



---

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**RELACIÓN ANTIGÉNICA ENTRE *Shigella* Y *E. coli* ENTEROINVASIVA DE  
DIFERENTES ZONAS GEOGRÁFICAS Y SU CARACTERIZACIÓN POR MÉTODOS  
GENOTÍPICOS**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**

**QUÍMICA DE ALIMENTOS**

**PRESENTA**

**RODRÍGUEZ GONZÁLEZ MARÍA MAGDALENA**



**MÉXICO, D.F.**

**AÑO 2016**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

**JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE: EDUARDO BONILLA ESPINOSA**

**VOCAL: MARTHA GILES GOMEZ**

**SECRETARIO: ARMANDO NAVARRO OCAÑA**

**1er. SUPLENTE: NORMA ANGELICA CAMACHO DE LA ROSA**

**2° SUPLENTE: BEATRIZ RUIZ VILLAFAN**

**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: RODRÍGUEZ GONZÁLEZ MARÍA MAGDALENA**

# ÍNDICE

	<b>Página</b>
RESUMEN .....	6
1. MARCO TEÓRICO .....	9
1.1 Enfermedades diarreicas; una de las principales causas de muerte en niños menores de 5 años a nivel mundial .....	9
1.1.1 Situación en México.....	10
1.2 <i>Enterobacteriaceae</i> .....	10
1.3 <i>Escherichia coli</i> .....	11
1.3.1 Características fenotípicas.....	11
1.3.2 De bacteria comensal a patógena .....	12
1.3.3 Patotipos.....	13
1.4 <i>Shigella</i> .....	13
1.4.1 Características fenotípicas.....	13
1.4.2 Bacteria patógena para humanos.....	14
1.5 Relación entre <i>Shigella</i> y <i>E. coli</i> enteroinvasiva (EIEC) .....	15
1.5.1 Mecanismo de patogenicidad invasivo .....	16
1.5.2 <i>ipaH</i> otro factor de virulencia .....	19
1.5.3 Relación antigénica entre <i>Shigella</i> y <i>E. coli</i> enteroinvasiva .....	21
1.6 Grupos filogenéticos.....	22
2. JUSTIFICACIÓN .....	24
3. HIPÓTESIS DE TRABAJO.....	25
4. OBJETIVO GENERAL.....	25
5. OBJETIVOS PARTICULARES .....	25
6. MATERIAL Y MÉTODOS .....	27
6.1 Cepas del estudio .....	28
6.2 Aislamiento y viabilidad .....	28
6.3 Identificación bioquímica.....	28
6.4 Obtención de los antígenos somáticos (O) y antígeno flagelar (H) .....	29

6.5 Tipificación serológica.....	29
6.6 Extracción de ADN de las cepas del estudio.....	30
6.7 Grupos filogenéticos e identificación de genes ( <i>lacZ</i> , <i>uidA</i> , <i>cyd</i> , <i>lacY</i> y <i>ipaH</i> ) para diferenciar <i>E. coli</i> y <i>Shigella</i> mediante PCR.....	31
6.8 Patrones de resistencia a antimicrobianos mediante pruebas de difusión en agar (Kirby-Bauer).....	31
6.9 Análisis estadístico.....	33
7. RESULTADOS .....	34
7.2 Origen de las cepas .....	34
7.2 Identificación bioquímica.....	34
7.3 Tipificación serológica.....	35
7.4 Grupos filogenéticos en cepas de <i>E. coli</i> de casos clínicos .....	39
7.5 Genes en cepas de <i>E. coli</i> de casos clínicos .....	40
7.6 Genes en cepas de <i>E. coli</i> de referencia NCTC.....	42
7.7 Genes en cepas de <i>Shigella</i> de aislamientos clínicos.....	43
7.8 Genes en cepas de <i>Shigella</i> de referencia NCTC.....	43
7.10 Comparación de identificación del gen <i>ipaH</i> utilizando dos iniciadores diferentes .....	45
7. 11 Patrones de resistencia a los antimicrobianos en cepas de <i>E. coli</i> .....	46
8. DISCUSIÓN DE RESULTADOS .....	48
9. CONCLUSIONES.....	56
10. PERSPECTIVAS.....	58
11. APÉNDICE .....	59
12. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	68

## ÍNDICE DE CUADROS

	<b>Página</b>
<b>Cuadro 1.</b> Distribución de serotipos encontrados en las cepas de <i>E. coli</i> de diferentes zonas geográficas.....	37
<b>Cuadro 2.</b> Genotipo y serotipos de <i>Shigella</i> obtenidas de México.....	38
<b>Cuadro 3.</b> Relaciones antigénicas entre las cepas de <i>E. coli</i> obtenidas de diferentes zonas geográficas y <i>Shigella</i> .....	39
<b>Cuadro 4.</b> Expresión del genotipo y grupo filogenético en cepas de <i>E. coli</i> obtenidas de diferentes zonas geográficas.....	41
<b>Cuadro 5.</b> Genotipo y grupos filogenéticos en las cepas controles de <i>E. coli</i> .....	42
<b>Cuadro 6.</b> Genotipo en cepas controles de <i>Shigella</i> NCTC.....	44
<b>Cuadro 7.</b> Resultados de $Chi^2$ para comparación de dos métodos de PCR para el gen <i>ipaH</i> .....	45
<b>Cuadro 8.</b> Patrones de resistencia a los antimicrobianos en cepas de <i>E. coli</i> y <i>Shigella</i> .....	47

## ÍNDICE DE FIGURAS

	<b>Página</b>
<b>Figura 1.</b> Modelo esquemático de la patogénesis de <i>Shigella</i> y EIEC.....	19
<b>Figura 2.</b> Árbol de decisión dicotómico para la determinación de grupos filogenéticos de <i>E. coli</i> .....	23
<b>Figura 3.</b> Metodología de procedimiento experimental.....	27
<b>Figura 4.</b> Electroforesis en geles de agarosa al 1.8 % de los amplicones de los genes <i>arpA</i> , <i>chuA</i> , <i>yjaA</i> y <i>TspE4.C2</i> de grupos filogenéticos de <i>E. coli</i> .....	40
<b>Figura 5.</b> Electroforesis en geles de agarosa al 1.5 % de amplicones de los genes <i>lacY</i> , <i>cyd</i> , <i>uidA</i> y <i>lacZ</i> de <i>E. coli</i> .....	43
<b>Figura 6.</b> Electroforesis en geles de agarosa al 1.8 % de los amplicones de los genes <i>ipaH</i> y <i>lacY</i> de <i>E. coli</i> .....	45

## RESUMEN

Estudios basados en el análisis de los genes (housekeeping) del metabolismo básico de las bacterias sugiere que todas las *Shigella*, excepto *S. boydii* 3 y *E. coli* enteroinvasiva (EIEC) pertenecen a un mismo patotipo lo que puede ser apoyado por estudios de antígenos O (somático) similares o compartidos entre estas dos enterobacterias. El presente estudio tuvo como propósito definir las características antigénicas y genotípicas de cepas de *E. coli* identificadas serológicamente como pertenecientes a serogrupos de EIEC y establecer si existe una relación antigénica y genotípica con *Shigella*. Se obtuvieron 82 cepas de *E. coli* aisladas de casos de diarrea infantil de diversos estudios epidemiológicos en diferentes áreas geográficas: Tailandia, Egipto, Bangladesh, Argentina y México. Por otro lado se incluyeron 29 cepas de *Shigella* obtenidas de casos de diarrea infantil en México, mediante reacciones de microaglutinación con sueros específicos anti-O y anti-H se determinó el serotipo, por la técnica de la reacción de la polimerasa (PCR) con iniciadores y condiciones previamente reportados se analizó la presencia de los genes *arpA*, *chuA*, *yjaA* y *TspE4.C2* para definir el grupo filogenético de las cepas de *E. coli*, además por esta técnica se determinó la presencia de los genes *lacZ*, *uidA*, *cyd*, *lacY* e *ipaH* con la finalidad de definir entre los género de *Shigella* y *E. coli*. Finalmente, utilizando el método de difusión en agar (Kirby-Bauer) se evaluó la sensibilidad a antimicrobianos. Como controles de los ensayos se utilizaron 15 cepas de EIEC y 14 de *Shigella*, ambos grupos obtenidos de las colecciones de NCTC y ATCC.

El análisis de la distribución de las 111 cepas mostró que 82 fueron *E. coli* de las cuales 34 (42 %) fueron de Tailandia, 30 (37 %) de Egipto, 8 (10 %) de Bangladesh y Argentina respectivamente y 2 (2 %) de México. Mientras 29 cepas fueron *Shigella* aisladas en México. La caracterización serológica de las cepas de *E. coli* mostró que 72 (88 %) pertenecieron a los serogrupos del patotipo EIEC, con relación a las 29 cepas de *Shigella* se determinaron seis serogrupos, siendo los de mayor prevalencia: O129 con 8 cepas (28 %), *Shigella flexneri* 2a con 6 cepas (21 %). La tipificación serológica permitió establecer relaciones antigénicas entre *E. coli* O167 y *S. boydii* 3, *E. coli* O124 y *S. dysenteriae* 3 y *S. flexneri* 2<sup>a</sup> con

*E. coli* O129. El análisis de los genes reveló que 82 cepas de *E. coli* presentaron los genes *lacZ*, *uidA*, *cyd* y *lacY* en 81/82 (99 %) cepas, mientras que las 29 cepas de *Shigella* solo amplificaron los genes *uidA* y *cyd* (100 %); el gen *ipaH* se encontró en 29 cepas de *Shigella* y sus respectivos controles, mientras que solo 22/82 cepas de *E. coli* presentaron dicho gen. La clasificación de las cepas de *E. coli* en grupos filogenéticos determinó que las 82 cepas se ubicaron en los grupos B1 (46 %), A (38 %) y 13 (16 %) cepas en los grupos E, F y ND (no determinados). Con respecto a la sensibilidad a los antimicrobianos 28 (34 %) cepas de *E. coli* y 22 cepas de *Shigella* presentaron resistencia a uno o más antimicrobianos, mientras que para el caso de los controles solo 4 (14 %) presentaron esta característica. Se confirmó la identidad de cepas como *E. coli* del serogrupo EIEC con presencia de genes de invasividad a las células del enterocito, en los serogrupos se observó la presencia de antígenos O compartidos entre *E. coli* y *Shigella*. Además las cepas de *E. coli* se ubicaron principalmente en los grupos A y B1 definidos como comensales propios del intestino humano. El uso de métodos genotípicos permitió clasificar adecuadamente a las cepas de *E. coli* en el patotipo EIEC.

# 1. MARCO TEÓRICO

## 1.1 Enfermedades diarreicas; una de las principales causas de muerte en niños menores de 5 años a nivel mundial

La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que aproximadamente el 73 % de las de las muertes anuales en niños menores de 5 años son atribuibles a seis principales causas; de las cuales la diarrea se ubica en el segundo lugar con un 18 % y este porcentaje es solo superado por la neumonía el cual cuenta con un 19 %. Dichas estimaciones muestran que en todo el mundo ocurren 10.6 millones de muertes anuales [1].

La diarrea se define como la evacuación de tres o más veces al día (o con mayor frecuencia que la normal de la persona) de heces líquidas o sueltas; Existen tres tipos de casos clínicos: diarrea aguda, esta dura varias horas y días; diarrea con sangre (conocida como disentería) y diarrea persistente que dura 14 días o más. La diarrea suele ser un síntoma de infección en el tracto intestinal la cual puede ser ocasionada por microorganismos bacterianos, víricos y/o parásitos, se transmite por alimentos o agua de consumo contaminados, o bien de persona a persona como resultado de una higiene deficiente [2].

Las enfermedades diarreicas son un problema de Salud Pública a nivel mundial, cada año se registran más de dos millones de casos fatales, sobre todo en los países en vía de desarrollo y principalmente en niños menores de 5 años [3]. Una estimación a nivel mundial sobre la diarrea en niños menores de 5 años que viven en países en vías de desarrollo reportó cerca de 1, 900 millones de episodios en

1990 y casi 1,700 millones en 2010 [4]. Pese a que el índice de mortalidad por esta enfermedad es muy elevado, se ha demostrado una disminución en este padecimiento del 4 % [5].

### **1.1.1 Situación en México**

Se estima que del total de muertes que ocurren por diarrea en todo el mundo, más del 90 % ocurren en niños menores de 5 años. En México, en el 2001 se notificaron 6 908 455 casos, para 2007 se contaron con 5 450 089 notificaciones; lo que mostró una disminución del 21 %. Posteriormente se observó una ligera tendencia ascendente hasta el 2011 con 6 030 193 casos, lo que mostró un incremento del 10.6 % con respecto a 2007 [6]. En 2001, la Secretaría de Salud (SSA) informó que las enfermedades gastrointestinales, ocasionadas por bacterias o parásitos, ocupaban la decimocuarta causa de fallecimientos a nivel nacional. Entre los factores asociados a un mayor riesgo de enfermar o morir a causa de estas enfermedades se encuentran: la higiene personal deficiente, limpieza en la preparación de alimentos y su consumo, contaminación fecal del agua; además de añadirse para la población infantil factores como la desnutrición, ausencia o prácticas inapropiadas de lactancia materna, peso bajo al nacimiento, esquema de vacunación incompleto y deficiencia de vitamina A [7].

## **1.2 *Enterobacteriaceae***

Actualmente la familia de *Enterobacteriaceae* está conformada por 34 géneros, 149 especies y 21 subespecies, este es un grupo heterogéneo de bacilos Gram-

negativos cuyo hábitat natural es el intestino de humanos y animales. Esta familia incluye varios géneros como *Escherichia*, *Shigella*, *Salmonella*, *Enterobacter*, etc. Algunos de estos microorganismos forman parte de la microbiota normal del intestino, tal es el caso de *E. coli*, que incidentalmente se le asocia con infecciones intestinales, mientras que otras como *Shigella* con frecuencia son patógenos de humanos [8,9]; Esta familia presenta las siguientes características microbiológicas: son bacilos Gram-negativos, con movilidad por flagelos peritricos o inmóviles; crecen bien en agar MacConkey en condiciones aeróbicas y anaeróbicas (anaerobios facultativos); fermentan la glucosa en vez de oxidarla y con frecuencia producen gas; son catalasa-positivos, oxidasa-negativos, no forman espora y reducen los nitratos en nitritos [9].

### **1.3 *Escherichia coli***

Fue hallada en 1885 por el pediatra alemán Theodor Escherich, por medio de estudios de la microbiota intestinal de infantes fue que se encontró tanto en individuos sanos como enfermos; se le nombró *Bacterium coli commune*, debido a esa característica; dicho nombre fue utilizado hasta 1919 cuando Castellani y Chalmers definieron el género *Escherichia* y la especie *coli* [10].

#### **1.3.1 Características fenotípicas**

*E. coli* es bacilo Gram-negativo de aproximadamente 2.0- 6.0 µm de largo y 1.1 – 1.5 µm de ancho, no formador de esporas, su movilidad es variable ya que puede o no poseer flagelos peritricos [10]. Es una bacteria anaerobia facultativa en condiciones de 37°C/24 h en medios comunes, por lo general tiene reacciones

positivas para: indol, lisina descarboxilasa,  $\beta$ - glucuronidasa, fermentación de manitol, rojo de metilo. En la mayoría de los casos fermentan hidratos de carbono como lactosa, maltosa, sorbitol, xilosa, rafinosa, entre otros y producen gas de la utilización de la glucosa. La reacción de Voges-Proskauer es negativa, no hidroliza la urea, ni produce ácido sulfhídrico y es Citrato de Simmons-negativo [9,10].

### **1.3.2 De bacteria comensal a patógena**

*E. coli* coloniza el tracto gastrointestinal de los humanos a pocas horas después del nacimiento; lo que la clasifica como parte de la microbiota comensal intestinal, la cual está constituida de microorganismos que interactúan con las células epiteliales y son expuestas al ambiente externo. Por lo que juega un papel importante en el funcionamiento normal de la fisiología intestinal de los humanos, no obstante, dicha bacteria es aislada con frecuencia en casos de infecciones diarreicas en los humanos [11].

Las cepas comensales no suelen causar enfermedades excepto en los casos donde el hospedero se encuentre inmunocomprometido o en el caso donde las barreras gastrointestinales normales se encuentren dañadas. Dicha bacteria para que pueda afectar al hospedero necesitaría adquirir algunos de los factores de virulencia como lo son: proteínas promotoras de invasión, toxinas proteicas, entre otros [12,13].

### 1.3.3 Patotipos

Actualmente se reconocen seis patotipos ETA's (Enfermedades Transmitidas por Alimentos): *E. coli* enteropatógena (EPEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* adherente difusa (DAEC) y *E. coli* productora de la toxina de Shiga (STEC) [14].

### 1.4 *Shigella*

El microbiólogo Shiga fue quien describió a *Shigella dysenteriae* como *Bacillus* en 1898. Lo llamó *Bacillus* porque parecía estar relacionada a *Bacillus coli*, que ahora se conoce como *Escherichia coli* [15,16]. En la década de 1940, Ewing propuso clasificar en cuatro especies (cuatro subgrupos A- D) al nuevo género *Shigella*: *S. dysenteriae* (Grupo A), *S. flexneri* (Grupo B), *S. boydii* (Grupo C) y *S. sonnei* (Grupo D), basado en las características del antígeno de esas especies. Posteriormente se demostró que la relación de los serotipos no es paralela a la relación genética [17].

#### 1.4.1 Características fenotípicas

*Shigella* es un bacilo Gram-negativo, no esporulado, no presenta movilidad, es anaerobio facultativo, pero crece en condiciones aérobicas, a una temperatura óptima 37°C. Todas las *Shigellas* fermentan la glucosa, con excepción de *Shigella sonnei*, ninguna fermenta lactosa; forman ácido a partir de la fermentación de hidratos de carbono, algunas variantes pueden producir gas. Todas fermentan el manitol con excepción de *S. dysenteriae* [9].

Algunas de las características bioquímicas importantes que distinguen a estas bacterias son: Citrato de Simmons-negativo, son oxidasa-negativa, no producen ácido sulfhídrico (con excepción de *S. flexneri* 6 y *S. boydii* 13 y 14), no producen gas a partir de glucosa, son inhibidas por cianuro de potasio, lisina descarboxilasa-negativo y son catalasa-positivo [18,19].

#### **1.4.2 Bacteria patógena para humanos**

Algunos microorganismos forman parte de la microbiota normal del intestino, tal es el caso de *E. coli*, que incidentalmente se le asocia con infecciones intestinales, mientras que otras como *Shigella* con frecuencia son patógenas de humanos; lo que significa que estas bacterias no se encuentran como microbiota normal del intestino y por lo tanto su presencia daña al hospedero debido a sus factores de virulencia que presenta [8].

*Shigella* se encuentran comúnmente en el agua contaminada con heces humanas y es la vía fecal-oral el principal modo de transmisión. Es responsable de problemas de salud en todo el mundo; sin embargo, es un problema de mayor importancia en los países en vías de desarrollo. Una de las causas de propagación de dicha bacteria son las condiciones que se presentan en los desastres naturales como las inundaciones, terremotos, etc., ya que favorecen la contaminación fecal-oral [18,19].

## 1.5 Relación entre *Shigella* y *E. coli* enteroinvasiva (EIEC)

A pesar de su cercanía, *Shigella* siempre es separada de *E. coli* en función de su características fenotípicas. Esto debido a que la mayoría de las cepas de *E. coli* (> 80 %) son móviles, lisina descarboxilasa (LDC) positivo, forman gas a partir de D-glucosa y son indol-positivo. En contraste, a las cepas de *Shigella* las cuales siempre son inmóvil, siempre LDC negativo y nunca forman gas a partir D-glucosa [20- 24]. Sin embargo, se han encontrado cepas que resultaron ser algún tipo de forma intermedia entre *Shigella* y *E. coli*, es decir, mientras que dichas cepas poseen algunas de las características bioquímicas de *E. coli*, muestran el comportamiento patógeno de *Shigella*. Posteriormente se encontró que aquellas cepas que han causado disentería (diarrea con sangre y moco) eran cepas de tipo híbrido que podría tener una reacción cruzada con sueros anti-*Shigella* en estudios de serotipificación, los cuales fueron descritos en 1944 y más tarde fueron llamadas *E. coli* enteroinvasiva (EIEC) [16,17]. Esto apoyado por estudios en donde se ha documentado la presencia de algunos antígenos de superficie como el antígeno somático (O) similares o estrechamente relacionados entre los diferentes serotipos de *E. coli* EIEC y *Shigella* [25,26].

Las cepas conocidas como EIEC poseen algunas de las características bioquímicas de *E. coli* y además cuentan con la capacidad de causar disentería utilizando el mismo método de invasión que *Shigella* spp. Estudios basados en el análisis de los genes “housekeeping” indica que EIEC está más relacionado con *Shigella* que con *E. coli* no invasiva. Es posible diferenciar a *Shigella* de *E. coli*, incluyendo al patotipo EIEC, mediante el uso de múltiples pruebas, incluyendo el gen *ipaH* en

PCR, perfil bioquímico y la tipificación serológica [27]. Algunas variaciones en las secuencias de los “clusters” de *Shigella* y EIEC indican que este último evolucionó a partir de un antepasado de *E. coli* y más tarde lo hizo *Shigella*. Por lo tanto se considera que *Shigella* fue una derivación posterior de EIEC. Se tienen dos hipótesis sobre la relación entre EIEC y *Shigella* las cuales indican: En primer lugar, EIEC es una forma ancestral que con el tiempo se desarrolló en *Shigella* "real". En segundo lugar, EIEC es un grupo diferente de organismos que se adaptan al huésped humano como lo hace *Shigella*, pero que está mejor adaptado para sobrevivir fuera del hospedero [17].

### **1.5.1 Mecanismo de patogenicidad invasivo**

El gran evento que probablemente dio origen a *Shigella* y EIEC es la adquisición del plásmido de invasión (*pINV*) de entre 180 kb – 230 kb [27,28]. El plásmido *pINV*, contiene muchos genes de virulencia que en cooperación con la virulencia asociada en genes del cromosoma producen una cascada de eventos que conducen a la infección. Estas bacterias causan la infección por la invasión de las células epiteliales intestinales, seguido por la multiplicación intracelular y propagación a las células adyacentes [15,29].

La enfermedad producida por *Shigella* spp. y EIEC se diferencia de las enfermedades producidas por la mayoría de los demás patógenos transmitidos por alimentos en al menos dos aspectos importantes: la producción de diarrea con sangre o disentería y la dosis infecciosa baja ( $10^1$  a  $10^2$  organismos viables por ingesta) la cual es capaz de producir síntomas clínicos [30,31]. Después de la ingestión de alimentos o agua contaminados, *Shigella* y EIEC muestran una

notable capacidad para sobrevivir a la acidez del estómago [32]. Una vez pasando este órgano, las bacterias pasan a través del intestino delgado para alcanzar el colon, donde se establece la infección; la cual se restringe a la mucosa intestinal e invade las células epiteliales del colon. Las etapas de invasión y propagación intracelular de estas bacterias consisten en [19,30]:

I. **Producción de adhesinas e invasivas a través del inyectisoma:**

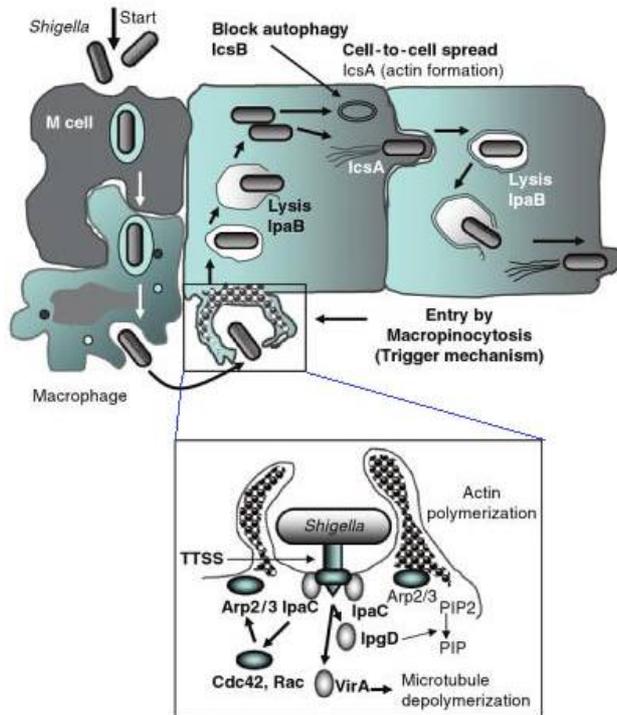
Estudios con diferentes modelos animales muestran que el acceso de estas bacterias al subepitelio del colon es a través del enterocito (19). Una vez adheridas a dichas células se comienza a formar un sistema de secreción *ipa*, conocido como *mxi-spa* (Expresión de membrana de los antígenos del plásmido de invasión y superficie de presentación de los antígenos del plásmido de invasión) [30,31]; el cual corresponde a un clásico sistema de secreción tipo III (SST3), este es ampliamente utilizado por patógenos animales y vegetales para la liberación de factores de virulencia de la superficie o en el interior de la célula hospedera (Figura 1) [33]. Los productos de los genes *ipa* (Antígenos del plásmido de invasión) son segregados activamente por este sistema, los cuales determinan la entrada bacteriana a la célula hospedera [19, 30,31].

II. **Invasión del enterocito:** Durante la invasión de las células epiteliales, genes como *ipa* (B, C y D) y *mxi* (A y B) son llevados a la expresión y secretados al interior de la célula. Estos genes son parte de la isla *ipa-mxi-spa* en el *pINV* [34-38]; lo que favorece a las bacterias para ser fagocitadas por los macrófagos y así formar un endosoma; la pérdida de esta isla de

patogenicidad daría como resultado la avirulencia. Las funciones de los otros genes de virulencia conocidos y asociados con la invasión de la célula aún no se han descubierto. Una vez dentro del endosoma, las bacterias escapan rápidamente en el citoplasma de la célula hospedera (Figura 1) [15,39]. Poco se sabe acerca del mecanismo exacto para dicho proceso pero se ha postulado que el producto del gen *ipaB* es una proteína de contacto que es responsable de la lisis del endosoma después de la entrada de la bacteria en la célula hospedera y de esta forma inducir la muerte de dicha célula [30,31].

- III. **Propagación de célula a célula:** las bacterias comienzan a replicarse en el interior del citosol de la célula del huésped. Debido a que estas bacterias son inmóviles utiliza la expresión de los genes *virG* e *icsA* (diseminación intracelular), los cuales codifican para una proteína que cataliza la polimerización de la actina, lo que crea una “cola de actina” que promueve la propagación célula a célula; Dando así como resultado la replicación bacteriana y propagación continua en toda la mucosa del colon (Figura 1) [19,30,31]. Por último, el epitelio sufre necrosis de las células infectadas, las cuales mueren, liberando así a las bacterias en el lumen intestinal, donde pueden difundirse al siguiente huésped a través de la vía fecal oral [19]. Estas bacterias también poseen un lipopolisacárido (LPS) que es un factor de virulencia que activa a los macrófagos para que produzcan la interleucina 1 (IL-1), la cual induce a la inflamación [30,31]. Para una máxima invasión, las bacterias infectan el enterocito e induce una afluencia masiva de leucocitos polimorfonucleares (PMNs), la migración de estos de

PMNs al sitio de inflamación interrumpe la mucosa intestinal, lo que les permite a las bacterias que se encuentran entre dos células vecinas entrar a la membrana basolateral del enterocito para la posterior invasión [19].



**Figura 1.** Modelo esquemático de la patogénesis de *Shigella* y EIEC. 1) Producción de adhesinas e invasivas a través del inyectisoma. 2) Invasión del enterocito. 3) Propagación de célula a célula. Figura tomada de Bhunia, 2008 [18].

### 1.5.2 *ipaH* otro factor de virulencia

Después de la adquisición del plásmido *pINV*, *Shigella* y EIEC son capaces de colonizar las células epiteliales intestinales humanas como un nuevo nicho. Para lograr la invasión y replicación en el huésped, *Shigella* y EIEC necesitan la expresión combinada de genes situados tanto en el *pINV* como en el cromosoma [34,40]. Los genes de virulencia contenidos en el *pINV* en cooperación con la virulencia asociada en genes del cromosoma desembocan una cascada de eventos que conducen a la infección del huésped [15,29].

El gen *ipaH* es un gen que se presenta en múltiples copias tanto en el plásmido *pINV* como en el cromosoma, este se encuentra únicamente en *Shigella* y EIEC [15,41,42]. Se ha descubierto que las copias de los genes *ipaH* tanto en *Shigella* y EIEC no son equivalentes sin embargo, todos ellos contienen un núcleo conservado (*ipaH* de 720- 1557 pb) y una región variable fuera de dicho núcleo [43]. Su función exacta aun no es determinada, sin embargo, se ha descubierto que estas proteínas pueden inducir una respuesta por anticuerpos, por lo tanto probablemente esté presente en la superficie bacteriana [37,41]. Se sabe que todos los productos de las copias de este gen contienen una zona rica en leucina en el extremo amino terminal, lo que es común en las células eucariotas, lo que podría indicar que la proteína *ipaH* podría desempeñar un papel en la manipulación de la expresión de los genes del huésped. Debido a que existen una gran cantidad de copias del gen *ipaH* (entre 4 a 10 copias) y a que estas también pueden ser presentadas en el cromosoma tanto de *Shigella* como de EIEC, la presencia de este gen es considerada una herramienta muy útil para la identificación de estos géneros bacterianos [27]. Igualmente, Horakova reportó cuatro genes que pudieran ayudar a diferencia entre *E. coli* y *Shigella*, uno de estos genes era *lacY* (lactosa permeasa) el cual se encuentra en el genoma de *E. coli*, y de *Enterobacter cloacae*, el segundo gen es *uidA* que codifica para una  $\beta$ -glucoronidasa y es específico para *E. coli* y *Shigella* spp. Además de los genes *cyd* y *lacZ* que codifican para el complejo del citocromo C y  $\beta$ -galactosidasa respectivamente [44].

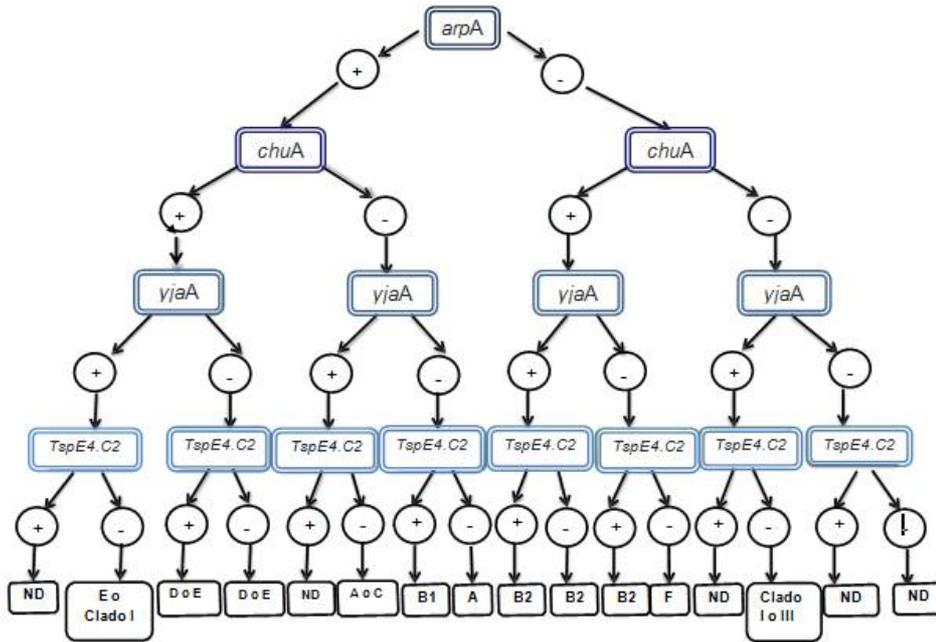
### 1.5.3 Relación antigénica entre *Shigella* y *E. coli* enteroinvasiva

El LPS es un componente importante de la pared celular de las bacterias Gram-negativas, está conformado por tres regiones distintas: lípido A, un núcleo de oligosacárido (core) y cadenas laterales conocidas que son unidades repetidas de carbohidratos, también conocidas antígeno O [45]. Este antígeno O proporciona la base para la serotipificación de *E. coli* y la diferenciación en 187 formas del antígeno O (serogrupos) que han sido reconocidos en *E. coli* [46,47]. Dichos antígenos O son resistentes al calor y al alcohol, generalmente se detectan mediante aglutinación usando sueros anti-O preparados en conejo. Por otro lado las especies de *Shigella* se clasifican serológicamente únicamente por su antígeno O, debido a que carecen de antígeno H (flagelar) y antígeno K (capsular); estas cuatro especies se clasifican sobre la base de las diferencias serológicas y bioquímicas en: *S. dysenteriae* (13 serogrupos), *S. flexneri* (14 serogrupos), *S. boydii* (18 serogrupos) y *S. sonnei*, que es un solo serogrupo. Aunque existen 46 serotipos reconocidos, solo 34 de estos tienen una estructura básica del antígeno O. Se ha encontrado que 21 de estos 34 serotipos son idénticos o estrechamente relacionados con algún antígeno O de *E. coli*. Es por esta razón que al hacer un estudio de serotipificación de las cepas de *Shigella* y EIEC se pueden encontrar reacciones cruzadas de aglutinación que pueden dar lugar a un resultado equivocado [25].

## 1.6 Grupos filogenéticos

En el 2000, Clermont y sus colegas describieron un método de PCR tríplex el cual permite asignar uno de cuatro grupos filogenéticos (A, B1, B2 o D) a cepas de *E. coli*, dicho método está basado en combinaciones de presencia o ausencia de los genes *chuA* (gen necesario para el transporte del grupo hemo en EHEC O157:H7), *yjaA* (identificado en *E. coli* K12 en su secuenciación completa con una función desconocida) y un fragmento de ADN conocido como *TspE4.C2* (identificado como un gen que codifica para una lipasa esterasa) dicho método demostró que del 80-85 % de las asignaciones de grupos filogenéticos eran correctos y que el porcentaje restante era clasificado en un grupo incorrecto [48]. Después del descubrimiento de otros grupos filogenéticos (E, F, C) en conjunto al porcentaje elevado de cepas clasificadas incorrectamente motivaron el desarrollo de un nuevo método en el cual se incluyó el gen *arpA* con dos propósitos: en primer lugar, es que este puede actuar como un control interno de calidad del ADN para que así se pueda producir al menos un producto en el PCR cuádruplex y en segundo lugar, que permita identificar al grupo F identificado erróneamente anteriormente como grupo D [49]. Además de esta inclusión se rediseñaron los iniciadores de los genes ya utilizados en el método tríplex (*chuA*, *yjaA* y *TspE4.C2*) esto con la finalidad de evitar el polimorfismo en la secuencia de nucleótidos y de esta forma excluir la amplificación de *TspE4.C2* y *chuA* [50]. Por lo tanto, el actual método de PCR cuádruplex considera ocho grupos filogenéticos de *E. coli* reconocidos (A, B1, B2, C, D, E, F) y uno correspondiente a *E. coli* clado I. Un

genotipo cuádruplex es revelado tras la valoración de presencia o ausencia de los cuatro genes según el siguiente mapa (Figura 2) [51].



**Figura 2.** Árbol de decisión dicotómico para la determinación de grupos filogenéticos de *E. coli*. Datos obtenidos de Clermont [51].

## 2. JUSTIFICACIÓN

En México las enfermedades gastrointestinales son uno de los principales problemas de salud pública. La Secretaría de Salud (SSA) informó que estas ocupan la decimocuarta causa de mortalidad a nivel nacional, dichas enfermedades afectan principalmente la población infantil [7]. La shigelosis es endémica de los climas tropicales y templados, en México y otros países en vía de desarrollo la más frecuente es *Shigella flexneri* 2<sup>a</sup>; esta enfermedad es importante debido a que su principal complicación es el Síndrome Urémico Hemolítico (SUH), la cual representa una de las causas más frecuentes de falla renal en niños menores de 10 años.

Como se ha descrito *Shigella* es un microorganismo que tiene la capacidad de invadir las células epiteliales del hospedero, característica que poseen un cierto patotipo de *E. coli* que se le denomina como EIEC, si bien se puede lograr diferenciar entre cepas de *Shigella* y *E. coli*, se ha encontrado que las cepas correspondientes al patotipo EIEC, presentan características fenotípicas y genotípicas similares a *Shigella* lo que dificulta la diferenciación entre ambas enterobacterias cuando se utilizan métodos tradicionales de laboratorio.

Por tal motivo en este proyecto se analizaron las características fenotípicas y genotípicas de aislados de cepas de *E. coli* identificadas serológicamente como pertenecientes a los serogrupos de EIEC y aislados de cepas de *Shigella*; ambas se obtuvieron de estudios epidemiológicos de diarrea infantil de diferentes zonas geográficas. Esto con el objetivo de definir su identidad antigénica y poder establecer si es que existe una relación antigénica entre las cepas de EIEC del estudio y las cepas de *Shigella*. Adicionalmente se realizaron pruebas genotípicas a todas nuestras cepas con el objetivo de evidenciar la capacidad invasiva típica de cepas EIEC y *Shigella* esto con la finalidad de poder definir cuantas de nuestras cepas con serotipo EIEC, son identificadas realmente como pertenecientes a dicho patotipo.

### 3. HIPÓTESIS DE TRABAJO

EIEC es un agente etiológico causante de diarrea infantil, debido a que EIEC y *Shigella* presentan características bioquímicas y antigénicas similares hacen difícil hacer una diferenciación entre estas dos enterobacterias, por lo que al emplear métodos fenotípicos y moleculares se podrá definir la identidad del patotipo de estas dos enterobacterias.

### 4. OBJETIVO GENERAL

Realizar la caracterización de cepas de *E. coli* y *Shigella* aisladas de infecciones intestinales empleando métodos fenotípicos y moleculares para conocer si estas cepas comparten características antigénicas y genotípicas con *Shigella*.

### 5. OBJETIVOS PARTICULARES

- i. Mediante reacciones de microaglutinación utilizando un esquema antigénico contra los antígenos somático y flagelar, determinar los serotipos de las cepas en estudio.
- ii. Determinar las reacciones cruzadas que existen entre los antígenos somáticos en las reacciones de microaglutinación.
- iii. Clasificar las cepas de *E. coli* del estudio en sus diferentes grupos filogenéticos con ayuda de la expresión de los genes *arpA*, *chuA*, *yjaA* y un fragmento anónimo designado como *TspE4.C2*, con la realización de un PRC cuádruplex.

- iv.** Clasificar la presencia o ausencia de los genes *lacZ*, *uidA*, *cyd* y *lacY* con la finalidad de diferenciar entre cepas de *Shigella* y *E. coli*.
- v.** Utilizando iniciadores específicos para la realización de una PCR dúplex, determinar la presencia de los genes *ipaH* y *lacY* con la finalidad de evidenciar la capacidad de virulencia invasiva.
- vi.** Evaluar la sensibilidad y resistencia de las cepas en estudio a diferentes antimicrobianos, utilizando el método de difusión en agar (Kirby- Bauer).

## 6. MATERIAL Y MÉTODOS

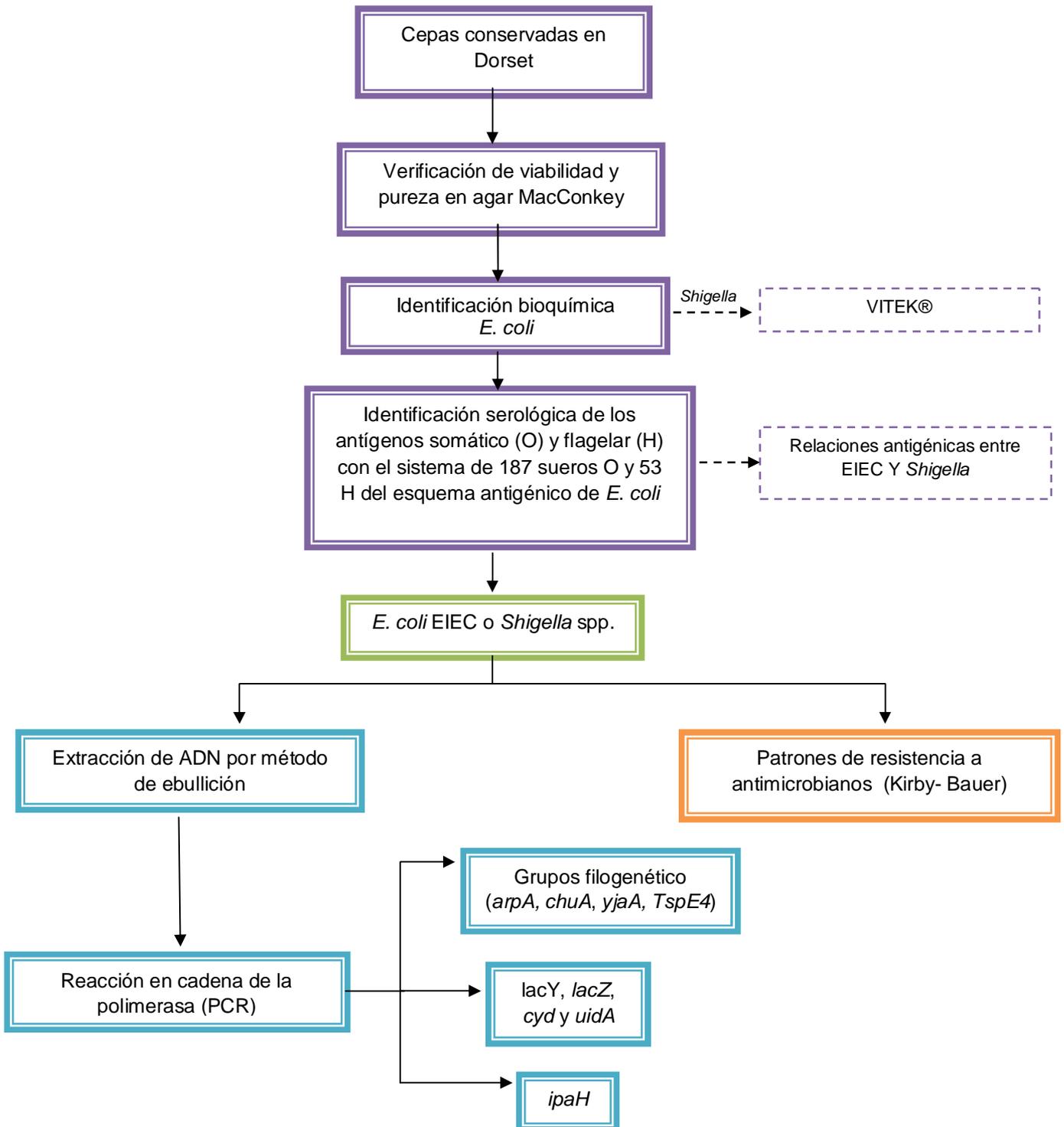


Figura 3. Metodología de procedimiento experimental.

### **6.1 Cepas del estudio**

En este estudio se analizaron 82 cepas de *E. coli* aisladas de casos de diarrea infantil de diferentes estudios epidemiológicos en distintas áreas geográficas que incluían Tailandia, Egipto, Bangladesh, Argentina y México. Por otro lado se incluyeron cepas de *Shigella* las cuales fueron aisladas de casos de diarrea infantil en México. Como controles de los ensayos se utilizaron 15 cepas EIEC y 14 cepas de *Shigella*, ambos grupos obtenidos de las colecciones del National Collection of Type Cultures (NCTC) y American Type Culture Collection (ATCC).

### **6.2 Aislamiento y viabilidad**

Debido a que las cepas de *E. coli* y *Shigella* se conservan en medio de Dorset en el cepario del Laboratorio de Salud Pública en la Facultad de Medicina, UNAM. Se procedió a inocularlas por estriado en cuadrante radial en agar MacConkey (MC, Bioxon) e incubar a 37° C durante 18-24 horas con la finalidad de corroborar la viabilidad y realizar el aislamiento de colonias de las bacterias. Simultáneamente se hizo una copia de las cepas de corto plazo en gelosa especial en frascos de antibiótico de 10 mL y una copia de trabajo en agar tripticaseína soya (TSA, Bioxon).

### **6.3 Identificación bioquímica**

Se realizó la confirmación de la identidad fenotípica de las cepas utilizando las siguientes pruebas bioquímicas estándares que se prepararon en el laboratorio de acuerdo con Barrow, 1993 [52]: agar de hierro de Kligler, rojo de metilo y Vogues-Proskauer, agar de urea, medio SIM, citrato de Simmons, caldo malonato-fenilalanina, caldo gluconato. Para lograr diferenciar entre cepas de *Shigella* y *E.*

*coli* se realizaron pruebas de fermentación de los siguientes carbohidratos: lactosa, sorbitol, maltosa, rafinosa y xilosa.

Por el hecho de que las 29 cepas de origen clínico la identificación bioquímica con substratos (carbohidratos y aminoácidos) preparados en el laboratorio se dificultó se utilizó el sistema de identificación automatizada VITEK®, ver descripción en el Apéndice A<sub>7</sub>.

#### **6.4 Obtención de los antígenos somáticos (O) y antígeno flagelar (H)**

Las cepas de *E. coli* y *Shigella* fueron inoculadas en tubos en agar TSA (Bioxon) inclinado y se incubaron a 37 °C de 18- 24 h. Posteriormente el crecimiento bacteriano fue re-suspendido con 10 mL de solución salina (0.15 M de NaCl) y se calentó a 100 °C durante 1 h con vapor fluente, como conservador se agregaron 10 mL de formalina (solución salina con 0.6 % de formaldehído).

En el caso del antígeno H las cepas de *E. coli* y *Shigella* se inocularon en medio semisólido en tubos de Craigie y se incubaron a 30 °C hasta observar el crecimiento bacteriano en la superficie del medio semisólido; posteriormente el crecimiento en el medio semisólido se inoculó en caldo biotriptasa a 30 °C durante 18 a 24 h y se agregó 10 mL de formalina como conservador.

#### **6.5 Tipificación serológica**

La identificación serológica del antígeno somático se realizó utilizando 187 sueros anti-O y 53 sueros del antígeno flagelar del esquema antigénico ampliado de *E. coli* obtenidos en conejo (SERUNAM) y se utilizó la metodología descrita previamente por Orskov, 1984 [47]. Con la ayuda de un dispensador automático

(Dynatech Laboratories, Quick Spense Controller) en microplacas de 96 pozos con fondo de U (Nunc) se distribuyeron 50  $\mu$ L las diluciones (1:100) de cada antisuero, se procedió a agregar 50  $\mu$ L de cada uno de los antígenos de las cepas en estudio, para llevar a cabo las reacciones de aglutinación. Las placas se incubaron a 50 °C de 18- 24 h o por 2 h, para el caso del antígeno somático y el antígeno flagelar respectivamente; una vez transcurrido el tiempo de incubación se procedió a registrar las reacciones de aglutinación. Debido a la presencia de reacciones antigénicas cruzadas (relación antigénica) de los antígenos con varios antisuecos, se procedió a titular los antisuecos con el antígeno de las cepas, dicha titulación se realizó con el método descrito anteriormente pero con diluciones seriadas al doble de los antisuecos comenzando con una dilución 1:100 y finalizando en 1:12,800. En los casos en los que persistieron la aglutinaciones se realizó una evaluación de aglutinación con antisuecos específicos (1:50-1:6,400). La identificación del antígeno flagelar y somático se definió a partir del suero que presentó un título similar al del antisuero con su antígeno homólogo.

## **6.6 Extracción de ADN de las cepas del estudio**

La extracción del DNA genómico de las cepas de *E. coli* se realizó por el método de ebullición previamente reportado por Islam, 2006 [53]; el cual es descrito en el Apéndice A<sub>1</sub>.

### **6.7 Grupos filogenéticos e identificación de genes (*lacZ*, *uidA*, *cyd*, *lacY* y *ipaH*) para diferenciar *E. coli* y *Shigella* mediante PCR**

En el caso de los genes *lacZ*, *uidA*, *cyd*, *lacY*, se empleó una PCR cuádruplex; por lo que respecta a los genes de *arpA*, *chuA*, *yjaA*, *TspE4.C2* de grupos filogenéticos también se utilizó una PCR cuádruplex y para los genes *ipaH* y *lacY* una PCR dúplex. Se realizaron reacciones de PCR en microtubos de 200 µL en donde se preparó un coctel (Apéndice A<sub>2</sub>), el cual contenía como reactivos una solución amortiguadora, MgCl<sub>2</sub>, Taq polimerasa, dNTP's, iniciadores (Apéndice A<sub>4</sub>) y agua ultrapura (Invitrogen); a cada microtubo con el coctel previamente mencionado se le añadió cada una de las muestra de ADN de las cepas del estudio o de los controles positivo del gen a determinar; además se incluyó un coctel sin ADN que sirviera de control negativo. Las condiciones del termociclador utilizado (Labnet, MultiGene Optimax) para los diferentes PCR realizados, se muestra en el Apéndice A<sub>3</sub>.

Los productos de la amplificación del DNA por la PCR (amplicones) obtenidos se analizaron por electroforesis en geles de agarosa (Apéndice A<sub>3</sub>); dicho método se encuentra descrito en el Apéndice A<sub>5</sub>.

### **6.8 Patrones de resistencia a antimicrobianos mediante pruebas de difusión en agar (Kirby-Bauer)**

Para este análisis se utilizó como referencia la metodología reportada en la décima edición de manual del Comité Nacional de Normas de Laboratorio Clínico (NCCLS). Las cepas del estudios y la cepa de *E. coli* ATCC® 25922™ utilizada como control fueron inoculadas en placas de agar TSA e incubadas a 37 °C

durante 18-24 h. Posteriormente se tomó un inóculo con el cual se preparó una suspensión bacteriana en tubos con 1.8 mL de solución salina fisiológica (0.15 M) estéril, la cual se ajustó al tubo 0.5 del nefelómetro de McFarland ( $1.5 \times 10^8$  bacterias/mL); en un tiempo no mayor a 15 minutos se procedió a impregnar dicha suspensión en un hisopo de algodón estéril con el cual después de eliminar el exceso de la suspensión se inoculó de manera masiva dos placas con agar Mueller-Hinton (MH, Bioxon) por cada una de las cepas, en dichas placas se colocaron sensidiscos de los antimicrobianos (BBL Sensi Disc BD®) con ayuda de una pinza estéril cuidando que la distancia entre cada uno de estos fuera no menor a 24 mm. Se evaluó la sensibilidad a los siguientes antimicrobianos; Cefoxitina (FOX) 30 µg (Cefalosporinas 2 generación), Ceftriaxona (CRO) 30 µg , Ceftazidima (CAZ) 30 µg, Cefotaxima (CTX) 30 µg, (Cefalosporinas 3ª generación), Cefepima (FEP) 30 µg, (Cefalosporinas 4ª generación), Ofloxacina (OFX) 5 µg, Norfloxacin (NOR) 10 µg, Ácido Nalidixico (NA) 30 µg, Ciprofloxacina (CIP) 5 µg, Imipinem (IMP) 10 µg, Aztreonam (ATM) 30 µg, Trimetroprim/Sulfametoxazol (SXT) 1.25/23.73 µg, Tetraciclina (TE) 30 µg. Una vez preparadas las placas con los antimicrobianos se incubaron a 37 °C durante 18-24 h, posteriormente con un Vernier se determinó la medida del diámetro de los halos de inhibición y se registraron los resultados. Se consideraron los diámetros de inhibición reportados por la NCCLS para interpretar las medidas del diámetro de inhibición y definir como resistente, intermedio o sensible la respuesta a cada antimicrobiano (Apéndice A<sub>6</sub>).

## **6.9 Análisis estadístico**

Los resultados obtenidos en la determinación del gen *ipaH* utilizando diferentes secuencias de iniciadores se analizaron mediante una prueba de hipótesis de proporciones con la prueba de  $Ch^2$  usando un nivel de significancia de 0.05. Dichas pruebas se efectuaron en Epi info<sup>TM</sup> 6, un programa de dominio público diseñado por el Centro para el Control de Enfermedades de Atlanta (CDC).

## 7. RESULTADOS

### 7.2 Origen de las cepas

Se obtuvieron 82 cepas de *E. coli* de serogrupos enteroinvasivos procedentes del mismo número de niños menores de cinco años con diarrea de diferentes áreas geográficas de las cuales: 34 (42 %) cepas fueron de Tailandia, 30 (37 %) de Egipto, 8 (10 %) de Bangladesh, 8 (10 %) de Argentina y 2 (2 %) de México. En el estudio se incluyeron 29 cepas de *Shigella* provenientes del mismo número de niños menores de cinco años con diarrea de México. Además de estas cepas se utilizaron 15 cepas de referencia de *E. coli* enteroinvasiva (EIEC) y 14 cepas de *Shigella*, ambos grupos de cepas obtenidas de las colecciones del National Collection of Type Cultures (NCTC) y American Type Culture Collection (ATCC).

### 7.2 Identificación bioquímica

Posteriormente al aislamiento y confirmación de la viabilidad de las cepas del estudio se procedió a realizar una identificación fenotípica utilizando diversas pruebas bioquímicas. De las 82 cepas 70 (85 %) mostraron el perfil bioquímico típico de *E. coli*; así como, los 15 controles de referencia de EIEC. Dicho perfil consistió en fermentación de glucosa, lactosa, maltosa, rafinosa, sorbitol y xilosa; en 6 cepas se registró la producción de gas a partir de la fermentación de glucosa, además se confirmó la producción de indol, no se produjo acetil-metilcarbinol (Voges-Proskauer), las muestras carecieron de ureasa, no utilizaron como fuente de carbono el citrato de Simmons y el ácido glucónico no fue oxidado; además no se detectó la producción de ácido sulfhídrico (Apéndice A<sub>8</sub> y A<sub>10</sub>).

Por otra parte para el caso de los 14 controles de *Shigella* presentaron propiedades fenotípicas típicas de esta bacteria que consistió en la falta de utilización de lactosa, maltosa, rafinosa y xilosa; así mismo ninguna de las cepas presento movilidad en los tubos de Craigie con medio semisólido (Apéndice A<sub>11</sub>).

La identificación de 29 cepas de origen clínico el sistema VITEK® reportó la identificación bioquímica de *Shigella*, este sistema proporcionó una identificación para estas cepas, la cual consistió en: 19 cepas (66 %) correspondieron a *S. flexneri*, 9 cepas (31 %) a *S. sonnei* y una cepa (3 %) de *S. dysenteriae*. Por lo que se procedió a confirmar dicha identificación por métodos serológicos, los resultados se describen más adelante. Cabe mencionar que estas cepas no utilizaron lactosa, maltosa, rafinosa, ni xilosa (Apéndice A<sub>9</sub>).

### **7.3 Tipificación serológica**

En los ensayos de caracterización serológica 72 (88 %) de las 82 cepas de *E. coli* fueron identificadas como serogrupos pertenecientes al patotipo EIEC, mientras que las 10 (12 %) restantes se identificaron con serogrupo distinto.

Se identificaron 10 diferentes serotipos en las cepas aisladas de casos de diarrea infantil en diferentes zonas geográficas (Cuadro 1), el serotipo más frecuente fue O159:NM con 22 (27 %) cepas, seguido del serotipo O167:H5 con 16 (20 %) cepas, antígeno O no tipificable (O?):H no móvil (NM) con 12 (15 %), O28ac:NM con 8 (10 %), O152:NM con 6 (7 %) cepas, O136:NM con 4 (5 %) cepas y por último los serotipos: O124:NM, O124:H24, O167:H49 y O167:NM cada uno se identificó en una cepa (1 %) respectivamente.

Con respecto a las 29 cepas de *Shigella* de casos clínicos se determinaron 6 serogrupos los cuales fueron: O129 con 8 cepas de 29 (28 %), *Shigella flexneri* 2<sup>a</sup> con 6 cepas (21 %), O135 con 4 cepas (14 %), *Shigella sonnei* 1 con 2 cepas (6 %), O112ac con una cepa (3 %) y 8 cepas (28 %) no tipificables. Estas cepas fueron inmóviles (Cuadro 2).

En el caso de las cepas controles: 15 cepas de EIEC y 14 *Shigella*, con la tipificación serológica se confirmó el serotipo, al presentarse reacciones de aglutinación con los antígenos O y H correspondientes a su serogrupo original, observando que las cepas de *Shigella* fueron inmóviles en tubos de Cragie. La tipificación serológica permitió establecer relaciones antigénicas entre *E. coli* enteroinvasiva y *Shigella*, en el análisis de las reacciones antigénicas de las 82 cepas de *E. coli* analizadas, 18 (22 %) presentaron una reacción antigénica entre *E. coli* O167 y *S. boydii* 3, 8 (8 %) cepas con una reacción entre *E. coli* O28ac y *E. coli* O42 y por último 2 cepas (2 %) con una reacción de *E. coli* O124 y *S. dysenteriae* 3. Así mismo se observaron que de las 29 cepas de *Shigella* de casos clínicos, 18 (63 %) presentaron reacciones antigénicas cruzadas, estas reacciones fueron: 8 (28 %) cepas con reacción entre *E. coli* O129 y *S. flexneri* 2<sup>a</sup>, 6 (21 %) cepas con reacción entre *S. flexneri* 2<sup>a</sup> y *E. coli* O129 y por último 4 (14 %) cepas con reacción entre *E. coli* O135 y *S. flexneri* 2<sup>a</sup>. (Cuadro 3).

**Cuadro 1.** Distribución de serotipos encontrados en las cepas de *E. coli* de diferentes zonas geográficas.

Origen	Serotipo	N
ARGENTINA	O167:H5	3
	O28ac:NM	2
	O?:HNM	3
BANGLADESH	O167:H5	6
	O167:H49	1
	*SD	1
EGIPTO	O159:NM	15
	*SD	5
	O?:HNM	1
	O167:H5	7
	O167:NM	1
MÉXICO	O?:HNM	1
	O?:HNM	2
TAILANDIA	*SD	4
	O?:HNM	1
	O124:H24	1
	O124:NM	1
	O136:NM	4
	O152:NM	6
	O159:NM	7
	O28ac:NM	6
	OR:MN	4
TOTAL		82

\*S.D.: Serotipo diferente, NM: No móvil

**Cuadro 2.** Relación entre la identificación VITEK® y serotipos identificados en cepas de *Shigella* (México).

Serotipo	ID*	Número de cepas	Genotipo				
			<i>lacZ</i>	<i>lacY</i>	<i>uidA</i>	<i>cyd</i>	<i>ipaH</i>
O129:NM	<i>S. flexneri</i>	8	-	-	1	1	1
	<i>S. flexneri</i>		-	-	1	1	1
	<i>S. flexneri</i>		-	-	1	1	1
	<i>S. flexneri</i>		-	-	1	1	1
	<i>S. flexneri</i>		-	-	1	1	1
	<i>S. flexneri</i>		-	-	1	1	1
	<i>S. flexneri</i>		-	-	1	1	1
	<i>S. flexneri</i>		-	-	1	1	1
OR:NM	<i>S. sonnei</i>	8	1	-	1	1	1
	<i>S. sonnei</i>		1	-	1	1	1
	<i>S. sonnei</i>		1	-	1	1	1
	<i>S. sonnei</i>		-	-	1	1	1
	<i>S. sonnei</i>		1	-	1	1	1
	<i>S. sonnei</i>		1	-	1	1	1
	<i>S. sonnei</i>		1	-	1	1	1
	<i>S. sonnei</i>		1	-	1	1	1
<i>S. flexneri</i> 2 <sup>a</sup>	<i>S. flexneri</i>	6	-	-	1	1	1
	<i>S. flexneri</i>		-	-	1	1	1
	<i>S. flexneri</i>		-	-	1	1	1
	<i>S. flexneri</i>		-	-	1	1	1
	<i>S. flexneri</i>		-	-	1	1	1
	<i>S. flexneri</i>		-	-	1	1	1
O135:NM	<i>S. flexneri</i>	4	-	-	1	1	1
	<i>S. flexneri</i>		-	-	1	1	1
	<i>S. flexneri</i>		-	-	1	1	1
	<i>S. flexneri</i>		-	-	1	1	1
<i>S. sonnei</i> 1	<i>S. flexneri</i>	2	1	-	1	1	1
	<i>S. sonnei</i>		1	-	1	1	1
O112ac:NM	<i>S. dysenteriae</i>	1	1	1	1	1	1
TOTAL			10	1	29	29	29

ID\*: Identificación bioquímica por VITEK®

**Cuadro 3.** Reacciones antigénicas entre las cepas de *E. coli* obtenidas de diferentes zonas geográficas y *Shigella*.

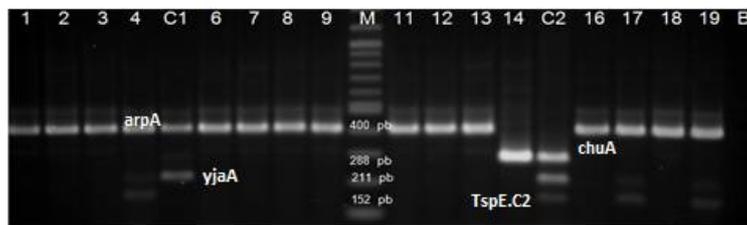
Serogrupo	N	Título con el suero homólogo	Título	Reacción antigénica cruzada	Título con el suero de <i>Shigella</i>	Título
				N		
O167	18	1:400	*ND	<i>S. boydii</i> 3	1:100	*ND
O28ac	8	1:1600	1:400	O42	1:400	1:200
O124	2	1:400	1:400	<i>S. dysenteriae</i> 3	1:800	1:400
*O129	8	1:800	1:600	<i>S. flexneri</i> 2 <sup>a</sup>	1:800	1:100
O135	4	1:400	1:600	<i>S. flexneri</i> 2 <sup>a</sup>	1:800	*ND
* <i>S. flexneri</i> 2 <sup>a</sup>	6	1:800	1:800	O129	1:800	*ND

ND\*: No determinado

#### 7.4 Grupos filogenéticos en cepas de *E. coli* de casos clínicos

La clasificación en grupos mostró que de 82 cepas, 38 (46 %) se ubicaron en el grupo B1 al presentar los genes *arpA* y *TspE4.C2* (Figura 4); de estas 15 (40 %) de 38 fueron de Tailandia, 8/38 (21 %) de Egipto y Bangladesh respectivamente y finalmente 7/38 (18 %) de Argentina (Cuadro 4). Así mismo con todas estas cepas para definir al grupo A se consideró la presencia del gen *arpA* (Figura 4), 31 (38 %) de 82 cepas se ubicaron en dicho grupo, de estas 31 cepas 13 (42 %) fueron obtenidas de Tailandia, 17/31 (55 %) de Egipto y 1/31 (3 %) de Argentina, para el caso del grupo E se consideró la presencia de los genes *arpA* (400 pb), *chuA* (288 pb) y *TspE4.C2* (152 pb) [51] (Figura 4), 6 (7 %) cepas se clasificaron en este grupo (Cuadro 4), de las cuales 4/6 (67 %) eran de Tailandia y 2/6 (33 %) de Egipto. También se encontró una (2 %) cepa de 82 únicamente con el gen *chuA* (Figura 4), por lo que se clasificó dentro del grupo F y por último se encontró 6

(7 %) cepas en las cuales no se pudieron clasificar dentro de alguno de estos grupos antes mencionados, entre estas cepas, 3/6 (50 %) fueron procedentes de Egipto, 1/6 (17 %) de México y 2/6 (33 %) de Tailandia (Cuadro 4).



**Figura 4.** Electroforesis en geles de agarosa al 1.8 % de los amplicones de los genes *arpA*, *chuA*, *yjaA* y *TspE4.C2* de grupos filogenéticos de *E. coli*; Los carriles 1-4, 6-9, 11-14 y 16-19 corresponden a aislamientos de casos de diarrea infantil. Carriles C1 y C2 corresponden al control positivo *arpA* y *yjaA* (*E. coli* K12), control positivo *chuA*, *yjaA* y *TspE4.C2* (116979, UPEC) respectivamente y carril M marcador de peso molecular (100 pb).

### 7.5 Genes en cepas de *E. coli* de casos clínicos

El análisis para detectar los genes *lacZ*, *uidA*, *cyd* y *lacY* (Figura 5) mostró que las 82 cepas de *E. coli* presentaron los genes *lacZ*, *uidA*, *cyd*, mientras que el gen *lacY* (permeasa) fue encontrado en 81/82 (99 %) cepas, por lo tanto, una cepa no presentó el gen *lacY*, esta cepa tiene como lugar de origen Tailandia y pertenece al serotipo O28ac:NM (Cuadro 4).

**Cuadro 4.** Expresión del genotipo y grupo filogenético en cepas de *E. coli* obtenidas de diferentes zonas geográficas.

Origen	Número de cepas	Serotipo	Grupo	Genotipo				
				<i>lacY</i>	<i>cyd</i>	<i>uidA</i>	<i>lacZ</i>	<i>ipaH</i>
				N				
TAILANDIA	7	O159:NM	A	7	7	7	7	-
	3	OR:NM		3	3	3	3	2
	1	O124:H24		1	1	1	1	-
	1	O?:NM		1	1	1	1	-
	1	O124:NM		1	1	1	1	1
EGIPTO	13	O159:NM		13	13	13	13	-
	1	OR:H?		1	1	1	1	-
	1	O166:H37		1	1	1	1	-
	1	O?:H10		1	1	1	1	-
	1	O?:NM		1	1	1	1	-
ARGENTINA	1	OR:NM	1	1	1	1	-	
TAILANDIA	4	O136:NM	B1	4	4	4	4	4
	4	O152:NM		4	4	4	4	4
	6	O28ac:NM		5	6	6	6	5
	1	OR:NM		1	1	1	1	1
EGIPTO	7	O167:H5		7	7	7	7	-
	1	O167:NM		1	1	1	1	-
BANGLADESH	1	O115:H5		1	1	1	1	-
	1	O167:H49		1	1	1	1	-
	6	O167:H5		6	6	6	6	-
ARGENTINA	3	O167:H5		3	3	3	3	-
	2	O28ac:NM	2	2	2	2	2	
	2	OR:NM	2	2	2	2	1	
TAILANDIA	2	O152:NM	E	2	2	2	2	2
	1	O159:H21		1	1	1	1	-
	1	O185:NM		1	1	1	1	-
EGIPTO	1	O73:H?		1	1	1	1	-
	1	O125ac:H34	1	1	1	1	-	
MÉXICO	1	OR:NM	F	1	1	1	1	-
TAILANDIA	1	O8:H9	ND*	1	1	1	1	-
	1	O?:H?		1	1	1	1	-
EGIPTO	2	O159:NM		2	2	2	2	-
	1	OR:NM		1	1	1	1	-
MÉXICO	1	O?:NM		1	1	1	1	-
TOTAL	82			81	82	82	82	22

ND\*: No determinado

## 7.6 Genes en cepas de *E. coli* de referencia NCTC

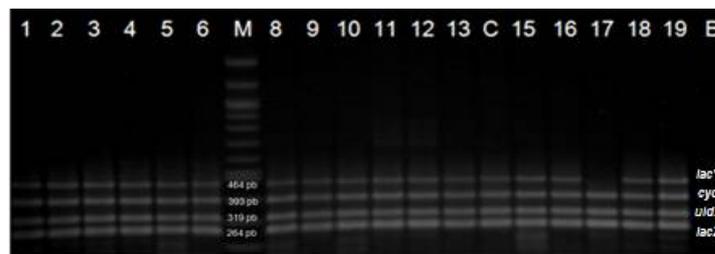
Por lo que respecta a 15 cepas EIEC controles, se encontró que: 6/15 (40 %) cepas pertenecen al grupo A, 6/15 (40 %) al grupo B1, 2/15 (11 %) al grupo E y 1/15 (9 %) fue no determinada (Cuadro 5). Por otra parte se puede observar que la diferencia genotípica más sobresaliente entre los géneros *Shigella* y *E. coli* fue la presencia de los genes *lacZ*, *uidA*, *cyd* y *lacY* (Figura 5) en diferentes combinaciones, para el caso de *E. coli* se puede observar que en las 15 cepas controles se encontró en la mayoría de las cepas (87 %) la presencia de los cuatro genes *lacZ*, *uidA*, *cyd* y *lacY*, es decir, que dichos genes tienen una prevalencia en las cepas de *E. coli* (Cuadro 5).

**Cuadro 5.** Genotipo y grupos filogenéticos en las cepas controles de *E. coli*.

Control	Grupo	Genotipo				
		<i>lacY</i>	<i>cyd</i>	<i>uidA</i>	<i>lacZ</i>	<i>ipaH</i>
		N				
O29:H10	A	1	1	1	1	-
O124:H30		-	1	1	1	1
O58:H27		1	1	1	1	-
O28ab:H-		1	1	1	1	-
O144:H-		-	1	1	1	1
O149K91:H10		1	1	1	1	-
O28ac:H-	B1	1	1	1	1	1
O168:H16		1	1	1	1	-
44037		1	1	1	1	-
EO167:H5		1	1	1	1	-
O121:H10		1	1	1	1	-
O112ab:H18		1	1	1	1	-
O112ac:H-	E	1	1	1	1	1
O143K:H-		1	1	1	1	1
64474:H32	*ND	1	1	1	1	-
TOTAL	15	13	15	15	15	5

### 7.7 Genes en cepas de *Shigella* de aislamientos clínicos

En las 29 cepas Mexicanas de *Shigella* fueron detectados los genes *uidA* y *cyd* (100 %); mientras que el gene *lacY* solo fue identificado en una cepa de *S. dysenteriae* (3 %); por lo que respecta al gen *lacZ* se determinó en 10/29 (34 %) cepas, observado que este gen se presentó en las cepas de *S. sonnei*, *S. dysenteriae* y *S. flexneri* (Figura 5) (Cuadro 2).



**Figura 5.** Electroforesis en geles de agarosa al 1.5 % de amplicones de los genes *lacY*, *cyd*, *uidA* y *lacZ* de *E. coli*. Los carriles 1-6, 8-13 y 15-19 corresponden a aislamientos de casos de diarrea infantil; carril C control positivo de *lacY*, *cyd*, *uidA* y *lacZ* (*E. coli* H10407) y carril M marcador de peso molecular (100 pb).

### 7.8 Genes en cepas de *Shigella* de referencia NCTC

El análisis de 14 cepas control de *Shigella*, confirmó la similitud de genotipos entre *E. coli* y *Shigella*, al obtener un 100 % de expresión de los genes *uidA* y *cyd*, con lo que se puede destacar la presencia de estos genes en todas las cepas. En contraste con *E. coli* en la mayoría de estas cepas no se detectó la presencia de los genes *lacY* y *lacZ*, estos genes se identificaron solo en las cepas de *S. dysenteriae* 12 y *S. boydii* 15 respectivamente (Figura 5) (Cuadro 6).

**Cuadro 6.** Genotipo en cepas controles de *Shigella* NCTC.

Serotipo	Genotipo				
	<i>lacY</i>	<i>lacZ</i>	<i>uidA</i>	<i>cyd</i>	<i>ipaH</i>
	N				
<i>S. boydii</i> 1	-	-	1	1	1
<i>S. boydii</i> 3	-	-	1	1	1
<i>S. boydii</i> 8	-	-	1	1	1
<i>S. boydii</i> 15	-	1	1	1	1
<i>S. boydii</i> 16	-	-	1	1	1
<i>S. boydii</i> 18	-	-	1	1	1
<i>S. dysenteriae</i> 2	-	-	1	1	1
<i>S. dysenteriae</i> 3	-	-	1	1	1
<i>S. dysenteriae</i> 4	-	-	1	1	1
<i>S. dysenteriae</i> 5	-	-	1	1	1
<i>S. dysenteriae</i> 6	-	-	1	1	1
<i>S. dysenteriae</i> 7	-	-	1	1	1
<i>S. dysenteriae</i> 11	-	-	1	1	1
<i>S. dysenteriae</i> 12	1	-	1	1	1
TOTAL	1 (7.1)	1 (7.1)	14 (100)	14 (100)	14 (100)

### 7.9 Análisis de los genes *ipaH* y *lacY* para diferenciar cepas de *E. coli* de *Shigella*

El análisis de este ensayo mostró que el gen *ipaH* (Figura 6) se encontró en 22 (27 %) cepas de las 82 cepas de *E. coli* analizadas procedentes de casos de diarrea; de las cuales: 19/22 (86 %) eran de Tailandia y 3 (14 %) de las cepas restantes correspondieron a Argentina. Cabe resaltar que estas 22 cepas fueron clasificadas por su tipificación serológica como no móviles, siendo el serogrupo de mayor prevalencia O28ac con 7/22 (32 %) cepas, mientras que las 15 (68 %) cepas restantes correspondieron a los serogrupos: O152, O136, O124 y OR (Cuadro 4). En el caso de las 15 cepas controles EIEC (NCTC) se observaron 5/15 (33 %) con la presencia del gen *ipaH* (Cuadro 5).

Con lo que respecta a 29 de *Shigella* de casos clínicos y 14 cepas controles de *Shigella* se encontró la presencia del gen *ipaH* en un 100 % (Cuadro 2 y 6).

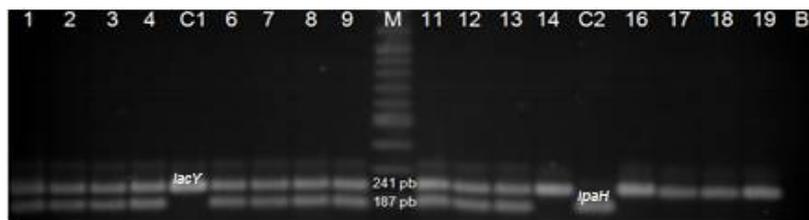
### 7.10 Comparación de identificación del gen *ipaH* utilizando dos iniciadores diferentes

Se realizó un análisis comparativo para la identificación del gen *ipaH* en las cepas que fueron positivas a este gen con la PCR, utilizando dos pares de iniciadores, el primer par consistió de iniciadores de *ipaH* diseñados en el Laboratorio y el segundo par de iniciadores publicados previamente por Navarro, 2010 [54]. El análisis estadístico  $\chi^2$  (Cuadro 7) no mostró, diferencia significativas ( $p > 0.12$ ) en los resultados obtenidos en las cepas de *E. coli* aisladas de casos de diarrea infantil; teniendo 24 (29 %) de 82 cepas con la presencia del gen *ipaH* con el segundo par de iniciadores mencionado.

**Cuadro 7.** Resultados de  $\chi^2$  para comparación de dos métodos de PCR para el gen *ipaH*.

Iniciador	Gen	N	N	$\chi^2$	p valor
Diseño en el Laboratorio	<i>ipaH</i> 187pb	22	82	0.12	0.73
Navarro, 2010 [54]	<i>ipaH</i> 446pb**	24	82		

***ipaH* 446pb\*\*:** PCR comparativo con diferentes iniciadores



**Figura 6.** Electroforesis en geles de agarosa al 1.8 % de los amplicones de los genes *ipaH* y *lacY* de *E. coli*. Carriles 1-4,6-9, 11-14 y 16-19 corresponden a aislamientos de casos de diarrea infantil; carriles C1, C2 corresponden al control positivo *lacY* (*E. coli* O42), control positivo *ipaH* (*S. dysenteriae* 3) y carril M, marcador de peso molecular (100 pb).

### **7. 11 Patrones de resistencia a los antimicrobianos en cepas de *E. coli***

El análisis de la sensibilidad a los antimicrobianos mostró que de las 82 cepas de *E. coli* solo 28 (34 %) de ellas presentaron resistencia a uno o más antimicrobianos, de estas cepas 10/28 (36 %) pertenecen a Tailandia y Egipto respectivamente, 4/28 (14 %) fueron de Bangladesh, 3/28 (11 %) de Argentina y 1 (3 %) a México. Señalando que 19 de 28 (68 %) cepas de *E. coli* mostraron resistencia a la Tetraciclina (TE), siendo este el de mayor porcentaje de resistencia, seguido Trimetoprim/Sulfametaxol (SXT) con 18/29 (64 %) cultivos (Cuadro 8).

Para el caso de las *Shigella* de origen clínico en 22 (76 %) cepas de 29 se encontró resistencia a uno o más antimicrobianos, de estas 16 (73 %) presentaron resistencia a la tetraciclina (TE), 14 (64 %) al Trimetoprim/Sulfametaxol (SXT) y una (5 %) a Cefepima (FEP) (Cuadro 8).

Por último de los 29 controles que incluyó 15 cepas de EIEC y 14 de *Shigella* solo 4 (14 %) presentaron resistencia a uno ó más de los antimicrobianos analizados de los cuales 3 de 4 (75 %) cepas eran *E. coli* de los serotipos: O58:H27, O168:H16 y O28ab:H- y solo una cepa (25 %) correspondió a *S. boydii* 3. Siendo *E. coli* O168:H16 la que presentó resistencia a un mayor número de antimicrobianos con 5, los cuales fueron: ATM, CRO, CAZ, FEP y CTX, de forma similar 2 de 4 (50 %) cepas presentaron resistencia a CAZ y ATM respectivamente, y únicamente una cepa (25 %) presentó resistencia a CRO, CTX, FEP, NA y TE (Cuadro 8).

**Cuadro 8.** Patrones de resistencia a los antimicrobianos en cepas de *E. coli* y *Shigella*.

Tipo de antimicrobiano	Antimicrobianos	<i>E. coli</i> (n= 28)	<i>Shigella</i> (n=22)	*Controles (n=4)
β-lactámico	ATM	3	0	2
	IPM	1	0	0
Cefalosporinas	FOX	1	0	0
	CRO	2	0	1
	CTX	1	0	1
Fluroquinolonas	NA	2	0	1
	OFX	1	0	0
	CIP	1	0	0
	FEP	0	1	1
	CAZ	0	0	2
Trimetroprim/Sulfametoxazol	SXT	18	14	0
Tetraciclina	TE	19	16	1

\*Cepas controles: *E. coli* O58:H27, *E. coli* O168:H16, *E. coli* O28ab:H- y *S. boydii* 3.

## 8. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Actualmente se calcula que la disentería causa aproximadamente 600 000 muertes al año en todo el mundo. Las dos terceras partes de los casos y la mayoría de las defunciones son registradas en menores de 10 años de edad [6]. En este estudio fueron caracterizadas fenotípicamente y genotípicamente cepas de *E. coli* y *Shigella* aisladas de niños menores de cinco años de diferentes zonas geográficas esto, con la finalidad de establecer en primer lugar si es que las cepas de *E. coli* pertenecen al patotipo EIEC y así mismo poder establecer el serotipo de las cepas de *Shigella*.

Es importante señalar que después de la identificación bioquímica de las muestras en alguno de los dos géneros en estudio, se logró observar que la diferencia fenotípica más representativa por la cual se consideran como géneros diferentes a estas dos *Enterobacteriaceae* fue la incapacidad de utilizar lactosa como fuente de carbono en el caso de las cepas de *Shigella* [27]; además se pudo observar que de las 82 cepas de *E. coli*: 28 (34 %) presentaron movilidad y que las 54 (66 %) cepas restantes fueron clasificadas como no móviles, la cual es una característica que comparten EIEC y *Shigella*, lo anterior debido a una supresión del operón flagelar *flhDC* [55].

Por consiguiente las 82 de cepas identificadas bioquímicamente como *E. coli*; 72 (88 %) pertenecieron al patotipo EIEC al analizar los resultados de la tipificación serológica; mientras que las 10 (12 %) cepas restantes se identificaron con un serotipo diferente. Por lo que se lograron identificar diez serotipos pertenecientes a

*E. coli* EIEC: O159:NM, O167:H5, O28ac:NM, O152:NM, O136:NM, O124:NM, O124:H24, O no tipificable (O?):H no móvil (NM), O167:H49 y O167:NM.

Simultáneamente se analizaron 29 cepas de casos clínicos identificadas fenotípicamente como *Shigella* en las que se determinaron 5 serotipos: O129, *Shigella flexneri* 2<sup>a</sup>, O135, *Shigella sonnei* 1 y O112ac; cabe mencionar que para el caso de los 15 controles de *E. coli* y 14 controles de *Shigella* con el ensayo de serología se confirmó el serotipo correspondiente.

La tipificación serológica ha tenido un papel importante en el diagnóstico clínico, ya que logra identificar serogrupos y serotipos característicos de grupos patógenos de las bacterias. Para el caso muy específico de los dos grupos de bacterias analizados en este estudio; se ha documentado la presencia de algunos antígenos de superficie como el antígeno somático (O) con similitud o estrechamente relacionados entre los diferentes serotipos EIEC y *Shigella* [25,26], dando así como resultado las reacciones antigénicas cruzadas entre estos dos grupos de *Enterobacteriaceae*. Dichas reacciones cruzadas de aglutinación dificultan la identificación entre ambas bacterias por este método y por consiguiente se puede obtener un resultado erróneo [25].

Para el caso de las cepas caracterizadas como EIEC se encontraron las siguientes reacciones cruzadas: *E. coli* O167 con *S. boydii* 3 en 18 (22 %) cepas la cual fue reportada por primera vez por Linnerborg, 1997 [56], *E. coli* O28ac con *E. coli* O42 en 8 (10 %) cepas reportada por Iguchi, 2015 [57] y finalmente 2 (2 %)

cepas presentaron una reacción entre *E. coli* O124 y *S. dysenteriae* 3 reportada por Cheasty y Rowe, 1983 [58].

En relación a las 29 cepas de *Shigella* se observaron relaciones antigénicas en 18 (63 %) de estas, 8 (28 %) tuvieron una reacción entre *E. coli* O129 y *S. flexneri* 2<sup>a</sup> reportada por Morona, 1995 [59], 6 (21 %) cepas con reacción entre *S. flexneri* 2<sup>a</sup> y *E. coli* O129 [59] y por último 4 (14 %) cepas con reacción entre *E. coli* O135 y *S. flexneri* 2<sup>a</sup> reportada por Morona, 1994 [60].

Debido a que las reacciones antigénicas cruzadas dificultan hacer una diferenciación entre estos dos géneros, por lo que el siguiente paso de este estudio fue utilizar un método molecular reportado por Horakova; el cual evalúa la presencia o ausencia de un genotipo cuádruplex que contiene los genes: *lacY*, *lacZ*, *cyd* y *uidA* ayudando a diferenciar con mayor exactitud entre los géneros *E. coli* y *Shigella*. Esto debido a estudios donde se demuestra que dentro del genoma de *E. coli* se encuentran estos cuatro genes, mientras que en el genoma de *Shigella* solo se encuentran *cyd*, *uidA* y en algunos casos *lacZ* [44].

De tal modo que para los 82 cepas de *E. coli* de casos clínicos se observó la presencia en un 100 % de los genes *lacZ*, *uidA*, *cyd*, mientras que para el gen *lacY* 81 (99 %) cepas; de esta manera se observa que una cepa no presentó el gen *lacY*, dicha cepa tiene como lugar de origen Tailandia y pertenece al serotipo O28ac:NM, dejando así de manifiesto que esta cepa de *E. coli* presenta un mayor parecido a *Shigella* ya que no es capaz de utilizar lactosa y es inmóvil. Resultados muy parecidos a los anteriores se encontraron en los 15 controles de *E. coli*

donde se logró apreciar que 13 (87 %) cepas presenta el genotipo cuádruplex (*lacZ*, *uidA*, *cyd* y *lacY*) y que dos cepas presentan incapacidad para utilizar lactosa al no presentar el gen *lacY* siendo los controles: *E.coli* O124:H30 y *E. coli* O144:NM.

Por el contrario, en el caso de las 29 cepas de *Shigella* se observó un genotipo diferente al encontrar una presencia del 100 % únicamente de los genes *uidA* y *cyd*, por lo que respecta al gen *lacZ* se determinó en 10 (34 %) cepas, mientras que el gene *lacY* solo fue identificado en una cepa de *S. dysenteriae* (3 %). Para el caso de los 14 controles de *Shigella* se observó un patrón muy similar esto al obtenerse un 100 % de expresión en los genes *uidA* y *cyd*, y para el caso de los genes *lacY* y *lacZ*, estos se identificaron solo en las cepas de *S. dysenteriae* 12 y *S. boydii* 15 respectivamente.

La diferenciación genotípica entre los géneros *Shigella* y *E. coli* se realizó con la identificación de los genes: *ipaH* y *lacY*, esto por medio de una PCR dúplex, lo más relevante de este ensayo fue la expresión del gen *ipaH*, ya que este es un gen que presenta múltiples copias, su función no es del todo conocida pero se sabe que favorece la entrada bacteriana a las células de huésped. Dicho gen se encuentra exclusivamente en EIEC y *Shigella*; es debido a estas características que es comúnmente utilizado para la identificación de estos grupos invasivos [61,62,63]. Este gen (*ipaH*) fue observado en la totalidad de las cepas analizadas de *Shigella*; en otras palabras, este gen fue identificado en las 29 cepas de *Shigella* de casos clínicos y en 15 cepas control del mismo género; lo que fue

bastante congruente ya que se conoce bien que este gen es característico de la patogenicidad de *Shigella*.

Por otra parte la presencia del gen *ipaH* en las cepas de *E. coli* indica que dichas cepas contienen este factor de virulencia asociado con la capacidad invasiva; por lo tanto este análisis nos permite diferenciar de manera más precisa las cepas de *E. coli*, EIEC y *Shigella*. Con base a lo anterior fue posible clasificar a las cepas en estudio en los siguientes tres grupos:

El primer grupo de *E. coli*, contiene en su genoma los genes característicos de una cepa de *E. coli* (*lacY*, *lacZ*, *cyd* y *uidA*), pero el gen *ipaH* estará ausente en este grupo. En otros términos se trata de un grupo de cepas de *E. coli* no invasivas; de este tipo de cepas encontramos 60 (73 %) de las 82 cepas de casos clínicos y 10 (67 %) cepas de las 15 cepas control.

En el segundo grupo clasificado como EIEC, presentaron los genes *lacY*, *lacZ*, *cyd* y *uidA*; se debe resaltar que las cepas de EIEC están principalmente relacionadas con *Shigella* la cual, tiene capacidad invasiva y en consecuencia expresa el gen *ipaH*. Entonces este grupo tuvo un perfil de *E. coli* además, de carácter invasivo lo que las clasifica como cepas de *E. coli* enteroinvasivas. A este grupo se le confieren 22 (27 %) cepas de las 82 cepas de *E. coli* de casos clínicos y 5 (33 %) cepas de los 15 controles de *E.coli*. Es así que podemos observar que las 22 cepas *ipaH* pertenecen a serotipos característicos del grupo patógeno EIEC: siendo el serotipo de mayor prevalencia O28ac:NM con 7 (32 %) cepas, mientras que las 15 (68 %) cepas restantes correspondieron a los serogrupos: O152:NM,

O136:NM, O124:NM y OR:NM. Es por ello que podemos observar que estas cepas también comparten características antigénicas y genotípicas con *Shigella*, apoyado por lo encontrado en la literatura y citado en el marco teórico [25, 44]. Hay que resaltar, el lugar de origen de dichas cepas: 19 (86 %) eran de Tailandia y las 3 (14 %) cepas restantes correspondieron a Argentina, lo que hace notar que como es reportado en las investigaciones la Shigelosis es una enfermedad que se presenta principalmente en la población de los países en vías de desarrollo.

Finalmente el tercer grupo clasificado como *Shigella*, presentó los genes *cyd* y *uidA* y solo en un mínimo porcentaje los genes *lacY* y *lacZ*; además de contener el gen *ipaH* característico de patogenicidad invasiva. En consecuencia se les clasifica en este grupo a la totalidad de las cepas de casos clínicos de *Shigella* y el total de las cepas control del mismo género.

Conjuntamente se realizó de manera complementaria una PCR del gen *ipaH* utilizando otros indicadores previamente reportados por Navarro, 2010 [54] lo más destacado de este estudio fue la confirmación del gen *ipaH* en la mayoría de las cepas *ipaH* positivo de las cepas de *E. coli* y *Shigella* en estudio; se realizó un análisis estadístico  $\chi^2$ , el cual no mostró diferencia significativa ( $p > 0.5$ ) entre los resultados obtenidos entre un método y el otro; por lo que la discrepancia obtenida en las cepas de *E. coli* de casos clínicos se puede deber a la secuencia de iniciadores utilizada entre un método y otro, ya que como sabemos el gen *ipaH* es un gen con múltiples copias en el cromosoma y en el plásmido *pINV* [15,41,42]. Después de realizar este análisis se procedió a agrupar a las cepas de *E. coli* en estudio y controles en su grupo filogenético correspondiente, lo que representa la

procedencia de las cepas, al igual que proporciona información acerca del tipo de cepa a la que pertenece que puede ser comensal o patógena.

Con el análisis realizado se logró determinar que el grupo más frecuente en las 82 cepas de *E. coli* de casos clínicos fue el grupo B1 con 38 (46 %) cepas, cabe destacar que 19 cepas de las 22 cepas clasificadas como EIEC pertenecen a este grupo. El grupo A fue el segundo con mayor frecuencia obteniendo 31 (38 %) cepas y 3 cepas de EIEC; se obtuvo un mismo número de cepas para estos grupos en el caso de los 15 controles obteniendo 6 (40 %) controles respectivamente para estos grupos mencionados; se observa que prevalecen principalmente los grupos filogenéticos A y B1 estos dos grupos son clasificados como componentes de la microbiota intestinal de los humanos y de animales. Dado a su procedencia de casos de niños menores de 5 años con diarrea, se confirma su patogenicidad. Este hecho podría explicarse por una probable transferencia horizontal de genes, entre estos: Los plásmidos que, son conocidos por cruzar las barreras entre las especies lo que les permite ser vehículos altamente eficaces para la transferencia horizontal de genes entre bacterias que coexisten en un entorno específico durante un determinado periodo de tiempo, como el intestino [64, 72]. Hay que indicar, que para el caso de los 5 controles que fueron clasificadas como pertenecientes a EIEC, los serotipos O112ac:H- y O143K:H- fueron clasificados como grupo E, que se le asocia con cepas diferentes al serotipo O157:H7 [72], pero que se clasifican como cepas patógenas.

Por último se realizaron ensayos de resistencia a antimicrobianos, observando que aunque la mayoría de las cepas de *E. coli* aislados de casos clínicos fueron

sensibles 54 (66 %) a los antimicrobianos, se presentó un número reducido de cepas resistentes a  $\beta$ -Lactámicos, Fluroquinolonas, Cefalosporinas, Tetraciclina y Trimetroprim/Sulfametoxazol; el antibiótico que presentó mayor resistencia fue la tetraciclina (TE) con 19 (8 %) cepas de las 28 cepas resistentes, seguido por el Trimetroprim/Sulfametoxazol (SXT) con 18 (64 %). Para el caso de las 29 cepas de *Shigella* de origen clínico, 22 (76 %) de las cepas presentaron al menos resistencia a uno de los antimicrobianos incluidos en el estudio, obteniendo la mayor frecuencia la tetraciclina (TE) con 16 cepas (73 %), seguida del Trimetroprim/Sulfametaxol (SXT) con 14 cepas (64 %). Por último solo 4 controles presentaron resistencia a uno o más antimicrobianos analizados de los cuales 3 eran *E. coli*: O58:H27, O168:H16 y O28ab:H- y la restante correspondió a *S. boydii* 3, siendo los más comunes con una frecuencia del 50 %, la a resistencia al Aztreonam (ATM) que pertenece a los  $\beta$ -Lactámicos y una Fluroquinolona conocida como Ceftazidima (CAZ).

Como se puede observar el antimicrobiano con mayor número de cepas resistentes para ambas enterobacterias fue tetraciclina (TE) este antibiótico actúa inhibiendo la síntesis de proteínas debido a que se une a la subunidad 30S del ribosoma por lo que impide la unión del aminoacil tRNA al complejo ribosoma 30S-mRNA. Esto tiene como consecuencia que no se puedan agregar más aminoácidos a la cadena de proteínas que está en crecimiento [67]. Es importante destacar que dicho antimicrobiano no es usado en el tratamiento de infecciones causadas por *E. coli* en humanos, además de que su administración en niños menores de dos años puede provocar efectos adversos en el sistema óseo [68].

Por lo tanto la frecuencia de resistencia a este antimicrobiano puede estar relacionada con el uso indiscriminado de los antibióticos en el tratamiento empírico de algunas infecciones; además de que este es utilizado para favorecer el crecimiento y engorda de los animales para consumo humano.

## 9. CONCLUSIONES

- I. Con el empleo de métodos fenotípicos y moleculares se logró definir la identidad de las 82 cepas de *E. coli*, logrando así conocer que el 88 % (72 cepas) de estas pertenece a alguno de los serotipos o serogrupos clasificados como EIEC y que de estas 22 (30 %) comparten características genotípicas con *Shigella*, lo que las caracterizó como EIEC.
- II. Se logró observar que las cepas de *E. coli* pertenecientes al patotipo EIEC, comparten características de virulencia con *Shigella*. Esto al encontrarse el gen *ipaH* expresado en ambas bacterias.
- III. Con la determinación de grupos filogenéticos se lograron clasificar las 82 cepas del estudio en alguno de dichos grupos característicos de *E. coli* corroborando así la presencia de uno o más genes característicos de *E. coli*: *arpA*, *chuA*, *yjaA* y *TspE4.C2*. Siendo el grupo filogenético B1 el más frecuentemente en las cepas de *E. coli*; En el caso de los 15 controles de *E. coli* se obtuvo el mismo porcentaje de cepas de los grupos A y B.; se debe recalcar que estos dos grupos son clasificados como cepas intestinales, por tanto, son componentes de la microbiota normal del intestino humano.
- IV. Además se logró observar la identificación de los genes *lacY* y *lacZ* expresados únicamente en el genoma de *E. coli* y por lo tanto no fueron

encontrados en *Shigella* de manera significativa; lo que permite su diferenciación; por otra parte se logró observar que los dos géneros de *Enterobacteriaceae* tienen en común los genes *cyd* y *uidA*.

- V. Se observó que aunque las 82 cepas de *E. coli* provenientes de aislados clínicos, la mayoría de las cepas 54 (66 %), presentaron sensibilidad a los 13 antimicrobianos en estudio y que 22 cepas de *Shigella* de casos clínicos fueron resistentes a uno o más de los antimicrobianos en estudio.

## 10. PERSPECTIVAS

- i. Establecer la capacidad invasiva que presentan las cepas clasificados como EIEC en cultivos celulares (HEp-2).
- ii. Proponer el sistema de PCR con los iniciadores empleados en este estudio para diferenciar cepas EIEC y *Shigella*.
- iii. Plantear un estudio prospectivo de tipo epidemiológico para determinar la prevalencia de EIEC y *Shigella* en alimentos y en población infantil Mexicana.

## 11. APÉNDICE

A<sub>1</sub>. Descripción del método de extracción de ADN por ebullición de Islam, 2006 [53].

El cultivo bacteriano se inoculó en 2 mL de caldo Luria-Bertain (LB, Invitrogen) e incubó a 37 °C durante 18- 24 horas; 1 mL de dicha suspensión se centrifugó en un microtubo a 13 000 rpm durante 5 minutos. Terminado el tiempo el sobrenadante se decantó. Posteriormente se le adicionaron 200 µL de agua ultra pura y con agitación vigorosa con vórtex el pellet se resuspendió; esta suspensión fue sometida a ebullición durante 10 minutos y después de la ebullición se pasó a una baño de hielo durante 5 minutos. Inmediatamente se volvió a agitar en vortex y se centrifugó a 13 000 rpm por 10 minutos, posteriormente se tomaron 100 µL del sobrenadante, los cuales se colocaron en un microtubo nuevo, dicha suspensión fue conservada en congelación hasta su uso.

Con la finalidad de comprobar la extracción del material genético se mezclaron 2.3 µL de azul de bromofenol con 8 µL del sobrenadante obtenido; esta mezcla fue colocada en uno de los pozos de un gel de agarosa al 1 %, el cual, se colocó en una cámara de electroforesis (BIO-RAD) con una solución amortiguadora de Tris borato de etilendiamino-tetra acético (TBE) al 0.5X y se le aplicó una corriente de 100V durante 60 minutos. Por último el gel se tiñó con el colorante Red Gel (Biotium, BioLabs New England) durante 30 minutos y se le tomó una fotografía con un documentador de imágenes (Biosens SC805 Gel Imagine Systems) con el cual se pudo visualizar el ADN con un transluminador de UV.

**A<sub>2</sub>.** Reactivos utilizados en la determinación de grupo filogenético e identificación de genes para diferenciar *E. coli* y *Shigella*.

PCR	Genes	Reactivos (Invitrogen)					Control positivo
		MgCl <sub>2</sub> (50mM)	Taq Polimerasa	dNTP's (μL)	Iniciadores	Buffer	
						PCR 10 X	
Dúplex	<i>ipaH</i> <i>lacY</i>	0.75	0.2	2.5	1.0	2.5	<i>E. coli</i> O42 <i>S. dysenteriae</i> 3
Comparativo	<i>ipaH</i>	1.5	0.3	5	1.0	2.5	FMU 91520
Cuádruplex*	<i>cyd, uidA,</i> <i>lacZ, lacY</i>	1.5	0.2	2.5	1.0	2.5	H10407
Grupos filogenéticos (Cuádruplex)	<i>arpA, chuA,</i> <i>yjaA, TspE4.C2</i>	0.75	0.25	2.5	1.0	2.5	<i>E. coli</i> K12 FMU 116979 (UPEC)
Grupo E	<i>arpA</i>	0.75	0.25	2.0	1.0	2.5	FMU 108287 ( <i>E. coli</i> O157:H7)
Grupo C	<i>TrpA</i>	0.75	0.25	2.0	1.0**	2.5	ECOR 70 ATCC

Las Reacciones se llevaron a cabo con 1.0 μL de DNA en un volumen de 25 μL

\*Reacción que se llevó a cabo con 2.5μL de DNA en un volumen de 25μL

\*\*Los iniciadores *trpBA* se agregan como control interno en la misma cantidad

**A<sub>3</sub>.** Condiciones de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para la determinación de grupos filogenéticos e identificación de genes para diferenciar *E. coli* y *Shigella*.

Fase	No. Ciclos	PCR			
		**Dúplex	Cuádruplex	<i>ipaH</i> comparativo	*Grupos filogenéticos
		T (°C) / t (min)			
Desnaturalización Inicial	1	94/1.5	94/1.5	94/5	94/4
Extensión	30	94/0.5	94/0.5	94/2	94/0.08
Alineamiento		60/0.42	58/0.42	58.6/1	58/0.33
Elongación		72/0.5	72/0.5	72/1	72/0.66
Extensión final		72/5	72/5	72/7	72/5
% Gel de Agarosa		1.8	1.5	1	1.8

\*\*Dúplex: el número de ciclos para este PCR fue de 35

\*Grupos filogenéticos: estas condiciones son las mismas para los grupos E o C

**A 4.** Iniciadores utilizados en la determinación de grupo filogenético e identificación de genes para diferenciar *E. coli* y *Shigella*.

Clave	Genes	Secuencia de nucleótidos 5' -3'	Tamaño amplicón (pb)	Referencia
EM_Sh ipaH_F EM_Sh_ipaH_R	<i>ipaH</i>	ATCTAATAACTTTGGATGTGTCCGA TTAAGATTAGAAGGCAGAGATGGAA	187	Diseño del Laboratorio
EM LacY_F EM LacY_R	<i>lacY</i>	CAA TAATCAGTTCGTTTTCTGGC AGCAAACCTGTTGGTCAAAAACAT	241	Diseño del Laboratorio
ipaH-F ipaH-R	<i>ipaH</i>	TCT CGG CAC GTT TTAATA GTC TGG TAA ATC TGC GGG CCG TGG TAG TC	446	Navarro [54]
lacY-F lacY-R	<i>lacY</i>	ACC AGA CCC AGC ACC AGA TAA G GCA CCT ACG ATG TTT TTG ACC A	464	
lacZ-F lacZ-R	<i>lacZ</i>	ATG AAA GCT GGC TAC AGG AAG GCC GGT TTA TGC AGC AAC GAG ACG TCA	264	Horakova [44]
uidA-F uidA-R	<i>uidA</i>	ATC GGC GAA ATT CCA TAC CTG GTT CTG CGA CGC TCA CAC C	319	
cyd-F cyd-R	<i>cyd</i>	CCG TAT CAT GGT GGC GTG TGG GCC GGC TGA GTA GTC GTG GAA G	393	
yjaA-F yjaA-R	<i>yjaA</i>	CAAACGTGAAGTGTCAGGAG AATGCGTTCCTCAACCTGTG	211	
TspE4-F TspE4-R	<i>TspE4.C2</i>	CACTATTCGTAAGGTCATCC AGTTTATCGCTGCGGGTTCGC	152	
arpA-F arpA-R	<i>arpA</i>	AACGCTATTCGCCAGCTTGC TCTCCCCATAACCGTACGCTA	400	Clemont [51]
chuA-F chuA-R	<i>chuA</i>	ATGGTACCGGACGAACCAAC TGCCGCCAGTACCAAAGACA	288	
arpAgpE-F arpAgpE-R	<i>arpA</i> (Grupo E)	GATTCCATCTTGTCAAAATATGCC GAAAAGAAAAAGAATTCCCAAGAG	301	
trpAgpC-F trpAgpC-R	<i>trpA</i> (Grupo C)	AGTTTTATGCCAGTGCGAG TCTGCGCCGGTCACGCC	219	

**A 5.** Electroforesis y visualización de los amplicones en un transluminador de UV.

Con la finalidad de revelar los productos de amplificación de la PCR (amplicones) se mezcló 2.3 µL de azul de bromofenol con 8 µL del coctel de la reacción; esta mezcla fue colocada en uno de los pozos de un gel de agarosa del porcentaje correspondiente (Apéndice A<sub>3</sub>), el cual, se colocó en una cámara de electroforesis (BIO-RAD) con una solución amortiguadora TBE al 0.5X y se le aplicó una corriente de 100 V por 60 minutos. Por último el gel se tiñó con colorante Red Gel (Biotium, BioLabs New England) durante 30 minutos y se le tomó una fotografía con un documentador de imágenes (Biosens SC805 Gel Imagine Systems), considerando el amplicón como positivo si presentó el mismo peso de pares de bases que los controles utilizados (Figuras 1-3).

**A6.** Interpretación del diámetro de inhibición de diferentes antimicrobianos, fragmento extraído del manual M100 S22 (M2) "Disk Diffusion Supplemental Tables"

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

**A7.** Sistema VITEK® 2 para identificación bioquímica de cepas de *Shigella* de origen clínico.

Las cepas de *Shigella* fueron inoculadas en agar Mac Conkey e incubadas a 37°C durante 18-24h. Posteriormente se procedió a seleccionar colonias aisladas que presentaran características de *Shigella*, las cuales fueron resembradas en cajas Petri con TSA divididas en 8 secciones e incubadas a 37 °C durante 24 h y a partir del crecimiento bacteriano se preparó una suspensión en tubos con 3 mL de solución salina estéril al 0.45 % (Air Life <sup>TM</sup>), la cual se ajustó al tubo 1.0 del nefelómetro de McFarland ( $3.0 \times 10^8$  bacterias/mL). Posteriormente se procedió a colocar cada tubo con la suspensión bacteriana dentro de una gradilla especial (cassette) junto con la tarjeta de identificación (GN Test Kit VTK2). Por último el cassette con las muestras se colocó en el panel de lectura de VITEK® 2 (Compact, (bioMérieux) durante 4-18 h posteriormente se registraron en un archivo del sistema.

A<sub>8</sub>. Perfil bioquímico de cepas de *E. coli* obtenidas de diferentes zonas geográficas.

Serotipo	Origen	N	Lactosa	Glucosa	Indol	*R.M.	*V.P.	Urea	Malonato	Fenilalanina	Movilidad	H <sub>2</sub> S	Citrato	Sorbitol	C. Lactosa	C. Glucosa	C. Maltosa	C. Rafinosa	C. Xilosa	Gluconato
O136:NM	TAILANDIA	4	4	4	4	4	-	-	-	-	-	-	-	4	4	4	4	-	4	-
O152:NM		6	6	6	6	5	-	-	-	-	-	-	-	6	6	6	5	-	6	-
O159:NM		7	7	7	-	7	-	-	-	-	-	-	-	7	7	7	4	7	7	-
O28ac:NM		6	5	5	6	6	-	-	-	-	-	-	-	6	5	5	6	-	6	-
OR:NM		4	2	4	4	4	-	-	-	-	-	-	-	4	2	4	4	-	4	-
O?:NM		1	1	1	-	1	-	-	-	-	-	-	-	1	1	1	-	1	1	-
O124:H24		1	1	1	1	1	-	-	-	-	-	-	-	1	1	1	-	-	1	-
O124:NM		1	-	1	1	1	-	-	-	-	-	-	-	1	-	1	1	-	1	-
*SD		4	4	4	4	4	-	-	-	-	3	-	-	2	4	4	2	3	4	-
O159:NM	EGIPTO	15	15	15	2	15	-	-	-	-	1	-	-	15	15	15	11	12	15	-
O167:H5		7	7	7	7	7	-	-	-	-	7	-	-	6	7	7	7	7	7	-
O?:NM		1	1	1	-	1	-	-	-	-	-	-	-	1	1	1	1	1	1	-
O167:NM		1	1	1	1	1	-	-	-	-	1	-	-	1	1	1	1	1	1	-
OR:NM		1	1	1	1	1	-	-	-	-	-	-	-	1	1	1	1	-	1	-
*SD		5	3	4	5	4	-	-	-	-	4	-	-	4	3	4	4	-	5	-
O?:NM	MÉXICO	2	2	2	2	1	-	-	-	-	-	-	-	2	2	2	1	2	2	-
O167:H5	ARGENTINA	3	3	3	3	3	-	-	-	-	3	-	-	3	3	3	3	3	2	-
O28ac:NM		2	1	2	2	2	-	-	-	-	-	-	-	2	1	2	2	-	2	-
O?:NM		3	2	3	3	3	-	-	-	-	1	-	-	3	2	3	3	1	3	-
O167:H5	BANGLADESH	6	6	6	6	6	-	-	-	-	6	-	-	6	6	6	6	6	6	-
O167:H49		1	1	1	1	1	-	-	-	-	1	-	-	1	1	1	1	1	1	-
*SD		1	1	1	1	1	-	-	-	-	1	-	-	1	1	1	1	1	1	-
TOTAL		82	74	80	60	79	0	0	0	0	28	0	0	78	74	80	68	46	81	0

\*R.M.: Rojo de metilo, \*V.P.: Vogues-Proskauer

**A9. Perfil bioquímico por sistema VITEK® de cepas de *Shigella* obtenidas de México.**

Identificación Bioquímica	N	DP3	OFG	GC	ACE	ESC	PLI	URE	CIT	MAL	TDA	PXB	LAC	MLT	MAN	XYL
<i>S. flexneri</i>	19	1	19	19	-	1	-	-	-	-	-	-	-	6	16	1
<i>S. sonnei</i>	9	-	9	9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	8	-
<i>S. dysenteriae</i>	1	-	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TOTAL	29	1	29	29	0	1	0	0	0	0	0	0	0	9	29	1

Identificación Bioquímica	N	RAF	SOR	SUC	INO	ADO	COU	H2S	ONP	RHA	ARA	GLU	ARG	LYS	ORN	OXY
<i>S. flexneri</i>	19	9	2	-	-	-	9	-	1	3	10	16	3	-	-	-
<i>S. sonnei</i>	9	-	-	-	-	-	-	-	7	-	7	8	-	-	3	-
<i>S. dysenteriae</i>	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-
TOTAL	29	9	2	0	0	0	9	0	8	3	17	25	3	0	3	0

**A<sub>10</sub>.** Perfil bioquímico de cepas control de *E. coli*.

Control	Lactosa	Glucosa	Indol	*R.M.	*V.P.	Urea	Malonato	Fenilalanina	Movilidad	H <sub>2</sub> S	Citrato	Sorbitol	C. Lactosa	C. Glucosa	C. Maltosa	C. Rafinosa	C. Xilosa	Gluconato
O29:H10	1	1	1	1	-	-	-	-	1	-	-	1	1	1	1	1	1	-
O112ab:H18	-	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	1	-	-	1	-
O124:H30	-	1	1	1	-	-	-	-	-	-	-	1	-	1	-	-	1	-
O112ac:H-	1	1	1	1	-	-	-	-	-	-	-	1	1	1	1	1	-	-
O58:H27	1	1	1	1	-	-	-	-	1	-	-	-	1	1	1	-	1	-
O28ac:H-	-	1	1	1	-	-	-	-	-	-	-	1	-	1	1	-	1	-
O168:H16	1	1	1	1	-	-	-	-	1	-	1	1	1	1	1	1	1	-
O28ab:H-	1	1	1	1	-	-	-	-	1	-	-	1	1	1	1	-	1	-
44037	1	1	1	1	-	-	-	-	-	-	-	1	1	1	1	-	1	-
64474:H32	1	1	1	1	-	-	-	-	1	-	-	1	1	1	1	-	1	-
O144:H-	-	1	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	1	1	-
O149K91:H10	1	1	1	1	-	-	-	-	1	-	-	1	1	1	1	-	1	-
O143K:H-	1	1	1	1	-	-	-	-	-	-	-	1	1	1	1	1	1	-
EO167:H5	1	1	1	1	-	-	-	-	1	-	-	1	1	1	1	1	1	-
O121:H10	1	1	1	1	-	-	-	-	-	-	-	1	1	1	1	-	1	-
TOTAL	11	15	15	14	0	0	0	0	7	0	1	13	11	15	13	6	14	0

\*R.M.: Rojo de metilo, \*V.P.: Vogues-Proskauer

A<sub>11</sub>. Perfil bioquímico de cepas control de *Shigella*.

Control	Lactosa	Glucosa	Indol	*R.M.	*V.P.	Urea	Malonato	Fenilalanina	Movilidad	H <sub>2</sub> S	Citrato	Sorbitol	C. Lactosa	C. Glucosa	C. Maltosa	C. Rafinosa	C. Xilosa	Gluconato
<i>S. boydii</i> 1	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	1	-	-	-	-
<i>S. boydii</i> 3	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	1	-	-	-	-
<i>S. boydii</i> 8	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	1	-	-	-	-
<i>S. boydii</i> 15	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	1	-	-	-	-
<i>S. boydii</i> 16	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	1	-	-	-	-
<i>S. boydii</i> 18	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	1	-	-	-	-
<i>S. dys</i> 2	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-
<i>S. dys</i> 3	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-
<i>S. dys</i> 4	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	1	-	-	-	-
<i>S. dys</i> 5	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-
<i>S. dys</i> 6	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-
<i>S. dys</i> 7	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-
<i>S. dys</i> 11	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-
<i>S. dys</i> 12	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-
TOTAL	0	14	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7	0	14	0	0	0	0

\**S. dys*: *Shigella dysenteriae*, \*R.M.: Rojo de metilo, \*V.P.: Vogues-Proskauer

## 12. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Bryce, J., Boschi, C., Shibuya, K., and Black, R. (2005) WHO estimates of the causes of death in children. *Lancet*. **365**,1147-1152.
2. Organización Mundial de la Salud (OMS). Organización Mundial de la Salud: OMS. [Online]. [cited 2015 Noviembre 11. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs330/es/>
3. Kosek, M., Bern, C., Richard, L., and Guerrant, R.L. (2000) The global burden of diarrhoeal disease, as estimated from studies published between 1992 and 2000. *Bull. World. Health. Organ.* **8**, 197-204.
4. Walker, C.L.F., Perin, J., Aryee, M.J., Boschi-Pinto, C., and Black, R.E. (2012) Diarrhea incidence in low-and middle-income countries in 1990 and 2010: a systematic review. *BMC. Public. Health.* **12**, 220.
5. Kotloff, K.L, Blackwelder, W.C., Nasrin, D., Nataro, J.P., Farag, T.H., Van Eijk A. (2012) The global enteric multicenter study (GEMS) of diarrheal disease in infants and young children in developing countries; Epidemiologic and clinical methods of the case/control study. *Clin. Infect. Dis.* **55**, 232 – 245.
6. Dirección General de Epidemiología (DGE). [Online].; 2012 [cited 2015 Noviembre 07. Disponible en: [http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/doctos/infoepid/vig\\_epid\\_manuales/18\\_2012\\_Manual\\_NuTraVe\\_vFinal\\_6nov12.pdf](http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/doctos/infoepid/vig_epid_manuales/18_2012_Manual_NuTraVe_vFinal_6nov12.pdf)
7. Hernández, C.C., Aguilera, A.C., Castro, E.G. (2011) Situación de las enfermedades gastrointestinales en México. *Enf. Inf. Microbiol.* **31**, 137-151.
8. Baylis, C.L. (2006) *Enterobacteriaceae*. En Blackbourn CdW. Ed. Food Spoilage Microorganisms. Boca Raton: Woodead. Publishing Ltd y CRC Press. **22**, 624- 667.
9. Brooks, G.F. (2010) Bacilos gramnegativos entéricos (*Enterobacteriaceae*). En J. de León Fraga. Ed. Microbiología médica de Jawetz, Melnick y Adelberg. Mc Graw Hill. **15**, 213 – 226..
10. Percival, L.S., Williams, D.D. (2014) *Escherichia coli*. En Percival LS. Ed. Microbiology of Waterborne Diseases. Academic Press. 89-117.
11. Velarde, J., Levine, M.M., Nataro, J.P. (2013) *Escherichia coli* Diarrhea. En Magill, A.J, Ryan, E.T. Ed. Hunter's Tropical Medicine and Emerging Infectious Disease. Saunders Elsevier. 442- 447.
12. Torres, A.G., Arenas- Hernández, M.M.P., Martínez- Laguna, Y. (2010) Overview of *Escherichia coli*. En Torres, A.G. Ed. Pathogenic Escherichia coli in Latin America. Science Publishers. 1-7.
13. Estrada – García, T., Hodges, K., Hecht, G.A., Tarr, P.I. (2013) *Escherichia coli*. En Morris JG, Potter ME. Ed. Foodborne Infections and Intoxications. Elsevier.129- 164.
14. Nataro, J.P. and Kaper, J.B. (1998) Diarrheagenic *Escherichia coli*. *J. Clin. Microbiol. Rev.* **11**, 142–201.
15. Hale, T.L. (1991) Genetic basis of virulence in *Shigella* species. *Microbiological Rev.* **55**, 206–224.

16. Pupo, G.M., Lan, R., Reeves, P.R. (2000) Multiple independent origins of *Shigella* clones of *Escherichia coli* and convergent evolution of many of their characteristics. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **97**, 10567–10572.
17. Lan, R., Alles, M.C., Donohoe, K., Martinez, M.B., Reeves, P.R. (2004) Molecular evolutionary relationships of enteroinvasive *Escherichia coli* and *Shigella* spp. *Infect. Immun.* **72**, 5080–5088.
18. Bhunia, A.K. (2008) *Shigella* species. En Springer. Ed. Foodborne Microbial Pathogens: Mechanisms and Pathogenesis. Springer, USA. 253- 265.
19. Maurelli, T.A. (2013) *Shigella* and enteroinvasive *Escherichia coli*: Paradigms for pathogen evolution and host-parasite interactions. En Donnenberg S.M. Ed. *Escherichia coli* Pathotypes and principles of pathogenesis. Baltimore. Elsevier. **7**, 215- 244.
20. Scheutz, F., Strockbine, N.A., Genus, I. (2005) *Escherichia*. En: Bergey's. Ed. Manual of Systematic Bacteriology. Springer, USA. 207–624.
21. Bopp, C.A., Brenner, F.W., Fields, P.I., Wells, J.G., Strockbine, N.A. (2003) *Escherichia*, *Shigella*, and *Salmonella*. En: Manual of Clinical Microbiology 8th edn. ASM Press, Washington D.C. 655–663.
22. Ewing, W.H. (1986) The genus *Escherichia* and the genus *Shigella*. En: Edwards and Ewing's Identification of Enterobacteriaceae, 4<sup>th</sup> edn. Elsevier Science Publishing Co., Inc., New York. 93–172.
23. Silva, R.M., Toledo, M.R., Trabulsi, L.R. (1980) Biochemical and cultural characteristics of invasive *Escherichia coli*. *J. Clin. Microbiol.* **11**, 441–444.
24. Toledo, M.R., Trabulsi, L.R. (1983) Correlation between biochemical and serological characteristics of *Escherichia coli* and results of the Sereny test. *J. Clin. Microbiol.* **17**, 419–421.
25. Liu, B., Knirel, Y.A., Feng, L., Perepelov, A.V., Senchenkova, S.N., Wang, Q., Reeves, P.R. and Wang, L. (2008) Structure and genetics of *Shigella* O antigens. *FEMS. Microbiol. Rev.* **32**, 627–653.
26. Li, Y., Cao, B., Liu, B., Liu, D., Gao, Q., Peng, X., Wu, J., Bastin, D.A., Feng, L. and Wang, L. (2009) Molecular detection of all 34 distinct O antigen forms of *Shigella*. *J. Med. Microbiol.* **58**, 69–81.
27. Van den Beld, M.J.C., Reubsaet, F.A.G. (2012) Differentiation between *Shigella*, enteroinvasive *Escherichia coli* (EIEC) and noninvasive *Escherichia coli*. *Eur. J. Clin. Microbiol Infect Dis.* **31**, 889-904.
28. Hale, T.L., Sansonetti, P.J., Schad, P.A., Austin, S., Formal, S.B. (1983) Characterization of virulence plasmids and plasmid-associated outer membrane proteins in *Shigella flexneri*, *Shigella sonnei*, and *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* **40**, 340–350.
29. Kopecko, D.J., Baron, L.S., Buysse, J. (1985) Genetic determinants of virulence in *Shigella* and dysenteric strains of *Escherichia coli*: their involvement in the pathogenesis of dysentery. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **118**, 71–95.
30. Binet, R., Lampel, K. (2013) *Shigella* Species. En Doyle, M.P., Buchanan, R.L. Ed. Food Microbiology. ASM Press. 377-399.
31. Ray, B., and Bhunia. A.K. (2010) *Fundamentos de microbiología de los alimentos*. McGraw-Hill Interamericana.

32. Gorden, J., Small, P.L.C. (1993) Acid resistance in enteric bacteria. *Infect. Immun.* **61**, 364- 367.
33. Galan, J.E., Wolf- Watz, H. (2006) Protein delivery into eukaryotic cells by type III secretion machines. *Nature.* **444**, 567-573.
34. Sansonetti, P.J., Kopecko, D.J., Formal, S.B. (1982) Involvement of a plasmid in the invasive ability of *Shigella flexneri*. *Infect. Immun.* **35**, 852–860.
35. Venkatesan, M.M., Goldberg, M.B., Rose, D.J., Grotbeck, E.J., Burland, V., Blattner, F.R. (2001) Complete DNA sequence and analysis of the large virulence plasmid of *Shigella flexneri*. *Infect. Immun.* **69**, 3271–3285.
36. Sansonetti, P.J., Kopecko, D.J., Formal, S.B. (1981) *Shigella sonnei* plasmids: evidence that a large plasmid is necessary for virulence. *Infect. Immun.* **34**, 75–83.
37. Buysse, J.M., Stover, C.K., Oaks, E.V., Venkatesan, M., Kopecko, D.J. (1987) Molecular cloning of invasion plasmid antigen (*ipa*) genes from *Shigella flexneri*: analysis of *ipa* gene products and genetic mapping. *J. Bacteriol.* **169**, . 2561–2569.
38. Venkatesan, M., Buysse, J.M., Vandendries, E., Kopecko, D.J. (1998) Development and testing of invasion-associated DNA probes for detection of *Shigella* spp. and enteroinvasive *Escherichia coli*. *J. Clin. Microbiol.* **26**, 261–266.
39. Uchiya, K., Tobe, T., Komatsu, K., Suzuki, T., Watarai, M., Fukuda, I., Yoshikawa, M., Sasakawa, C. (1995) Identification of a novel virulence gene, *virA*, on the large plasmid of *Shigella*, involved in invasion and intercellular spreading. *Mol. Microbiol.* **17**, 241–250.
40. Maurelli, A.T. (2007) Black holes, antivirulence genes, and gene inactivation in the evolution of bacterial pathogens. *FEMS. Microbiol. Lett.* **267**, 1–8.
41. Hartman, A.B., Venkatesan, M., Oaks, E.V., Buysse, J.M. (1990) Sequence and molecular characterization of a multicopy invasion plasmid antigen gene, *ipaH*, of *Shigella flexneri*. *J. Bacteriol.* **172**, 1905–1915.
42. Fernandez-Prada, C.M., Hoover, D.L., Tall, B.D., Hartman, A.B., Kopelowitz, J., Venkatesan, M.M. (2000) *Shigella flexneri ipaH* (7.8) facilitates escape of virulent bacteria from the endocytic vacuoles of mouse and human macrophages. *Infect. Immun.* **68**, 3608–3619.
43. Venkatesan, M.M., Buysse, J.M., Hartman, A.B. (1991) Sequence variation in two *ipaH* genes of *Shigella flexneri* 5 and homology to the LRG-like family of proteins. *Mol. Microbiol.* **5**, 2435–2445.
44. Horakova, K., Mlejnkova, H., Mlejnek, P. (2008) Specific detection of *Escherichia coli* isolated from water samples using polymerase chain reaction targeting four genes: cytochrome bd complex, lactose permease, b-D-glucuronidase, and b-D-galactosidase. *J. Appl. Microbiol.* **105**, 970– 976.
45. Raetz, C.R.H. and Whitfield, C. (2002) Lipopolysaccharide endotoxins. *Annu. Rev. Biochem.* **71**, 635–700.
46. Scheutz, F., Cheasty, T., Woodward, D. and Smith, H.R. (2004) Designation of O174 and O175 to temporary O groups OX3 and OX7, and six new *E. coli* O groups that include verocytotoxinproducing *E. coli* (VTEC): O176, O177, O178, O179, O180 and O181. *Apmis.* **112**, 569–584.

47. Orskov, F. and Orskov, I. (1984) Serotyping of *Escherichia coli*. In T. Bergan Ed. Methods in Microbiology. Academic Press Ltd, London. **14**, 43-112.
48. Clermont, O., Bonacorsi, S. and Bingen, E. (2000) Rapid and simple determination of *Escherichia coli* phylogenetic group. Appl. Environ. Microbiol. **66**, 4555–4558.
49. Clermont, O., Bonacorsi, S. and Bingen, E. (2004) Characterization of an anonymous molecular marker strongly linked to *Escherichia coli* strains causing neonatal meningitis. J. Clin. Microbiol. **42**, 1770–1772.
50. Clermont, O., Gordon, D.M., Brisse, S., Walk, S.T., Denamur, E. (2011b) Characterization of the cryptic *Escherichia* lineages: rapid identification and prevalence. Environ. Microbiol. **13**, 2468–2477.
51. Clermont, O., Christeson, J., Denamur, E., Gordon, D.M. (2013) The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylo-groups. Environ Microbiol Rep. **5**, 58-65.
52. Barrow, G.I. and Feltham, R.K.A. (1993) Cowan and Steel's Manual for the Identification of Medical Bacteria, 3rd edn. Cambridge. Cambridge University Press.
53. Islam, M.A., Heuvelink, A.E., Talukder, K.A., Zwietering, M.H. and De Boer, E. (2006) Evaluation of immunomagnetic separation and PCR for the detection of *Escherichia coli* O157 in animal feces and meats. J. Food Protec. **69**, 2865-2869.
54. Navarro, A., Eslava, C., Perea, L., Inzunza Delgado, G., Morales, R., Chesty, T., Cravioto, A. (2010) New enterovirulent *Escherichia coli* serogroup 64474 showing antigenic and genotypic relationships to *Shigella boydii* 16. J. Med. Microbiol. **59**, 453-461.
55. Tominaga, A., Lan, R. and Reeves, P.R. (2005) Evolutionary changes of the *flhDC* flagellar master operon in *Shigella* strains. J. Bacteriol. **187**, 4295–4302.
56. Linnerborg, M., Wollin, R. and Widmalm, G. (1997) Structural studies of the O-antigenic polysaccharide from *Escherichia coli* O167. Eur. J. Biochem. **246**, 565–573.
57. Iguchi, A., Iyoda, S., Kikuchi, T., Ogura, Y., Katsura, K., Ohnishi, M. and Thomson, N.R. (2015) A complete view of the genetic diversity of the *Escherichia coli* O-antigen biosynthesis gene cluster. DNA research. **22**, 101-107.
58. Cheasty, T. and Rowe, B. (1983) Antigenic relationships between the enteroinvasive *Escherichia coli* O antigens O28ac, O112ac, O124, O136, O143, O144, O152, and O164 and *Shigella* O antigens. J. Clin. Microbiol. **17**, 81–84.
59. Morona, R., Van den Bosch, LUISA, and Manning, P.A. (1995) Molecular, genetic, and topological characterization of O-antigen chain length regulation in *Shigella flexneri*. J. Bacteriol. **177**, 1059-1068.
60. Morona, R., Mavris, M., Fallarino, A. and Manning, P.A. (1994) Characterization of the *rfb* region of *Shigella flexneri*. J. Bacteriol. **176**, 733-747.

61. Me´nard, R., Pre´vost, M.C., Gounon, P., Sansonetti, P. and Dehio, C. (1996) The secreted *Ipa* complex of *Shigella flexneri* promotes entry into mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **93**, 1254–1258.
62. Sethabutr, O., Venkatesan, M., Murphy, G.S., Eampokalap, B., Hoge, C.W. and Echeverria, P. (1993) Detection of *Shigella* and enteroinvasive *Escherichia coli* by amplification of the invasion plasmid antigen H DNA sequence in patients with *dysentery*. *J. Infect. Dis. Rev.* **167**, 458–461.
63. Ye, L.Y., Lan, F.H., Zhu, Z.Y., Chen, X.M. and Ye, X.L. (1993) Detection of *Shigella* and enteroinvasive *Escherichia coli* using polymerase chain reaction. *J. Diarrhoeal Dis. Res.* **11**, 38–40.
64. Escobar-Páramo, P., Giudicelli, C., Parsot, C. and Denamur, E. (2003) The evolutionary history of *Shigella* and enteroinvasive *Escherichia coli* revised. *J. Mol. Evol.* **57**, 140–148.
65. Schubert, S., Darlu, P., Clermont, O., Wieser, A., Magistro, G., Hoffmann, C., Weinert, K., Tenailon, O., Matic, I. and Denamur, E. (2009) Role of intraspecies recombination in the spread of pathogenicity islands within the *Escherichia coli* species. *PLoS. Pathogens.* **5**, e1000257.
66. Tenailon, O., Skurnik, D., Picard, B. and Denamur, E. (2010) The population genetics of commensal *Escherichia coli*. *Nature.* **8**, 207–217.
67. T Madigan, M. (2009) *Biología de los microorganismos* BROCK. Ed.12.
68. Sánchez, A.R., Rogers, R.S.I., Sheridan, P.J. (2004) Tetracycline and other tetracycline-derivative staining of the teeth and cavity. *Int. J. Dermatol.* **43**, 709-715.