variables (24-100%) (99). En nuestro estudio ninguno de los aislamientos aEPEC y STEC O111 presentó dicho gen, lo cual concuerda con la baja frecuencia hallada por Brunder (100) en cepas de este serotipo. Estos hallazgos confirman que otros serogrupos STEC como O157:H7, O26:H11/NM y O145:H25/H28/NM poseen la mayor prevalencia (102, 103).

Los hallazgos de subtipos de EPEC dieron lugar a realizar un análisis para conocer los grupos filogenéticos en los cuales se ubicaban las cepas del estudio, de esta forma se determinó que el grupo B1 fue el más frecuente en nuestros aislamientos de casos de diarrea infantil de México (78 %) y otros países (66 %), el grupo A ocupó el segundo lugar 8 % y 30 % respectivamente. Estos dos grupos también fueron los más comunes en los aislamientos EPEC obtenidos de una cohorte de niños con diarrea originarios de una zona periurbana de Lima, Perú (104), pero con una proporción inversa a la determinada en nuestro estudio, A (49 %) y B1 (22.4 %).

Asimismo en las cepas de bovinos, B1 fue el más abundante, lo cual coincide con lo reportado por Baldy-Chudzik (105) teniendo como referencia un análisis de las heces de animales que habitan en un zoológico y en donde encontró una mayor incidencia de este grupo en animales herbívoros, sugiriendo que las cepas de *E. coli* del grupo B1 se han adaptado de una mejor manera a estos animales. Nuestros hallazgos sugieren que el ganado vacuno es una fuente importante para la transmisión a humanos de cepas diarreogénicas de *E. coli* O111, particularmente del grupo B1.

Es común encontrar que varios autores consideran que en los grupos A y B1 se ubican principalmente cepas de *E. coli* de tipo intestinal, mientras que las cepas ExPEC

pertenecen en su mayoría al grupo B2 y, con menor frecuencia al grupo D (57, 58). De acuerdo con lo anterior, los resultados obtenidos en el presente estudio muestran la pertenencia de *E. coli* O111 aislada de casos de diarrea infantil a grupos comensales. Diversos estudios (56, 57) han propuesto que las cepas de los grupos B2 y D, mediante transferencia horizontal pueden aportar islas de patogenicidad o plásmidos a las cepas de los grupos A y B1, las cuales poseen menos factores de virulencia; de este modo, cepas de *E. coli* no virulentas pudieran adquirir la cualidad de patógenos. En este sentido, una característica importante que distingue a los grupos B1 y A de B2 y D, es el gen *chuA*, los dos primeros grupos carecen de este gen, mientras que está presente en B2 y D. Dicho gen codifica para una proteína de membrana externa (69 kD) que regula el transporte del grupo hemo de la hemoglobina, necesaria para el desarrollo de la bacteria y en caso de limitación de hierro esta es sintetizada (106).

Los primeros estudios sobre el contenido de ECA en cepas de *E. coli* fueron realizados por Carrillo (63), en estos reportes hizo notar que cepas obtenidas antes, durante y después del episodio diarreico de niños recién nacidos tanto prematuros como nacidos en condiciones normales en dos hospitales de México, variaba el contenido de ECA, observado que en las cepas aisladas durante el episodio diarreico el contenido de ECA era menor, mientras que antes de dicho evento y en el periodo de convalecencia este contenido era mayor, estas observaciones fueron ratificadas por Hojyo (74) . Los títulos de ECA más frecuentes determinados en este estudio en los aislamientos de *E. coli* O111 de casos de diarrea infantil y bovinos fueron 1:32 y 1:64. Al no determinarse diferencia entre las proporciones podemos afirmar que no hay variación en el contenido de ECA entre estas fuentes. Estos resultados difieren de los reportados por Hojyo, ya que se considera como bajo contenido de ECA cuando el título es 1:8 y alto cuando el

título varía entre 1:128-1:256. De acuerdo a esto, proponemos evaluar el contenido de ECA en aislamientos de este serotipo durante las tres etapas del cuadro clínico para confirmar si lo expuesto en los dos trabajos anteriormente mencionados se cumple para el serogrupo O111.

Finalmente en relación a los patrones de resistencia a los antimicrobianos, en general las cepas de *E. coli* O111 fueron susceptibles a los β -lactámicos (Cefalosporinas de 2^a, 3^a, 4^a generación, carbapenémicos y monobactámicos) y quinolonas. Actualmente se observa alta resistencia a cefalosporinas de 2^a y 3^a generación en cepas de *E. coli* aislada de infecciones en vías urinarias, situación preocupante a nivel mundial (107). La administración de CIP, NA y otras quinolonas no es recomendada en pacientes pediátricos debido al riesgo de daño irreversible al sistema músculo esquelético (108), por lo tanto aunque *E. coli* O111 posee sensibilidad a estos agentes su uso podría considerarse limitado.

En contraste, el 30 % de los nuestros aislamientos presentó resistencia a uno o más antimicrobianos, incluyendo TE, SXT, particularmente en las cepas aisladas del ganado, además de estos dos antimicrobianos hubo resistencia a FOX. En EPEC se ha documentado la resistencia a estos antimicrobianos, aunque en porcentajes mayores a los determinados en las cepas de nuestro estudio. Estrada-García (93) encontró que el 46 % de aislamientos aEPEC y 100 % de tEPEC fueron resistentes a TE, mientras que para SXT fue de 38 % y 37 % respectivamente, Aslani (109) encontró porcentajes de resistencia de EPEC a TE en 55 % y a SXT en 35 %. El uso indiscriminado y sin regulación de estos antimicrobianos en la terapia empírica es uno de los factores que contribuyen a la aparición y propagación de dicha resistencia. En regiones en

desarrollo, incluyendo México, SXT es uno de los antimicrobianos más usados para el tratamiento de diarrea en niños (110), lo cual puede explicar la resistencia de *E. coli* O111 a este antimicrobiano.

Aunque TE no es usada para el tratamiento de infecciones causadas por *E. coli* en humanos, y su administración en niños menores de dos años está contraindicada por los efectos adversos que puede provocar en el sistema óseo, la resistencia a TE es común (111). El que se haya determinado resistencia en ambas fuentes de nuestros aislamientos puede estar relacionado con el hecho de que este antimicrobiano es utilizado habitualmente como promotor de crecimiento en el ganado vacuno (112), por lo tanto, este se convierte en un reservorio importante de este tipo de bacterias que potencialmente pueden ser transferidas a humanos a través de la cadena alimenticia.

9. CONCLUSIONES

- I. Existe una amplia diversidad de características fenotípicas y genotípicas en cepas de *E. coli* del serogrupo O111 aisladas de diferentes fuentes y zonas geográficas. En consecuencia, las cepas pueden pertenecer a los subtipos del patotipo EPEC o bien al patotipo STEC de acuerdo a las características genotípicas de la bacteria. El análisis de las cepas del estudio muestra una coexistencia de los subtipos de EPEC O111 típico y atípico, ambos localizados regionalmente en zonas urbanas; mientras que en zonas rurales prevalecen las cepas tEPEC. En contraste a las cepas de México, en otros países prevalecieron las cepas aEPEC.
- II. En los aislamientos de ganado vacuno prevalece principalmente el patotipo STEC, los cuales pueden constituir una fuente importante de transmisión de los microorganismos hacia la población humana.
- III. En las cepas aisladas tanto de niños como del ganado vacuno, se observó una prevalencia de los grupos B1 y A considerados como componentes de la microbiota intestinal, con escasa presencia de los grupos considerados como extraintestinales.
- IV. La presencia de los marcadores genéticos *espC* y *espP* fue escasa en ambos subtipos de EPEC.
- V. El contenido de ECA determinado en cepas *E. coli* O111 fue un contenido alto (1:32-1:64), contrario a lo reportado para cepas aisladas en la etapa de un episodio de diarrea.
- VI. La resistencia a TE de cepas *E. coli* O111 aisladas de casos de diarrea infantil y bovinos sugiere que la transmisión de estas bacterias juega un papel importante en la propagación de la resistencia. En consecuencia la terapia con TE para la diarrea se dificulta y/o se vuelve ineficaz.

10. PERSPECTIVAS

- i. Diseñar un estudio prospectivo de etiología de la diarrea infantil para establecer si en la actualidad se presenta la coexistencia de cepas de EPEC típicas y atípicas en las poblaciones previamente estudiadas.
- ii. Evaluar mediante ensayos de células en cultivo (HEp-2) los patrones de adherencia de *E. coli* O111.
- iii. Examinar el contenido de ECA en aislamientos de casos de diarrea infantil del serogrupo O111 en un estudio epidemiológico longitudinal, con la finalidad de distinguir los cambios en el contenido de este antígeno en las tres etapas clínicas de la diarrea.
- iv. Estudiar las propiedades inmunogénicas del ECA, por lo que se propone purificarlo y acoplarlo a una proteína para evaluarlo como vacuna en un modelo animal.

11. APÉNDICE

A1. Insumos empleados en la determinación de genes de virulencia y grupos filogenéticos

Gen	Reactivos (Invitrogen)					Control Positivo
	MgCl ₂ (50mM)	Taq Polimerasa	dNTP's	Iniciadores	Buffer PCR 10 X	
	(μL)					
<i>eae</i>	1.5	0.15	2.5	1.0	2.5	<i>E. coli</i> O127:H6 E2348/69
<i>eaf</i>	1.5	0.15	0.5	1.0	2.5	
<i>bfp</i>	1.5	0.15	5.0	1.0	2.5	
<i>perA</i>	2.5	0.20	2.5	1.0	2.5	<i>E. coli</i> O157:H7 ATCC 700927
• <i>espC</i>	0.75	0.20	1.0	1.0	2.5	
<i>espP</i>	0.75	0.20	1.0	1.0	2.5	
<i>stx1</i>	0.75	0.20	1.0	1.0	2.5	<i>E. coli</i> K12 FMU 108287
<i>stx2</i>	1.5	0.30	2.5	1.0	2.5	
• <i>arpA</i> <i>chuA</i> <i>yjaA</i> TspE4.C2	0.75	0.25	2.5	1.0	2.5	<i>E. coli</i> K12 FMU 108287
<i>trpA</i> (grupo C)	0.75	0.25	2.5	1.0*	2.5	ECOR 70
<i>arpA</i> (grupo D)	0.75	0.25	2.5	1.0*	2.5	<i>E. coli</i> O157:H7 ATCC 700927

•PCR múltiple para dos genes (dúplex).

•PCR múltiple para cuatro genes (cuádruplex).

* Los iniciadores *trpBA* se añaden a la reacción como control interno en la misma cantidad.

A2. Condiciones de amplificación de los genes de virulencia y grupos filogenéticos (cuádruplex y reacciones de los grupos C y D) mediante PCR en un termociclador MultiGene™ OptiMax Thermal Cycler (Axygen).

Fase	No. ciclos	Genes							Grupos filogenéticos
		<i>eae</i>	<i>eaf</i>	<i>bfp</i>	<i>perA</i>	<i>espC</i> <i>espP</i>	<i>sxt1</i>	<i>sxt2</i>	
		T (°C)/ t (min)							
Desnaturalización inicial	1	94 / 5	95 / 5	95 / 5	94/5	95 / 5	95/5	95/5	94 / 4
Extensión	30	94 / 0.5	96 / 0.6	72 / 2	92/1	95 / 1	94/0.5	94/0.1	94 / 0.08
Alineamiento		55 / 1	57 / 1	94 / 0.5	61/0.45	59 / 1	56/0.33	56/0.6	58 / 0.33
Elongación		72 / 2	72 / 0.7	56 / 1	72/0.30	72 / 1.3	72/1	72/1	72 / 0.66
Extensión final		72 / 5	72 / 10	72 / 8	72/5	72 / 10	72/5	72/5	72 / 5
% Gel Agarosa		1.0	1.2	1.2	1.0	1.0	1.5	1.0	2.0

A2. Iniciadores utilizados en la identificación de factores de virulencia y grupos filogenéticos

Gen	Iniciador	Secuencia iniciadores 5' a 3'	Tamaño producto (pb)	Referencia
<i>eae</i>	sk.F sk.R	CCCGAATTCGGCACAAGCATAAGC CCCGGATCCGTCTCGCCAGTATTC	864	Schmidt (68)
<i>eaf</i>	eaf.F eaf.R	CAGGGTAAAAGAAAGATGATAA TATGGGGACCATGTATTATCA	399	Franke (69)
<i>bfp</i>	bfp.f bfp.r	AATGGTGCTTGCGCTTGCTGC GCCGCTTTA TCCAACCTGGTA	326	Gunzburg (70)
<i>perA</i>	perA.F perA.R	AACAAACGCGCATGAAGGTG TGACATCGCCTAGTTTCCAGTTTT	539	Lacher (71)
<i>espC</i>	espC.F espC.R	TAGTGCAGTGCAGAAAGCAGTT AGTTTTCTGTTGCTGTATGCC	301	Abreu (72)
<i>espP</i>	espP.F espP.R	GTCCATGCAGGGACATGCCA TCACATCAGCACCGTTCTCTAT	547	
<i>stx1</i>	vtx1.F vtx1.R	GAAGAGTCCGTGGGATTACG AGCGATGCAGCTATTAATAA	130	Pollard (73)
<i>stx2</i>	vtx2.F vtx2.R	TTAACACACCCACGGCAGT GCTCTGGATGCATCTCTGGT	346	
<i>arpA</i>	Acek.F ArpA1.R	AACGCTATTCGCCAGCTTGC TCTCCCATAACCGTACGCTA	400	Clermont (59)
<i>chuA</i>	chuA.1bF chuA.2R	ATGGTACCGGACGAACCAAC TGCCGCCAGTACCAAAGACA	288	
<i>yjaA</i>	yjaA.1bF yjaA.2bR	CAAACGTGAAGTGTCAGGAG AATGCGTTCCTCAACCTGTG	211	
TspE4.C2	TspE4C2.1bF TspE4C2.2bR	CACTATTCGTAAGGTCATCC AGTTTATCGCTGCGGGTCGC	152	
<i>arpA</i> (grupo C)	ArpAgpE.F ArpAgpE.R	GATTCCATCTTGTCAAAATATGCC GAAAAGAAAAAGAATTCCTCAAGAG	301	
<i>trpA</i> (grupo D)	trpAgpC.1F trpAgpC.2R	AGTTTTATGCCAGTGCGAG TCTGCGCCGGTCACGCC	219	
Control interno	trpBA.F trpBA.R	CGCGGATAAAGACATCTTCAC GCAACGCGGCCTGGCGGAAG	489	

A4. Interpretación del diámetro de inhibición de diferentes antimicrobianos. Fragmento extraído la décima edición del manual del Comité Nacional de Normas de Laboratorios Clínicos (CLSI) –Disk Difussion Supplemental Tables”

Antimicrobiano	Concentración (μg)	Diámetro interpretativo (mm)		
		Resistente	Intermedio	Sensible
FOX	30	≤ 14	15-17	≥ 18
CRO	30	≤ 13	14-20	≥ 21
CAZ	30	≤ 14	15-17	≥ 18
CTX	30	≤ 14	15-22	≥ 23
FEP	30	≤ 14	15-17	≥ 18
IPM	30	≤ 13	14-15	≥ 16
ATZ	30	≤ 15	16-21	≥ 22
OFX	5	≤ 12	13-15	≥ 16
NOR	10	≤ 12	13-16	≥ 17
CIP	5	≤ 15	16-20	≥ 21
NA	30	≤ 12	13-16	≥ 17
STX	1.25/23.75	≤ 12	13-16	≥ 17
TE	30	≤ 12	13-16	≥ 17

12. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Bryce J, Boschi-Pinto C, Shibuya K. WHO estimates of the causes of death in children. *Lancet*. 2005; 365: p. 1147-1152.
2. Organización Mundial de la Salud (OMS). Organización Mundial de la Salud: OMS. [Online]. [cited 2015 Marzo 17. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs330/es/>.
3. Fischer Walker CL, Perin J, Aryee MJ, Boschi-Pinto C, Black RE. Diarrhea incidence in low- and middle-income countries in 1990 and 2010: a systematic review. *BMC Public Health*. 2012; 12(220).
4. Kosek M, Bern C, Guerrant RL. The global burden of diarrhoeal disease, as estimated from studies published between 1992 and 2000. *Bull World Health Organ*. 2003; 81(3): p. 197-204.
5. Velazquez F R, García-Lozano H, Rodríguez E, Cervantes Y, Gómez A, Melo M, et al. Diarrhea Morbidity and Mortality in Mexican Children. *Pediatr. Infect. Dis. J*. 2004; 23(10): p. S149-S155.
6. Dirección General de Epidemiología (DGE). [Online].; 2012 [cited 2014 Noviembre 25. Disponible en: http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/doctos/infoepid/vig_epid_manuales/1_2012_Manual_NuTraVe_vFinal_6nov12.pdf.
7. Navarro A, Estrada-García T. Epidemiology of Diarrheagenic *Escherichia coli* Pathotypes in México, Past and Present. In Torres A. Pathogenic *Escherichia coli* in Latin America.: Bentham Science Publishers Ltd.; 2010. p. 191-2008.
8. Petri Jr W, Miller M, Blinder H, Levine M, Dillingham R, Guerrant R. Enteric infections, diarrhea, and their impact. *J Clin Invest* 2008; 118(4): p. 1277–1290.
9. Parashar UD, Gibson C, Bresee JS, Glass RI. Rotavirus and Severe Childhood Diarrhea. *Emerg Infect Dis*. 2006; 12(2): p. 304-306.
10. Percival LS, Williams DD. *Escherichia coli*. In Percival LS, Yates VM, Williams DD, Chalmers R, Gray N. Microbiology of Waterborne Diseases. Microbiological Aspects and Risks. 2nd ed.: Academic Press; 2014. p. 89-117.
11. Kaper J, Nataro J, Mobley H. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol*. 2004; 2(2): p. 123-140.
12. Varela G, Aguirre A, Carrillo J. *Escherichia coli*-gómez: nueva especie aislada de un caso mortal de diarrea. *Bol Méd Hosp Infant Méx*. 1946; 3: p. 623-627.
13. Carrillo-Rascon J. *Escherichia coli*: Historia de una hipótesis. *Bol Méd Hosp Infant Méx*. 1983; 40(2): p. 28-33.
14. Carrillo-Rascon J. Historia de la mexicana y primigenia revelacion del carácter patogénico de un colibacilo: *Escherichia coli*-Gómez (*E. coli* O111:B4). *Bol*

- Med Hosp Infant Mex. 2001; 58: p. 499-500.
15. Bray J. Isolation of antigenically homogeneous strains of *Bacterium coli Neapolitanum* from summer diarrhoea of infants. J Pathol Bacteriol. 1945 March; 57(2).
 16. Giles C, Sangster G, Smith J. Epidemic gastroenteritis of infants in Aberdeen during 1947. Arch Dis Child. 1949; 24: p. 45-53.
 17. Taylor J, Powel B, Wright J. Infantile Diarrhoea and vomiting: a clinical and bacteriological investigation. Brit Med J. 1949 July; 2(4619): p. 117-125.
 18. Olarte J, Varela G, Carrillo J. A complete somatic antigen common to *Salmonella adelaide*, *Escherichia coli-gómez* and *Escherichia coli* O111. J Lab Clin Med. 1952; 40(2): p. 252-254.
 19. Neter E, Westphal O, Luderitz O, Needell MH. Demonstration of antibodies against enteropathogenic *Escherichia coli* in sera of children of various ages. Pediatr. 1955; 16(6): p. 801-808.
 20. Nataro J, Kaper J. Diarrheagenic *Escherichia coli*. Clin Microbiol Rev. 1998; 11(1): p. 142-201.
 21. Clements A, Young JC, Constantinou N, Frankel G. Infection strategies of enteric pathogenic *Escherichia coli*. Gut Microbes. 2012; 3(12): p. 71-87.
 22. Vidal RM, Oñate A, Salazar JC, Prado V. Shiga Toxin Producing *Escherichia coli* in Chile. In Torres AG. Pathogenic *Escherichia coli* in Latin America.: Bentham Science Publishers Ltd.; 2010. p. 179-190.
 23. Nisa S, M K, Donnenberg M. Enteropathogenic *Escherichia coli*. In Donnenberg M, editor. *Escherichia coli* Pathotypes and Principles of Pathogenesis. 2nd ed.: Academic Press; 2013. p. 75-119.
 24. Croxen M, Finlay B. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. Nat Rev Microbiol. 2010; 8(1): p. 26-38.
 25. Trabulsi L, Keller R, Tardelli GT. Typical and atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. Emerg Infect Dis. 2002; 8(5): p. 508-513.
 26. Mellies J, Barron A, Carmona A. Enteropathogenic and Enterohemorrhagic *Escherichia coli* Virulence Gene Regulation. Infect Immun. 2007; 75(9): p. 4199-4210.
 27. Medrano A, Huerta A, Puente JL. *Escherichia coli* Enteropatógena, Mecanismos de Patogenicidad. In Rocha-Gracia RdC, Lozano-Zarain P, Martínez-Laguna Y. Modelos de la Patogénesis de las Enfermedades Infecciosas II.: Publicación especial de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla; 2012. p. 1-21.
 28. Donnenberg M, Kaper JB. Enteropathogenic *Escherichia coli*. Infect Immun. 1992; 60 (10): p. 3953-3961.

29. Scaletsky I C, Silva M L, Trabulsi R L. Distinctive Patterns of Adherence of Enteropathogenic *Escherichia coli* to HeLa Cells. *J Clin Microbiol.* 1985; 45(2): p. 534-536.
30. Nataro JP, Scaletsky IC, Kaper JB, Levine MM, Trabulsi LR. Plasmid-Mediated Factors Conferring Diffuse and Localized Adherence of Enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun.* 1985; p. 378-383.
31. Campos L, Whittam T, Gomes TA T, Andrade J, Trabulsi R L. *Escherichia coli* Serogroup O111 Includes Several Clones of Diarrheagenic Strains with Different Virulence Properties. *Infect Immun.* 1994; 62(8): p. 3282-3288.
32. World Health Organization. Programme for Control of Diarrhoeal Diseases. Manual for Laboratory Investigations of Acute Enteric Infections. In ; 1987; Geneva.
33. Karch H, Tarr P, Bielaszewska M. Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* in human medicine. *Int J Med. Microbiol.* 2005; 295: p. 405-418.
34. Elias P W, Barros F S, Moreira G C, Trabulzi R L, Gomes TAT. Enteroaggregative *Escherichia coli* Strains among Classical Enteropathogenic *Escherichia coli* O Serogroups. *J Clin Microbiol.* 2002;. 40(4): p. 3540–3541.
35. Guth EC B, Picheth F C, Gomes TA T. *Escherihcia coli* Situation in Brazil. In Torres A. Pathogenic *Escherichia coli* in Latin America.: Bentham Science Publishers Ltd.; 2010. p. 162-178.
36. Andrade JA, Gomes TA, Fagundes-Neto U. Mortality in breast-fed infants with persistent diarrhea: risk factors associated with death. *Arq Gastroenterol.* 1998; 35(1): p. 62-68.
37. Torres E M, Pérez C M, Schelotto F, Varela G, Parodi V, Allende F, et al. Etiology of Children's Diarrhea in Montevideo, Uruguay: Associated Pathogens and Unusual Isolates. *J Clin Microbiol.* 2001; 31: p. 2134–2139.
38. Prado V, Braun S, Bosch P, Bercovich M, Reyes L, Sawada M. Análisis de *Escherichia coli* Enteropatógeno Clásico (ECEP) como causa Endémica de Diarrea Aguda en Niños Chilenos. *Rev Chil Pediatr.* 1984; 55(3): p. 171-175.
39. Tarr P, Gordon C, WL C. Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* and haemolytic uraemic syndrome. *The Lancet.* 2005; 365: p. 1073-1086.
40. Scallan E, Griffin M P, Angulo J F, Tauxe V R, Hoekstra M R. Foodborne Illness Acquired in the United States—Unspecified Agents. *Emerg Infect Dis.* 2011; 17(1): p. 7-15.
41. Viljanen M, Peltola T, Junnula SY, Olkkonen L, Järvinen H, Kuistila M, et al. Outbreak of diarrhoea due to *Escherichia coli* O111:B4 in schoolchildren and adults: association of Vi antigen-like reactivity. *Lancet.* 1990; 336(8719): p. 831-834.

42. Tozzi AE, Niccolini A, Caprioli A, Luzzi I, Montini G, Zacchello G, et al. A community outbreak of haemolytic-uraemic syndrome in children occurring in a large area of northern Italy over a period of several months. *Epidemiol Infect.* 1994; 113(2): p. 209-219.
43. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Community outbreak of hemolytic uremic syndrome attributable to *Escherichia coli* O111:NM--South Australia 1995. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 1995; 44(29): p. 550-551, 557-558.
44. Piercefield EW, Bradley KK, Coffman RL, Mallonee SM. Hemolytic Uremic Syndrome After an *Escherichia coli* O111 Outbreak. *Arch Intern Med.* 2010; 170(18): p. 1656-1663.
45. Watahiki M, Isobe J, Kimata K, Shima T, Kanatani J, Shimizu M, et al. Characterization of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O111 and O157 Strains Isolated from Outbreak Patients in Japan. 2014; 52(8): p. 2757–2763.
46. Vanaja KS, Jandhyala M D, M M, Emily LMJ, Balasubramanian S. Enterohemorrhagic and other Shigatoxin-producing *Escherichia coli*. In Donnenberg M. *Escherichia coli* Pathotypes and Principles of Pathogenesis. 2nd ed.: Academic Press; 2013. p. 121-182.
47. Johnson KE, Thorpe CM, Sears CL. The Emerging Clinical Importance of Non-O157 Shiga Toxin–Producing *Escherichia coli*. *Clin Infect Dis.* 2006; 43(12): p. 1587–1595.
48. Goldwater P, Karl B. Treatment of enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) infection and hemolytic uremic syndrome (HUS). *BMC Med.* 2012; 10(12).
49. Hunt JM. Shiga Toxin–Producing *Escherichia coli* (STEC). *Clin Lab Med.* 2010; 30(1): p. 21-45.
50. Martínez-Laguna Y, Torres AG, Rojas M, Olvera E, Arenas MRRdC, Lozano P. *Escherichia coli* Enterohemorrágica: Modelo de Patogénesis Subersiva. In Puebla PedIBUAd, editor. *Modelos de la Patogénesis de las Enfermedades Infecciosas II.*; 2012. p. 46-64.
51. Lim J, Yoon J, Hovde CJ. A brief overview of *Escherichia coli* O157:H7 and its plasmid O157. *J Microbiol Biotechnol.* 2010; 20(1): p. 5-14.
52. Welinder-Olsson C, Kaijser B. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC). *Scand J Infect Dis.* 2005; 37(6): p. 405-416.
53. Frankel G, Phillips AD, Rosenshine I, Dougan G, Kaper JP, Knutton S. Enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli* : more subversive elements. *Mol Microbiol.* 1998; 30(5): p. 911-921.
54. Lai Y, Rosenshine I, Leong M J, Frankel G. Intimate host attachment: enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli*. *Cell Microbiol.*

- 2013; 15(11): p. 1796–1808.
55. Rosenshine I, Ruschkowski S, Stein M, Reinscheid DJ, Mills SD, Finlay BB. A pathogenic bacterium triggers epithelial signals to form a functional bacterial receptor that mediates actin pseudopod formation. *Embo J.* 1996; 15(11): p. 2613-2624.
 56. 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; 67(2): p. 546–553.
 57. Johnson JR, Delavari P, Kuskowski M, Stell AL. Phylogenetic distribution of extraintestinal virulence-associated traits in *Escherichia coli*. *J Infect Dis.* 2001; 183(1): p. 78-88.
 58. Clermont O, Bonacorsi S, Bingen E. Rapid and Simple Determination of the *Escherichia coli* Phylogenetic Group. *Appl Environ Microbiol.* 2000; 66(10): p. 4555-4558.
 59. Clermont O, Christenson J, Denamour E, Gordon D. 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.
 60. Kunnin CM, Beard MV, Halmagyi NE. Evidence for a Common Hapten Associated with Endotoxin Fractions of *E. coli* and other *Enterobacteriaceae*. *Exp Biol Med.* 1962; 111(1): p. 160-166.
 61. Rick PD, Silver RP. Enterobacterial common antigen and capsular polysaccharides. In Neidhardt FC, Curtiss IR, Ingraham JL, Lin ECC, Low KB, Magasanik B, et al., editors. *Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular biology. 2nd ed. Washington, D.C: ASM Press p. 104–122.
 62. Makela HP, Mayer H. Enterobacterial common antigen. *Bacteriol Rev.* ; 40(3): p. 591-632.
 63. Carrillo J, Hashimoto B, Kumate J. Content of heterogenetic antigen in *Escherichia coli* and its relationship to diarrhea in newborn infants. *J Infect Dis.* 1966; 116(3): p. 285-296.
 64. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. Antibióticos. In *Microbiología Médica*. Barcelona; 2006. p. 203-212.
 65. Barrow G, Feltham R. Cowan and Steel's. Manual for the Identification of Medical Bacteria. Third ed. 1993: Cambridge University Press.
 66. Orskov F, Orskov I. Serotyping of *Escherichia coli*. In Bergan T, editor. *Methods in Microbiology*.: Academic Press Inc; 1984. p. 43-112.
 67. Islam M, Heuvelink A, Talukder K, Zwietering M, De Boer E. Evaluation of Immunomagnetic Separation and PCR for the Detection of *Escherichia coli* O157 in Animal Feces and Meats. *J Food Protect.* 2006; 69: p. 2865–2869.

68. Schmidt H, Schwarzkopf A, Heesemann J, Karch H. Differentiation in virulence patterns of *Escherichia coli* possessing *eae* genes. *Med Microbiol Immunol*. 1994; 183: p. 23-31.
69. Franke J. 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; 32(10): p. 2460-2463.
70. Gunzburg T, Tornieporth G, Riley W. Identification of Enteropathogenic *Escherichia coli* by PCR-Based Detection of the Bundle-Forming Pilus Gene. *J Clin Microbiol*. 1995; 35(5): p. 1375-1377.
71. Lacher DW, Steinsland H, Blank TE, Donnenberg MS, Whittam TS. Molecular evolution of typical enteropathogenic *Escherichia coli*: clonal analysis by multilocus sequence typing and virulence gene allelic profiling. *J Bacteriol*. 2007; 189(2): p. 342-350.
72. Abreu GA BV, Porangaba T, Sircili M, Navarro-García F, Elias W. 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.
73. Pollard D, Johnson W, Lior H, Tyler S, Rozee K. Rapid and specific detection of verotoxin genes in *Escherichia coli* by the polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol*. 1990; 28: p. 540-545.
74. Hojyo M, Miranda L, Kumate J, Carrillo J. Efectos enteropatogénicos de *Escherichia coli* en asas ileales de conejo y su relación con el contenido en antígeno heterogénico. *Ból Méd Hosp Infant Mex*. 1969; 26(1): p. 15-20.
75. Suzuki T, Gorzynski E, Neter E. Separation by Ethanol of Common and Somatic Antigens of *Enterobacteriaceae*. *J Bacteriol*. 1964; 88(5): p. 1240-1243.
76. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standarts for Antimicrobial Disk Suceptibility Tests; Aptoved Satandard-Tenth Edition M2-A10. 10th ed. CLSI , editor. Wayne; 2009.
77. Edwards PR, Ewing WH. Edwards and Ewing's Identification of *Enterobacteriaceae*. 4th ed. New York: Elsevier Science Publishing Inc; 1986.
78. Afset JE, Bevanger L, Romundstad P, Bergh K. Association of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) with prolonged diarrhoea. *J Med Microbiol*. 2004; 53(11): p. 1137-1144.
79. Contreras CA, Ochoa TJ, Lacher DW, DebRoy C, Navarro A, Talledo M, et al. Allelic variability of critical virulence genes (*eae*, *bfpA* and *perA*) in typical and atypical enteropathogenic *Escherichia coli* in Peruvian children. *J Med*

Microbiol. 2010; 59(1): p. 25-31.

80. Tobias J, Kassem E, Rubinstein U, Bialik A, Vutukuru SR, Navarro A, et al. Involvement of main diarrheagenic *Escherichia*, with emphasis on enteroaggregative *E. coli*, in severe non-epidemic pediatric diarrhea in a high-income country. *BioMed Central*. 2015; 15(79).
81. Varela G, Batthyány L, Bianco MN, Pérez W, Pardo L, Algorta G, et al. Enteropathogens Associated with Acute Diarrhea in Children from Households with High Socioeconomic Level in Uruguay. *Int J Microbiol Res*. 2015; 2015.
82. Aidar-Ugrinovich L, Blanco J, Blanco M, Blanco JE, Leomil L, Dahbi G, et al. Serotypes, virulence genes, and intimin types of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and enteropathogenic *E. coli* (EPEC) isolated from calves in São Paulo, Brazil. *Int J Food Microbiol*. 2007; 115(3): p. 297-306.
83. Brooks JT, Bergmire-Sweat D, Kennedy M, Hendricks K, Garcia M, Marengo L, et al. Outbreak of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O111:H8 infections among attendees of a high school cheerleading camp. *Clin Infect Dis*. 2004; 38(2): p. 190-198.
84. Toledo MR, Alvariza MdC, Murahovschi J, Ramos SR, Trabulsi LR. Enteropathogenic *Escherichia coli* serotypes and endemic diarrhea in infants. *Infect Immun*. 1983; 39(2): p. 586-589.
85. 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.
86. Tristão LC, Gonzalez AG, Coutinho CA, Cerqueira AM, Gomes MJ, Irino K, et al. Virulence markers and genetic relationships of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains from serogroup O111 isolated from cattle. *Vet Microbiol*. 2007; 119(2-4): p. 358-365.
87. Alikhani MY, Asl HM, Khairkhah M, Farajnia S, Aslani MM. Phenotypic and genotypic characterization of *Escherichia coli* O111. *Gastroenterol Hepatol Bed Bench*. 2011; 4(3): p. 147-152.
88. Ewing WH, Davis BR, Montague TS. Studies on the Occurrence of *Escherichia coli* Serotypes associated with Diarrheal Disease. Atlanta: Communicable Disease Center, US Department of Health; 1963.
89. Ochoa TJ, Barletta F, Contreras C, Mercado E. New insights into the epidemiology of enteropathogenic *Escherichia coli* infection. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2008; 102(9): p. 852-856.
90. Ratchtrachenchai OA, Subpasu S, Hayashi H, Ba-Thein W. Prevalence of childhood diarrhoea-associated *Escherichia coli* in Thailand. *J Med Microbiol*. 2004; 53(3): p. 237-243.

91. Franzolin MR, Alves RC, Keller R, Gomes TA, Beutin L, Barreto ML, et al. Prevalence of diarrheagenic *Escherichia coli* in children with diarrhea in Salvador, Bahia, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2005; 100(4): p. 359-563.
92. Araujo JM, TGF, Aranda KR, Fabbriotti SH, Fagundes-Neto U, Mendes CM, et al. Typical enteroaggregative and atypical enteropathogenic types of *Escherichia coli* are the most prevalent diarrhea-associated pathotypes among Brazilian children. *J Clin Microbiol*. 2007; 45(10): p. 3396-3399.
93. Estrada-García T, Cerna JF, Pacheco-Gil L, Velázquez RF, Ochoa JT. Drug-resistant Diarrheogenic *Escherichia coli*, Mexico. *Emerg Infect Dis*. 2005; 11(8): p. 1306–1308.
94. Cravioto A, Reyes RE, Trujillo F, Uribe F, Navarro A, De La Roca JM, et al. Risk of diarrhea during the first year of life associated with initial and subsequent colonization by specific enteropathogens. *Am J Epidemiol*. 1990; 131(5): p. 886-904.
95. Makobe CK, Sang WK, Kikui G, Kariuki S. Molecular characterization of virulence factors in diarrhoeagenic *Escherichia coli* isolates from children in Nairobi, Kenya. *J Infect Dev Ctries*. 2012; 6(8): p. 598-604.
96. Mellies JL, Navarro-Garcia F, Okeke I, Frederickson J, Nataro JP, Kaper JB. *espC* Pathogenicity Island of Enteropathogenic *Escherichia coli* Encodes an Enterotoxin. *Infect Immun*. 2001; 69(1): p. 315-324.
97. Navarro-García F, Canizalez-Roman A, Sui BQ, Nataro JP, Azamar Y. The serine protease motif of EspC from enteropathogenic *Escherichia coli* produces epithelial damage by a mechanism different from that of Pet toxin from enteroaggregative *E. coli*. *Infect Immun*. 2004; 72(6): p. 3609-3621.
98. Stein M, Kenny B, Stein MA, Finlay BB. Characterization of EspC, a 110-kilodalton protein secreted by enteropathogenic *Escherichia coli* which is homologous to members of the immunoglobulin A protease-like family of secreted proteins. *J Bacteriol*. 1996; 128(22): p. 6546-6554.
99. Weiss A, Brockmeyer J. Prevalence, Biogenesis, and Functionality of the Serine Protease Autotransporter EspP. *Toxins*. 2013; 5(1): p. 25-48.
100. Bugarel M, Martin A, Fach P, Beutin L. Virulence gene profiling of enterohemorrhagic (EHEC) and enteropathogenic (EPEC) *Escherichia coli* strains: a basis for molecular risk assessment of typical and atypical EPEC strains. *BMC Microbiol*. 2011; 11(142).
101. Brunder W, Schmidt H, Frosch M, Karch H. The large plasmids of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) are highly variable genetic elements. *Microbiology*. 1999; 145(5): p. 1005-1014.
102. Sonntag AK, Prager R, Bielaszewska M, Zhang W, Fruth A, Tschäpe H, et al.

- Phenotypic and genotypic analyses of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O145 strains from patients in Germany. J Clin Microbiol. ; 43(3): p. 954-962.
103. Khan AB, Naim A, Orth D, Grif K, Mohsin M, Prager R, et al. Serine protease *espP* subtype α , but not β or γ , of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* is associated with highly pathogenic serogroups. Int J Med Microbiol. 2009; 299(4): p. 247-254.
 104. Mosquito S, Pons MJ, Riveros M, Ruiz J, Ochoa TJ. Diarrheagenic *Escherichia coli* Phylogroups Are Associated with Antibiotic Resistance and Duration of Diarrheal Episode. Sci World J. 2015.
 105. Baldy-Chudzik K, Mackiewicz P, Stosik M. Phylogenetic background, virulence gene profiles, and genomic diversity in commensal *Escherichia coli* isolated from ten mammal species living in one zoo. Vet Microbiol. 2008; 131(1-2): p. 173-184.
 106. Torres AG, Payne SM. Haem iron-transport system in enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. Mol Microbiol. 1997; 23(4): p. 825-833.
 107. Pitout JD. Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli*: A Combination of Virulence with Antibiotic Resistance. Front Microbiol. 2012; 3(9).
 108. Grady RW. Systemic quinolone antibiotics in children: a review of the use and safety. Expert Opin Drug Saf. 2005; 4(4): p. 623-630.
 109. Aslani MM, Ahrabi SS, Alikhani YM, Jafari F, Zali RM, Mani M. Molecular detection and antimicrobial resistance of diarrheagenic *Escherichia coli* strains isolated from diarrheal cases. Saudi Med J. 2008; 29(3): p. 388-392.
 110. Oberhelman RA, Javier de la Cabada F, Vasquez EBJA, DuPont HL. Efficacy of trimethoprim-sulfamethoxazole in treatment of acute diarrhea in a Mexican pediatric population. J Pediatr. 1987; 110(6): p. 960-965.
 111. Sánchez AR, Rogers RSI, Sheridan PJ. Tetracycline and other tetracycline-derivative staining of the teeth and oral cavity. Int J Dermatol. 2004; 43(10): p. 709-715.
 112. Van den Bogaard AE, Stobberingh EE. Epidemiology of resistance to antibiotics. Links between animals and humans. Int J Antimicrob Agents. 2000; 14(4): p. 327-335.