



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**ANÁLISIS DE FACTORES DE VIRULENCIA DE
Escherichia coli ENTEROTOXIGÉNICA DE DIARREA
INFANTIL DE DIVERSAS REGIONES GEOGRÁFICAS**

TESIS

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

PRESENTA

KARLA ANDREA LÓPEZ SALAS



MÉXICO, D.F.

AÑO 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Adriana Guadalupe Mejía Chávez
VOCAL: Aurora Irma Ortegón Ávila
SECRETARIO: Armando Navarro Ocaña
1ER. SUPLENTE: Martha Giles Gómez
2DO. SUPLENTE: Norma Angélica Camacho de la Rosa

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: KARLA ANDREA LÓPEZ SALAS

ÍNDICE

ÍNDICE DE CUADROS Y FIGURAS	i
I. RESUMEN	1
II. INTRODUCCIÓN	2
1. Mortalidad infantil	2
2. Enfermedades diarreicas	3
III. ANTECEDENTES	4
1. <i>Escherichia coli</i>	4
1.1 Generalidades	4
1.2 Comensal y patógeno	5
1.3 Métodos de estudio de <i>E. coli</i>	6
1.3.1 Serología	6
1.3.2 Grupos filogenéticos	7
2. ETEC	9
2.1 Datos generales	9
2.2 Toxinas	10
2.2.1 ST	10
2.2.2 LT	12
2.3 Factores de colonización (CFs)	13
2.3.1 CFA I	14
2.3.2 CFA II	15
2.3.3 Longus	16
3. Antimicrobianos	16
3.1 Generalidades	16
3.2 Familias de antimicrobianos	17
3.3 Resistencia a antimicrobianos	19
IV. JUSTIFICACIÓN	20
V. HIPÓTESIS	21
VI. OBJETIVOS	21
1. Objetivo general	21
2. Objetivos particulares	21
VII. METODOLOGÍA	22

1. Confirmación de viabilidad y pureza	22
2. Tipificación serológica	23
2.1 Preparación del antígeno somático (O)	23
2.2 Obtención del antígeno flagelar (H)	24
3. Determinación de genes de virulencia	25
3.1 Extracción de DNA	25
3.2 PCR	26
3.3 Estudio de estabilidad de plásmidos	29
4. Resistencia a antimicrobianos	30
VIII. RESULTADOS	32
1. Origen de las cepas	32
2. Confirmación de serotipos de <i>E. coli</i>	33
3. Obtención de genes relacionados con virulencia de ETEC	34
3.1 Persistencia de plásmidos en las cepas de <i>E. coli</i>	36
3.2 Factores de colonización	37
3.2.1 Análisis de CFs por serotipos	39
3.2.2 Combinación de genes de CFs en cepas de <i>E. coli</i>	40
3.2.3 Detección del gen <i>cs21</i> en cepas de <i>E. coli</i> aisladas en México	41
3.3 Grupos filogenéticos	42
4. Resistencia a los antimicrobianos	44
4.1 Análisis de resistencia a los antimicrobianos por serotipos y zona geográfica	46
IX. DISCUSIÓN	47
X. CONCLUSIONES	68
XI. PERSPECTIVAS	70
XII. BIBLIOGRAFÍA	71

ÍNDICE DE CUADROS Y FIGURAS

Figura 1. Diagrama general para la caracterización de cepas ETEC.	22
Cuadro 1. Secuencia de iniciadores para llevar a cabo la PCR.	26
Cuadro 2A. Composición de mezcla de reacción para amplificar diversos genes mediante PCR.	27
Cuadro 2B. Programa de temperatura en el termociclador (AXYGEN) para llevar a cabo la PCR de diversos genes y porcentaje de agarosa.	27
Cuadro 3. Concentración de los antimicrobianos para determinar patrones de resistencia y diámetro del halo de inhibición recomendados para su interpretación.	31
Cuadro 4. Información general del origen de las cepas de trabajo.	32
Cuadro 5. Serotipos identificados en cepas de <i>E. coli</i> de diferentes zonas geográficas.	33
Cuadro 6. Genotipos en cepas de <i>E. coli</i> de diferentes fuentes.	34
Cuadro 6A. Comparación de genotipo de cepas de Bangladesh en los años 2007 y 2015.	35
Cuadro 6B. Persistencia de plásmidos de toxinas en cepas ETEC.	36
Figura 2. Electroferograma de los genes <i>lta</i> y <i>stp</i> .	36
Cuadro 7A. Genotipos con factores de colonización en cepas de <i>E. coli</i> .	37
Cuadro 7B. Análisis de factores de colonización por zona geográfica.	38
Cuadro 8A. Factores de colonización y su relación con serotipos por zona geográfica.	39
Cuadro 8B. Asociación de factores de colonización con la presencia de plásmidos.	40
Figura 3. Cepas <i>cs21+</i> aisladas en México 1986-2002.	41
Cuadro 9. Grupos filogenéticos en cepas de <i>E. coli</i> de diferentes zonas geográficas.	42
Figura 4. Electroferograma de los genes <i>arpA</i> , <i>chuA</i> , <i>yjaA</i> y <i>TSPE.C2</i> .	43
Cuadro 10. Proporción de cepas resistentes en aislamientos de ETEC.	44
Cuadro 11. Antimicrobianos a los que presentaron resistencia las cepas de ETEC.	45
Cuadro 12. Patrones de resistencia a los antimicrobianos en diversas localidades en relación al serotipo.	46

I. Resumen

Introducción: *Escherichia coli* enterotoxigénica (ETEC) es uno de los agentes bacterianos responsables del mayor número de muertes por diarrea en niños menores de 5 años en países subdesarrollados, así como de la diarrea del viajero en visitantes a dichas regiones. ETEC coloniza el intestino delgado y al secretar una toxina (LT/ST) genera un desequilibrio osmótico que desencadena diarrea acuosa. **Objetivo:** Caracterizar antigénicamente cepas aisladas de diarrea infantil de tres regiones geográficas por sus factores de virulencia y patrones de resistencia a los antimicrobianos. **Material y método:** Se obtuvieron 104 cepas de *E. coli* de México, Egipto, Tailandia y Bangladesh, las cuales se tipificaron serológicamente por microaglutinación utilizando 187 sueros obtenidos en conejo contra los antígenos somáticos y 53 sueros contra los antígenos H de *E. coli* (SERUNAM). Utilizando la reacción de la polimerasa (PCR) con iniciadores y condiciones previamente reportadas se analizó la presencia de los genes *ltA*, *sth*, *stp*, *cfal*, *cs1*, *cs3*, *cs8*, *cs21*; con la misma técnica se determinó la presencia de los genes *arpA*, *chuA*, *yjaA* y *TspE4* para definir grupos filogenéticos. Los patrones de resistencia a los antimicrobianos se determinaron utilizando el método de difusión en agar (Kirby-Bauer). **Resultados:** La tipificación serológica de las cepas identificó los serogrupos O153 (50.9 %), O6 (28.8 %), O128 (7.9 %), O128ac (8.6 %) y O128ab (3.8 %), que en combinación con el antígeno H conformaron 8 serotipos distintos. El análisis de factores de virulencia mostró que 15.4% de las cepas fueron positivas para la presencia de alguna toxina, prevaleciendo el genotipo *st+lt+* en cepas O6:H16, mientras que las cepas *st+* estuvieron asociadas a los serotipos O153:H45 y O128ab:H12 y O128ac:H12. En cuanto a la presencia de factores de colonización (CFs), 70.2 % fue *cfal+*, 63.4 % *cs21+*, 18.2 % *cs3+* y 15.4 % *cs1+*. En las cepas O153 de México, Tailandia y Egipto prevaleció *cfal* y *cs21*, contrario a las cepas de los serogrupos O6 y O128 en México y Bangladesh se presentaron los genes de *cs1* y *cs3*. La determinación de grupos filogenéticos ubicó al 81.7 % de las cepas de las 3 regiones en el grupo A, observando una menor frecuencia de los grupos B1 (9.6 %), B2 (1.9 %) y C (1.9 %). Los patrones de resistencia a los antimicrobianos mostraron que en México, Egipto y Tailandia prevaleció la resistencia a TE y SXT, en tanto que en Bangladesh la resistencia fue principalmente a NA. **Conclusión:** Las cepas de estudio se clasificaron en el grupo A considerado como integrante de la microbiota del intestino de los humanos. Aunque los genes de toxinas (LT y ST) están codificados en plásmidos en conjunto con los CFs, los genes de toxinas se identificaron en una baja frecuencia en contraste con los genes de los CFs que se identificaron en la mayoría de las cepas, requiriendo de un estudio genético más profundo para comprender la patogénesis de ETEC. **Perspectivas:** Estudiar el papel de CS21 como inmunógeno protector. Utilizar secuenciación y ensayos animales para comprender a fondo la pérdida de toxigenicidad.

II. Introducción

1. Mortalidad infantil

La tasa de mortalidad infantil es un indicador de salud y bienestar infantil, que en un sentido más amplio refleja el desarrollo social y económico de cada país. Durante el periodo comprendido entre 1990 y 2015 a nivel global se reportó la disminución de un 53 % de mortalidad en niños, con la reducción de 91 decesos/1000 nacimientos a 43 [1].

Mientras que en el este de Asia, Latinoamérica y el Caribe, así como África del norte se ha reducido a 2 terceras partes el índice de mortalidad desde 1990, las regiones del Sub-Sahara en África y el sur de Asia permanecen con el mayor índice de mortalidad en el mundo, contribuyendo con más del 80 % de muertes en niños menores de 5 años a nivel mundial. En estas regiones 1 de cada 12 niños no alcanza a cumplir 5 años, mientras que en países desarrollados la relación es de 1 entre 147 [1, 2].

En el año 2015 según datos de la OMS, las principales causas de muerte en menores de 5 años fueron complicaciones en neonatos (35 %), neumonía (16 %), diarrea (9 %), sepsis neonatal (7 %) y malaria (5 %). A nivel global, aproximadamente el 50 % de las muertes en niños menores de 5 años son atribuidas a enfermedades infecciosas, las cuales pueden ser prevenidas o tratadas [1, 2].

El reporte de enfermedades diarreicas por la OMS en 2013 indicó que de 1 700 millones de casos al año a nivel global, mueren 760 000 niños menores de cinco años [3]. En México, según datos de la Dirección General de Epidemiología en su

último informe de 2011, la tasa de mortalidad se redujo un 55.7 % durante el periodo de 1998 a 2011. Igualmente se alcanzaron 9.1 muertes de niños <5 años por cada 100 000 habitantes con una tendencia hacia la reducción [4].

2. Enfermedades diarreicas

En esencia, la diarrea es una alteración en el movimiento de iones y agua debido a un gradiente osmótico [5]. Para fines epidemiológicos, la OMS la ha definido como la evacuación al día de tres o más veces de heces sueltas o líquidas o presentes con una mayor frecuencia de la normal. Como factores de riesgo en países subdesarrollados se encuentran la falta de higiene y la desnutrición. A finales del año 2000 las estadísticas a nivel global mostraron que 1.1 billones de personas (18 %) no contaban con acceso a agua potable, mientras que un 40 % vivía en condiciones de mala higiene; contribuyendo así al desarrollo de alrededor 88 % de casos de diarrea infantil [6, 7]. La desnutrición por su parte se ha asociado a 53 % de los casos de mortalidad por diarrea; donde la deficiencia de vitamina A o Zinc por ejemplo, aumentan el riesgo de muerte en aproximadamente 20 % [8, 9].

La diarrea infecciosa se debe a la colonización por un virus, bacteria o protozooario generalmente transmitido por agua o alimentos contaminados, frecuentemente acompañada con síntomas como náusea, vómito y/o dolor abdominal [10].

Entre los agentes etiológicos conocidos como endémicos en países subdesarrollados se encuentra el rotavirus, ETEC, *Vibrio cholerae* y *Shigella* spp.; que pueden actuar modulando directamente el transporte iónico del epitelio intestinal [5, 11].

III. Antecedentes

1. *Escherichia coli*

1.1 Generalidades

Después de que en 1885 Theodor Escherich reportó por primera vez la caracterización y aislamiento de bacilos cortos en heces de infantes, a los que denominó como *Bacterium coli commune*, en 1954 finalmente se le reconoció como *Escherichia coli*. Se trata de un bacilo Gram-negativo, oxidasa-negativo perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae*, que crece preferentemente a 37 °C y puede ser móvil o no mediante flagelos peritricos [12]. La producción de indol, fermentación de lactosa, así como una reacción negativa para las pruebas de KCN, gelatinasa y malonato, sirven para diferenciar a *E. coli* de otros géneros dentro de la tribu *Escherichieae* [13].

E. coli forma parte de la microbiota intestinal, compuesta por más de 500 especies de bacterias que suman alrededor de 10^{10} – 10^{11} células por gramo de contenido intestinal. En un par de horas posterior al nacimiento *E. coli* coloniza el tracto gastrointestinal infantil estableciéndose como el microorganismo anaerobio facultativo predominante de por vida ubicado principalmente en el colon y el ciego [14, 15]. Está presente también en nichos secundarios altamente heterogéneos como tierra, sedimentos y agua, usualmente como resultado de contaminación fecal [16].

El contenido G+C del genoma de *E. coli* es de ~50 %, cuyo tamaño varía entre 2.3×10^9 y 3×10^9 Da. Los genomas de *E. coli* están integrados por una serie de genes compartidos altamente conservados, llamado *central core*, y un conjunto flexible de

genes responsable de la plasticidad del genoma denominada como *flexible gene pool* [12].

1.2 Comensal y patógeno

Inicialmente, las cepas de *E. coli* se consideraban organismos comensales no patógenos. A principios de 1940 fueron asociadas directamente con severos brotes de diarrea infantil [11, 17]. Aunque generalmente permanece confinado al lumen intestinal, en hospederos inmunocomprometidos o cuyas barreras gastrointestinales han sido traspasadas, *E. coli* puede causar infección [18].

E. coli enfrenta múltiples ambientes, donde la presión selectiva en cada hospedero es intensa. Existen clonas altamente adaptadas que han adquirido atributos específicos de virulencia, los cuales le han conferido la habilidad de persistir en diversos nichos, así como la capacidad de causar un amplio espectro de enfermedades. Estos atributos son codificados frecuentemente en elementos genéticos intercambiables capaces de crear nuevas combinaciones de factores de virulencia, o en elementos genéticos que alguna vez fueron móviles pero que evolucionaron siendo integrados al genoma. Haciendo uso de estrategias adicionales se han presentado las eliminaciones “black hole” en el genoma o ciertas mutaciones funcionales al azar que forman parte de la plasticidad genómica para adaptarse a las diferentes condiciones. Sólo las combinaciones más exitosas de factores de virulencia han persistido para convertirse en “Patotipos” (categorías patogénicas de *E. coli*) específicos [12, 19, 20].

Se reconocen tres síndromes clínicos distintos causados por los patotipos de *E. coli*: enfermedades diarreicas, infecciones en el tracto urinario y sepsis/meningitis. Las

infecciones urinarias son la afección más común causada por cepas extraintestinales de *E. coli* uropatógena (UPEC) [20].

Entre los patógenos intestinales se reconocían seis categorías ampliamente descritas: *E. coli* enteropatógena (EPEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC) y *E. coli* adherente difusa (DAEC) [20]. Tradicionalmente la descripción de patotipos se basaba principalmente en la identificación de ciertas características fenotípicas y genotípicas, pero en el 2012 dos patotipos emergentes fueron reconocidos: *E. coli* adherente invasiva (AIEC) que se piensa está asociada con la enfermedad de Crohn sin causar infección intestinal y *E. coli* enteroagregativa productora de la toxina Shiga (STEAE) responsable del brote en Alemania en el año 2011. Entre las características que *E. coli* O104:H4 presentó fue un fenotipo de adhesión agregativo, ausencia de la Isla de Patogenicidad (PAI) en el locus LEE y expresión de la toxina Shiga, así como homólogos y subunidades de las toxinas de ETEC, sugiriendo el potencial de *E. coli* y sus híbridos emergentes [12, 21].

1.3 Métodos de estudio de *E. coli*

1.3.1 Serología

El género *Escherichia* en un principio se definía por una serie de características fisiológicas y morfológicas. Sin embargo, se reconocía ampliamente que el género era bastante heterogéneo por lo que caracteres adicionales debían introducirse para una descripción más precisa [13]. Las cepas de *E. coli*, como todas las enterobacterias, expresan antígenos somático y flagelar en la superficie bacteriana, que en conjunto constituyen la base para el sistema estándar de tipificación serológica para definir serotipos (formula antigénica O:H) [22].

El primer intento exitoso para clasificar a *E. coli* utilizando métodos serológicos fue llevado a cabo por Kauffman en 1944, quien estableció el primer esquema antigénico conformado por 20 antígenos O [23, 24]. El antígeno O es un antígeno termoestable de superficie encontrado en las colonias lisas de las Enterobacterias. El lipopolisacárido (LPS) está integrado estructuralmente por tres regiones: el lípido A o región III compuesto de ácidos grasos y fosfato de glucosamina que se encuentra anclado en la membrana celular externa de la bacteria, la Región II o *core* que sirve de unión con el lípido A vía carbohidratos y la Región I, que es el lipopolisacárido O específico, constituido por unidades oligosacarídicas repetidas que conforman la base química de la especificidad antigénica [13].

La serología ocupa un lugar central en la historia de los patógenos de *E. coli*. Previo a la identificación de factores de virulencia, la serología era el análisis fundamental para diferenciar a los patógenos [24]. Actualmente se reconocen 187 antígenos somáticos y 53 flagelares; donde sólo un grupo limitado de combinaciones se asocia directamente a enfermedades [13].

1.3.2 Grupos filogenéticos

A principios de los años 80's Whittam et al. revelaron la existencia de una subestructura genética de *E. coli* [25]. A nivel epidemiológico se habían hecho importantes observaciones acerca de la diversidad antigénica la cual consistía de la relativa frecuencia de antígenos específicos de acuerdo a la fuente de aislamiento, la asociación de antígenos O, H y K con ciertas características fenotípicas, así como la distribución en todo el mundo y la estabilidad temporal de serotipos específicos asociados a enfermedades [26].

Con base en estas observaciones en 1984 Ochman y Selander postularon por primera vez el concepto de “clona” para explicar la estructura genética de las poblaciones autóctonas de *E. coli*; donde ésta se conforma por un arreglo de linajes celulares estables con una recombinación de genes cromosomales muy limitada [27]. Los primeros estudios con Electroforesis de Multilocus de Enzimas (MLEE) demostraron que los serotipos no eran índices confiables de identidad clonal [27], pero permitieron establecer la Colección de cepas de Referencia de *E. coli* (ECOR) con 72 cepas aisladas de humanos y otras 16 especies de mamíferos [17].

Selander definió una filogenia inicial a partir del análisis por *cluster* con datos obtenidos por MLEE de 35 *loci*. Utilizando el Método apareador de grupos que emplea promedios aritméticos (UPGMA), el cual asume que la evolución de todos los linajes ocurre a un ritmo constante determinado por un estricto reloj molecular, definió seis grupos filogenéticos: A, B1, B2, C, D y E. En 1991 Herzer et al. aplicando un algoritmo más robusto, utilizaron datos de 38 *loci* de enzimas obteniendo 4 grupos filogenéticos principales: A, B1, B2 y D; con algunas secuencias sin clasificar referidas como grupo E. Estos últimos grupos filogenéticos han sido sustentados en numerosos estudios utilizando diversos datos que incluyen Análisis de Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP), Amplificación aleatoria de ADN polimórfico (RAPD), Variación de mononucleótidos en copias de loci (MNR) y secuenciación de nucleótidos [14, 17].

Clermont et al. en el 2000 desarrollaron un método triplex para clasificar las cepas de *E. coli* en 4 grupos filogenéticos (A, B1, B2 y D) por la ausencia o presencia de los genes *chuA*, requerido para el transporte del grupo hemo en EHEC O157:H7, *yjaA* identificado en la secuencia genómica de la cepa de *E. coli* K-12 y TSPE4.C, fragmento correspondiente al gen de una lipasa esterasa [14, 17, 28]. Para el año

2012 trabajos realizados por Walk, Moissenet y Luo reconocieron formalmente 8 grupos filogenéticos: A, B1, B2, C, D, E, F y Clada I. Clermont et al. propusieron un método Quadruplex de PCR, utilizando secuencias modificadas de los genes *chuA*, *yjaA* y TSPE4.C2 para evitar polimorfismos, incluyendo el gen *arpA*, que permite identificar cepas del grupo F, erróneamente asignadas al grupo D [25].

2. ETEC

2.1 Datos generales

Responsable por un estimado de 300,000-500,000 muertes anuales en niños menores de 5 años, ETEC es una de las mayores causas de diarrea infantil en países subdesarrollados tropicales, así como de la diarrea del viajero en visitantes de dichas regiones [17, 29, 30].

Reconocida por primera vez como causa de diarrea en lechones, la enfermedad continúa siendo letal en animales recién nacidos; cuyo estudio permitió elucidar el mecanismo de patogénesis de ETEC, incluidas las dos enterotoxinas codificadas en plásmidos [23, 31]. La identificación de ETEC en humanos comenzó en Calcuta en 1956, De y col. utilizaron cepas aisladas de humanos en intestino de conejo, observando un efecto similar al de la toxina colérica. Estos trabajos fueron continuados 10 años después por Sack definiendo a ETEC como responsable de diarrea en Calcuta. En México, Du Pont describió la asociación de ETEC con enfermedades diarreicas en adultos y niños en 1971 [11, 32].

ETEC se transmite principalmente a través de agua y comida contaminada con una dosis infecciosa de 10^6 a 10^{10} microorganismos, contrario a *Shigella* o *E. coli* O157:H7 cuya transmisión primaria es de persona a persona [12, 20]. A diferencia de los comensales localizados en el colon, ETEC coloniza el intestino delgado,

confinándose a la superficie epitelial -contrario a otros enteropatógenos que invaden tejidos internos-, permitiendo la secreción posterior de al menos una de sus enterotoxinas: termolábil (LT) y/o termoestable (ST) [20, 33].

Al menos 150 serotipos O:H han sido encontrados en las cepas ETEC de humanos, sin embargo un número más limitado de combinaciones se ha detectado en pacientes que han requerido atención médica, caracterizados por un grupo conservado de factores de virulencia [35]. Entre los serogrupos más comunes asociados a enfermedad se encuentran O6, O8, O25, O78, O128 y O153, que comprenden alrededor de 60-70 % de los aislamientos examinados alrededor del mundo, donde el 30-40 % restante pertenece a una amplia diversidad de serogrupos distintos [35].

2.2 Toxinas

2.2.1 ST

Se ha reportado la existencia de dos toxinas de ST que son química y genéticamente distintas: STI (STa) y STII (STb). STI comprende una familia de polipéptidos no inmunogénicos identificados en aislamientos humanos cuyo peso molecular está comprendido entre 1500-2000 Da. Se trata de moléculas solubles en metanol que muestran actividad biológica en ratones lactantes, conejos, ratas y lechones [36, 37] mediada por la estimulación de guanilato ciclasa en el intestino por su unión a receptores guanilil ciclasa C (GC-C-). Las moléculas STII típicamente asociadas a cepas porcinas son insolubles en metanol y su actividad biológica se restringe a lechones sin involucrar elevación de nucleótidos cíclicos [29, 37, 38].

Las moléculas STI consisten de 18 (STp) o 19 (STh) residuos de aminoácidos donde 13 son idénticos entre sí, incluyendo las cisteínas responsables de los puentes

disulfuro formados entre Cys-6 y Cys-11, Cys-7 y Cys-15, y Cys-10 y Cys-18 que estabilizan al péptido y conforman el dominio tóxico del mismo [39]. Investigaciones sugieren que el 2º giro (aa 12-15: Asn-Pro-Ala-Cys) es el más importante para interactuar con el receptor y por tanto, al ejercer su toxicidad; además de ser altamente conservado dentro de la familia ST [40].

Codificadas por el gen *estA* asociado al transposón Tn1681 localizado en plásmidos transmisibles [40], STp y STh son expresadas como pre-propéptidos de 72 aminoácidos en el citoplasma [41]. El péptido líder –pre-región (aa 1-19)- dirige la translocación del pre-propéptido a través de la membrana interna con ayuda de la maquinaria general de exportación Sec (vía común de secreción entre bacterias Gram negativas). La translocación de la membrana externa es acompañada por el desprendimiento del propéptido (aa 20-53) generando un péptido maduro. En el espacio extracelular se da la formación de puentes disulfuro por acción de la proteína disulfuro intercambiadora DsbA dando lugar al péptido biológicamente activo [42, 43].

STI actúa a concentraciones nanomolares enlazándose a receptores GC-C- localizados sobre la membrana apical de células epiteliales intestinales [41, 43]. Dichos receptores se encuentran en gran cantidad en infantes y su número decrece rápidamente con la edad, su agonista endógeno es una hormona de 15 aa denominada guanilina que presenta 4 cistinas en su estructura y que es menos potente que la toxina, jugando un papel regulador en la homeóstasis basal del tracto gastrointestinal. La interacción de STI con el receptor genera una respuesta mayor a la normal que incrementa los niveles de cGMP y activa la protein cinasa dependiente de cGMP II. Lo anterior provoca la fosforilación del regulador transmembranal fibroso quístico (CFTR por sus siglas en inglés), un canal iónico en las vellosidades,

aumentando así la secreción de Cl⁻ y disminuyendo la absorción de NaCl que resulta en la pérdida neta de agua a través de diarrea osmótica [29].

2.2.2 LT

Existen dos clases de LT diferenciadas por la estructura de la subunidad B así como por sus propiedades antigénicas: la toxina prototípica LT-I codificada en plásmidos y LT-II, aislada principalmente en animales y muy poco en humanos, codificada en el cromosoma [12, 41].

LT-I se encuentra íntimamente relacionada con la toxina colérica (CT), donde aproximadamente el 80 % de las secuencias de aminoácidos son idénticas entre sí. LT-I y CT comparten numerosas características incluyendo la estructura terciaria, identidad de receptor primario, actividad enzimática y actividad en ensayos con animales. La gran similitud estructural y funcional sugiere que se encuentran relacionadas evolutivamente, donde el gen LT fue adquirido por *E. coli* resultado de la transferencia interespecie de genes por *V. cholerae* [24, 44].

LT es una holotoxina heterohexamérica compuesta por la subunidad B que comprende 5 polipéptidos idénticos (11.5 kDa) ensamblados formando un anillo pentamérico altamente estable y la subunidad A. La subunidad A es un polipéptido individual (28 kDa) compuesto por dos dominios unidos entre sí con un puente disulfuro: A1, que activa la toxina, y A2, una porción helicoidal de la molécula anclada al pentámero de subunidades B [29, 45].

La secreción de LT requiere que los péptidos N-terminales de señalización de ambas subunidades se desprendan durante el transporte dependiente de la maquinaria Sec, a través de la membrana hacia el periplasma. Una vez que salen, los monómeros son ensamblados en la holotoxina. La secreción a través de la

membrana externa depende de un complejo sistema de secreción tipo II, conocido como la vía general de secreción [29].

El intestino humano está revestido por una monocapa continua de células polarizadas epiteliales unidas estrechamente entre sí que forman una barrera contra el transporte de solutos así como de la invasión microbiana. Para poder penetrar la barrera epitelial, tanto CT como LT co-adoptan la maquinaria molecular de los enterocitos del hospedero para ordenar, mover y organizar las membranas celulares y sus componentes. Esto depende de la habilidad oportunista de LT para enlazarse a receptores lipídicos específicos en la superficie celular [45]. La toxina LT se une a un receptor (gangliósido GM₁) cuya secuencia sacarídica terminal es Galβ1-3GalNacβ1(NeuAcα2-3)-3Gal--, y a una segunda clase de receptores no reconocidos por CT que incluyen GM₂ y asialo-GM₁. Esta unión desencadena la endocitosis de la holotoxina. La porción A1 debe ser translocada a través de la membrana intracelular y reducirse para ser enzimáticamente activa [44]. De esta manera puede interactuar alostéricamente con factores ADP ribosilantes para ribosilar Gsα, una proteína intracelular con guanina. La inhibición de la actividad GTPasa de Gsα conduce a la activación constitutiva de la adenilato ciclasa. Al elevarse los niveles de cAMP intracelular, se activa el CFTR seguido por la secreción de electrolitos y agua, clínicamente descrito como diarrea acuosa [24, 29].

2.3 Factores de colonización

La colonización del intestino delgado por ETEC depende principalmente de la expresión de estructuras proteicas de superficie denominadas factores de colonización (CFs por sus siglas en inglés) [29, 46]. Se trata de filamentos compuestos por un tracto homopolimérico largo y rígido integrado a partir de subunidades de pilina, la cual determina las propiedades antigénicas de cada

fimbria; y un tramo adhesivo menor en relación >1000:1 altamente conservado que se localiza en la punta de la fimbria [47, 48].

Las propiedades de adhesión de *E. coli* fueron reconocidas desde 1990 al observar la hemaglutinación de eritrocitos por ciertas cepas de *E. coli*, pero fue hasta 1955 que se relacionó directamente con las fimbrias permitiendo su identificación [49]. La interacción que establecen los CFs con sus receptores en el hospedero es altamente específica, atribuida a la enorme diversidad de oligosacáridos expresados en la membrana celular. Los receptores reportados comprenden asialogangliósidos y glicoconjugados (glicolípidos y glicoproteínas) [46, 47, 50].

Codificados en plásmidos, los CFs se expresan preferencialmente en medios sólidos y no se presentan a temperaturas comprendidas entre 18-22 °C [36]. Hasta el momento se han caracterizado al menos 25 CFs para ETEC cuya longitud varía de 1-20 µm, la mayoría clasificadas como fimbrias Clase 1 y 5 con base en relaciones filogenéticas [51]. Dentro de los CFs identificados con mayor prevalencia a nivel mundial se incluyen CFA I, CS1, CS2, CS3, CS4, CS5, CS6, CS7, CS14, CS17 Y CS21, sin embargo un 30-50 % de los aislamientos continúa sin CFs detectables [11].

2.3.1 CFA I

CFA I es el arquetipo de la familia de fimbrias Clase 5, ensambladas mediante la vía de la proteína acarreadora alterna, que comparten características bioquímicas y genéticas, cuyo análisis evolutivo ha permitido subdividir las en: 5a (CFA/I, CS4, CS14), 5b (CS1, CS17, CS19, PCFO71) y 5c (CS2). Su diferenciación ha sido atribuida a la presión adaptativa impuesta por el hospedero [48, 52].

Las fimbrias CFA/I maduras son polímeros típicamente compuestos por filamentos helicoidales de ~1 µm de largo con diámetro de 7.4 nm constituidos de 1,000 copias idénticas de la subunidad mayor de pilina CfaB y 1 copia de la subunidad adhesiva menor CfaE en la punta [53, 54]. Los plásmidos que codifican para CFA/I son regulados positivamente por genes trans-activos tales como *rns* y *cfaR* encontrados en el mismo plásmido o en otros [35]. Los operones que codifican para el bioensamblaje de CFA I codifican para (en orden) la chaperona periplásmica, la subunidad mayor fimbrial, la proteína *usher* de membrana externa y la subunidad fimbrial menor [33].

2.3.2 CFA II

CFA II comprende los factores de colonización CS1, CS2 y CS3; CS3 se puede encontrar solo o en asociación con CS1 o CS2 [55].

CS1 está compuesta de cientos de subunidades de CooA más una subunidad menor de pilina CooD, la cual es necesaria para comenzar el ensamblaje de la fimbria. CS2, de manera muy similar a CS1 y CFA I se ensambla mediante la vía alterna de la proteína chaperona y cuenta con dos subunidades [35].

CS3 es un apéndice angosto con un diámetro de 2 nm, por lo que ha sido descrito en numerosas ocasiones como fibrilla. Está codificado en el *cluster* de genes *cstA-H*. *CstA* codifica para una proteína con secuencia similar a las chaperonas periplásmicas de pilina. El gen más largo, *cstB* codifica una proteína similar a las proteínas *usher*. A diferencia de los pili CS1 o CS2, la relación de la adhesina respecto a las subunidades estructurales es de 1:1.5 [35].

2.3.3 Longus

El CS21 (longus) posee una longitud (20 μm) y distribución polar característica entre las fimbrias de ETEC, consiste de largos filamentos de 7 nm de diámetro entrecruzados de manera similar al pili en forma de rizo de EPEC. Los filamentos de longus son polímeros lineales integrados de la subunidad estructural LngA de 22 KDa generada a partir de la acción de una prepilina peptidasa sobre una subunidad mayor de 28 kDa [55, 56].

El CS21 pertenece a la clase B dentro de los pili tipo IV expresados por enteropatógenos, incluyendo *V. cholerae* y EPEC; que generalmente comparten una serie de propiedades estructurales. Los pili tipo IV tienen en común una característica secuencia de péptido líder, un residuo de aminoácidos altamente conservado en el extremo N-terminal de 25-30 aa, así como dos residuos de Cys que forman un puente disulfuro en el extremo C-terminal [57, 58].

La expresión del pili funcional CS21 requiere la presencia de varios genes accesorios involucrados en la síntesis de la subunidad precursora, la secreción a través de la célula, el anclaje y la polimerización para formar el organelo. El *cluster* de DNA presente en el plásmido de virulencia que codifica para CS21 tiene un tamaño de 14kb y se compone de 16 genes biosintéticos homólogos en un 57-95 % a los genes de CFA III [57].

3. Antimicrobianos

3.1 Generalidades

Las moléculas de antimicrobianos pueden considerarse como ligandos cuyos receptores son las proteínas de los microorganismos, donde la interacción entre la

concentración de ellos y el efecto en una población microbiana está modelada por: la concentración mínima inhibitoria (Índice de potencia del antimicrobiano), el efecto máximo y el factor de Hill. Las proteínas sobre las que actúa el antimicrobiano son componentes esenciales de reacciones bioquímicas de los microorganismos, y la interferencia en sus vías fisiológicas termina por destruirlos. La clasificación de un antimicrobiano se basa en:

- a. La clase y el espectro de microorganismo que destruye.
- b. La vía metabólica que interfiere.
- c. La estructura química de su farmacóforo (fracción química activa del fármaco que se une al receptor microbiano) [59].

3.2 Familias de antimicrobianos

Desde su descubrimiento en la década de los 40's han surgido diversas familias de antimicrobianos y actualmente son el principal grupo terapéutico; entre las que se distinguen: penicilinas, aminoglicósidos, cefalosporinas, macrólidos, lincosinamidas, tetraciclinas, sulfonamidas, carbapenemes, quinolonas, glicopéptidos, monobactam y otras [60].

Cefalosporinas: actúan a nivel de la pared celular, en la última etapa de su síntesis. Se clasifican en generaciones que van desde la primera hasta la cuarta dependiendo del espectro de acción que poseen [61]. Las cefalosporinas de tercera generación son las más activas frente a bacilos Gram negativos, resistentes a muchas de las β -lactamasas que producen, la cefotaxima y ceftazidima son un ejemplo de ellas [62].

Los carbapenem son antimicrobianos bicíclicos relacionados estructuralmente con los β -lactámicos con la ventaja de no ser inactivados por las β -lactamasas plasmídicas o cromosómicas de las Enterobacterias. Presentan el mayor espectro

de acción conocido, activos frente a los anaerobios. El imipenem, meropenem, doripenem y ertapenem pertenecen a este grupo [62, 63].

El único antimicrobiano monobactam es el aztreonam, que tiene cobertura sobre bacterias gram negativas comunitarias y nosocomiales. Su mecanismo de acción es similar a los β -lactámicos: atraviesan la pared y la membrana celular para interaccionar con las proteínas de unión de penicilinas (PBP's) necesarias en las últimas etapas de la transpeptidación. Su actividad difiere de la de otros β -lactámicos y se asemeja mucho a la de un aminoglucósido; presenta gran resistencia a las β -lactamasas [59, 60, 63].

La tetraciclina tiene un anillo de naftaleno y se une a la fracción 30s, bloqueando la unión del aminoacil del ARNt con el sitio aceptor (locus A) en el complejo formado por el ARNm y el ribosoma. Inhibe la síntesis proteica por lo que su espectro de acción es muy amplio [61, 63]. Este antimicrobiano sigue siendo el antibiótico de elección en el tratamiento del acné, cólera aguda, brucelosis, clamidiasis, peste, neumonía comunitaria leve, entre otras [60].

La combinación trimetoprim (diaminopiridina) y sulfametoxazol (sulfonamida) se basa en su acción sobre la reacción enzimática de la síntesis del ácido tetrahidrofólico mediante competitividad metabólica. La sulfonamida inhibe la incorporación del ácido p-aminobenzoico al ácido fólico y el trimetoprim inhibe la reducción de dihidrofolato a tetrahidrofolato [61, 62].

El desarrollo profiláctico de las quinolonas comenzó en 1962, cuando Leshner et al. descubrieron por accidente al ácido nalidíxico como subproducto en la síntesis del compuesto cloroquinona, fármaco utilizado contra la malaria [64]. Existe un gran número de quinolonas, pero todas poseen una estructura y mecanismo de acción

comunes [62]. Las quinolonas actúan sobre las enzimas girasa y topoisomerasa IV, que trabajan en conjunto en la replicación, transcripción, recombinación y reparación del DNA. La girasa puede introducir superenrollamientos negativos en el DNA, remover superenrollamientos negativos y positivos y catenar y descatenar moléculas cerradas circulares. La topoisomerasa IV puede igualmente remover superenrollamientos y actúa aún mejor descatenando [65]. Ejemplos de quinolonas de acuerdo a la generación son: 1^a ácido nalidíxico, cinoxacina; 2^a norfloxacin, ciprofloxacina, ofloxacina, levofloxacina, 3^a gatifloxacina, grepafloxacina, 4^a trovafloxacina, moxifloxacina [64].

3.3 Resistencia a antimicrobianos

El desarrollo de resistencias es extremadamente variable. Existen varios mecanismos de resistencia entre los que se incluyen: destrucción o inactivación del agente antimicrobiano –numerosas enzimas llevan a cabo este mecanismo, entre las más conocidas están las β -lactamasas-, disminución de la concentración intrabacteriana del antimicrobiano que puede deberse a la modificación de la permeabilidad el fármaco o el uso de bombas de eflujo, desarrollo de un objetivo estructuralmente alterado para el fármaco y desarrollo de vías metabólicas alternativas [63].

IV. Justificación

Responsable de alrededor de 350,000 muertes al año alrededor del mundo, ETEC se ha posicionado como uno de los patógenos más importantes después del rotavirus al causar diarrea infecciosa en niños menores de 5 años primordialmente. Es también uno de los agentes etiológicos de primera línea causantes de la diarrea del viajero en zonas tropicales.

ETEC junto con rotavirus, *Salmonella* y *V. cholerae* se consideran agentes endémicos de países subdesarrollados [11], donde las condiciones climáticas, de higiene, así como la desnutrición son factores que contribuyen al desarrollo de enfermedades diarreicas. Debido a la severidad de la deshidratación puede presentarse la muerte, sin embargo en infantes puede tener efectos agravantes sobre otras enfermedades e incluso puede causar deficiencias cognitivas durante el desarrollo [9].

Aunque actualmente se considera que México está atravesando la transición epidemiológica, la cual consiste en el tránsito de la morbilidad caracterizada por enfermedades infectocontagiosas hacia enfermedades crónico degenerativas [4], el número de casos aún lo posiciona como un problema de salud pública. Lo anterior aunado al panorama mundial donde en África y Asia aún se presentan altos niveles de mortalidad hace necesaria la creación de estrategias para mejorar la situación.

El entendimiento de la patogénesis de ETEC resulta primordial para la optimización de recursos empleados actualmente para manejar la infección, así como para el desarrollo de inmunógenos protectores que prevengan tan amplia cobertura de la bacteria.

V. Hipótesis

Si las cepas de *E. coli* aisladas de diarrea infantil presentan genes de las toxinas LT y/o ST y factores de colonización se clasificarán como ETEC.

VI. Objetivos

1. Objetivo general

Caracterización de un grupo antigénicamente diverso de *Escherichia coli* con base en factores de virulencia y perfiles de resistencia a antibióticos.

2. Objetivos particulares

- 1) Mediante reacciones de aglutinación con 187 sueros anti-antígenos somáticos (O) y 53 sueros anti-antígeno H (H), confirmar el serotipo de los aislamientos de *E. coli*.
- 2) Con el uso de iniciadores específicos y la PCR conocer si los aislamientos de *E. coli* presentan factores de virulencia acordes al patotipo ETEC: *lt*, *st*, factores de colonización (CFs): *cs1*, *cs3*, *cfa I* y *cs21*.
- 3) Realizar un análisis de la presencia de los genes *arpA*, *chuA*, *yjaA* y un fragmento designado como *TSPE4.C2* mediante la reacción de la polimerasa (PCR) para definir el o los grupos filogenéticos en los que se ubican las cepas de *E. coli*.
- 4) Establecer mediante el método de Kirby-Bauer el patrón de resistencia a los antimicrobianos de espectro extendido.

VII. Metodología

1. Confirmación de viabilidad y pureza

Debido a que los cultivos bacterianos en el cepario del Laboratorio de Salud Pública de la Facultad de Medicina, UNAM se conservan en medio Dorset, se confirmó su viabilidad y pureza. Para esto fueron inoculados y estriados por agotamiento en placas de Agar MacConkey (BD, Bioxon®). Después de incubar las placas a 37 °C durante 18-24 h, se eligió una colonia lisa cóncava de color rosa a rojo con borde liso característica de *E. coli*. De presentarse dos colonias típicas con morfología distinta, ambas fueron sembradas por estría cerrada en tubos de agar de soya tripticaseína (TSA) inclinado, dicho tubo se utilizó como copia de trabajo y a partir de este cultivo se realizaron todas las pruebas del estudio.

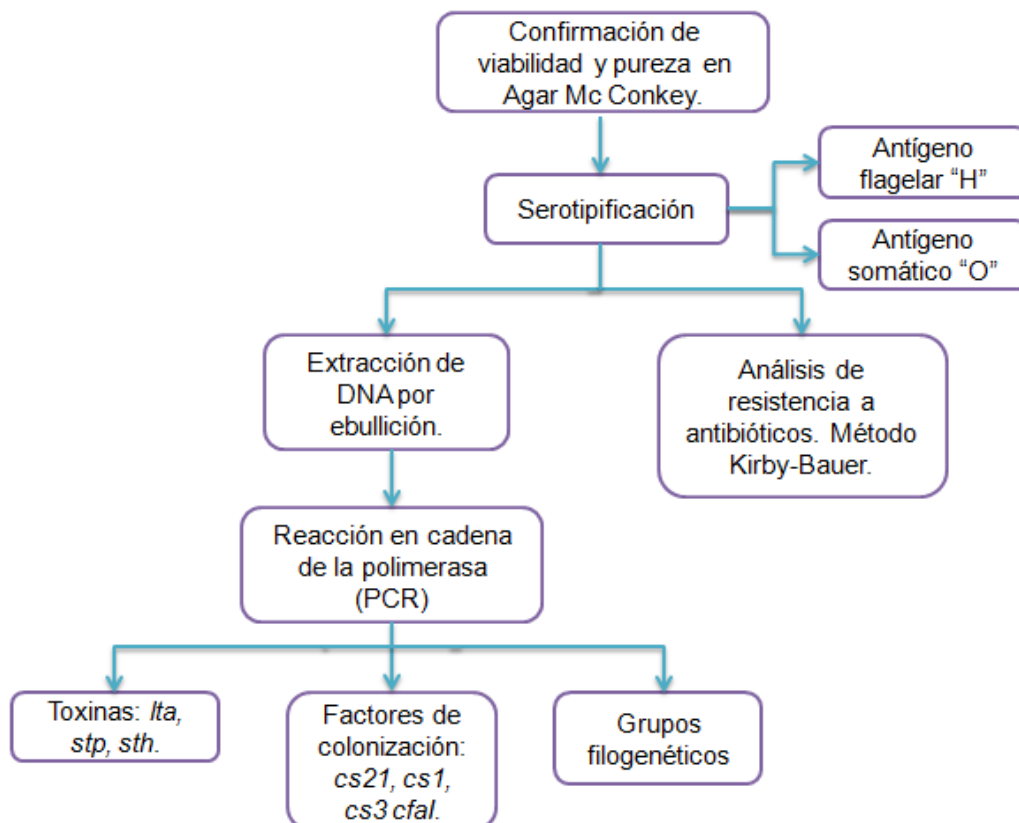


Figura 1. Diagrama general para la caracterización de cepas ETEC de diversas regiones.

2. Tipificación serológica

2.1 Preparación del antígeno somático (O)

Las cepas fueron sembradas por estría cerrada en agar TSA inclinado, la incubación se realizó a 37 °C durante 18-24 h, posteriormente el crecimiento bacteriano se resuspendió con 10 mL de solución salina (0.876 % de NaCl). La suspensión bacteriana obtenida se transfirió a otro tubo de ensayo y se sometió a ebullición con vapor fluente a 115 °C durante 1 h. Al finalizar el tiempo de ebullición, a cada tubo se adicionaron 10 mL de formalina (0.876 % NaCl, 0.03 % Formaldehído) para su conservación y uso posterior.

Utilizando un dispensador multicanales automático (Dynatech Laboratories, Quick Spense Controller), en microplacas de 96 pozos con fondo en U (NUNC) se colocaron 50 µL de cada uno de 187 sueros (SERUNAM) contra el antígeno somático de *E. coli* a una dilución 1:100. Los sueros anti-O de *E. coli* fueron obtenidos previamente en conejos utilizando un esquema de inmunización reportado previamente por Ewing (1984) con cepas de referencia de la National Collection of Type Cultures (NCTC). En cada pozo con los sueros anti-O se adicionaron 50 µL del antígeno O de las cepas y las microplacas con las suspensiones sueros/antígeno O se incubaron a 50 °C por 18-24 h. Las reacciones positivas de microaglutinación se identificaron a contraluz y se registraron en la hoja de datos correspondiente. En caso de presentarse reacciones cruzadas se procedió a realizar la titulación de sueros.

Determinación de serogrupos. Para esto se realizó la titulación de sueros anti-O con los antígenos O de las cepas, primero en los pozos en la primera fila de las microplaca de 96 pozos se colocan 100 µL del suero correspondiente mientras que en los 84 pozos restantes se colocaron 50 µL de solución salina. Utilizando una

micropipeta multicanales se tomaron 50 μ L del antisuero de la primera fila y se mezclaron con 50 μ L de solución salina de la siguiente fila hacia abajo para realizar diluciones dobles seriadas logrando un intervalo de dilución de 1:100 a 1:12800 de cada suero. El antígeno O se distribuyó por columnas en las microplacas, de modo que después de incubarse a 50 °C por 24 h, fuera posible identificar la dilución a la que se presentó una reacción antígeno-anticuerpo y comparar con los títulos homólogos de los sueros correspondientes. De presentarse reacciones cruzadas, se procedió a realizar una segunda serie de diluciones con los antisueros específicos como se describió anteriormente.

2.2 Obtención del antígeno flagelar (H)

Cada cepa fue inoculada por picadura en medio semisólido en tubos de Craigie y se incubó a 30 °C. Después de tres días de incubación se revisaron los tubos para ver si el medio presentaba turbidez por el movimiento de las bacterias, lo cuales continuaron siendo revisados por 14 días consecutivos. Una vez que se movió el cultivo, la bacteria fue inoculada en caldo biotriptasa al 2.0 % y se incubó a 30 °C por 18-24 h. Por último, después de la incubación a cada tubo se adicionaron 10 mL de formalina al 0.6 % para su conservación y uso posterior.

Determinación del antígeno H (serotipo). En microplacas de 96 pozos con fondo en U, se distribuyeron 50 μ L de 53 sueros flagelares (1:100), posteriormente se adicionó el antígeno flagelar de cada cepa y las microplacas se incubaron a 50 °C por 2 h. Se registran los resultados de las micro-aglutinaciones y se prosiguió a realizar las diluciones dobles seriadas. De forma similar que en la determinación del serogrupo del antígeno somático, se realizaron diluciones seriadas al doble desde 1:100 a 1:12800 de los sueros anti-H en volúmenes de 50 μ L. Una vez realizadas las

diluciones se adicionaron los antígenos H de las cepas, cada placa se incubó a 50 °C durante 2 h y finalmente se registraron las microaglutinaciones.

3. Determinación de genes de virulencia

3.1 Extracción de DNA

Cada cepa fue inoculada en tubos con 2 mL de caldo Luria-Bertain (LB, BDBioxon®) y se incubaron a 37 °C por 18-24 h. Después de la incubación, se recuperó el crecimiento bacteriano; para esto, cada tubo se agitó utilizando un Vórtex (FisherScientific®). La suspensión bacteriana se transfirió a microtubos de 1.5 mL para centrifugar a 13,000 rpm por 5 minutos. Después de la centrifugación el sobrenadante se separó por decantación y se desechó, el pellet se resuspendió con 200 µL de agua ultrapura (libre de DNasas y RNasas) y agitación fuerte con Vórtex. Los tubos fueron sometidos a ebullición por 10 min e inmediatamente se colocaron en hielo por 5 min. Se realizó una segunda centrifugación a 13,000 rpm por 10 min después de mezclar el contenido con agitación en vórtex. Finalmente se recuperaron 100 µL del sobrenadante y en un microtubo de 0.6 mL debidamente etiquetado se conservó en congelación a -20 °C hasta su uso.

Para confirmar que la extracción de ADN se realizó adecuadamente, el ADN se corrió en geles de agarosa al 1 % usando una cámara para electroforesis (BIORAD) que contenía buffer de Tris Borato Etilendiamino-tetra acético (TBE). Para cargar los carriles del gel con 10 µL de una suspensión que consistía de 8 µL de DNA y 2 µL de azul de bromofenol. Se le aplicó una corriente de 100 V durante una hora. Una vez que el ADN se desplazó, el gel se tiñó con colorante RedGel (Biotium, Biolabs New England) durante 15 minutos. Para visualizar las bandas de DNA, se utilizó un transiluminador de rayos UV, que en conjunto con un documentador de imágenes (Biosens SC805 Gel Imagine Systems) permitieron tomar la fotografía del ADN.

3.2 PCR

Para llevar a cabo la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se prepararon diferentes cocteles en volúmenes de 25 µL con dNTP's, buffer de MgCl₂, Taq polimerasa, agua ultrapura. Las condiciones de la PCR y los iniciadores fueron las reportadas previamente por diferentes autores (Cuadro 1), como control de la PCR se utilizó DNA de cepas de referencia recomendadas por los autores.

Cuadro 1. Secuencia de iniciadores para llevar a cabo la PCR.

PCR	Gen	Secuencia de 5' a 3'	Producto (pb)	Referencia
Cuadruplex	<i>chuA.f</i>	ATGGTACCGGACGAACCAAC	288	Clermont, 2013 [25]
	<i>chA.r</i>	TGCCGCCAGTACCAAAGACA		
	<i>yjaA.f</i>	CAAACGTGAAGTGTCAGGAG	211	
	<i>Yja.r</i>	AATGCGTTCCTCAACCTGTG		
	<i>TspE4C2.f</i>	CACTATTCGTAAGGTCATCC	152	
	<i>TspE4C2.r</i>	AGTTTATCGCTGCGGGTTCGC		
	<i>AceK.f</i>	AACGCTATTCGCCAGCTTGC	400	
	<i>ArpA1.r</i>	TCTCCCCATACCGTACGCTA		
Grupo E	<i>ArpAgpE.f</i>	GATTCCATCTTGTCAAAATATGCC	301	
	<i>ArpAgpE.r</i>	GAAAAGAAAAGAATTCCCAAGAG		
Grupo C	<i>trpAgpC.f</i>	AGTTTTATGCCAGTGCGAG	219	
	<i>trpAgpC.r</i>	TCTGCGCCGGTACGCCC		
Control Interno	<i>trpBA.f</i>	CGGCGATAAAGACATCTTCAC	489	
	<i>trpBA.r</i>	GCAACGCGGCCTGGCGGAAG		
LTa	<i>lt.f</i>	ACGGCGTTACTATCCTCTC	273	Sjöling, 2007 [66]
	<i>lt.r</i>	TGGTCTCGGTACAGATATGTG		
STp	<i>stp.f</i>	TCTTTCCCTCTTTTAGTCAG	166	
	<i>stp.r</i>	ACAGGCAGGATTACAACAAAG		
STh	<i>Sth.f</i>	CTTTCTGTATTATCTTTTTACCTTT	185	Savarino, [48]
	<i>Sth.r</i>	CACCCGGTACAAGCAGGATTAC		
CS21	<i>IngA.f</i>	ATGAGCCTGCTGGAAGTTATCATTG	608	Mazariego-Espinosa et al., 2010 [31]
	<i>IngA.r</i>	TTAACGGCTACCTAAAGTAATTGAGTT		
CFA I	<i>cfal.f</i>	GGTGAATGGCTCTGACCACA	479	Bekal S., 2003 [67]
	<i>cfal.r</i>	GTCATTACAAGAGATACTACT		
CS1	<i>cs1.f</i>	GCTCACACCATCAACACCGTT	321	
	<i>cs1.r</i>	CGTTGACTTAGTCAGGATAAT		
CS3	<i>cs3.f</i>	GGGCCACTCTAACCAAAGAA	400	
	<i>cs3.r</i>	CGGTAATTACCTGAACTAAA		

Las cantidades de cada reactivo de la PCR variaron dependiendo del gen (Cuadro 2A).

Cuadro 2A. Composición de mezcla de reacción para amplificar diversos genes mediante PCR.

	Filogenia		Factores de virulencia					
	Quadruplex	C/D	<i>lta+stp</i>	<i>sth</i>	<i>cfal</i>	<i>cs21</i>	<i>cs1</i>	<i>cs3</i>
H2O	10	14,5	14	15,3	16,75	15,25	12,7	12,7
Buffer	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
dNTP's	2,5	2	2,5	2,5	1	2,5	5	5
MgCl2	0,75	0,75	0,75	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
taq	0,25	0,25	0,25	0,2	0,25	0,25	0,3	0,3

En todos los casos, se adicionó 1 µL del *primer delantero* y 1 µL del *primer reverso* dependiendo de los genes que se quisiera identificar en cada reacción, además se añadió 1 µL del DNA de la cepa a analizar para así completar el volumen de reacción de 25 µL. En el caso de la PCR para determinar subgrupos de filogenia se añadió 1 µL de los iniciadores para el gen del grupo correspondiente (C o D) y 1 µL de *primer delantero* y *reverso* del control interno.

Por último, los programas de temperatura para la amplificación también presentaron variaciones en el número de ciclos para la fase de extensión, alineación y elongación (Cuadro 2B).

Cuadro 2B. Programa de temperatura en el termociclador (AXYGEN) para llevar a cabo la PCR de diversos genes y porcentaje de agarosa.

	Filogenia	<i>lta+stp</i>	<i>sth</i>	<i>cfal</i>	<i>cs21</i>	<i>cs1</i> y <i>cs3</i>
Desnaturalización	94/4'	94/5'	94/5'	94/5'	94/2'	94/5'
Extensión	(30) 94/5''	(40) 94/30''	(35) 94/1'	(30) 94/1'	(35) 95/1'	(40) 94/30''
Alineamiento	58/20''	54/30''	49/1'	51/1'	62/1'	52/30''
Elongación	72/40''	72/30''	72/1'	72/1'	72/1'	72/30''
Extensión final	72/5'	72/5'	72/7'	72/5'	72/5'	72/5'
Control	Quadruplex K12 ¹ y 116979 ² Grupo C: Ecor 70 Grupo D: 108287 ³	ETEC H10407 O78:H11			ETEC 9034A O8:H9	<i>E. coli</i> 112114
Agarosa (%)	1.8	1.5			1.2	1.5

() Número de ciclos requeridos para la PCR. Cada ciclo está integrado por una fase de extensión inicial, alineamiento y elongación.

- 1 O127:H6 (E2348/69)
- 2 UPEC O6:H1 (CFT073)
- 3 O157:H7 (ATCC 700927)

Los productos de amplificación obtenidos fueron visualizados en un gel de agarosa cuya concentración dependió del peso molecular del amplicón. Para esto, en cada carril se depositaron 8 μ L del amplicón mezclados previamente con 2 μ L de azul de bromofenol. Un pozo se utilizó para el marcador de peso molecular (New England, BioLabs. Quick-Load, 100 pb). El gel se colocó en una cámara para electroforesis inmerso en buffer TBE, al cual se le aplicó una corriente de 100 V por 90 min. La tinción del gel al terminar la electroforesis se realizó con colorante RedGel (Biotium, Biolabs New England) durante 15 minutos. La visualización del gel se llevó a cabo usando UV con fotodocumentador de imágenes (Biosens SC805 Gel Imagine Systems).

3.3 Estudio de estabilidad de plásmidos

Una observación interesante de nuestro estudio fue la falta de concordancia de los resultados obtenidos previamente en la detección de los genes de las toxinas ST y LT en las cepas de estudio por lo que se decidió realizar una prueba de estabilidad de plásmidos. Esto con el fin de establecer si el hecho estaba relacionado con la falta de concordancia en la detección de los genes mencionados. Para este propósito se eligieron 3 cepas de *E. coli* de los serotipos O6:H16, 153:NM- y O128ac:H12 que presentaron reacción positiva para la presencia de uno o más genes de las toxinas de ETEC. Como control de los experimentos se utilizó la cepa ETEC H10407 (O78:H12). Dichos experimentos consistieron en realizar 10 pases consecutivos de las cepas en caldo LB, cada uno de los pases consistió en inocular el caldo LB con 5 μ L del cultivo e incubar a 37 °C durante 24 h, al final del tiempo de incubación el crecimiento bacteriano se agitó con vórtex para resuspender el cultivo y en condiciones de asepsia fueron inoculados tubos nuevos con LB con 5 μ L de la suspensión bacteriana, y nuevamente los tubos se incubaron a 37 °C por 24 h. El procedimiento anterior se llevó a cabo durante diez días. De cada una de las suspensiones bacterianas (1.8 mL) se obtuvo el ADN por el método de ebullición, como se describió previamente. El DNA obtenido fue empleado para detectar mediante la PCR los genes *lta*, *stp* y *sth*; cuyas secuencias, condiciones de reacción y amplificación fueron similares a las que se establecieron previamente para la detección de dichos genes.

4. Resistencia a los antimicrobianos

Se realizó de acuerdo al método de difusión en agar Kirby-Bauer, cuya metodología se encuentra descrita en la décima edición del manual del Comité Nacional de Normas de Laboratorios Clínicos del 2009; para este propósito se prepararon cajas con 25 mL de agar Mueller Hinton (M-H, BD Bioxon). Las placas se utilizaron no más de 24 h después de su preparación para evitar deshidratación y modificación en la difusión del antibiótico. Se utilizaron cultivos frescos, sembrados el día anterior en TSA e incubados a 37 °C por 24h, del crecimiento bacteriano se preparó una suspensión bacteriana con solución salina fisiológica estéril cuya concentración correspondía al tubo 0.5 de la escala McFarland determinado por nefelometría (1.5×10^8 bacterias/mL). Una vez ajustado el inóculo, en un tiempo no mayor a 15 minutos, con hisopos estériles se realizó la siembra masiva en un par de cajas de M-H y por triplicado, en la pared del tubo se eliminó el exceso de suspensión bacteriana. Inmediatamente, con pinzas estériles se colocaron los sensidiscos de manera equidistante, con una separación mínima de 24 mm para evitar efectos de sinergia o antagonismo. Las placas de agar M-H con los sensidiscos fueron incubadas a 37 °C durante 24 h, y con un Vernier se procedió a medir y registrar los halos de inhibición. Como control de las pruebas se utilizó la cepa de *E. coli* de la ATCC® 25922.

Cuadro 3. Concentración de los antimicrobianos para determinar patrones de resistencia y diámetro del halo de inhibición recomendados para su interpretación.

Antimicrobiano		Concentración (µg/sensidisco)	Diámetro (mm)		
			R	I	S
Cefalosporinas	Cefepime (FEP)	30	14	15-17	18
	Cefotaxime (CTX)	30	14	15-22	23
	Ceftriaxone (CRO)	30	13	14-20	21
	Ceftazidime (CAZ)	30	14	15-17	18
	Cefoxitin (FOX)	30	14	15-17	18
β-lactámicos	Imipenem (IPM)	10	13	14-15	16
	Aztreonam (ATM)	30	15	16-21	22
Quinolonas	Ácido Nalidíxico (NA)	30	13	14-18	19
	Ciprofloxacín (CIP)	30	15	16-20	21
	Ofloxacín (OFX)	5	12	13-15	16
	Norfloxacín (NOR)	10	12	13-16	17
Antagonista del folato	Sulfamethoxazol/ Trimetropim (SXT)	1.25 /23.75	10	13-15	16
Amplio espectro	Tetraciclina (TE)	10	14	15-18	19

VIII. Resultados

1. Origen de las Cepas

El estudio se llevó a cabo con 104 cepas de *E. coli* obtenidas entre 1986-2010 de 86 casos de diarrea en niños menores de 5 años de 4 zonas geográficas (Cuadro 4). De acuerdo al lugar de origen, de México se incluyeron 50 (48 %) cepas, de estas 22 (21.1 %) cepas eran de Tlaltizapan, Mor., y 28 (26.9 %) cepas, del Centro Médico del IMSS. De otros países se incluyeron 54 (52 %) cepas, de las cuales, 17 (16.4 %) cepas eran de Egipto, 10 (9.6 %) cepas de Tailandia y 27 (25.9 %) de Bangladesh.

Cuadro 4. Información general del origen de las cepas de trabajo.

País	Localidad	Año	No. de Casos N (%)	No. Cepas N (%)
Bangladesh		2007	26 (32)	27 (25.9)
Egipto	El Cairo	1999	17 (20.9)	17 (16.4)
Tailandia		1996	10(12.3)	10 (9.6)
México	IMSS	2002	5 (6.1)	9 (8.6)
		1998	4 (4.9)	9 (8.6)
		1996	5 (6.1)	10 (9.6)
	DIF	1996	2 (2.5)	2 (1.9)
		1987	7 (8.6)	11 (10.6)
		1986	5 (6.1)	9 (8.6)
Total			81	104

2. Confirmación de Serotipos de *E. coli*

El análisis por serogrupos mostró a O153 (50.9 %) y O6 (28.8 %), O128 (7.9 %) O128ac (8.6 %) y O128ab (3.8 %) todos ellos, distintos entre sí. De acuerdo al antígeno flagelar, se identificaron a H45 (34.6 %), H16 (25.9 %), H12 (19.2 %) y H1 (1 %); y 19.2 % no presentó movilidad (H-). En las cepas de estudio se identificaron 8 serotipos que fueron O153:H45, O153:H-, O6:H16, O6:H-, O128:H12, O128:H1, O128:H12ac y O128ab:H12, con 36 (34.6 %) cepas, 17 (16.3 %), 27 (25.9 %), 3 (2.9 %), 7 (6.7 %), 1 (1 %), 9 (8.6 %) y 4 (3.8 %) cepas respectivamente (Cuadro 5).

Cuadro 5. Serotipos identificados en cepas de *E. coli* de diferentes zonas geográficas.

País	Año de aislamiento	Serotipos	N (%)
México	1986-2002	O153:H45	17 (16.3)
		O153:H-*	9 (8.6)
	1986-2002	O6:H16	14 (13.5)
		O6:H-	2 (1.9)
	1987-2002	O128:H12	7 (6.7)
		O128:H1	1 (0.9)
Tailandia	1996	O153:H45	7 (6.7)
		O153:H-	3 (2.8)
Egipto	1999	O153:H45	12 (11.5)
		O153:H-	5 (4.8)
Bangladesh	2007	O6:H16	13 (12.5)
		O6:H-	1 (0.9)
	2007	O128ac:H12	9 (8.6)
		O128ab:H12	4 (3.8)
Total			104

*H-: No móvil

3. Detección de genes relacionados con virulencia de ETEC

El análisis genotípico para detectar genes que codifican para las toxinas STp, STh y LT, así como factores de colonización CS21, CFA I, CFA II, CS1 y CS3, mostró que sólo 16 (15.4 %) de las cepas de todas las zonas geográficas presentaron los genes de dichas toxinas, específicamente: 7 (43.8 %) cepas presentaron la combinación *ItA/st*, 5 (31.3 %) cepas *sth*, 3 (18.8 %) cepas *stp* y 1 (6.2 %) *ItA* (Cuadro 6). Considerando el lugar de origen, en cuanto a las cepas de México 8 (50 %) presentaron *ItA/sth* en conjunto con uno de los factores de colonización; en relación a las cepas de Bangladesh, 8 (50 %) presentaron los genes de las toxinas (*ItA/sth*) en combinación con factores de colonización. Observando que la combinación *ItA/sth* se encontró asociada en todos los casos al serotipo O6:H16, tanto de México como en Bangladesh. El serotipo O128:H1 de México fue el único aislamiento que presentó *ItA*. El factor de colonización CS21 estuvo distribuido en 11 (68.7 %) cepas pertenecientes a todos los serotipos.

Cuadro 6. Genotipos en cepas de *E. coli* de diferentes fuentes.

País	Serotipo	Año	No. de cepas	Perfiles de genes de toxinas y factores de colonización N (%)								
				<i>It/sth</i>	<i>It</i>	<i>sth</i>	<i>stp</i>	<i>cs21</i>	<i>cfa1</i>	<i>cs1</i>	<i>cs3</i>	
México	O153:H45	1996	2	-	-	-	2	2	-	-	-	
		1996	1	-	-	-	1	1	-	-	-	
	O6:H16	1986	1	-	-	1	-	-	-	-	-	
		1987	1	1	-	-	-	1	1	-	1	
	O128:H1	2002	2	2	-	-	-	-	2	-	2	
			1	1	1	-	-	1	-	1	-	
Bangladesh	O6:H16	2007	1	1	-	-	-	1	-	-	1	
			1	1	-	-	-	1	-	1		
			2	2	-	-	-	2	2	-	2	
	O128ac:H12	2007	1	-	-	1	-	1	-	-	-	
			1	-	-	1	-	1	-	1	-	
			1	-	-	1	-	-	-	-	-	
O128ab:H12	2007	1	-	-	1	-	1	-	-	1		
Total			16	7 (43.8)	1 (6.2)	5 (31.2)	3 (18.7)	11 (68.7)	6 (37.5)	2 (12.5)	8 (50)	

Las 27 (100 %) cepas de Bangladesh de este estudio inicialmente fueron clasificadas como ETEC, caracterizándose por la presencia de los genes de las toxinas *ltA* y *sth*. Por lo que respecta a las cepas del serogrupo O6 presentaban la combinación *ltA/sth*, mientras que los serogrupos O128ab y O128ac fueron *sth+*. El análisis genotípico de las mismas cepas con los iniciadores y condiciones de PCR utilizados mostró que sólo 8 cepas fueron positivas para presencia genes de toxinas (Cuadro 5A). El análisis estadístico (X^2) de la presencia de estos genes mostró diferencias significativas ($p < 0.05$).

Cuadro 6A. Comparación de genotipo de cepas de Bangladesh en los años 2007 y 2015.

Serotipo	No. de cepas que presentan toxinas.					
	2007			2015		
	<i>lt</i>	<i>stp</i>	<i>sth</i>	<i>lt</i>	<i>stp</i>	<i>sth</i>
O6:H-	1	-	1	-	-	-
O6:H16	13	-	13	4	-	4
O128ab:H12	-	-	4	-	-	1
O128ac:H12	-	-	9	-	-	3
Total	14	0	27	4	0	8

Las cepas LT+ aisladas en el 2007 si mostraron diferencia significativa ($p < 0.05$) en comparación con las cepas LT+ cultivadas en el 2015. Lo mismo sucedió con las cepas ST+ del 2007 y 2015 que mostraron diferencia ($p < 0.05$) significativa dependiendo del año en el que fueron analizadas.

3.1 Persistencia de plásmidos en las cepas de *E. coli*

Utilizando cepas de los serotipos O153:H-, O6:H16 y O128ac:H12 se realizaron 10 pases consecutivos en caldo LB para estudiar si se presentaba algún cambio en la presencia de los genes *ltA* y *stp*. En estas pruebas, en la cepa O6:H16 (112889) a partir del séptimo día, la reacción para el gen *sth* fue negativa, mientras que las demás cepas se mantuvieron sin cambios durante los 10 días de la prueba.

Cuadro 6B. Persistencia de plásmidos de toxinas en cepas ETEC.

Cepa	Toxina	Día de ensayo									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Control H10407	<i>ltA</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	<i>stp</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	<i>sth</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
116931 O153:H-	<i>ltA</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>stp</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>sth</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
112889 O6:H16	<i>ltA</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	<i>stp</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>sth</i>	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
112786 O128ac:H12	<i>ltA</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>stp</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>sth</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

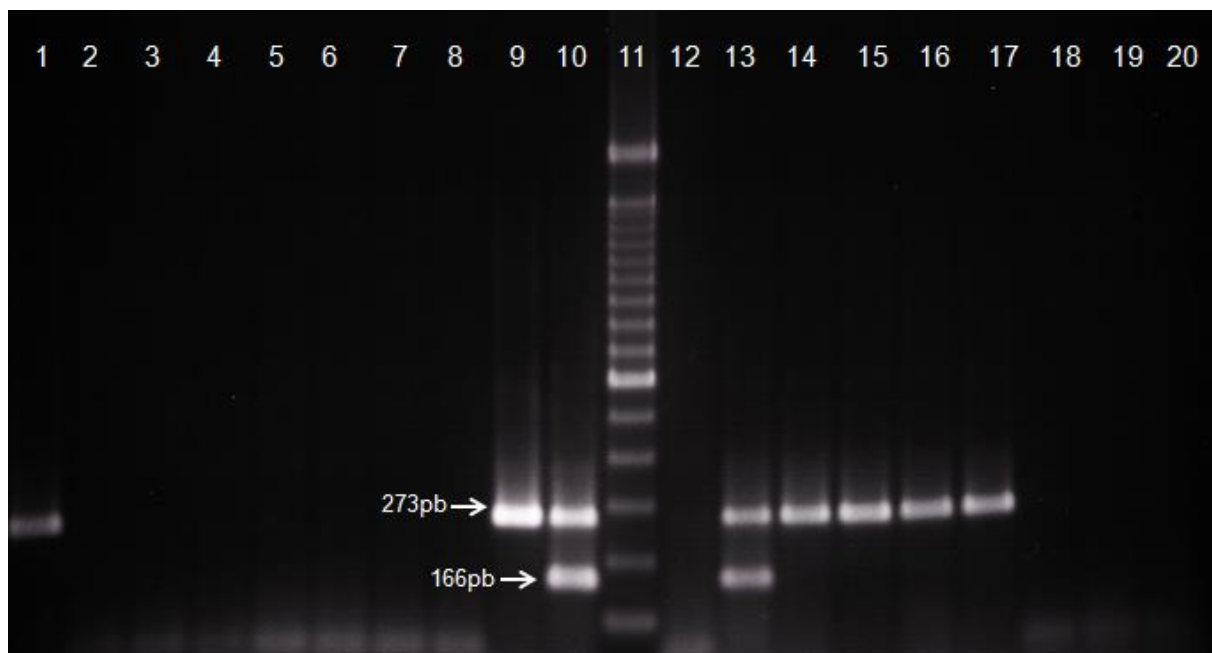


Figura 2. Electroforesis en gels de agarosa al 1.8 % de los amplicones de los genes *ltA* y *stp*. Carriles 1-9 y 13-17 muestras positivas para *ltA*. Carril 10, cepa H10407 positiva para *ltA* y *stp*. Carril 11, marcador de peso molecular (New England, BioLabs. Quick-Load, 100 pb); Carril 20, control negativo para *ltA* y *stp*.

3.2 Factores de colonización

De 4 genes de factores de colonización estudiados, *cs21*, *cfal*, *cs1* y *cs3*; estos se detectaron en 66 (63.4 %), 73 (70.2 %), 16 (15.4 %) y 19 (18.2 %) cepas en todas las zonas geográficas (Cuadro 7A). Con respecto a la presencia de los genes *cs1* y *cs3*, estuvo limitada a las cepas de México y Bangladesh con una frecuencia de 16 (15.4 %) y 19 (18.2 %) cepas respectivamente.

Cuadro 7A. Genotipos con factores de colonización en cepas de *E. coli*.

País		Número de cepas	Factores de Colonización			
			<i>cs21</i>	<i>cfal</i>	<i>cs1</i>	<i>cs3</i>
			N (%)			
México	DIF	22	7	16	4	6
	IMSS	28	17	13	3	3
Tailandia		10	8	7	0	0
Egipto		17	12	17	0	0
Bangladesh		27	22	20	9	10
Total		104	66 (63.4)	73 (70.2)	16 (15.4)	19 (18.2)

Se realizó un análisis similar al anterior, pero de forma específica para cada una de las zonas geográficas, considerando el análisis, en las cepas de México, los factores de colonización más frecuentemente identificados fueron *cs21* y *cfal* con 24 (48 %) y 29 (58 %) cepas respectivamente y los genes *cs1* y *cs3* se detectaron en 7 (14 %) y 9 (18 %) cepas; en los casos de las cepas de Egipto y Tailandia se encontró al gen *cs21* en 12 (70.5 %) y 8 (80 %), mientras que el gen *cfal* se detectó en 17 (100 %) y 7 (70 %) de las cepas. Finalmente en las cepas de Bangladesh los genes *cs21*, *cfal*, *cs1* y *cs3* se encontraron en 22 (81.4 %), 20 (74 %), 9 (33.3 %) y 10 (37 %) cepas respectivamente (Cuadro 7B).

Cuadro 7B. Análisis de factores de colonización por zona geográfica.

	México	Egipto	Tailandia	Bangladesh
N	50	17	10	27
Genes	N (%)			
<i>cs21</i>	24 (48)	12 (70.5)	8 (80)	22 (81.4)
<i>cfal</i>	29 (58)	17 (100)	7 (70)	20 (74)
<i>cs1</i>	7 (14)			9 (33.3)
<i>cs3</i>	9 (18)			10 (37)

3.2.1 Análisis de factores de colonización por serotipos de *E. coli*

El análisis de la presencia de factores de colonización mostró que en las cepas de México los serotipos O6:H16 y O128:H1 presentan el gen *cfal*. Por otra parte, las cepas de los serogrupos O6 y O128 tanto de México como en las cepas de Bangladesh presentaron una correlación entre la presencia de los genes *cs1* y *cs3*. Interesantemente los serotipos O153:H45 y O153:H- de las distintas regiones presentaron los genes *cs21* y *cfal* en aproximadamente el 80 % de las cepas.

Cuadro 8A. Factores de colonización y su relación con serotipos por zona geográfica.

País	Serotipo	No. Cepas	<i>cs21</i>	<i>cfal</i>	<i>cs1</i>	<i>cs3</i>
			N (%)			
México	O6:H16	14	5	14	6	5
	O6:H-	2				1
	O128:H12	7	2	7		3
	O128:H1	1	1		1	
	O153:H45	17	8	6		
	O153:H-	9	7	2		
		50	23 (46)	29 (58)	7 (14)	9 (18)
Tailandia	O153:H45	7	6	4		
	O153:H-	3	2	3		
		10	8 (80)	7 (70)		
Egipto	O153:H45	12	9	12		
	O153:H-	5	3	5		
		17	12 (70,6)	17 (100)		
Bangladesh	O128ab:H12	4	3	2		2
	O128ac:H12	9	6	5	2	3
	O6:H16	13	12	12	6	5
	O6:H-	1	1	1	1	
		104	22 (81.5)	20 (74)	9 (33.3)	10 (37)

3.2.2 Combinación de genes de factores de colonización en cepas de *E. coli*

Las cepas presentaron asociaciones entre factores de colonización en diferentes combinaciones (Cuadro 8B). El serotipo O6:H16 presentó el mayor número de combinaciones incluyendo los 4 factores de colonización; en la mayoría de ellas estuvo presente *cfal* y *cs3*, por ejemplo: *cfal-cs21*, *cfal-cs3*, *cfal-cs1-cs3*, entre otras. El serotipo O128ac:H12 en todas las cepas presentó el gene *cs21*. Los serotipos O153:H45, O153:H- y O128ab:H12 no presentaron más de dos factores de colonización, para los dos primeros serotipos se encontró presencia de *cfal* y *cs21*, mientras que para cepas O128ab:H12 prevaleció *cs3*.

Cuadro 8B. Asociación de factores de colonización con la presencia de plásmidos.

Serotipos			Combinación de genes	N (%)	
		O128ac:H12	<i>cs21, cs1, cs3</i>	1	
			<i>cs21, cfal, cs3</i>	5	
			<i>cs21, cs1</i>	1	
			<i>cs21</i>	20	
O153:H45, H-		O128:H12	<i>cfal</i>	19	
			<i>cfal, cs21</i>	30	
	O6:H16	O128ab:H12	<i>cfal, cs3</i>	7	
			<i>cs21, cs3</i>	2	
			<i>cs3</i>	2	
			<i>cs21, cfal, cs1, cs3</i>	1	
			O6:H-	<i>cfal, cs1, cs3</i>	1
				<i>cs21, cfal, cs1</i>	8
Total				97 (89)	

3.2.3 Detección del gen *cs21* en cepas de *E. coli* aisladas en México.

El análisis genotípico de las cepas en México permitió evaluar cronológicamente la presencia de *cs21*. Se apreció que el factor de colonización tuvo mayor prevalencia mientras más reciente fuera el cultivo. Como se muestra en la Figura 3, los porcentajes de cepas *cs21+* en los años 1986, 1996 y 2002 fueron 36.8, 55 y 77.8 % respectivamente.

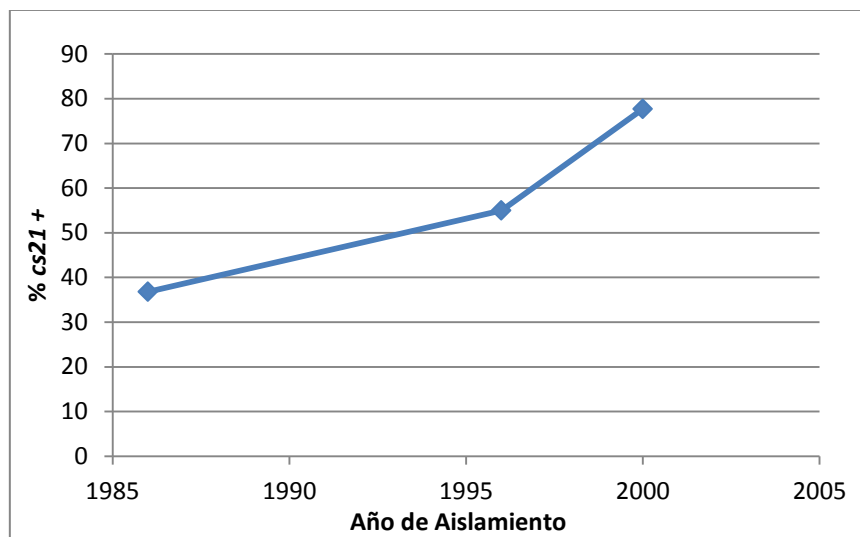


Figura 3. Proporción de cepas *cs21+* aisladas en México durante los años 1986-2002.

3.3 Grupos filogenéticos

Los grupos filogenéticos se asignaron de acuerdo al árbol dicotómico de decisión propuesto por Clermont en 2013 con base en la ausencia o presencia de 4 genes: *arpA*, *chuA*, *yjA*, y TSPE.C2. Los resultados obtenidos mostraron que 85 (81.7 %) cepas pertenecieron al grupo A, 10 (9.6 %) al grupo B1, 2 (1.9 %) al grupo B2 y finalmente 2 (1.9 %) correspondieron al grupo C. (Cuadro 9). El 100 % de cepas de Tailandia y Bangladesh fueron caracterizadas como A, mientras que las cepas de México presentaron cepas clasificadas como A, B1 y B2 (Cuadro 9).

Cuadro 9. Grupos filogenéticos en cepas de *E. coli* de diferentes zonas geográficas

País	Serotipo	Grupo Filogenético	N (%)
México	O6:H16	A	14 (13.5)
	O128:H12		3 (2.9)
	O153:H45		10 (9.6)
	O153:H-		6 (5.7)
	O128:H12	B1	4 (3.8)
	O128:H12		1 (0.9)
O153:H45	5 (4.8)		
	O6:H-	B2	2 (1.9)
Bangladesh	O128ab:H12	A	4 (3.8)
	O128ac:H12		9 (8.6)
	O6:H-		1 (0.9)
	O6:H16		13 (12.5)
Tailandia	O153:H45	A	7 (7)
	O153:H-		3 (2.9)
Egipto	O153:H45	A	10 (9.6)
	O153:H-		5 (4.8)
	O153:H45	C	2 (1.9)
Total			104

En México los serotipos O6:H16, O128:H12, O153:H45 y O153:H- fueron clasificados dentro del grupo A; por otra parte los serotipos O128:H12 (3.7 %),

O128:H1 (0.9 %) y O153:H45 (4.6 %) se designaron pertenecientes al grupo B1 (9.2 %). En contraste 2 cepas (1.8 %) del serotipo O6:H- fueron asignadas al grupo B2.

En las 17 cepas de Egipto, de forma similar a las cepas de México, se presentó más de un grupo filogenético, en el grupo A se ubicaron 15 (88.2 %) cepas y en el grupo C, 2 (11.8 %) cepas.

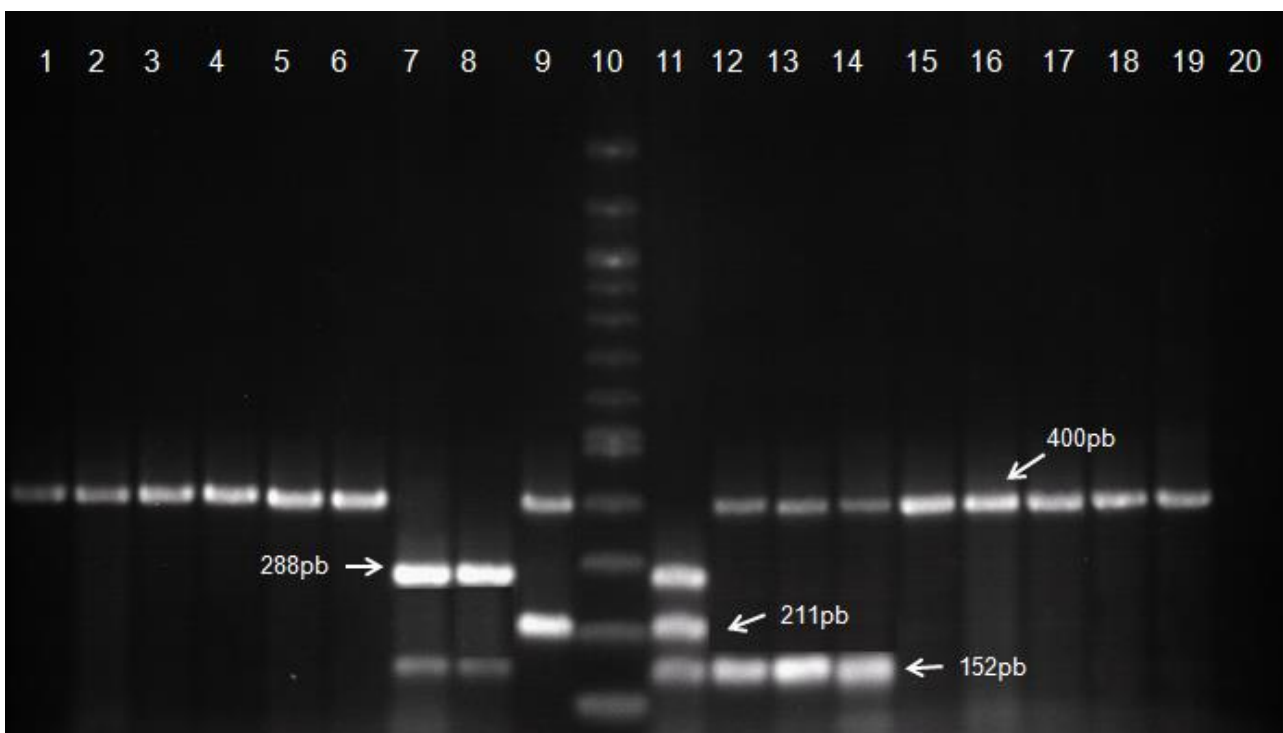


Figura 4. Electroforesis en geles de agarosa al 1.8 % de los amplicones de los genes *arpA* (400pb), *chuA* (288pb), *yjaA* (211pb) y *TSPE.C2* (152pb) para determinar el grupo filogenético. Carriles 1-6 y 15-19 muestras positivas para el gen *arpA*. Carriles 7 y 8 con muestras positivas para genes *chuA* y *TSPE.C2*. Carriles 12-14 muestras positivas para los genes *arpA* y *TSPE.C2*. Carriles 9 y 11 controles positivos *E. coli* K12 y *E. coli* 116 979. El carril 10 marcador de peso molecular (New England, BioLabs. Quick-Load, 100pb); carril 20, control negativo.

4. Resistencia a los antimicrobianos

El análisis de resistencia a los antimicrobianos reveló que 66 (63.4 %) de las cepas presentaron resistencia a alguno de los antimicrobianos (Cuadro 10). En las cepas de Bangladesh se presentó la mayor frecuencia de cepas resistentes (85 %), le siguió Egipto (76.5 %), Tailandia (70 %), México IMSS (53.6 %) y por último México DIF (36.4 %).

Cuadro 10. Proporción de cepas resistentes en aislamientos de ETEC.

Año	País		N	No. cepas resistentes (%)
1996	Tailandia		10	7 (70)
1999	Egipto		17	13 (76.5)
1986-1996	México	DIF	22	8 (36.4)
1996-2000		IMSS	28	15 (53.6)
2007	Bangladesh		27	23 (85)
Total			104	66 (63.4)

La resistencia más frecuente a los antimicrobianos fue a tetraciclina en 35 cepas (33.6 %), timetroprim- sulfametoxasol 28 (26.8 %) cepas y ácido nalidíxico 24 cepas (23 %) (Cuadro 11). La resistencia a TE y SXT se encontraron en las 4 localidades de estudio. La resistencia a fluoroquinolonas y cefalosporinas se observó principalmente en las de cepas de México y Bangladesh, con sólo 1 cepa con resistencia a OFX, CTX y FEP. La resistencia a aztreonam sólo se observó en 1 cepa de México y 1 cepa en Bangladesh.

Cuadro 11. Antimicrobianos a los que presentaron resistencia cepas de ETEC.

Localidad	Cepas resistentes a diversos antibióticos N (%)						
	AE*	Folato	Quinolonas			Cefalosporina	β *
	TE	SXT	NA	OFX	CTX	FEP	ATM
México DIF	5	2	1		1	1	1
México IMSS	15	3					
Tailandia	7	5					
Egipto	7	13	1				
Bangladesh	1	5	22	1		1	1
Total	35 (33.6)	28 (26.9)	24	1	1	2 (1.9)	2 (1.9)
			26 (25)				

*AE: Antimicrobiano de amplio espectro, β : mono- β -lactámico.

4.1 Análisis de resistencia a los antimicrobianos por serotipos y zona geográfica

En las cepas de Bangladesh los serotipos O128ac:H12, O128ab y O6:H16, fueron resistentes principalmente a NA, ya sea de forma individual o en combinación con uno o dos antimicrobianos (Cuadro 12). Las cepas de los serotipos O153:H45 y O153:H- de México, Egipto y Tailandia fueron resistentes en común a TE y SXT y a la combinación SXT y TE. Las cepas O6:H16 de México y Bangladesh no presentaron patrones de resistencia en común.

Cuadro 12. Patrones de resistencia a los antimicrobianos en diversas localidades en relación al serotipo.

Serotipo	No. total de cepas	Patrón de resistencia	No. de cepas resistentes			
			Bangladesh	México	Egipto	Tailandia
O128ac:H12	9	NA	7			
		SXT	1			
		NA SXT	1			
		NA SXT	1			
O128ab:H12	4	NA FEP ATM	1			
		NA SXT OFX	1			
		NA	1			
		NA SXT	1			
O6:H16	27	NA	8			
		NA SXT TE	1			
		TE		2		
		FEP CTX ATM		1		
O6:H-	3	NA	1			
		SXT TE		2		
O128:H12	7	NA		1		
O128:H1	1	SXT TE		1		
O153:H45	36	TE		10		1
		SXT			4	
		SXT TE			5	3
		NA SXT TE			1	
O153:H-	17	TE		4		1
		SXT		1	2	
		SXT TE		1	1	2
	104		23	23	13	7

IX. Discusión

Las enfermedades diarreicas son una de las principales causas de mortalidad y morbilidad en niños menores de 5 años, concentradas principalmente en países subdesarrollados. La tasa de mortalidad ha disminuido en gran parte debido a las mejoras en la calidad del agua, sistemas de sanidad e higiene, así como la vacunación contra el rotavirus y los tratamientos de rehidratación oral [2]. Sin embargo las cifras aún ascienden a 5.9 millones de muertes al año en niños menores de 5 años donde en las regiones del Sub-Sahara en África y Sur de Asia se concentra el 80 % de las mismas. En México, las enfermedades diarreicas continúan siendo un problema de salud pública, situadas como la segunda causa de morbilidad y la quinta de mortalidad en menores de 5 años [32]. En el 2010, fueron reportados más de 5.5 millones de casos con un promedio nacional de 5,264.24 casos por 100,000 habitantes [68]. Entre los agentes etiológicos prevalentes que se presentan de forma endémica en países en vías de desarrollo se consideran el rotavirus, *E. coli* (ETEC), *V. cholerae* y *Shigella spp.* ETEC es también principal responsable de la diarrea del viajero, pudiendo ser importado regularmente al primer mundo [11].

Las cepas ETEC tradicionalmente se definen por la presencia de uno o más genes que codifican para toxinas (ST y LT) y un factor de colonización específico. Investigaciones han planteado que los patotipos de *E. coli* comparten un *background* genético específico necesario para la expresión y mantenimiento de factores de virulencia [69]. En este estudio fueron analizadas cepas de Bangladesh, Egipto y Tailandia, estos países son considerados como zonas con mayor riesgo para presentar enfermedades diarreicas. La relación de número de cepas y número de casos fue 1:1 a diferencia de las provenientes de México, que en la mayoría de las ocasiones fue 2:1; sugiriendo una variabilidad genética por región, donde

probablemente las cepas en zonas de alto riesgo son más estables. A pesar de los estudios realizados para estimar la incidencia de ETEC, el trabajo no ha sido tan extensivo como para *V. cholerae*. Sin embargo, se ha mostrado que las cepas ambientales halladas en aguas superficiales en Bangladesh en áreas urbana y rural, presentan características muy similares a aquellas cepas aisladas en pacientes, explicando la endemidad de la bacteria, así como las características genotípicas y fenotípicas que expresa; y en consecuencia la estabilidad de ellas [70].

El análisis serológico clásico está basado en el esquema de clasificación de Kauffman, donde se determinan los polisacáridos antigénicos de superficie O (somático) y H (flagelar). Mientras que esta clasificación es informativa para ciertos patotipos, no siempre es útil para aislamientos no tipificables (formas rugosas) o que presentan reacciones cruzadas entre antígenos [12]. ETEC es considerada como una de las categorías diarreogénicas con mayor diversidad antigénica, como lo han mostrado numerosos estudios en distintos países, puede pertenecer a un gran número de serotipos. Wolf en 1997 reportó en un estudio con cepas ETEC de todo el mundo 78 antígenos O distintos en 954 aislamientos, siendo los más comunes O6, O78, O8, O128 y O153. En un estudio más reciente en Egipto, se identificaron 47 grupos O en 100 aislamientos, siendo O43 y O159 los más frecuentes [11, 71]. El análisis serológico de las cepas de estudio mostró en orden descendente los serogrupos O153 (50.9 %) y O6 (28.8 %), O128 (7.9 %) O128ac (8.6 %) y O128ab (3.8 %) (Cuadro 5) correspondiendo en gran medida a los serogrupos identificados con mayor frecuencia por Wolf en 1997. Se ha visto que los perfiles de serogrupos asociados con ETEC pueden cambiar con el tiempo. Sin embargo, los serogrupos encontrados en este grupo de cepas son muy estables, reportados en numerosos estudios desde los años 70's; considerados clásicos de ETEC.

En 1955 Taylor y Carter describieron seis antígenos H ligados al serogrupo O128: H1, H2, H8, H9, H10 y H12 como causantes de diarrea infantil [72]. Como lo menciona Guth, diez años después Erwing et al. en 1963 continuaron los trabajos de caracterización y observaron que el serogrupo O128 podía ser dividido en tres subgrupos O128ab, O128ac y O128ad, identificando a los serotipos O128ab:H2, O128ab:H7, O128ab:H8 y O128ac:H12 como prevalentes en clínica. En 1984 un estudio conducido en Brasil con cepas, del lugar, Bangladesh y Atlanta las caracterizó como O128 ab, ac y ad, revelando que la presencia del serotipo no estaba restringida a alguna zona en particular [73]. Las cepas de México caracterizadas como O128:H12 fueron aisladas entre 1986 y 2002, no fueron caracterizadas según subgrupos, pudiendo reflejar algunas limitaciones en los análisis de aquel entonces. Se puede hablar de estabilidad de las cepas a través del tiempo, considerando los aislamientos de Bangladesh de 2007 que presentan serotipos O128ac:H12 y O128ab:H12; el primero se menciona como prevalente desde la década de los 70's y el cambio de asociación del serogrupo O128ab con H12 en lugar de H2, sugiere una alta estabilidad y prevalencia del antígeno H12. La distribución de cepas O128 en México y Bangladesh refleja que no ha habido restricción territorial en cuanto a este serotipo.

De los 3 serogrupos identificados en las cepas de estudio, el serotipo O153:H45, actualmente presenta amplia distribución a nivel mundial; fue uno de los serogrupos cuya distribución es un fenómeno relativamente reciente. En la década de los 90's había sido posible identificar un número limitado de serogrupos asociados a ETEC en África y Asia, por ejemplo O6, O8, O15, O25 y O78. Los datos acerca de incidencia y distribución de serotipos y biotipos entre cepas ETEC responsables de brotes esporádicos en Europa y Sudamérica eran escasos. Las cepas O153:H45

habían sido responsables de brotes esporádicos en Chile, Tailandia, República Central de África y Somalia, y fue hasta 1991 que se posicionó como una de las cepas ETEC más importantes en casos esporádicos y brotes epidémicos de diarrea en niños menores de tres años en España. Actualmente se sabe que está ampliamente distribuido alrededor del mundo [74].

En general, los serotipos fuertemente asociados a ETEC tienen perfiles de toxinas y factores de colonización reconocidos como propios por la frecuencia en la que han sido observados en numerosos estudios. De esta manera se han reconocido las cepas O153:H45 ST+CFAI, O6:H16 ST+LT+ CFAII y el serotipo O128 se asocia típicamente con ST y CFA I [71, 75].

Los resultados obtenidos mediante la PCR, permitieron determinar que sólo el 15.4 % de las cepas dio resultado positivo para presencia de alguna toxina, mismas que en todos los casos, concordaron con los perfiles de toxinas reportados en la literatura. Las cepas O6:H16 de México (1987) y Bangladesh (2007) presentaron el típico patrón ST+LT+. Sólo las cepas O153:H45 de México (1996) mostraron reacción positiva para ST. En cuanto a las cepas O128ac y O128ab de Bangladesh, donde ambas presentaron el antígeno flagelar H12, igualmente se asociaron con ST. En primera instancia, los resultados obtenidos parecen contradictorios considerando cepas ETEC, ya que la condición para que sean denominadas pertenecientes a este patotipo es la presencia de una toxina. Sin embargo, hay que tener en cuenta que los factores de virulencia de ETEC están contenidos en plásmidos, lo que les confiere características particulares. Desde 1991 ya era bien conocido que las cepas ETEC pierden frecuentemente su habilidad para producir enterotoxinas.

Evans [1977] fue el primero en observar la conversión de cepas ST+LT+ de México a ST-LT+ después de diez pases consecutivos en medio sólido, evaluando la

presencia de ST con el ensayo del ratón infante. La estabilidad presentaba variaciones de acuerdo con el serotipo que se tratara, y en ocasiones un mismo serotipo podía agruparse en diferentes grupos de estabilidad. Así mismo, comparó la estabilidad en cepas de Bangladesh liofilizadas y mantenidas en agar peptonado por 5 años. En dicho ensayo confirmó que las cepas conservadas por liofilización presentaban mayor estabilidad y por otro lado, fue claro que no se trataba de un fenómeno exclusivo de las cepas en México [76]. Estudios similares al de Evans pero utilizando medios de conservación diferentes fueron realizados por Yoh et al. [1991], en su estudio los autores compararon el efecto del medio de conservación sobre la producción de LT. De varios medios probados el de elección para conservación fue medio de Dorset, con resultados ligeramente mejores mantenidos en congelación a -70 °C. De los métodos que no requerían transferencia periódica, el congelamiento en agar soya tripticaseína mantuvo las cepas viables después de 3 años y la producción de toxina fue estable. La observación más importante con base en estos resultados fue que el medio de conservación no tuvo un efecto significativo sobre la estabilidad de la producción de LT en cepas muy estables o muy inestables, sino que el medio óptimo tendría mayor aplicabilidad con cepas de estabilidad intermedia [77].

Para 1983, Levine et al. [1983] realizaron un ensayo más completo, evaluando también al cabo de diez días de pases consecutivos la estabilidad de toxinas y factores de colonización CFAI y CFAll, además de establecer los perfiles plasmídicos. Con los resultados fue posible observar que las cepas CFAI ST+LT- perdieron sólo ST sin cambiar su perfil plasmídico, a diferencia de las cepas CFA II ST+LT+ que perdieron ambas toxinas además de revelar la pérdida de dos plásmidos de ~60 y 48 MDa. Con las observaciones anteriores se pudo determinar

que la pérdida de actividad de ST pudiera ocurrir o no debido a la pérdida del plásmido, considerando la existencia de otros mecanismos genéticos involucrados en la pérdida de toxigenicidad [78].

Los resultados obtenidos en nuestro estudio de estabilidad de los plásmidos, permitieron ver que al séptimo pase, una cepa del serotipo O6:H16 de Bangladesh perdió ST, concordando con lo reportado por Evans. Cabe mencionar que esta cepa se considera entre los serotipos clásicos de ETEC, que se postulaba tienen mayor tendencia a retener la toxigenicidad, por lo que elucidar dichos mecanismos llevaría a un mayor entendimiento de la supervivencia de ETEC. Se puede apreciar una variabilidad importante en los resultados de presencia de toxinas en la muestra (Cuadro 6), donde una cepa O6:H16 de México aislada en 1987 aún muestra toxigenicidad contra cepas aisladas en el 2002. Lo mismo sucedió con las cepas O153:H45, donde una cepa de México de 1996 sí presenta ST, pero cepas de Tailandia (1996) y Egipto (1999) fueron negativas para la presencia de la toxina. Los resultados nos sugieren que hay que considerar otros factores como:

1. Los genes que codifican para toxinas se encuentran en plásmidos *Ent*, que pueden no ser estables en algunas cepas. Esta estabilidad puede verse influenciada por diversos factores como la temperatura y el medio de conservación. La limitación de nutrientes durante la replicación celular puede causar la pérdida de plásmidos dependiente de una relación directa con el peso molecular y número de copias de los mismos para mantener viable a la bacteria. El mantenimiento de plásmidos grandes reduce la capacidad de adaptación de la bacteria al medio, mientras que los plásmidos con gran número de copias generalmente se pierden en los cultivos debido a la segregación imperfecta de plásmidos en las células hijas conocido como inestabilidad segregacional. [79].

2. Con un impacto más importante según estudios de Yoh et al. [1991], los plásmidos pueden perderse con mayor facilidad por la ausencia total o parcial de genes que le proporcionan estabilidad en el genoma. Para que un plásmido sea heredado de manera estable tanto el ciclo de división celular como la partición de réplicas de plásmidos deben ser cuidadosamente regulados y coordinados [80]. Especialmente los plásmidos con bajo número de copias no pueden confiar en la dispersión al azar para asegurar su propagación en células hijas, por lo que hacen uso de estrategias adicionales que aseguren su distribución. Dentro de las más importantes figuran los sistemas de partición activa que codifican para un centrómero análogo, un sitio de partición que permite que el plásmido sea segregado a las células hijas activamente; y los sistemas toxina-antídoto, que se cree funcionan por muerte post-segregacional (PSK) matando a las células hijas que han perdido el plásmido [81]. La secuenciación de plásmidos de ETEC ha sido una gran herramienta para conocer más a detalle los mecanismos implicados en su naturaleza. Erika Ban et al [2015] reportaron la secuencia del plásmido pEntYN10 altamente inestable perteneciente al serotipo emergente O169:H41. Fue posible saber que presenta únicamente el operón *psiAB* propio de los plásmidos tipo RepFII que generalmente poseen los operones *stbAB* y *psiAB* en su estructura. Igualmente revelan que en comparación con otros plásmidos de ETEC, carecen de diversos genes relacionados con la estabilidad como el sistema *hok/mok/sok* (anti post-segregación) y *sopAB* [81, 82].
3. Los plásmidos contienen “replicones” que son responsables de su replicación. Las propiedades que se le confieren a los plásmidos, tales como replicación autónoma, transmisibilidad, estabilidad y resistencia a antibióticos, pueden estar localizados en loci genéticos dentro del plásmido, los cuales pueden ser

disociados y transformados de manera independiente en la bacteria receptora. Las secuencias de inserción que flanquean estos loci sugieren una alta plasticidad plasmídica. Esto origina eventos de transposición que controlan la delección o introducción de genes o bloques de genes pudiendo resultar en la remodelación de plásmidos [35].

Para el plásmido NR1 IncFII que transmite resistencia con aproximadamente 2 copias por cromosoma en *E. coli* la división y partición de réplicas está a cargo del replicón *repA* y el locus de estabilidad *stb*, respectivamente. Cuando ocurren mutaciones puntuales que inactivan *stb*, la replicación es normal pero exhiben herencia inestable que resulta en la acumulación de células libres de plásmidos [80].

Desde de la década los 70's se confirmó que ST está codificada en un transposón, flanqueado por secuencias de inserción. Cuando están presentes en un operón aumenta ~1000 veces la frecuencia de eventos de delección en la región. Un solo evento de recombinación o borrado puede afectar la expresión de genes adyacentes por eliminación de DNA de ambos genes o por una simple inversión que afecte la señalización para un gen, interfiriendo subsecuentemente en la iniciación del gen adyacente. Este último fenómeno, no implica la pérdida del plásmido, sin embargo la toxina no será detectable [78].

Cabe puntualizar que el ensayo de Evans sirvió para dejar un precedente respecto a la pérdida unilateral de ST en cepas ST+LT+, planteándolo como un fenómeno extendido entre las cepas ETEC. Pero fueron estudios posteriores los que demostraron las dos posibilidades a considerar en cuanto a pérdida de toxigenicidad que sucede cuando se pierde el plásmido, o cuando ocurre un evento genético de delección, recombinación, etc. dentro del mismo. Los datos anteriores demostraron

que estos eventos genéticos serán determinantes para la estabilidad de la toxina en la bacteria, donde la influencia del medio o el serotipo son factores secundarios.

De manera similar a las toxinas de ETEC, los factores de colonización se encuentran codificados en plásmidos. Retomando el estudio de Levine, en ocasiones se puede perder un plásmido y en consecuencia la adhesión mediada por los factores de colonización y la toxigenicidad de la bacteria. Evans et al. en 1983 desarrollaron diversos trabajos donde pudieron observar que cepas de los serogrupos O25, O63, O78 y O128 perdían de forma espontánea el CFAI y ST en conjunto con un plásmido de 54-60MDa; mientras que cepas del serotipo O6:H16 contenían un solo plásmido con los genes de CFAII, ST y LT. Adicionalmente observaron que cepas de los serogrupos O6, O8 y O80 podían perder un plásmido con la consecuente pérdida de CFA II y toxinas; o de manera alterna, podían presentar una disminución en el tamaño del plásmido donde la bacteria sólo perdía la expresión de CFA II, pero mantenía la toxigenicidad (CFAII-ST+LT+) [83, 84]. Años después [1991] con cepas del serotipo O153:H45 se realizó un estudio similar y contrario a lo observado por Levine, los perfiles plasmídicos permitieron saber que en este serotipo los genes que codifican para CFAI, STa y la resistencia para los antimicrobianos se encontraban en plásmidos diferentes en la bacteria [74].

Los resultados del presente trabajo mostraron que 88 (84.5 %) cepas fueron negativas a la presencia de los genes de las toxinas, sin embargo sólo 6 (5.8 %) no presentaron toxinas ni factores de colonización. Aunque la presencia de plásmidos recombinantes ha sido reportada para ETEC, en este estudio se observó que la pérdida de la toxina no significaba una pérdida de los factores de colonización. Con base en estos datos, en una primera instancia se podría sugerir que los factores de virulencia se encuentran codificados en plásmidos diferentes. Aunque existe también

la posibilidad de que sólo haya habido una remodelación de los loci que codifican para ST y/o LT, debido a la gran plasticidad plasmídica por transposones y secuencias de inserción.

A diferencia de lo reportado en estudios anteriores con los serogrupos O6, O128 y O153 considerados típicamente CFAI y CFAII+, en las cepas analizadas se identificaron diversas variantes. En las cepas que fueron positivas para la presencia de *cfal* podía ocurrir que contuvieran adicionalmente uno de los siguientes factores de colonización CS1, CS3 o CS1+CS3. Por ejemplo, de 27 cepas serotipificadas en México y Bangladesh como O6:H16, 25 (92.9 %) fueron *cfal*+, 20 (74.1 %) *cs1+* y/o *cs3+*, mientras que 17 (63 %) cepas se mostraron *cs21+*. En el caso de las cepas O128:H12 (incluyendo subtipos) se presentó algo similar, donde concordando con la literatura el gen de factor de colonización más común fue *cfal*, en 14 (70 %) de 20 cepas, seguido por *cs21* en 10 (50 %) cepas y por último *cs1+* y/o *cs3+* en 9 (45 %) cepas. Los resultados obtenidos para las cepas O153:H45 concordaron de manera más precisa con lo que ya se conocía, donde de 36 cepas, 23 (64 %) fueron *cfal*+ y 25 (69.4 %) *cs21+*.

En el Cuadro 8B, se observan asociaciones no consideradas como típicas, como en el caso del serotipo O128ac:H12 que presentó la combinación de los genes que codifican para los factores de colonización CS21CS1CS3; en cuanto al serotipo O128ab:H12, éste contenía *cs3* y *cs21cs3*. El serogrupo O6 presentó la mayor diversidad de combinaciones de factores de colonización.

La diferencia en el genotipo mostrado por las cepas de estudio en comparación con lo reportado en la literatura, donde clásicamente se reconocía un sólo factor de colonización asociado a cada serotipo puede deberse a que en un principio el

método para detectar la presencia de un factor de colonización se basaba en la expresión del mismo por medio de aglutinación de eritrocitos de diferentes especies según la secuencia oligosacáridica que presentara. Como se mencionó anteriormente, las características fenotípicas son condicionadas por el medio en el que se desarrollan las cepas, así por ejemplo se ha reportado que la expresión de factores de colonización se estimula mayormente en medio sólido que en uno líquido y a 37 °C a diferencia que el CS21, mejor conocido como longus que requiere anaerobiosis para ser expresado [56]. Girón en 1994 fue quien reportó la presencia de longus, explicando la falta de información respecto a este factor de colonización en estudios previos, de hecho las pruebas de hemaglutinación se realizaban con bacterias cultivadas en medios aerobios, lo cual no estimulaba la expresión del mismo.

La detección de factores de colonización en este trabajo fue genotípica, teniendo una mejor y mayor sensibilidad, dando lugar a dos posibilidades. Una de ellas sería que el genotipo de la bacteria no ha cambiado a través del tiempo, sino que el método utilizado para detectarlo anteriormente, estaba limitado a lo que expresara la bacteria, sin considerar el genoma de la bacteria. Retomando el plásmido pEntYN10 correspondiente a una cepa O169:H41 por Erika Ban et al., entre una de las características sobresalientes fue que poseía genes para CS6, CS8 (tipo CFA III) y K88 (tipo F4, clásico en cepas porcinas), revelando que es completamente posible la coexistencia de genes para diversos factores de colonización en un solo plásmido [81]. La segunda posibilidad, es que anteriormente la estructura de ETEC fuera más sencilla y los diferentes eventos genéticos fueran dando lugar a su evolución. Existen diversos datos que apoyan que la plasticidad plasmídica puede dar origen a una amplia variación en la estructura genética de ETEC, explicando de esta manera

la diversidad de factores de colonización que coexisten en las bacterias de este estudio. Quadri et al. [2014] estudiaron un cambio en las características fenotípicas en cepas ETEC de Bangladesh, observando la combinación de los factores de colonización CS1/CS2+CS3 asociados con CS21 y CFA I, así como una mayor prevalencia de CS7 y CS17 [85].

Otro factor a considerar acerca de la diversidad de los factores de colonización es la microbiota co-existente que es capaz de transmitir plásmidos intraespecie donde la única condición para que sean mantenidos es que sean compatibles. Históricamente, los plásmidos co-residentes han sido definidos como incompatibles cuando comparten los mismos mecanismos de replicación y elementos de partición, siendo incapaces de proliferar establemente en el mismo linaje celular. La mayoría de los plásmidos de virulencia asociados a *E. coli* pertenecen al grupo de incompatibilidad F [35, 86].

Una vez que el plásmido ha sido transmitido a la bacteria receptora, puede sufrir modificaciones. Por ejemplo, los genes *coo* que codifican para CS1 se encuentran en el plásmido pCoo, que no es auto-transmisible. Por otro lado el plásmido IncF11 R64 posee al menos 23 genes esenciales para la conjugación en líquidos y superficies, 12 genes necesarios para la síntesis de un pili delgado tipo IV, presenta homología y organización similar en las regiones de estabilidad de pCoo, así como identidad a nivel DNA con los genes que codifican para fimbrias. La co-residencia temporal de cualquier plásmido pCoo con R64 resulta en la recombinación homóloga de los mismos dando lugar a derivados auto-transmisibles conocidos como plásmidos cointegrados [87]. La secuenciación del plásmido pCoo, aislado de la cepa humana ETEC C921b-1 conocido por expresar CS1 y CS3, reveló que contiene regiones homólogas con la sección Rep11 del plásmido R64 de *Salmonella*

enterica serovariedad Typhimurium, así como la región RepFIIA del plásmido R100 de *Shigella sonnei*. Las regiones están separadas por secuencias de inserción repetidas *IS-100* asociadas entre sí [35, 82, 88]. La información aclara como todos los elementos genéticos móviles poseen implicaciones importantes en la evolución [87]. Así como algunas bacterias pueden tener en su estructura el plásmido co-integrado CS1CS3, en algunas pudo haberse transmitido sólo un plásmido de *Shigella* o *Salmonella* dando lugar a cepas ETEC CS1+ o CS3+ según el caso.

Este plásmido recombinante también permitió observar que al integrarse R64 a una bacteria que contiene pCoo, le permitirá producir el pili delgado y transferirse a cualquier bacteria en el tracto gastrointestinal que posea receptores para este, pero la expresión de *cs1* sólo será posible si el activador apropiado, *rns* también se encuentra dentro de la célula [87]; evidenciando la limitación de los métodos fenotípicos utilizados anteriormente.

Por otro lado, análisis detallados de la cepa tipo H10407 mostraron que el plásmido pH10407_95 que codifica para CFAI no posee regiones relacionadas con RepI1, pero contiene un esqueleto y replicón tipo RepFIIA. El plásmido contiene *eatA*, las dos proteínas de secreción del *locus* *etpABC*, involucradas en la adhesión al epitelio intestinal; y los genes que codifican para CFAI. La presencia de los genes que codifican para CFAI en el plásmido pH10407_95 sugiere que los operones que codifican para CFs de ETEC han sido adquiridos en múltiples ocasiones y en múltiples *backbones* de plásmidos [35].

Como se ha mencionado, CS21 es un factor de colonización descrito en los 90's, cuya distribución ha sido abordada en los últimos años. Los estudios han mostrado que cepas de ETEC muestran una amplia distribución del gen *IngA* en diferentes

regiones [75, 89]. Los resultados obtenidos concordaron con lo anterior, teniendo una prevalencia de CS21 en todas las regiones: Bangladesh (81.4 %), Tailandia (80 %), Egipto (70.5 %) y México (48 %).

Girón et al. [1995] sentaron el precedente de que CS21 posee una distribución uniforme en los serotipos heterólogos asociados a ETEC. Las cepas de estudio correspondientes a los serogrupos O6 (60 %), O153 (69.8 %) y O128 (52.4 %) presentaron una distribución homogénea, tal como se ha registrado en reportes anteriores [75, 90]. Adicionalmente Girón et al. mencionan que la alta prevalencia de *IngA* en cepas ETEC es un marcador de la estabilidad del plásmido que lo codifica y con base en eso predice que la frecuencia de *IngA* en aislamientos recientes debe ser mayor [54]. Esto último resulta de gran importancia para explicar la prevalencia de las cepas CS21+ en México. A diferencia de los aislamientos de Egipto, Bangladesh y Tailandia, entre las cepas de México se encontraban aislamientos de 1986, 1996 y 2002. Si consideramos que la presencia de *IngA* en la muestra es condicionada por la estabilidad del plásmido, es claro que en cepas más antiguas el porcentaje de cepas positivas será menor, lo cual disminuirá el porcentaje de prevalencia. La Figura 4 permite observar que esta tendencia se cumple en las cepas de México, donde el porcentaje de cepas CS21+ en los años 80's es de 36.8 %, 55 % durante los 90's y de 77.8 % en el 2002.

Cabe mencionar que *longus* ha cobrado importancia en los últimos años por su potencial como candidato a elaborar inmunógenos protectores contra ETEC, los resultados obtenidos en este trabajo adicionan evidencia de la amplia distribución de CS21 identificándolo como un buen objetivo en el diseño de vacunas contra la infección por ETEC.

El análisis de grupos filogenéticos identificó al grupo A como el de mayor prevalencia con 85 (81.7 %) cepas de las 4 regiones incluidas en el estudio. Tanto en Tailandia como Bangladesh todas las cepas correspondieron al grupo A, contribuyendo con 9.6 y 25.9 % de toda la muestra del estudio. En este caso, la prevalencia de cepas pertenecientes al grupo A concordó con la hipótesis de que existe una preferencia de los plásmidos que codifican para toxinas y CFs por un *background* genético particular, donde los grupos B1 (9.2 %), B2 (1.9 %) y C (1.9 %) tuvieron una contribución menor. Esto permitió hacer varias observaciones: en primer lugar hay que considerar que en la naturaleza los grupos A y B1 son mucho más abundantes que los demás, presentes como comensales tanto en humanos como animales, aumentando así la probabilidad de encontrar patógenos correspondientes a estos grupos. En segundo lugar Escobar-Páramo resalta específicamente el hecho de que la mayoría de cepas comensales en individuos que habitan regiones tropicales pertenecen a los grupos filogenéticos A y B1. Siendo una observación importante, ya que ETEC tiende a ser endémica de zonas tropicales y los lugares de aislamiento cumplen con esta característica [14, 69]. Por otro lado, un estudio del 2012 por Clermont y col [2012], identificó una asociación directa de las cepas DEC con las clonas A, B1 y E, mientras que los patógenos extraintestinales fueron comúnmente agrupados como B2 y D [17]. De nuevo los resultados obtenidos concuerdan con lo reportado, mostrando la tendencia de estas cepas a pertenecer a grupos comensales sin importar el serotipo del que se trate.

Teniendo en cuenta lo anterior acerca de la relativa abundancia de las clonas A y B1, en las cepas de estudio se estableció que la proporción del grupo A fue más frecuente que de los demás grupos. Esto puede relacionarse directamente a la fuente de contaminación. Las investigaciones recientes han presentado evidencias

de cómo los grupos filogenéticos juegan diversos roles ecológicos; por ejemplo en humanos los grupos A (49.5 %) y B2 (25.5 %) son los más comunes, siendo los grupos B1 y D (17 %) menos prevalentes, en cambio en animales predominan las cepas B1 (41 %) seguidas por el grupo A (22 %), B2 (21 %) y D (16 %) [14]. Se conoce de los sistemas de sanidad deficientes que se dan en Egipto, Tailandia, Bangladesh y principalmente la zona rural de México, donde el agua potable no es un servicio disponible para toda la población. El hacinamiento, los sistemas de drenaje y purificación deficiente conducen al consumo de agua y alimentos contaminados. En este caso, la prevalencia alta de cepas del grupo A puede hacer referencia a una contaminación fecal humana sobre la transmisión por animales como punto de partida para la infección en los menores.

La presión del hospedero ha llevado a los microorganismos a desarrollar mecanismos de subsistencia, uno de los más importantes es la resistencia a antimicrobianos. Cuando por primera vez ETEC fue reconocida como patógeno, era altamente sensible a todo tipo de antimicrobianos. Con el tiempo, surgió la resistencia a antimicrobianos, requiriendo la síntesis de nuevas sustancias para innovar tratamientos principalmente destinados a la diarrea del viajero [11].

El 63.4 % de las cepas del estudio presentaron resistencia al menos a un antimicrobiano, incluyendo cepas de todos los serotipos identificados. Considerando el porcentaje de cepas resistentes por zona, Bangladesh (85 %), Egipto (76.5 %) y Tailandia (70 %) presentaron valores muy similares, posicionando a México por debajo de ellos (36.4 y 53.6 % en zonas rural y urbana respectivamente).

Numerosos factores pueden promover la aparición de cepas resistentes en países subdesarrollados, impulsadas primeramente por la gran limitación de recursos que genera sistemas de salud deficientes. Aun cuando la práctica no es legal, los

antimicrobianos pueden ser adquiridos sin prescripción médica. Por ejemplo, en un estudio conducido en Bangladesh con 2000 participantes, el 95 % de los medicamentos consumidos durante un mes provenían directamente de farmacias locales, donde solo el 8 % había sido prescrito por un médico [91].

Lo anterior se relaciona directamente con el personal sin entrenamiento que muchas veces recomienda el uso de antimicrobianos para infecciones que no las requieren, que en lugar de ser efectivas promueven la resistencia en bacterias. En Tailandia, los farmacéuticos recetan rifampicina para uretritis y tetraciclina para niños pequeños [92]. No se puede dejar de mencionar la autoprescripción; con reportes emergentes en India, Bangladesh, Sri Lanka y Tailandia desde la década de los 80's. Es más factible que un niño con diarrea en Indonesia sea tratado con antibióticos a recibir rehidratación oral [93].

Adicionalmente, están las características inherentes al lugar de distribución que impactan directamente en la bioequivalencia del antibiótico. En zonas tropicales las condiciones de transporte y almacenamiento carecen de controles estrictos, provocando la degradación del principio activo. Muchos medicamentos son compuestos termolábiles o susceptibles a la humedad, resultando particularmente vulnerables. En Guinea-Bissau por ejemplo, en un periodo de 2 años se reportaron temperaturas de 26-40 °C con una humedad relativa de 30-90 %; suficiente para degradar un antibiótico [92].

Respecto a los habitantes de países desarrollados, donde las condiciones climáticas, los sistemas de vigilancia en control de calidad y sanidad son mejores, la persistencia de cepas resistentes es menor, pero definitivamente también está presente. Un factor importante son las visitas a países subdesarrollados, donde los viajeros adquieren cepas de *E. coli* resistentes de manera pasiva, aun cuando no

estén tomando medicamentos para profilaxis. Numerosos factores, tales como la migración urbana, la sobrepoblación y el inadecuado manejo de desechos, sirven como catalizadores del intercambio de microorganismos resistentes entre las personas, así como del intercambio de genes de resistencia entre bacterias [92].

Entre las estrategias que han utilizado las bacterias para resistir a los antimicrobianos se encuentran alterar la diana para disminuir la susceptibilidad al mismo, inactivar o destruir el antibiótico, reducir el transporte dentro de la célula con bombas de eflujo, entre otros. Estos determinantes de resistencia pueden estar mediados por dos mecanismos genéticos: mutaciones en el cromosoma bacteriano o por elementos transmisibles, ya sea plásmidos o transposones. Los elementos transmisibles son de mayor preocupación en salud pública al permitir la diseminación intra e interespecie de genes de resistencia, cubriendo una amplia gama de antimicrobianos, entre los que se contemplan: β -lactámicos, aminoglucósidos, macrólidos, sulfonamidas, tetraciclinas, cloramfenicol y trimetroprim [94].

La resistencia a tetraciclina y la combinación sulfametoxazol-trimetroprim estuvo presente en un 33.6 y 26.9 % respectivamente, comprendiendo las 4 regiones de estudio. La proporción de cepas resistentes a TE varió de acuerdo a la región de estudio, con un orden de mayor a menor prevalencia como se indica: Tailandia (70%), México IMSS (53.6 %), Egipto (41.2 %), México DIF (22.7 %) y Bangladesh (3.7 %). Con base en estos datos no fue posible identificar una tendencia por región. La distribución tan amplia puede explicarse debido a la alta transmisibilidad del plásmido que codifica para genes de resistencia a TE.

De hecho, desde 1999 la examinación directa de secuencias de nucleótidos de genes de resistencia en bacterias por Davison, se confirmó sin duda que existe

transferencia horizontal de genes entre bacterias de hábitats diferentes. Por ejemplo, el gen *tetM* de *Streptomyces sp.* aislada de sedimentos fue el mismo hallado en *Peptostreptococcus sp.* integrante de la microbiota intestinal de los humanos. De manera similar, los genes *tetQ* son compartidos por *Bacteroides sp.* y *Prevotella ruminicola* de la microbiota normal del tracto digestivo en humanos y del rumen e intestinos de animales de granja respectivamente y *Prevotella intermedia* aislada en la cavidad bucal humana. Un hecho igualmente importante fue descubrir que la conjugación del transposón que contiene los genes *tetQ* es autoinducible con niveles bajos de tetraciclina. Cabe resaltar que los datos anteriores sugirieron por primera vez que la microbiota comensal en el humano puede actuar como reservorio de genes de resistencia, mismos que puede transferir subsecuentemente a microorganismos patógenos [95]. Es claro que son numerosas las vías para que surja la resistencia en microorganismos, sin embargo hay una que indirectamente está siempre latente en alimentos. A partir de la década de 1950, ha sido una práctica habitual la utilización de antimicrobianos con fines terapéuticos o profilácticos en animales productores de alimento. En 1948 se identificaron los efectos de la clortetraciclina como promotora del crecimiento en bovinos, porcinos y otros animales, en 1954 se comenzó a utilizar en solución para la conservación de alimentos, que después de evaluar su toxicidad en trabajos de Swan [2001], fueron retirados como aditivos en 1978. Fue hasta 1992 que en Europa se definieron los límites máximos de residuos (LMR) para tetraciclinas en alimentos de origen animal [96]. En México la Norma Oficial Mexicana NOM-004-Z00-1994, para Grasa, hígado, músculo y riñón en aves, bovinos caprinos, cérvidos, equinos, ovinos y porcinos. Establece los límites máximos permisibles y procedimientos de muestreo; sin embargo el control oficial del uso de medicamentos en la producción pecuaria y de

residuos farmacológicos en alimentos de origen animal es deficiente [97]. Los tiempos de espera para la degradación del antibiótico muchas veces no se respetan por la alta demanda de alimento, teniendo consecuencias que los productores descuidan. En general, este tipo de prácticas se consideran comunes, pudiendo referir al tipo de alimentación propia de cada zona como explicación de un mayor porcentaje de cepas resistentes a TE en la zona urbana (53.6 %) de México que en la zona rural (22.7 %). Respecto a las cepas con resistencia a SXT, la relación por región en orden decreciente fue el siguiente: Egipto (76.5 %), Tailandia (50 %), Bangladesh (18.5 %), México IMSS y DIF (10.7 y 9 %).

El uso de las sulfonamidas en combinación con trimetoprim se pensaba tenía un efecto de sinergia, además de evitar el desarrollo de resistencia a los mismos. Ambos inhibidores del ciclo del folato, poseen espectros de acción ligeramente diferentes, lo cual no quiere decir que forzosamente actúen en sinergia. Por otro lado, en 1972, apenas 4 años después de que la combinación fuera introducida en Reino Unido, comenzó a reportarse resistencia transferible a SXT-TMP. Desde 1972 se han caracterizado aproximadamente 20 diferentes genes *dhfr* de transferencia. La resistencia en *E. coli* varía de 10-70 % alrededor del mundo [62, 98].

Previamente la shigellosis era tratada con SXT, en la actualidad prácticamente todos los aislamientos de *Shigella* presentan resistencia a este antimicrobiano. En el año 1998 un estudio de 15 años por Hoge et al. en Tailandia reportó que la resistencia en *Salmonella* y ETEC para SXT había alcanzado un 40 %, concordando con los resultados obtenidos [99].

Como pudo observarse en México, Egipto y Tailandia cuyas cepas fueron serotipificadas como O153:H45, la resistencia a TE y SXT prevaleció sobre otros antibióticos. Lo cual sugiere cierta afinidad del serotipo por estos plásmidos. En

contraste, en Bangladesh las cepas fueron resistentes a ácido nalidíxico principalmente. Se encontró escasa información relacionada a este patrón (TE/SXT) en ETEC, a partir de 1977 se reportó en Vietnam, Tajikistan, India y Reino Unido la presencia de *Salmonella* Typhi resistente a ácido nalidíxico con una menor susceptibilidad a cirpofloxacina [100]. Como se mencionó anteriormente, la resistencia debida a elementos transmisibles hace posible el intercambio de material genético interespecie. Evidencia de esto, fue observado a comienzos de los años 90's cuando la resistencia a NA en *Shigella* y ETEC fue reconocida por primera vez [99].

X. Conclusiones

1.- En el estudio fueron identificados serotipos considerados como clásicos tales como O6:H16, O153:H45 y O128:H12, estos muestran una tendencia a conservar los factores de virulencia, siendo frecuentemente aislados en casos de infecciones intestinales en diversas regiones del mundo.

2.- La pérdida de la enterotoxigenicidad en cepas caracterizadas como ETEC es un fenómeno generalizado, que puede deberse a la pérdida del plásmido, o únicamente del gen que la codifica. Las secuencias de inserción y transposones en los plásmidos que los contienen pudieran tener un papel clave en la estabilidad de las toxinas.

3.- Los genotipos temporalmente estables y ampliamente distribuidos como O6:H16 ST+LT+ CFA II, O128ab:H12 ST+ CFAI, en este estudio se observaron con variaciones, donde fue posible apreciar que es factible la coexistencia de 2 o más factores de colonización en una cepa.

4.- El longus (CS21) tuvo presencia de más del 50 % en las cepas de las regiones de estudio, con mayor prevalencia en aislamientos más recientes. La alta prevalencia de este CF le confiere gran potencial como candidato a ser considerado un inmunógeno protector contra ETEC.

5.- La prevalencia de cepas ETEC asignadas al grupo filogenético A sugieren que se requiere de un *background* genético específico para su expresión. Aunque a este grupo se le considera un componente normal del intestino de los humanos y de algunos animales como los cerdos y las aves, las cepas presentaron factores de virulencia como fueron los genes *ltA*, *sth* y *stp* y factores de colonización

relacionados ampliamente con la diarrea del viajero y en niños menores de cinco años.

6.- La multirresistencia no es común en cepas ETEC, los patrones de resistencia determinados en las cepas sugieren el uso indiscriminado de antimicrobianos (NA y SXT).

XI. Perspectivas

1. Obtener el factor colonización CS21 purificado para utilizarlo en la determinación de la respuesta inmune en muestras de suero en población con prevalencia de ETEC, para evaluar su posible uso como un inmunógeno protector.
2. Utilizar un modelo animal (ratones BALB/c) para establecer si cepas ETEC que han perdido la expresión de genes relacionados con la producción de las toxinas LT y ST al colonizar el intestino de los animales se restituye la expresión de dichas toxinas.
3. Secuenciación de plásmidos con el propósito de identificar genes donde se han presentado modificaciones en las secuencias de DNA que ocasionan la pérdida de la toxigenicidad.
4. Optimizar los métodos de PCR para identificación de patógenos en alimentos con el fin de utilizarlos en el control de la inocuidad alimentaria.

XII. Bibliografía

1. Garin E, Idele S, You D, et al. Committing to a Child Survival: A Promise Renewed. Progress Report. United Nations Child's Fund, Division of Data, Research, and Policy.; 2015.
2. You D, Hug L, Edjemyr S, et al. Levels & Trends in Child mortality. Report 2015. United Nations Child's Fund; 2015.
3. Organización Mundial de la Salud. [Online].; 2015 [cited 2015 Diciembre 19. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs330/es/>.
4. Dirección General de Epidemiología. [Online].; 2016 [cited 2016 Enero 8. Available from: http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/doctos/infoepid/publicaciones/2015/Mortalidad_2011.pdf.
5. Hodges K, Gill R. Infectious Diarrhea: Cellular and Molecular Mechanisms. Gut Microbes. 2010; 1(1): p. 4-20.
6. Black R, Morris S, Bryce J. Why and where are 100 million children dying every year? Lancet. 2003; 361: p. 2226-2234.
7. Mara DD. Water, sanitation and hygiene for the health of developing nations. Public Health. 2003; 117(6): p. 452-456.
8. Bryce J, Boschi-Pinto, Shibuya K, Black RE. WHO Child Health Epidemiology Reference Group. WHO estimates causes of death of children. Lancet. 2005; 365: p. 1147-1152.
9. Petri W Jr, Miller M, Blinder H, Levine M, Dillingham R, Guerrant R. Enteric infections, diarrhea, and their impact on function and development. J Clin Invest. 2008; 118(4): p. 1277-1290.
10. Guerrant R, Van Gilder T, Steiner TS, et al. Practice Guidelines for the Management of Infectious Diarrhea. Clin Infect Dis. 2001; 32: p. 331-50.
11. Quadri F, Svennerholm A, Faruque SG, Sack B. Enterotoxigenic *Escherichia coli* in Developing Countries: Epidemiology, Microbiology, Clinical Features, Treatment and Prevention. Clin Microbiol Rev. 2005; 18(3): p. 465-483.
12. Croxen A, Law RJ, Scholz R, Keeney KM, Wlodarska M, Finlay BB. Recent Advances in Understanding Enteric Pathogenic *Escherichia coli*. Clin Microbiol Rev. 2013; 26(4): p. 822-880.
13. Orskov F, Orskov I. Serotyping of *Escherichia coli*. Methods Microbiol. 1984; 14: p. 43-112.
14. Tenaillon O, Skurnik D, Picard B, Denamur E. The population genetics of commensal *Escherichia coli*. Nat Rev Microbiol. 2010; 8(3): p. 207-217.
15. Crossman LC, Chaudhuri RR, Beatson S, et. al. A commensal gone bad: Complete Genome Sequence of the Prototypical Enterotoxigenic *Escherichia coli* Strain H10407. J Bacteriol. 2010; 192(21): p. 5822-31.
16. Hartl D, Dykhuizen D. The population genetics of *Escherichia coli*. Ann Rev Genet. 1984; 18: p. 31-68.
17. Chaudhuri R, Henderson IR. The Evolution of the *Escherichia coli* phylogeny. Infect Genet Evol. 2012; 12: p. 214-226.
18. Khan MA, Steiner TS. Mechanisms of Emerging Diarrheagenic *Escherichia coli* infection. Curr Infect Dis Rep. 2002; 4(2): p. 112-117.
19. Duriez P, Clermont O, Bonacorsi S, Chaventré A, Elion J, Bingen E, Denamur E. Commensal *Escherichia coli* isolates are phylogenetically distributed among geographically distinct human population. Microbiology. 2001; 147: p. 1671-6.
20. Kaper JB, Nataro JP, Mobley HL. Pathogenic *Escherichia coli*. Nat Rev Microbiol. 2004; 2(2): p. 123-140.
21. Clements A, Young J, Constantinou N, Frankel G. Infection strategies of enteric pathogenic *Escherichia coli*. Gut Microbes. 2012; 3(2): p. 71-87.
22. Shaheen HI, Khalil SB, Rao MR, et al. Phenotypic profiles of enterotoxigenic *Escherichia coli* associated with early childhood in rural Egypt. J Clin Microbiol. 2004; 42(12): p. 5588-95.
23. Orskov I, Orskov F, Jann B, Jann K. Serology, Chemistry and Genetics of O and K Antigens of *Escherichia coli*. Bacteriol Rev. 1977; 41(3): p. 667-710.
24. Nataro J, Kaper J. Diarrheagenic *Escherichia coli*. Clin Microbiol Rev. 1998; 11(1): p. 142-201.
25. Clermont O, Christenson JK, Denamur E, Gordon DM. The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylo-groups. Environ

- Microbiol Rep. 2013; 5(1): p. 58-65.
26. Selander RK, Caugant DA, Ochman H, Musser JM, Gilmour M, Whittam TS. Methods of multilocus enzyme electrophoresis for bacterial population genetics and systematics. *Appl Environ Microbiol.* 1986; 51(5): p. 873-84.
 27. Ochman H, Selander RK. Evidence for clonal population structure in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1984; 81(1): p. 198-201.
 28. Clermont O, Bonacorsi S, Bingen E. Simple Determination of the *Escherichia coli* Phylogenetic Group. *Appl Environ Microbiol.* 2000; 66(10): p. 4555-4558.
 29. Fleckenstein J, Hardwidge R, Munson G, Rasko D, Sommerfelt H, Steinsland H. Molecular Mechanisms of enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Microbes Infect.* 2010; 12(2): p. 89-98.
 30. Echeverría P, Orskov I, Plianbangchang D. Serotypes of enterotoxigenic *Escherichia coli* in Thailand and the Philippines. *Infect Immun.* 1982; 36(3): p. 851-856.
 31. Mazariego K, Cruz A, Ledesma M, Ochoa S, Cortés X. Longus, a type IV pilus of enterotoxigenic *Escherichia coli*, is involved in adherence to intestinal epithelial cells. *J Bacteriol.* 2010; 192(11): p. 2791-800.
 32. Navarro A, Estrada-García T. Epidemiology of diarrheagenic *Escherichia coli* Pathotypes in México, Past and Present. In Torres AG, editor. *Pathogenic Escherichia coli in Latin America.*: Bentham Science Publishers Ltd.; 2010. p. 191-208.
 33. Madhavan V, Sakellaris H. Colonization Factors of Enterotoxigenic *Escherichia coli*. In Gadd SS, & G. M, editors. *Advances in Applied Microbiology.*: Academic Press: Elsevier Inc.; 2015. p. 155-197.
 34. Lasaro MA, Rodrigues JF, Mathis-Santos C, Guth BE, Balan A, Sbrogio-Almeida ME, Ferreira LC. Genetic Diversity of heat-labile toxin expressed by enterotoxigenic *Escherichia coli* strains isolated from humans. *J. Bacteriol.* 2008; 190(7): p. 2400-10.
 35. Johnson TJ, Nolan L. Pathogenomics of the Virulence plasmids of *Escherichia coli*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2009; 73(4): p. 750-774.
 36. Levine M, Kaper J, Black R, Clements M. New knowledge on Pathogenesis of Bacterial Enteric Infections as applied to Vaccine Development. *Microbiol. Rev.* 1983; 47(4): p. 510-550.
 37. Dreyfus LA, Frantz JC, Robertson D. Chemical Properties of Heat-Stable Enterotoxin Produced by Enterotoxigenic *Escherichia coli* of Different Host Origin. *Infect. Immun.* 1983; 42(2): p. 539-548.
 38. Kennedy, DJ, Greenberg R, Dunn J, Abernathy R, Ryerse JS, Guerrant RL. Effects of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin STb on intestines of mice, rats, rabbits and piglets. *Infect. Immun.* 1984; 46(3): p. 639-643.
 39. Hirayama T, Wada A, Iwata N, Takasaki S, Shimonishi Y, Takeda Y. Glycoprotein receptors for a heat-stable enterotoxin (STh) produced by enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 1992; 60(10): p. 4213-20.
 40. Dallas W. The heat-stable toxin I gene from *Escherichia coli* 18D. *J. Bacteriol.* 1990; 172(9): p. 5490-3.
 41. Sears C, Kaper J. Enteric Bacterial Toxins: Mechanisms of Action and Linkage to Intestinal Secretion. *Microbiol. Rev.* 1996; 60(1): p. 167-215.
 42. Yamanaka H, Nomura Y, Fijii Y, Okamoto K. Extracellular secretion of *Escherichia coli* Heat-Stable Enterotoxin I across the outer membrane. *J. Bacteriol.* 1997; 179(11): p. 3383-3390.
 43. Taxt A, Aasland R, Sommerfelt H, Nataro J, Puntervoll P. Heat-stable enterotoxin of enterotoxigenic *Escherichia coli* as a vaccine target. *Infect Immun.* 2010; 78(5): p. 1824-31.
 44. Spangler B aDB. Structure and Function of Cholera Toxin and the related *Escherichia Coli* Heat-Labile Enterotoxin. *Microbiol Rev.* 1992; 56(4): p. 622-647.
 45. Lencer WI, Hirst TR, Holmes RK. Membrane traffic and the cellular uptake of cholera toxin. *Biochim Biophys Acta.* 1999; 1450(3): p. 177-90.
 46. Torres AG, Zhou X, Kaper JB. Adherence of diarrheagenic *Escherichia coli* strains to epithelial cells. *Infect Immun.* 2005; 73(1): p. 18-29.
 47. Gastra W, Svennerholm AM. Colonization Factors of Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC). *Trends Microbiol.* 1996; 4(11): p. 444-452.
 48. Chattopadhyay S, Tchesnokova V, McVeigh A, Kisiela D, Dori K, Navarro A, Sokurenko E,

- Savarino S. Adaptive Evolution of class 5 Fimbriae Genes in Enterotoxigenic *Escherichia coli* and its Functional Consequences. *J Biol Chem*. 2012; 287(9): p. 6150-8.
49. Cassels FJ, Wolf MK. Colonization factors of diarrheagenic *Escherichia coli* and their intestinal receptors. *J Ind Microbiol*. 1995; 15(3): p. 214-226.
 50. Klemm P, Schembri MA. Bacterial adhesins: function and structure. *Int J Med Microbiol*. 2000; 290(1): p. 27-35.
 51. Mortezaei N, Epler C, Shao P, Shirdel M, Singh B, McVeigh A, Uhlin E, Savarino S, Andersson M, Bullitt E. Structure and Function of Enterotoxigenic *Escherichia coli* fimbriae from differing assembly pathways. *Mol Microbiol*. 2015; 95(1): p. 116-26.
 52. Anantha R, Mc Veigh A, Lee L, Agnew M, Cassels F, Scott D, Whittman T, Savarino S. Evolutionary and Functional Relationships of Colonization Factor I and other Class 5 Adhesive Fimbriae of Enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Infect Immun*. 2004; 72(11): p. 7190-7201.
 53. Andersson M, Björnham O, Svantesson M, Badahdah A, Uhlin BE, Bullitt E. A structural basis for sustained bacterial adhesion: biomechanical properties of CFA/I pili. *J Mol Biol*. 2012; 415(5): p. 918-28.
 54. Li YF, Poole S, Nishio K, Jang K, Rasulova F, McVeigh A, Savarino SJ, Xia D, Bullitt E. Structure of CFA/I fimbriae from enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2009; 106(26): p. 10793-8.
 55. Girón JA, Viboud GI, Serandio V, Gómez-Duarte OG, Maneval DR, Albert MJ, Levine MM, Kaper JB. Prevalence and association of the longus pilus structural gene (IngA) with colonization factor antigens, enterotoxin types, and serotypes of enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Infect Immun*. 1995; 63(10): p. 4165-8.
 56. Girón JA, Levine MM, Kaper JB. Longus: a long pilus ultrastructure produced by human enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*. 1994; 12(1): p. 71-82.
 57. Clavijo AP, Bai J, Gómez-Duarte O. The Longus type IV pilus of enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) mediates bacterial self-aggregation and protection from antimicrobial agents. *Microb Pathog*. 2010; 48(6): p. 230-8.
 58. Girón JA, Gómez-Duarte OG, Jarvis KG, Kaper JB. Longus pilus of enterotoxigenic *Escherichia coli* and its relatedness to other type-4-pili- a minireview. *Gene*. 1997; 191(1): p. 39-43.
 59. Brunton L. Goodman&Gilman: Las bases farmacológicas de la terapéutica. 12th ed. México: Mc Graw Hill; 2011.
 60. Vargas C, Ugarte CA, Montiel M. Uso adecuado y racional de los antibióticos. *Acta Med Per*. 2006; 23(1): p. 15-20.
 61. Negroni M. Microbiología Estomatológica: Fundamentos y guía práctica. 2nd ed.: Editorial Médica Panamericana; 2009.
 62. Álvarez Bravo J. Mapa bacteriológico de bacilos gram negativos. Tesis Doctoral. Madrid: Universidad Complutense, Facultad de Medicina; 1991.
 63. Gómez ML, Calvo A, Prieto J. Antibióticos y quimioterapéuticos: Generalidades. In Lorenzo-Velázquez B., editor. *Farmacología básica y clínica.*: Editorial Médica Panamericana; 2008. p. 791-803.
 64. Andriole V. The quinolones: past, present, and future. *Clin Infect Dis*. 2005; 41: p. 113-9.
 65. Jacoby G. Mechanisms of resistance to quinolones. *Clin Infect Dis*. 2005; 41: p. 120-6.
 66. Sjöling A, Wiklund G, Savarino SJ, Cohen DI, Svennerholm AM. Comparative analyses of phenotypic and genotypic methods for detection of enterotoxigenic *Escherichia coli* toxins and colonization factors. *J Clin Microbiol*. 2007; 45(10): p. 3295-301.
 67. Bekal S, Brousseau R, Masson L, Prefontaine G, Fairbrother J, Harel J. Rapid identification of *Escherichia coli* Pathotypes of virulence Gene Detection with DNA Microarrays. *J Clin Microbiol*. 2003; 41(5): p. 2113-2125.
 68. Patzi-Vargas S, Zaidi Mb, Pérez Martínez I, León M, Ayala A, Chaussabel D, Estrada García T. Diarrheagenic *Escherichia coli* carrying supplementary virulence genes are an important cause of moderate to severe diarrhoeal disease in Mexico. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015; 9(3).
 69. Turner SM, Chaudhuri RR, Jiang ZD, DuPont H, Gyles C, Penn CW, Pallen MJ, Henderson IR. Phylogenetic comparisons reveal multiple acquisitions of the toxin genes by enterotoxigenic *Escherichia coli* strains of different evolutionary lineages. *J Clin Microbiol*. 2006; 44(12): p. 4528-

- 36.
70. Begum YA, Talukder KA, Qadri F, Sack RB, Svennerholm AM. Enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from surface water in urban and rural areas of Bangladesh. *J Clin Microbiol.* 2005; 43(7): p. 3582-3.
 71. Wolf M. Occurrence, distribution, and associations of O and H serogroups, colonization factor antigens, and toxins of enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev.* 1997; 10(4): p. 569-84.
 72. Taylor J, Charter RE. *Escherichia coli* O128 causing gastroenteritis of infants. *J Clin Pathol.* 1955; 8: p. 276-281.
 73. Guth B, Silva L, Scaletsky I, Toledo R, Trabulsi L. Enterotoxin production, presence of colonization factor antigen I, and adherence to HeLa cells by *Escherichia coli* O128 strains belonging to different O subgroups. *Infect Immun.* 1985; 47(1): p. 338-40.
 74. González EA, Blanco J, Garabal JI, Blanco M. Biotypes, antibiotic resistance and plasmids coding for CFA/I and STa in enterotoxigenic *Escherichia coli* strains of serotype O153:H45 isolated in Spain. *J Med Microbiol.* 1991; 34(2): p. 89-95.
 75. Pichel MG, Binsztejn N, Qadri F, Girón Ja. Type IV longus pilus of enterotoxigenic *Escherichia coli*: occurrence and association with toxin types and colonization factors among strains isolated in Argentina. *J Clin Microbiol.* 2002; 40(2): p. 694-7.
 76. Evans DJ Jr, Evans DG, DuPont HL, Orskov F, Orskov I. Patterns of loss of enterotoxigenicity by *Escherichia coli* isolated from adults with diarrhea: suggestive evidence for an interrelationship with serotype. *Infect Immun.* 1977; 17(1): p. 105-11.
 77. Yoh M, Narita I, Honda T, Miwatani T, Nishibuchi M. Comparison of preservation methods for enterotoxigenic *Escherichia coli* producing heat-labile enterotoxin. *J Clin Microbiol.* 1991; 29(10): p. 2326-8.
 78. Levine MM, Ristaino P, Sack BB, Kaper JB, Orskov F, Orskov I. Colonization factor antigens I and II and type 1 somatic pili in enterotoxigenic *Escherichia coli*: relation to enterotoxin type. *Infect Immun.* 1983; 39(2): p. 889-97.
 79. Smith MA, Bidochka MJ. Bacterial fitness and plasmid loss: the importance of culture conditions and plasmid size. *Can J Microbiol.* 1998; 44(4): p. 351-5.
 80. Jiang T, Min YN, Liu W, Womble DD, and RH Rownd. Insertion and deletion mutations in the repA4 region of the IncFII plasmid NR1 cause unstable inheritance. *J Bacteriol.* 1993; 175(17): p. 5350-8.
 81. Ban E, et al. Characterization of unstable pEntYN10 from enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) O169:H41
 82. Froehlich B, Parkhill J, Sanders M, Quail MA, Scott JR. The pCoo plasmid of enterotoxigenic *Escherichia coli* is a mosaic cointegrate. *J Bacteriol.* 2005; 187(18): p. 6509-16.
 83. Peñaranda ME, Evans DG, Murray BE, Evans DJ. ST:LT:CFA/II plasmids in enterotoxigenic *Escherichia coli* belonging to serogroups O6, O8, O80, O85, and O139. *J Bacteriol.* 1983; 154(2): p. 980-3.
 84. Murray BE, Evans DJ Jr, Peñaranda ME, Evans DG. CFA/I-ST plasmids: comparison of enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) of serogroups O25, O63, O78, and O128 and mobilization from an R factor-containing epidemic ETEC isolate. *J Bacteriol.* 1983; 153(1): p. 566-70.
 85. Begum YA, Baby NI, Faruque AS, Jahan N, Cravioto A, Svennerholm AM, Qadri F. Shift in phenotypic characteristics of enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) isolated from diarrheal patients in Bangladesh. *PLoS Negl Trop Dis.* 2014; 8(7).
 86. Johnson TJ, Wannemuehler YM, Johnson SJ, Loque CM, White DG, Doetkott C, Nolan LK. Plasmid replicon typing of commensal and pathogenic *Escherichia coli* isolates. *Appl Environ Microbiol.* 2007; 73(6): p. 1976-83.
 87. Froehlich B, Hotzapple E, Read TD, Scott JR. Horizontal transfer of CS1 pilin genes of enterotoxigenic *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 2004; 186(10): p. 3230-7.
 88. Rasko DA, Rosovitz MJ, Myers GS, et al. The pangenome structure of *Escherichia coli*: comparative genomic analysis of *E. coli* commensal and pathogenic isolates. *J Bacteriol.* 2008; 190(20): p. 6881-93.
 89. Cruz-Córdova A, Espinosa-Mazariego K, Ochoa SA, et al. CS21 positive multidrug-resistant

- ETEC clinical isolates from children with diarrhea are associated with self-aggregation, and adherence. *Front Microbiol.* 2014; 5: p. 709.
90. Rodas C, Mamani R, Blanco J, Blaco JE, Wiklund G, Svennerholm AM, Sjöling A, Iñiguez V. Enterotoxins, colonization factors, serotypes and antimicrobial resistance of enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) strains isolated from hospitalized children with diarrhea in Bolivia. *Braz J Infect Dis.* 2011; 15(2): p. 132-7.
 91. Byarugaba D. A view on antimicrobial resistance in developing countries and responsible risk factors. *Int J Antimicrob Agents.* 2004; 24(2): p. 105-10.
 92. Okeke IN, Lamikanra A, Edelman R. Socioeconomic and behavioral factors leading to acquired bacterial resistance to antibiotics in developing countries. *Emerg Infect Dis.* 1999; 5(1): p. 18-27.
 93. Kunin C. Use of antimicrobial drugs in developing countries. *Int J Antimicrob Agents.* 1995; 5(2): p. 107-13.
 94. Smith JT, Lewin CL. Mechanisms of antimicrobial resistance and implications for epidemiology. *Vet Microbiol.* 1983; 35(3-4): p. 233-42.
 95. Davison J. Genetic exchange between bacteria in the environment. *Plasmid.* 1999; 42(2): p. 73-91.
 96. Körner U, Kühne M, and S Wemzel. Tetracycline residues in meat and bone meals. Part 1: Methodology and examination of field samples. *Food Additives and Contaminants.* 2001; 18: p. 593-600.
 97. Huerta González M. Evaluación de los residuos de tetraciclinas en huesos de cerdos y bovinos. Tesis. Jalisco: Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, División de Ciencias Veterinarias; 2006.
 98. Houvinen P. Resistance to Trimethoprim-Sulfamethoxazole. *Antimicrob Res.* 2001; 32: p. 1609-14.
 99. Hoge CW, Gambel JM, Srijan A, Pitarangsi C, Echeverría P. Trends in antibiotic resistance among diarrheal pathogens isolated in Thailand over 15 years. *Clin Infect Dis.* 1998; 26(2): p. 341-5.
 100. Asna SM, Haq A, Rahman MD. Nalidixic acid-resistant *Salmonella enterica* Serovar *Typhi* with decreased susceptibility to Ciprofloxacin caused treatment failure: A report from Bangladesh. *J Infect Dis.* 2003; 56: p. 32-33.