



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

***Escherichia coli* QUE COMPARTE ANTÍGENOS CON *Shigella* Y SU
RELACIÓN CON FACTORES DE VIRULENCIA DETERMINADO POR
MÉTODOS MOLECULARES**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICA DE ALIMENTOS

PRESENTA:

LILIANA NAYELLI CORTES HERNÁNDEZ

CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX

2016



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: Rodolfo Pastelín Palacios

VOCAL: Profesora: Gloria Díaz Ruíz

SECRETARIO: Profesor: Armando Navarro Ocaña

1er. SUPLENTE: Profesora: Martha Giles Gómez

2° SUPLENTE: Profesora: Norma Angélica Camacho De la Rosa

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

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

FACULTAD DE MEDICINA.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO.

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

SUSTENTANTE: LILIANA NAYELLI CORTES HERNÁNDEZ



ÍNDICE

I. RESUMEN	1
II. INTRODUCCIÓN	3
1. El problema de las enfermedades diarreicas a nivel mundial.	3
2. La situación de la diarrea en México.	4
3. Agentes etiológicos.	5
4. Generalidades de las enterobacterias.	6
5. <i>E. coli</i> diarreogénica.	7
6. El género <i>Shigella</i> .	9
7. <i>E. coli</i> y su relación con <i>Shigella</i> .	12
8. Relación antigénica entre <i>E. coli</i> y <i>Shigella</i> .	14
9. Grupos filogenéticos.	15
10. Diferenciación de <i>Shigella</i> y <i>E. coli</i> .	17
11. Mecanismos de acción de los antimicrobianos.	18
III. JUSTIFICACIÓN.	22
IV HIPÓTESIS.	22
V. OBJETIVOS.	22
1. General.	22
2. Particulares.	22
VI. METODOLOGÍA.	24
1. Cepas bacterianas.	24
a. Origen de las cepas.	24
b. Aislamiento y viabilidad.	24
2. Confirmación bioquímica.	24
3. Caracterización antigénica de los cultivos de <i>E. coli</i> .	25
a. Antígeno somático (O).	25
b. Antígeno flagelar (H).	25
c. Tipificación serológica.	25
4. Obtención del ADN.	26
5. Genes de virulencia y grupos filogenéticos.	26
a. Determinación de grupos filogenéticos de <i>E. coli</i> .	26
b. Reacción de la polimerasa (PCR) para identificar genes y diferenciar cepas de <i>E. coli</i> y <i>Shigella</i> (<i>lacZ</i> , <i>uidA</i> , <i>cyd</i> y <i>lacY</i>).	26
6. Antimicrobianos.	28

VII. RESULTADOS.	30
1. Origen de las cepas.	30
2. Identificación bioquímica.	30
3. Tipificación serológica.	31
4. Grupos filogenéticos.	36
5. Genes del operón de lactosa y citocromo oxidasa y glucoronidasa e invasivo.	42
6. Resistencia a antimicrobianos.	49
VIII. DISCUSIÓN.	52
IX. CONCLUSIONES.	56
X. PERSPECTIVAS.	57
XI. BIBLIOGRAFÍA.	58

ÍNDICE DE FIGURAS.

Figura 1	Modelo de la patogénesis inducida por <i>Shigella spp.</i>	12
Figura 2	Mecanismo patogénico de <i>Escherichia coli</i> enteroinvasiva.	18
Figura 3	Iniciadores para clasificar grupos filogenéticos.	41
Figura 4	Genes <i>lacZ</i> , <i>uidA</i> , <i>cyd</i> y <i>lacY</i> .	47
Figura 5	Gen para la actividad invasiva (<i>ipaH</i>).	48

ÍNDICE DE CUADROS.

Cuadro 1	28
Cuadro 2	31
Cuadro 3	32
Cuadro 4	33
Cuadro 5	34
Cuadro 6	35
Cuadro 7	37
Cuadro 8	38
Cuadro 9	39
Cuadro 10	40
Cuadro 11	43
Cuadro 12	44
Cuadro 13	45
Cuadro 14	46
Cuadro 15	49
Cuadro 16	50
Cuadro 17	51
Cuadro 18	51



I. RESUMEN.

Las enfermedades diarreicas son un problema importante de Salud Pública en todo el mundo, cada año se registran más de dos millones de casos fatales, sobre todo en los países en vías de desarrollo, principalmente en niños menores de 5 años. Aunque algunos integrantes de la familia *Enterobacteriaceae* forman parte de la microbiota normal del intestino de los mamíferos incluyendo al hombre, otros como *Salmonella*, *Shigella* y algunas serovariedades de *Escherichia coli* son importantes en la patogénesis de las infecciones intestinales. **Objetivo general:** Realizar la caracterización de cepas de *E. coli* aisladas de infecciones intestinales y otras fuentes empleando métodos fenotípicos y moleculares para conocer si estas cepas comparten características antigénicas y genotípicas con *Shigella*. **Hipótesis:** Cepas de *E. coli* de los serogrupos enteroinvasivos presentarán características antigénicas y de factores de virulencia similares a *Shigella*. **Material y métodos.** Se obtuvieron 87 cepas de diferentes fuentes y como controles de los ensayos se utilizaron 16 cepas de referencia de *E. coli* enteroinvasiva (EIEC) y 15 de *Shigella* de las colecciones NCTC y ATCC. Mediante pruebas bioquímicas preparadas en el laboratorio se realizó la identificación bioquímica, la tipificación serológica de las cepas se llevó a cabo utilizando 187 sueros obtenidos en conejo contra los antígenos somáticos y 53 sueros contra los antígenos H de *E. coli* (SERUNAM). Utilizando la reacción de la polimerasa (PCR) con iniciadores y condiciones previamente reportados se analizó la presencia de los genes *arpA*, *chuA*, *yjaA* y *TspE4* para definir el grupo filogenético de las cepas y los iniciadores *lacZ*, *uidA*, *cyd*, *lacY* e *ipaH* se utilizaron para diferenciar entre *E. coli* y *Shigella*. Los patrones de resistencia a los antimicrobianos se determinaron utilizando el método de difusión en agar (Kirby-Bauer). **Resultados:** Las cepas del estudio mostraron un perfil bioquímico que coincide con el reportado para *E. coli*. El análisis de la tipificación mostró reacciones antigénicas cruzadas con títulos similares entre los serogrupos O29, O32, O112ac, O124, O143, O152, O153, O166, O167, de *E. coli*, y las serovariedades de *S. dysenteriae* 11, *S. boydii* 14, *S. dysenteriae* 2, *S. dysenteriae* 3, *S. boydii* 8, *S. boydii* 4, *S. dysenteriae* 12, *S. boydii* 14, *S. boydii* 3 y *S. boydii* 18 respectivamente. Las cepas se clasificaron en los siguientes grupos filogenéticos: en el grupo A, 34 (39 %) cepas; en el grupo B1, 43 (49.4 %); en el grupo B2, 3(3.5%); en el grupo F, 2 (2.3 %); en el grupo E, 2 (2.3 %) y en el grupo I, 2(2.3 %). El análisis de los genes de virulencia mostró que las cepas de *E. coli* presentaron los genes *uidA*, *cyd*, *lacZ* y *lacY*, en relación al gen *ipaH* este se identificó en 22 (25.3%) cepas. En contraste con las cepas controles de *Shigella*, estas fueron positivas para los genes *uidA*, *cyd* e *ipaH*, pero negativas para *lacZ* y *lacY*. Finalmente 45 (51.7%) de 87 cepas presentaron resistencia a los antimicrobianos en diferentes combinaciones, la resistencia más significativa fue a TE en 35 (77.8 %) cepas, a NA 13 (28.9%) y SXT en 12 (26.7 %). **Conclusiones:** Las cepas de *E. coli* comparte antígenos similares con *Shigella* y se ubicaron principalmente en los grupos A y B1 definidos como comensales y componentes normales del intestino de los humanos y escasa presencia de los grupos B2 y F definidos como extraintestinales. Las cepas de *E. coli* presentaron factores de virulencia de EIEC y fueron resistentes a TE, NA y SXT.



II. INTRODUCCIÓN.

1. El problema de las enfermedades diarreicas a nivel mundial.

Las enfermedades diarreicas de tipo infecciosa son un problema importante de Salud Pública en todo el mundo, cada año se registran más de dos millones de casos fatales, sobre todo en los países en vías de desarrollo y principalmente en niños menores de 5 años y son un factor importante de desnutrición. En estimaciones realizadas por Bryce (1), reportan que las principales causas de muerte en niños menores de 5 años de edad fueron: muerte neonatal (36 %), neumonía (19%), diarrea (17%), malaria (8%), sarampión (4%), VIH/SIDA y accidentes (3 %) y otras causas (10%) (1,2). La diarrea es una enfermedad que se caracteriza por la evacuación frecuente de heces blandas o líquidas que contienen más agua de lo normal, e implica pérdida de sales (electrolitos) que son importantes para mantener el estado de hidratación del organismo; en muchos casos esta puede contener sangre y moco la cual se conoce como disentería (3-5). El riesgo de enfermedad depende de factores ambientales, es especialmente elevado en grupos poblacionales de escasos recursos, sin provisión segura de agua potable, sin saneamiento y con nula información y educación para la salud, referida a higiene personal y alimentaria, promoción de la lactancia materna y de factores individuales como la inmadurez inmunológica del lactante, la falla frecuente de aporte de leche materna, que constituye el alimento más completo durante los 6 primeros meses de vida y la desnutrición que se acentúa con la enfermedad creando un círculo vicioso; ocho de cada 10 defunciones se producen en los dos primeros años de vida, los niños menores de 5 años de los países en



desarrollo presentan una media de cuatro episodios diarreicos por año. Los laboratorios de investigación pueden identificar actualmente los microorganismos que causan diarrea en más de tres cuartas partes de los niños que acuden a los centros de salud. De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), cada año se producen alrededor de 1700 millones de casos de enfermedades diarreicas en todo el mundo, de los cuales, aproximadamente 760,000 casos terminan siendo fatales en niños menores de 5 años; se estima que 2.5 millones de personas carecen de instalaciones mejoradas de saneamiento, y casi mil millones de personas no tienen acceso al agua potable. Estas condiciones ambientales permiten que patógenos que producen diarrea se propaguen con mayor facilidad (4).

2. La situación de la diarrea en México.

En México las enfermedades intestinales ocupan los primeros lugares entre las veinte principales causas de mortalidad en menores de 5 años. El mayor porcentaje de las defunciones asociadas por esta enfermedad se debe a la deshidratación (4). En 1990 la mortalidad por Enfermedad Diarreica Aguda (EDAS) fue de 112.6 defunciones por 100 mil menores de cinco años, ésta tasa de defunciones descendió significativamente en 2007 al registrarse sólo 14.2 defunciones por 100 mil menores de cinco años por esta enfermedad (3,5); esto se debió a las acciones y políticas de salud que se establecieron en nuestro país, tales como las vacunas contra diferentes enfermedades como el sarampión y el rotavirus, la administración de vitaminas (como la A) y antihelmínticos (como el abendazol) en las Semanas Nacionales de Salud, promoción de la lactancia



materna, promociones públicas de higiene como el lavado de las manos antes y después de ir al baño, tomar agua hervida o potable, así como la terapia de hidratación oral, siendo esta una de las estrategias más importantes con lo que se ha permitido reducir importantemente la mortalidad por esta enfermedad. A pesar de estas prevenciones de salud, la enfermedad diarreica aguda en menores de 5 años de edad sigue siendo una de las 10 principales causas de mortalidad en nuestro país; se presentan al año más de 1 millón de casos, afectado principalmente a los niños menores de 5 años (3,5).

3. Agentes etiológicos.

La diarrea es un síntoma común de infecciones gastrointestinales causadas por una amplia gama de agentes enteropatógenos, señalándose la presencia de bacterias como *E. coli*, *Salmonella spp.*, *Shigella spp.*, *Campylobacter spp.*, *Aeromonas spp.* y *Vibrios spp.*, y de parásitos como *Giardia lamblia*, *Entamoeba histolytica* y *Cryptosporidium spp.*, entre otros; así como de Rotavirus. Sin embargo, sólo unos cuantos microorganismos son responsables de la mayoría de los casos agudos de diarrea infantil. El rotavirus es la causa más importante de diarrea aguda y es responsable de aproximadamente el 40 por ciento de todas las hospitalizaciones por diarrea entre los niños menores de cinco años en todo el mundo. Los agentes etiológicos más estudiados en los países desarrollados son *Shigella*, *Salmonella* y algunas variedades de *E. coli*, que están clasificados dentro de la familia *Enterobacteriaceae* (6) y aunque algunos integrantes de esta familia forman parte de la microbiota normal del intestino de los mamíferos incluyendo al



hombre, otros están frecuentemente involucrados en la patogénesis de infecciones intestinales.

Las diarreas producidas por agentes bacterianos se producen mayormente en los meses de verano y los virus aumentan su frecuencia en la época de invierno. La mayoría de los patógenos que causan diarrea comparten un modo similar de transmisión, a partir de las heces de una persona a la boca de otra. Esto se conoce como la ruta transmisión fecal-oral. Puede haber diferencias, sin embargo, en el número de organismos necesarios para causar la enfermedad clínica, o en la ruta que el patógeno toma durante la transmisión entre los individuos por ejemplo, de las heces a los alimentos o el agua que se ingiere (7,8), que son factores para que se presente la enfermedad.

Estos agentes causan enfermedades desde leves y autolimitadas hasta cuadros severos de deshidratación, toxemia o sepsis que causan gran mortalidad y morbilidad, o tienen efectos sobre el estado nutricional de los niños menores de 5 años o de personas inmunocomprometidas. El tratamiento de estas enfermedades está orientado principalmente a las especies bacterianas involucradas, sin embargo en los últimos años se observa el aumento de la resistencia bacteriana a los antimicrobianos (9).

4. Generalidades de las enterobacterias.

El nombre *Enterobacteriaceae* fue propuesto por Rahn en 1937 (10). Dicho nombre es derivado del latín “enterobacterium” cuyo significado es bacteria intestinal. La familia *Enterobacteriaceae* constituye un grupo grande y heterogéneo



de bacterias Gram negativas, aerobios o anaerobios facultativos no formadores de esporas, fermentadores de lactosa con o sin producción de gas, que son inmóviles o son móviles mediante flagelos peritricos, son oxidasa negativas, producen catalasa y tienen requerimientos nutricionales relativamente sencillos al fermentan azúcares hasta varios productos finales; la pared celular está constituida por una membrana interna o citoplasmática y una membrana externa, lipoproteínas, porinas multiméricas (que facilitan el paso de diversas sustancias, incluidos los antibióticos β -lactámicos). Además presenta organelos complejos que se extienden hacia el exterior como los flagelos, las fimbrias o pilis. A la membrana externa está anclado el lipopolisacárido (LPS) que está constituido por tres regiones: el lípido A conocido como endotoxina, un oligosacárido fosforilado central o core y las cadenas laterales o unidades repetidas de carbohidratos. Las unidades repetidas de carbohidratos del LPS se conoce como antígeno O. Este antígeno es la base para la clasificación de los serogrupos mediante reacciones antígeno-anticuerpo en este tipo de microorganismos. Actualmente la familia *Enterobacteriaceae* comprende al menos 34 géneros, 149 especies y 21 subespecies (11). Dentro de la cual destaca *E. coli* que es el microorganismo mejor estudiado que conforma la microbiota normal de intestino y *Shigella* que en los últimos años se ha le ha puesto un enfoque especial por lo que se ha estudiado con más detalle.

5. *E. coli* diarreogénica.

E. coli fue llamada así en honor a Theodor Escherich, pediatra Alemán que 1885 la aisló y caracterizó. Es un bacilo Gram negativo perteneciente a la familia



Enterobacteriaceae, móvil, fermentador de lactosa, citrato negativo, coloniza el tracto intestinal humano a pocas horas del nacimiento y es considerado un miembro no patógeno de la microbiota del intestino, rara vez causan enfermedad. Sin embargo, existen diferentes cepas de *E. coli* que causan diversas enfermedades conocidas como intestinales y extraintestinales; las primeras mediante factores de virulencia afectan a una amplia gama de procesos celulares; *E. coli* productora de diarrea presenta factores de virulencia que le permite lesionar las células intestinales o alterar la función del intestino. Mientras que las denominadas extraintestinales pueden causar una serie de cuadros clínicos como la infección urinaria, meningitis, sepsis, etc. En consecuencia, *E. coli* patógena es ampliamente estudiada en los seres humanos, los animales, los alimentos y el medio ambiente. En la actualidad existen 6 categorías principales de *E. coli* que ocasionan diarrea las cuales son clasificadas en patotipos con base en sus características de patogenicidad que presenta y cuadro clínico que producen (12,13): *E. coli* enteropatógena (EPEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC) y *E. coli* adherente difusa (DAEC) y en el 2013 se describieron dos categorías más: *E. coli* adherente invasiva (AIEC) y *E. coli* productora de toxinas Shiga enteroagregativa (STEAEC) (14). Las bacterias también han generado ciertos factores de virulencia para causar daño al hospedero, ya que promueven la colonización y facilitan la sobrevivencia de las bacterias infectantes, destacando su adherencia mediada por pilis o fimbrias, la presencia de enterotoxinas, las adhesinas no fimbriales y la cápsula.



El conocimiento actual de las características fenotípicas y genotípicas de la diversidad de *E. coli* se basa en cepas aisladas de humanos o animales; se pueden aislar y clasificar utilizando los métodos tradicionales, como la identificación por sus características bioquímicas, que se basa en la fermentación de azúcares y la utilización de otros sustratos como los aminoácidos, además de productos del metabolismo bacteriano. Los mecanismos de patogenicidad se pueden estudiar en cultivos de células y ensayos de modelo animal, así como métodos de biología molecular para el diagnóstico clínico. Estos últimos han demostrado los genes involucrados en la patogénesis de la bacteria. *E. coli* es un agente etiológico de casos esporádicos de brotes de diarrea, colitis hemorrágica (CH), disentería y el síndrome urémico hemolítico (SHU) (13,14). Las manifestaciones de la diarrea por *E. coli* se producen principalmente entre los niños menores de 5 años y un profundo conocimiento y comprensión de este microorganismo son importantes para una mejor vigilancia epidemiológica.

6. El género *Shigella*.

El científico japonés Kiyoshi Shiga en 1898 identificó por primera vez a *Shigella*. Él lo denominó como *Bacillus* porque parecía estar relacionado con *Bacillus coli*, que ahora se conoce como *E. coli*. En taxonomía, en la década de 1940, las cepas de *Shigella* se clasificaron en un género diferente de *E. coli* debido a su significado patológico. *Shigella* es un bacilo Gram-negativo perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae*, anaerobio facultativo, no formador de esporas, se caracteriza por no fermentar lactosa y mucato, ser inmóvil, no produce lisina decarboxilasa y raramente produce gas a partir de la glucosa, esta estrechamente relacionada



antigénicamente y bioquímicamente con *E. coli*. Es un patógeno importante para los humanos, intracelular que coloniza la mucosa intestinal (15). *Shigella* tiene importancia para salud pública, principalmente en los países subdesarrollados con las condiciones de falta de higiene causando enfermedades que van desde la diarrea hasta la disentería bacilar (16,17). *Shigella* por lo general es transmitida por el agua contaminada con heces humanas, así como bebiendo o comiendo alimentos lavados con la misma agua contaminada. Estos organismos invaden las células que recubren la mucosa del colon y allí se multiplican, conduciendo a la muerte celular. Sin embargo, de vez en cuando invade el intestino más allá del revestimiento de la superficie. Desde la década de 1970, el uso de la rehidratación oral en los países en desarrollo ha contribuido significativamente a la reducción de la mortalidad por deshidratación diarreica. Existen cuatro especies de *Shigella*, divididas sobre la base de diferencias en el antígeno O de su lipopolisacárido y algunas reacciones bioquímicas características, tales como la producción de indol o la fermentación de manitol; el diagnóstico de laboratorio se hace mediante el cultivo de las muestras de heces utilizando medios de agar selectivos y diferenciales. En base a ello se describen cuatro especies (18). *Shigella dysenteriae* (grupo A, 15 serotipos), *Shigella flexneri* (grupo B, 15 serotipos), *Shigella boydii* (grupo C, 20 serotipos) y *Shigella sonnei* (grupo D, 2 serotipos).

La ingestión de 10 a 500 células viables de cualquiera de las 4 especies de *Shigella* es suficiente para causar shigelosis en individuos susceptibles (16). En general, *S. dysenteriae* es responsable de epidemias mortales en los países en desarrollo. *S. flexneri* y *S. sonnei* son responsables de las enfermedades



endémicas en los países desarrollados, y *S. boydii* para la mayoría de los casos de la infección es importante en la India y los países vecinos (17). De estas especies, la más estudiada es *S. flexneri*, su identificación se basa en características bioquímicas, todas ellas pueden causar disentería, aunque con diferente gravedad. Al menos una especie, *S. dysenteriae*, también secreta una toxina que más probablemente juega un papel en la destrucción de tejidos y enfermedad sistémica más grave, la disentería (disentería bacilar o shigelosis) que es una infección del intestino grueso y se caracteriza por dolor abdominal, diarrea y fiebre. Inicialmente, la diarrea puede ser copiosa, con evacuaciones líquidas y con frecuencia contienen sangre y moco, se acompaña de otros síntomas como vómitos y dolor de cabeza y la infección rara vez se involucra otras partes del cuerpo. La dosis infecciosa son 10 bacterias, (16) hecho que permite que la enfermedad se propague de manera eficaz. En una encuesta de shigelosis realizada entre 2000 y 2004 en seis países de Asia (Bangladesh, China, Pakistán, Indonesia, Vietnam y Tailandia) demostró que la incidencia anual global de shigelosis tratada fue de 2.1 por 1000 habitantes de todas las edades por año y el 13.2 por 1000 niños menores de 5 años por año (17), esta incidencia fue más alta que la determinada en los países industrializados. La prevalencia anual estimado de episodios de shigelosis es de 160 millones, con 1.1 millones de muertes, en su mayoría niños menores de 5 años de edad (19).

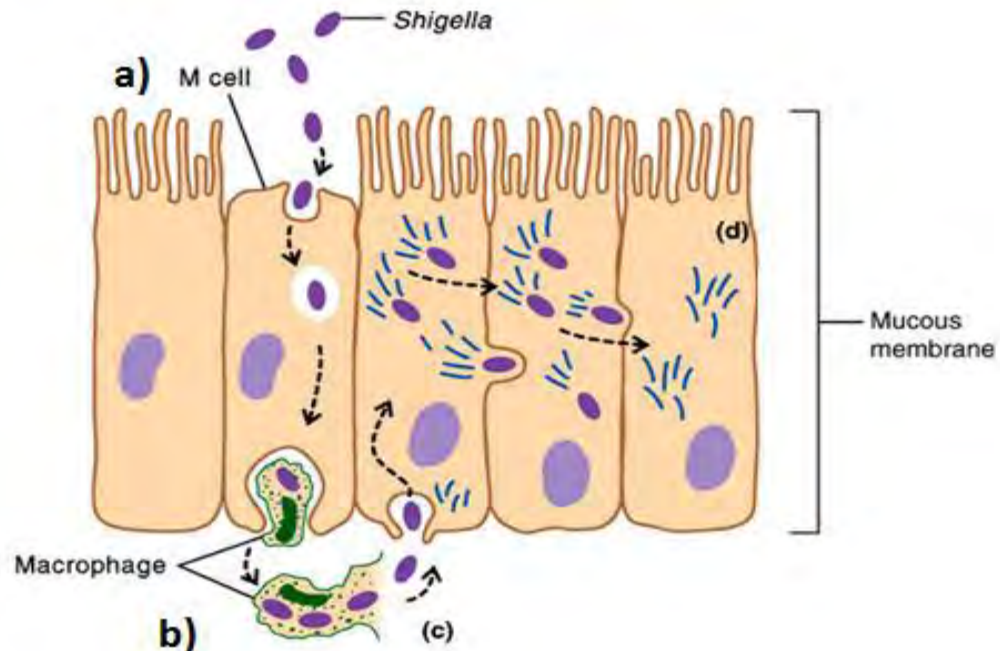


Figura 1. Modelo de la patogénesis inducida por *Shigella spp.* Las bacterias atraviesan la barrera epitelio mediante la introducción en las células M (a). Las bacterias son fagocitadas por los macrófagos residentes, en los que se inducen apoptosis (b), y alcanzan el polo basolateral de las células epiteliales (c). El movimiento de las bacterias intracelulares conduce a la formación de protuberancias y la difusión de las bacterias dentro del epitelio. La liberación de citocinas y quimiocinas, por los macrófagos apoptóticos y por los enterocitos infectados, promueve el reclutamiento de los monocitos, que migran a través de la barrera epitelial, lo que facilita la entrada de bacterias hacia las células epiteliales (d) y el aumento de la invasión del epitelio. Figura tomada de Parsot (20).

7. *E. coli* y su relación con *Shigella*.

Las bacterias de *Shigella spp.* y *E. coli* enteroinvasiva (EIEC) son responsables de la shigelosis en los seres humanos. La shigelosis se caracteriza por la destrucción del epitelio del colon provocado por la respuesta inflamatoria que se induce sobre la invasión de la mucosa por las bacterias (Figura 1). En comparación con bacterias comensales y otras cepas patógenas de *E. coli*, las características de *Shigella spp.* y cepas EIEC son la presencia de un plásmido de virulencia (VP) de aproximadamente 220 kb y su capacidad para inducir su entrada en las células epiteliales y propagarse de célula a célula (21).



Estudios recientes basados en el análisis de genes “housekeeping” (genes del metabolismo básico de los microorganismos) indican que *E. coli* y todas las especies de *Shigella*, a excepción de *S. boydii* tipo 13, pertenecen a una sola especie (22). Las cepas de *Shigella* se dice que en realidad son clonas de *E. coli* y se cree que han surgido hace relativamente poco tiempo (22,23). Aunque *Shigella* y *E. coli* están estrechamente relacionados, *E. coli* siempre muestra algunas propiedades físico-bioquímicas diferentes de *Shigella*; más de 80% de *E. coli* son prototróficas¹, móviles, capaz de descarboxilar lisina y fermentar azúcares como glucosa, lactosa, arabinosa, producir gas a partir de D-glucosa y producción de indol, mientras que *Shigella spp.* son auxotróficas², patógenos obligados, no móviles, incapaces de descarboxilar lisina, fermentar la salicina e hidrolizar la esculina y no producen gas a partir de D-glucosa, excepto *Shigella flexneri* 6, *S. boydii* 13 y *S. dysenteriae* 3 (24). Debido a estas diferencias fenotípicas *Shigella spp.* ha sido considerado como un género distinto de *E. coli*; sin embargo en 1971 se aislaron las primeras cepas de *E. coli* enteroinvasiva (EIEC) causantes de una enfermedad similar a la disentería causada por *Shigella*, por ello la relación de *Shigella* y *E. coli* fue reconsiderada y aunque se puede diferenciar *Shigella* de *E. coli*, las dificultades se observan con EIEC y *Shigella* ya que tienen notable similitud fenotípica y genotípica, ambas enterobacterias muestran características bioquímicas similares y pueden causar disentería utilizando el mismo modo de patogénesis. Se ha demostrado que *Shigella* y *E. coli* poseen mecanismos que les confiere resistencia a la acidez, reprimido por glucosa y el mecanismo conocido como GDAR [Glutamate Dependence Acid Resistance], dependiente de descarboxilasa de aminoácidos y sistemas antiporter. La secuenciación de varios

1.Prototróficas: Son bacterias silvestres que pueden crecer en medios mínimos (sales inorgánicas, fuente de carbono, glucosa y agua). A partir de estas sustancias mínimas las bacterias pueden construir todas las macromoléculas necesarias para vivir.

2.Auxotróficas: Las bacterias son generalmente mutantes y no pueden crecer a menos que se adicionen al medio nutrientes específicos (Adenina, biotina, metionina, etc.)



genes del metabolismo básico, indica que *Shigella* ha derivado más de una vez por medio de la adquisición de las formas transferibles de los plásmidos de virulencia ancestrales de *E. coli* comensal, por lo que forman un solo patotipo *Shigella*-EIEC (22). Esta es una de las razones más probables por lo que las pruebas de laboratorios tradicionales no permitan diferenciar entre cepas de EIEC y *Shigella*. Los métodos utilizados actualmente para discriminar entre EIEC y *Shigella* spp. se basan en un número muy limitado de características. Algunas cepas de EIEC, particularmente aquellas que son inmóviles, tienen esencialmente todas las propiedades de las cepas de *Shigella*. Por lo general son no móviles, lactosa negativa y lisina descarboxilasa negativo (25). Así como *Shigella*, EIEC es un grupo distinto de los organismos que se adaptan a los hospederos humanos.

8. Relación antigénica entre *E. coli* y *Shigella*.

La identificación de antígenos de superficie somático (O) y flagelar (H) utilizando anticuerpos específicos, se ha empleado durante muchos años para la caracterización de bacterias como *E. coli* (26). El polisacárido de la superficie celular tiene un papel importante en la capacidad de las bacterias para sobrevivir y persistir en el ambiente y en el hospedero. El antígeno O, constituye la parte más exterior del lipopolisacárido presente en la membrana externa de las bacterias Gram negativas. La composición química y la estructura del antígeno O exhiben alta diversidad incluso dentro de una especie (27).

Las cepas de *Shigella* se clasifican por el antígeno O únicamente ya que carecen de los antígenos H y K. Sin embargo, algunas cepas de ambos géneros (*Shigella* y



Escherichia), comparten alguno de los antígenos O. Hasta el momento, el Centro Colaborador de Referencia e Investigación de *Escherichia* y *Klebsiella* (Statens Serum Institut, SSI) de la Organización Mundial de la Salud con sede en Dinamarca ha reconocido 184 serogrupos O de *E. coli* (28) y para *Shigella* se describen 46 serogrupos O, de las cuales 21 son idénticos de algunos antígenos O de *E. coli* (18); En conjunto los antígenos H y O constituye el serotipo de la bacteria con lo que se define la identidad antigénica del microorganismo, lo que ocasiona que por serología se identifiquen como pertenecientes a una especie, aunque, por sus propiedades genóticas corresponda a otra, tales como EIEC O112ac que presenta reacciones cruzadas con *S. dysenteriae* 2, *S. boydii* 1 y *S. boydii* 15 y EIEC O124 presenta una relación antigénica idéntica a *S. dysenteriae* 3, etc. (29).

9. Grupos filogenéticos.

Los avances en los métodos de biología molecular ofreció a los investigadores un aumento significativo en el conocimiento de los microorganismos, por lo que pueden ser identificados de acuerdo a sus propiedades específicas genéticas codificadas en el DNA genómico. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a base de métodos genóticos se aplica con mayor frecuencia para detectar e identificar especies bacterianas particulares.

A principios de la década de 1980 el trabajo de Whittam (30) pusieron de manifiesto la existencia de la subestructura genética en *E. coli*. Una vez que la subestructura presente en *E. coli* fue revelado, se dieron cuenta rápidamente de



que las cepas que pertenecen a los diferentes grupos filogenéticos de *E. coli* no eran distribuidos al azar con respecto a su fuente de aislamiento. La importancia clínica de estas observaciones sugirió que un método simple de asignación a un grupo filogenético sería de valor en la clasificación de *E. coli*. A partir de estos trabajos, en el año 2000 un método de PCR triple desarrollado por Clermont (31), permitieron que acepas de *E. coli* se asignarán en uno de los grupos filogenéticos (A, B1, B2 y D). Esta PCR triple se usó ampliamente como un método sencillo y barato para la asignación de *E. coli* en un grupo filogenético. En este sistema las cepas virulentas extra-intestinales se ubicaron principalmente en el grupo B2, en menor proporción al grupo D, mientras que la mayoría de las cepas comensales pertenecen al grupo A, y en B1 se clasificaron cepas aisladas de animales herbívoros y de humanos.

Sin embargo en el 2013, fueron reconocidos ocho grupos filogenéticos: siete (A, B1, B2, C, D, E y F) y el clado I, lo cual fue el resultado del desarrollo de un PCR cuádruple que permitió que cepas de *E. coli* se pudieran designar a uno de los ocho grupos filogenéticos (32). Este nuevo método incluyó los genes *chuA*, *yjaA* y un fragmento de ADN *TspE4.C2*, pero añadiéndole un nuevo gen llamado *arpA*. El gen *chuA* es necesario para el transporte del grupo hemo en *E. coli* enterohemorrágica O157:H7; *yjaA* un gen inicialmente identificado en la secuencia completa del genoma de *E. coli* K-12, cuya función es desconocida; *TspE4.C2* es un fragmento de DNA relacionado con una lipasa esterasa y *arpA* control interno para asegurar la calidad del DNA. El nuevo sistema de PCR cuádruple, ha proporcionado evidencia adicional de que las cepas de los diversos grupos



filogenéticos difieren en sus características fenotípicas y genotípicas, sus nichos ecológicos y capacidad para producir enfermedad (32). Por lo tanto, más del 95% de las cepas de *E. coli* se puede asignar correctamente utilizando el nuevo método de PCR cuádruple.

10. Diferenciación de *Shigella* y *E. coli*.

Utilizando un método de PCR dúple, Horakova, (33) reportó que *lacY*, un gen que codifica para la lactosa permeasa, capaz de distinguir *E. coli* (*lacY* positivo) de *Shigella spp.* (*lacY* negativo). En la mayoría de las aplicaciones de la PCR publicadas usaron genes que codifican para la β -D-glucuronidasa (*uidA*) y β -D-galactosidasa (*lacZ*) como secuencias blanco de ADN (33), aunque no exclusivas de *E. coli* por lo que se pueden encontrar en otras bacterias, por ejemplo en *Shigella*. Para mejorar la especificidad del método, se propuso una PCR cuádruple para la identificación de *E. coli* y los genes blanco fueron: *uidA*, *lacZ*, *lacY*, y genes *cyd*, que codifica para el complejo de citocromo bd (34). La lactosa permeasa es esencial para el transporte de lactosa a través de la membrana citoplásmica y β -D-galactosidasa escinde el disacárido lactosa en glucosa y galactosa. La fermentación de lactosa se utiliza para la identificación de *E. coli* por métodos de cultivo estándar. La detección de la actividad de la enzima β -D-glucuronidasa (codificada por el gen *uidA*), es particularmente importante ya que permite identificar cepas de *E. coli* que no presentan actividad de β -glucuronidasa a pesar de que son portadores del gen *uidA* que se observa en aproximadamente 94% de las cepas de *E. coli* y se utiliza generalmente para la identificación *E. coli* por métodos de cultivo estándar.



EIEC comparte con *Shigella spp.* un plásmido (pINV) que codifica varias proteínas de membrana externa implicadas en la invasión de la célula huésped. Un antígeno (*ipaH*) asociado al plásmido de invasión (pINV), se ha descrito como un posible blanco para herramientas de diagnóstico, ya que el gen está presente tanto en el plásmido invasión y en los cromosomas de *Shigella* y EIEC. Esta característica permite la detección de estos patógenos a pesar de la pérdida de los plásmidos. Los genes de virulencia asociados al pINV son probablemente adquiridos por transferencia horizontal de otras bacterias de géneros no relacionados, ya que el contenido de nucleótidos A+T de estos genes es del 75% en estos grupos de bacterias, mientras que el contenido de A+T en los genomas de *Shigella* y *E. coli* es 50% (35,36).

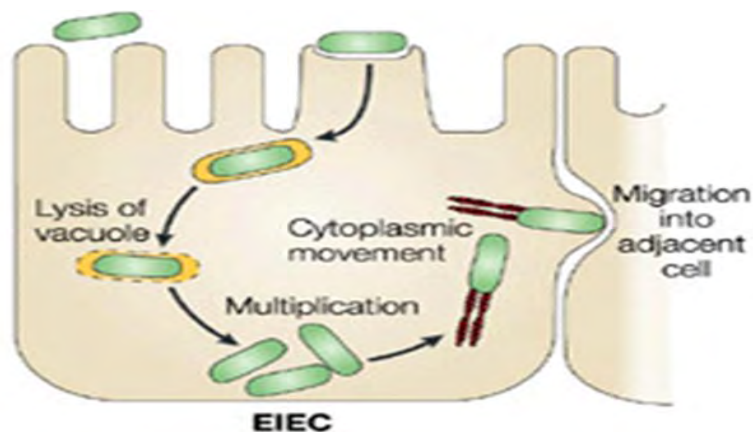


Figura 2. Mecanismo patogénico de *E. coli* enteroinvasiva; al igual que *Shigella*, EIEC penetra las células M dada la interrupción de las uniones estrechas y el daño causado por la inflamación, las células son fagocitadas por los macrófagos residentes y después son liberados por los mismos en la submucosa, desde donde invaden el lado basolateral de los enterocitos con la ayuda de efectores que son secretadas por el sistema III de secreción (T3SS), posteriormente se induce la entrada al epitelio gracias a la polimerización de la actina y este movimiento produce la difusión de las bacterias. Figura tomada de Hale (36).

11. Mecanismos de acción de los antimicrobianos.

Los organismos de todo el árbol filogenético, incluyendo animales, producen sustancias para la protección contra agentes extraños. Alexander Fleming



comenzó la era de los antimicrobianos cuando descubrió en una placa de Petri sembradas con *Staphylococcus aureus* que un compuesto producido por un hongo eliminó a las bacterias del medio de cultivo. El hongo, fue identificado como *Penicillium notatum*, dicho microorganismo, produjo un agente activo que fue nombrado penicilina. Más tarde, la penicilina se aisló como un polvo de color amarillo y se utilizó como un antibacteriano durante la Segunda Guerra Mundial. Posteriormente usando el método de Fleming, se aislaron otras sustancias de origen natural, tales como cloranfenicol y estreptomina (37).

Para sobrevivir, las bacterias desarrollan mecanismos de resistencia a los antimicrobianos. Por lo tanto, no es sorprendente que se han vuelto resistentes a la mayoría de los agentes antimicrobianos naturales que se han desarrollado en los últimos 50 años. Esta resistencia limita cada vez más la eficacia de los antimicrobianos actuales. El problema no es sólo la resistencia a los antimicrobianos, sino también resistencia a múltiples fármacos. En 2004, más del 70% de las bacterias patógenas se estima que son resistentes a uno o más de los antimicrobianos disponibles en la actualidad. Las llamadas 'superbacterias', organismos que son resistentes a la mayoría de los antibióticos utilizados clínicamente están surgiendo rápidamente. Por lo que la incidencia de bacterias patógenas resistentes a múltiples antimicrobianos está aumentando en la actualidad (38). La Sociedad Americana de Enfermedades Infecciosas (IDSA) informó en 2004 que en los hospitales de los Estados Unidos se presentan aproximadamente 2 millones de infecciones bacterianas (39).



El desarrollo de los antimicrobianos ha sido de mayor éxito en la orientación de los componentes esenciales del metabolismo bacteriano entre los que se incluyen: síntesis de la pared celular, la síntesis de proteínas, síntesis de ARN, síntesis de ADN, y el metabolismo intermediario. Los agentes antimicrobianos actúan por una serie de mecanismos, muy diferentes entre ellos y cuyos blancos se encuentran en diferentes regiones del microorganismo (40-42).

1. β -lactámicos (Penicilinas, Cefalosporinas, Carbapenémicos, Monobactámicos): Este grupo en particular, se caracteriza por producir la inhibición de la síntesis de la pared celular, la composición es un anillo de β -lactámico que contiene nitrógeno en el núcleo de su estructura, que es clave para el modo de acción de este grupo de antimicrobianos. Los β -lactámicos se dirigen a las proteínas de unión a penicilina o PBPs, un grupo de enzimas que se encuentran anclados en la membrana celular y que están involucrados en la síntesis de la pared celular bacteriana. La porción del anillo β -lactámico de este grupo de antimicrobianos se une a estos diferentes PBPs, haciéndolos incapaces de funcionar en la síntesis de la pared celular. Esto lleva a la muerte de la bacteria debido a la inestabilidad osmótica o autólisis.
2. Quínoonas: Alteración del metabolismo o la estructura de los ácidos nucleicos.
3. Fluoroquinolonas: Inhibición de la síntesis de ácido nucleico, se unen al complejo de la ADN-ADN girasa e interrumpen un proceso que conduce al



superenrollamiento negativo del ADN bacteriano y hacen que las bacterias no puedan multiplicarse y sobrevivir.

4. Tetraciclinas: Inhibición de la síntesis de proteínas; una vez que las tetraciclinas han sido transportadas a la célula, se unen reversiblemente a los receptores en la subunidad 30S ribosomal de las bacterias, e inhiben la unión del aminoacil-tRNA al complejo de RNA-ribosomal. Esto evita que la adición de aminoácidos a la cadena peptídica de alargamiento, por lo que previene la síntesis de proteínas.
5. SXT: Inhibe la síntesis bacteriana de la dihidrofolato al competir con ácido aminobenzoico (PABA). Por lo tanto, bloquea pasos consecutivos de la biosíntesis de ácidos nucleicos y proteínas esenciales para muchas bacterias.
6. Amino glucósidos: Inhibición de la síntesis de proteínas; una vez dentro de la célula bacteriana, los amino glucósidos se unen a la subunidad 30S ribosomal y provocan una lectura errónea del código genético. Esto conduce posteriormente a la interrupción de la síntesis de proteína bacteriana normal.
7. Macrólidos: Inhibición de la síntesis de proteínas, se unen a la subunidad 50s de los ribosomas e inhiben procesos transpeptidación y la translocación, que resulta en desprendimiento prematuro de cadenas polipeptídicas incompleta.



III. JUSTIFICACIÓN.

El presente estudio se diseñó para caracterizar cepas de *E. coli* que fueron aisladas de diferentes fuentes de diarrea infantil en México, Tailandia y de animales para poder establecer si comparte antígenos de superficie con *Shigella*, así como su relación con grupos filogenéticos y factores de virulencia, mediante el uso de métodos fenotípicos y moleculares.

IV. HIPÓTESIS.

Cepas de *Escherichia coli* de los serogrupos enteroinvasivos presentarán características antigénicas y de factores de virulencia similares a *Shigella*.

V. OBJETIVOS.

1. Objetivo general.

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

2. Objetivos particulares.

1. Conocer la identidad del perfil de utilización de substratos de cepas de *E. coli* y *Shigella* para diferenciar entre ambas especies.



2. Determinar las reacciones antigénicas cruzadas entre los serogrupos de EIEC y *Shigella* para establecer la similitud antigénica entre ambos grupos de enterobacterias.
3. Mediante la PCR e iniciadores específicos conocer si las cepas de *E. coli* presentan los genes relacionados con la capacidad de invasividad a células epiteliales intestinales.
4. Por PCR determinar la presencia de los genes *arpA*, *chuA*, *yjaA* y *tspeC2*, para definir el o los grupos filogenéticos en los que se ubican las cepas EIEC.
5. Realizar un análisis del contenido de los genes *lacZ*, *uidA*, *cyd*, *lacY* e *ipaH* utilizando la PCR e iniciadores para diferenciar EIEC de *Shigella*.

VI. METODOLOGÍA.

1. Cepas bacterianas.

- a. Origen de las cepas. Se obtuvieron 87 cepas de niños menores de cinco años con diarrea de México, Tailandia y de hisopo rectal de bovinos. Como controles de los ensayos se utilizaron 31 cepas de referencia de *E. coli* y de *Shigella* de la colección de la *National Collection of Type Cultures* (NCTC).
- b. Aislamiento y viabilidad. Las cepas de *E. coli* se conservan en medio de Dorset y se sembraron por estría en agar MacConkey para su aislamiento y corroborar la viabilidad de los microorganismos, se incubaron a 37° C durante 18-24 horas y se hizo una copia de corto plazo en gelosa especial en frascos de antibiótico de 10 mL y una copia de trabajo en tubos 13 X 100 mm con 4 mL de agar soya tripticaseina (TSA).

2. Confirmación bioquímica.

Se confirmó la identidad fenotípica de las cepas utilizando las siguientes pruebas bioquímicas estándares que se prepararon en el laboratorio (43): lactosa, glucosa, indol, rojo de metilo, Voges-Proskauer, urea, malonato, fenilalanina, movilidad, ácido sulfhídrico y gluconato. Para diferenciar entre cepas de *Shigella* y *E. coli* se realizaron pruebas de fermentación de los siguientes carbohidratos: lactosa, sorbitol, maltosa, rafinosa, xilosa, sacarosa.



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

- a. Antígeno somático (O). Las cepas de *E. coli* se inocularon en tubos con 10 mL de TSA inclinado y se incubaron a 37 °C durante 18-24 h. Posteriormente los cultivos bacterianos se re-suspendieron con 10 mL de solución salina fisiológica (0.15 M de NaCl) y se sometieron a vapor fluyente (100 °C) durante 1 h, para conservarlos se agregó 10 mL de formalina (NaCl al 0.15 M y 0.6 % de formaldehído).

- b. Antígeno flagelar (H). Las cepas de *E. coli* 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. Una vez que se obtuvo el crecimiento de las bacterias en el medio semisólido, estas se inocularon en un caldo biotriptasa y se incubaron a 30 °C durante 18-24 h. Posteriormente a cada tubo se agregó 10 mL de formalina.

- c. Tipificación serológica. La tipificación serológica del antígeno somático (O) se realizó utilizando 187 sueros anti-O del esquema antigénico de *E. coli* obtenidos en conejo (SERUNAM) y se utilizó la metodología descrita previamente por Orskov (26). En placas de 96 pozos se colocaron 50 µL/pozo de cada uno de los 187 sueros anti-O y 46 anti-*Shigella*, a estos pozos se adicionaron 50 µL del antígeno O de las bacterias previamente preparados.

4. Obtención del ADN.

La extracción del DNA genómico de las cepas de *E. coli* se realizó por el método de ebullición previamente reportado por Islam (44), el cual consistió en inocular el cultivo bacteriano en 2 mL de caldo Luria-Bertani (LB), los tubos se incubaron 37 °C durante 18-24 h. La suspensión bacteriana se centrifugó (1mL) en un microtubo a 13000 rpm durante 5 min. Posteriormente el sobrenadante se decantó y se adicionaron 200 µL de agua ultra pura para resuspender el pellet. La suspensión anterior se hirvió durante 10 min y se pasó a hielo durante 5 min. La suspensión una vez más se re-suspendió y centrifugo 13000 rpm durante 10 min, de esta se tomaron 100 µL del sobrenadante que se colocaran en un tubo nuevo y la suspensión se conservó en congelación hasta su uso.

5. Genes de virulencia y grupos filogenéticos.

- a. Determinación de grupos filogenéticos de *E. coli*. Para definir los grupos filogenéticos en los que se ubicaron las cepas de *E. coli*, se realizó mediante el análisis de la presencia de los genes *arpA*, *chuA*, *yjaA* y un fragmento anónimo designado como *TSPE4.C2* de acuerdo a la metodología y condiciones previamente reportada por Clermont (32) (Cuadro 1).
- b. Reacción de la polimerasa para identificar genes y diferenciar cepas de *E. coli* y *Shigella* (*lacZ*, *uidA*, *cyd* y *lacY*). Adicionalmente en el laboratorio se diseñaron los iniciadores de *ipaH* y *lacZ*. La PCR se realizó en un ensayo



multiplex para detectar los genes *lacZ*, *uidA*, *cyd* y *lacY* usando iniciadores previamente reportados (36). La mezcla del coctel de la PCR para cada muestra consistió de 7.8 μL de H_2O , 2.5 μL de buffer, 1.5 μL de MgCl_2 , 1 μL de cada iniciador (Cuadro 1), 2.5 μL dNTP's, 0.2 μL Taq polimerasa, 2.5 μL DNA. Se utilizó el termociclador (Labnet, MultiGene Optimax) y 30 ciclos de amplificación con las siguientes condiciones, desnaturalización inicial a 94°C durante 90s, una etapa de desnaturalización a 94°C durante 30s, alineación a 60°C durante 25s y una etapa de extensión a 72°C durante 30s, finalmente a 4°C. Los productos de la amplificación (amplicones) del DNA obtenidos se analizaron por corrimiento en gel de agarosa al 1.8% con 100 mVolts de corriente y el DNA se tiñó con Gelred (BioLabs). Los amplicones se visualizaron utilizando luz UV en un foto-documentador de imágenes (BiosensSC805 Gel Imagine Systems) y se consideró el amplicón como positivo sí presentó el mismo peso de pares de bases que los controles positivos (Cuadro 1).

Cuadro 1. Iniciadores utilizados.

Primer	Genes	Secuencia Forward	Secuencia Reverse	Peso molecular (pb)	Referencia
chuaA.1b, 2	<i>chuA</i>	5'ATGGTACCGGACGAACCAAC-3'	5'TGCCGCCAGTACCAAAGACA-3'	288	Clermont [2013]
YjaA.1bF	<i>yjaA</i>	5'AATGCGTTCCTCAACCTGTG-3'	5'AATGCGTTCCTCAACCTGTG-3'	211	
TspE4C2.1b	<i>TspE4.C2</i>	5'CACTATTCGTAAGGTCATCC-3'	5'AGTTTATCGTCTCGGGTCGC-3'	152	
AceK.f,r	<i>arpA</i>	5'AACGCTATTCGCCAGCTTGC-3'	5'TCTCCCCATACCGTACGCTA-3'	400	
ArpAgpE.f	<i>arpA</i>	5'GATTCCATCTTGTCAAAATATGCC-3'	5'GAAAAGAAAAAGAATCCCAAGAG-3'	301	
trpAgpC.1,2	<i>trpA</i>	5'AGTTTTATGCCAGTGCGAG-3'	5'TCTGCGCCGGTCACGCC-3'	219	
trpBA.f,r	<i>trpA</i>	5'CGGCGATAAAGACATCTTAC-3'	5'GCAACGCGGCCTGGCGGAAG-3'	489	
IEMSh	<i>ipaH</i>	5'ATCTAATAACTTTGGATGTGTCGA3'	5'TTAAGATTAGAAGGCAGAGATGGA3'	187	No publicados
IEMlacY	<i>lacY</i>	5'CAATAATCAGTTCGTTTTCTGGC3'	5'AGCAAAGTGTGGTCAAAAACAT3'	241	
lac Z	<i>lacZ</i>	5'ATGAAAGCTGGCTACAGGAAGGCC3'	5'GGTTTATGCAGCAACGAGACGTCA3'	264	Horáková [2008]
cid A	<i>uidA</i>	5ATCGGCGAAATTCATACCTG3'	5'GTTCTGCGACGCTCACACC3'	319	
cyd	<i>cyd</i>	5'CCGTATCATGGTGCGTGTGG3'	5'GCCGGCTGAGTAGTCGTGGAAG3'	393	
lac Y	<i>lacY</i>	5'ACCAGACCCAGCACACATAAG3'	5'GCACCTACGATGTTTTGACCA3'	463	

6. Antimicrobianos.

Patrones de resistencia a antimicrobianos mediante pruebas de difusión en agar (Kirby-Bauer). Se utilizó como referencia la metodología reportada en la décima edición del manual del Comité Nacional de Normas de Laboratorio Clínico (NCCLS). Las cepas de *E. coli* se inocularon en placas con agar nutritivo (TSA) y se incubaron a 37°C durante 24 h. Posteriormente se tomó un inóculo para preparar una suspensión bacteriana en tubos con 1.8 mL de solución salina fisiológica estéril, la cual se ajustó al tubo 0.5 del nefelómetro de McFarland 1.5×10^8 bacterias/mL. En un tiempo que no excedió de 15 minutos, después del ajuste se impregnó un hisopo de algodón estéril con la suspensión bacteriana, quitando el exceso de la suspensión haciendo presión del hisopo contra las paredes del tubo y se



inocularon de manera masiva en dos placas con agar Mueller Hinton para cada una de las cepas. Los sensidiscos BBL Sensi Disc BD® se colocaron con ayuda de unas pinzas estériles cuidando que la distancia entre cada uno de estos fuera no menor a 24mm. Se utilizaron los siguientes antimicrobianos; Cefoxitina (FOX) 30 μ (Cefalosporinas 2^{da} generación), Ceftriaxona (CRO) 30 μ g, Ceftazidima (CAZ) 30 μ g , Cefotaxima (CTX) 30 μ g (Cefalosporinas 3^a generación), Cefepima (FEP) 30 μ g (Cefalosporinas 4^a generación), Ofloxacina (OFX) 5 μ g , Norfloxacina (NOR) 10 μ g , Ácido Nalidixico (NA) 30 μ g , Ciprofloxacina (CIP) 5 μ g , Imipinem (IMP) 10 μ g , Aztreonam (ATM) 30 μ g, Trimetoprim/Sulfametoxazol (SXT) 1.25/23.73 μ g, Tetraciclina (TE) 30 μ g. Una vez preparadas las placas con los sensidiscos de los antimicrobianos se incubaron a 37°C durante 18-24h, posteriormente con Vernier se tomó la medida del diámetro de los halos de inhibición y se registraron los resultados. Se consideraron los diámetros de inhibición reportados por la NCCLS (45) para interpretar las medidas del diámetro de inhibición y definir como resistente o sensible a la respuesta a cada antimicrobiano. Como control de las pruebas de resistencia a los antimicrobianos se utilizó la cepa ***E. coli 25922***TM de la American Type Culture Collection (ATCC).

VII. RESULTADOS.

1. Origen de las cepas.

Se obtuvieron 87 cepas de *E. coli* obtenidas de niños menores de cinco años con diarrea de diferentes áreas geográficas y origen de las cuales: 55 (63.2 %) cepas fueron de México, 13 (14.9 %) de Tailandia y 19 (21.8 %) de bovinos lecheros. Además de estas cepas se utilizaron 16 cepas de referencia de EIEC y 15 cepas de *Shigella*, ambos grupos de cepas obtenidas de la colecciones de la NCTC.

2. Identificación bioquímica.

De las 87 cepas 87 (100 %) 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 2 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 cepas 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. Por otra parte para el caso de las 14 cepas control de *Shigella* presentaron propiedades bioquímicas 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.

3. Tipificación serológica.

Los resultados de la serotipificación de las 55/87 (63.2 %) cepas de diarrea infantil en México, mostró 20 serotipos, los más frecuentes fueron OR:NM, O166:NM O28ac:NM, O159: NM, O167:NM(Cuadro 2).

Cuadro 2. Serotipos identificados en las cepas de aisladas de diarrea infantil en México.

Procedencia	Serotipo	Número de cepas (%)
México 55 (63.2%)	OR ^S :NM*	11
	OR ^S :H30	1
	OR ^S :H10	1
	O28ac:NM*	6
	O29:NM*	1
	O32:H4	1
	O112ac:NM*	1
	O115:NM*	2
	O119:H6	1
	O124:H11	1
	O143:NM*	1
	O152:NM*	3
	O153:NM*	1
	O153:H34	1
	O153:H? ^F	1
	O159:NM*	4
	O166:NM*	7
	O167:NM*	3
	O167:H5	4
	O167:H? ^F	3
<i>S. dysenteriae</i> 11:NM*	1	
Total	55 (63.2)	

*NM: No móvil.

^SOR: Antígeno somático rugosa.

^FH?: Antígeno flagelar no determinado.

Los resultados para la clasificación de los serotipos determinados en las cepas provenientes de diarrea infantil en Tailandia, reveló que fueron identificados tres serotipos y el prevalente en estas cepas fue O28ac:NM (Cuadro 3).

Cuadro 3. Serotipos identificados en las cepas aisladas de diarrea infantil en Tailandia.

Procedencia	Serotipo	Número de cepas
Tailandia 13 (14.9%)	O28ac:NM*	11
	O28ac:H5	1
	O166: NM*	1
	Total	13 (14.9)

*NM: No móvil.

La clasificación de las cepas provenientes de animales mostró la identificación de 16 serotipos, los más frecuentes fueron O112ac:H7 y OR:NM, los demás 14 serotipos cada uno con una cepa (Cuadro 4).

Cuadro 4. Serotipos identificados en cepas de *E. coli* aisladas de animales.

Procedencia	Serotipo	Número de cepas
Animales 19 (21.8%)	OR ^S :H7	1
	O112ac:H2	1
	O112ac:H7	2
	O124:H2	1
	O124:H43	1
	O152: H? ^F	1
	O153:H? ^F	1
	O159:H49	1
	O166:H4	1
	O167:H32	1
	O167:H4	1
	O28ac: H? ^F	1
	O29:H27	1
	OR ^S :H12	1
	OR ^S :H2	1
	OR ^S :NM*	2
	<i>S. boydii</i> 18: NM*	1
Total	13 (14.9)	

*NM: No móvil.

^SOR: Antígeno somático rugosa.

^FH?: Antígeno flagelar no determinado.

Con relación a los serotipos de *Shigella* se encontraron reacciones cruzadas con el antígeno somático de *E. coli* (Cuadro 5). El análisis de los títulos determinados con los sueros anti-O de *E. coli*, mostró que *S. boydii* 1, *S. dysenteriae* 3, *S. dysenteriae* 6, *S. dysenteriae* 12 y *S. dysenteriae* 13, presentaron reacción con dos de los sueros anti-O de *E. coli*.

Antígenos somáticos de los controles de <i>Shigella</i> y <i>E. coli</i>	Sueros anti-O de <i>E. coli</i>														
	O23	O29	O39	O82	O102	O112ac	O124	O130	O138	O143	O149	O150	O167	O175	44037
<i>S. boydii</i> 1	-	-	-	-	-	1:3200	-	-	-	-	1:1600	-	-	-	-
<i>S. boydii</i> 3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1:800	-	-
<i>S. boydii</i> 8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1:1600	-	-	-	-	-
<i>S. boydii</i> 16	-	-	1:1600	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. boydii</i> 18	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1:200
<i>S. dysenteriae</i> 3	-	-	-	1:200	-	-	1:3200	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. dysenteriae</i> 6	-	-	-	-	1:200	-	-	1:400	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. dysenteriae</i> 11	-	1:200	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. dysenteriae</i> 12	1:1600	-	-	-	-	-	-	-	1:3200	-	-	-	-	-	-
<i>S. dysenteriae</i> 13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1:6400	-	1:400	-
O121	-	-	-	-	-	-	-	-	1:800	-	-	-	-	-	-

Cuadro 5. Reacciones antigénicas cruzadas entre cepas de *Shigella* y el suero anti-O de *E. coli*. El cuadro muestra la máxima dilución (de 1:100 hasta 1:12800) en la que el antígeno somático de las cepas control de *Shigella* y *E. coli* presentaron una reacción de aglutinación con los sueros anti-O del esquema de tipificación serológica, si se presentó una reacción a una dilución igual o mayor a la previamente establecida en el laboratorio con antígenos homólogos, se consideró como positivo.

Al respecto de las reacciones antigénicas cruzadas la tipificación serológica permitió identificar estas reacciones entre las cepas *E. coli* del estudio y *Shigella*. Para el análisis de las reacciones cruzadas las cepas se dividieron de acuerdo al antígeno somático, las cuales fueron O29, O32, O112ac, O124, O143, O152, O153, O166, O167 y una *E. coli* caracterizada como *S. boydii* 18, las cuales tuvieron correspondencia con los antígenos somáticos de *S. dysenteriae* 11, *S. boydii* 14, *S. boydii* 1 y *S. dysenteriae* 2, *S. dysenteriae* 3, *S. boydii* 8, *S. boydii* 4, *S. dysenteriae* 12, *S. boydii* 14, *S. boydii* 3 y finalmente *S. boydii* 18, respectivamente para cada serogrupo de las cepas aisladas de diarrea infantil y animales (Cuadro 6).

Antígenos somáticos de cepas aisladas de <i>E. coli</i>	Sueros anti-O de <i>Shigella</i> y <i>E. coli</i>												
	<i>S. boydii</i> 1	<i>S. boydii</i> 3	<i>S. boydii</i> 4	<i>S. boydii</i> 8	<i>S. boydii</i> 14	<i>S. boydii</i> 16	<i>S. boydii</i> 18	<i>S. dysenteriae</i> 2	<i>S. dysenteriae</i> 3	<i>S. dysenteriae</i> 11	<i>S. dysenteriae</i> 12	44037	O21
O29	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1:400	-	-	-
O32	-	-	-	-	1:1600	-	-	-	-	-	-	-	-
O39	-	-	-	-	-	1:1600	-	-	-	-	-	-	-
O112ac	1:100	-	-	-	-	-	-	1:200	-	-	-	-	-
O124	-	-	-	-	-	-	-	-	1:1600	-	-	-	-
O143	-	-	-	1:800	-	-	-	-	-	-	-	-	-
O152	-	-	1:100	-	-	-	-	-	-	-	-	1:100	-
O153	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1:400	-	-
O166	-	-	-	-	1:100	-	-	-	-	-	-	-	1:800
O167	-	1:200	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. boydii</i> 18	-	-	-	-	-	-	1:800	-	-	-	-	-	-

Cuadro 6. Relaciones antigénicas entre cepas de *E. coli* y *Shigella*. El cuadro muestra la máxima dilución (de 1:100 hasta 1:12800) en la que el antígeno somático de las cepas de *E. coli* presentaron una reacción de aglutinación con los sueros anti-O del esquema de tipificación serológica de *Shigella*, si se presentó una reacción a una dilución igual o mayor a la previamente establecida en el laboratorio con antígenos homólogos, se consideró como positivo.

4. Grupos filogenéticos.

La clasificación en grupo filogenéticos de todas las cepas del estudio, mostró que 34 (39.1%) cepas se ubicaron en el grupo filogenético A, siendo positivas solo para el gen *arpA* y negativas para los genes *chuA*, *yjaA* y *TspE*. Por otro lado, en el grupo filogenético B1 se ubicaron 43 (49.4%) cepas, que fueron positivas para los genes *arpA* y *TspE*; y negativas para los genes *chuA* y *yjaA*. Por el contrario a las cepas de los dos grupos filogenéticos mencionados, las cepas de los grupos filogenéticos B2, I, E, F y no determinado (ND), en común fueron positivas para el gen *chuA*.

Utilizando el mismo criterio de clasificación en las cepas de México, con un total de 55 cepas, se clasificaron en los diferentes grupos filogenéticos, ubicándose en los grupos A (47.3 %), B1 (41.8 %), B2 (5.4 %), I (3.6 %) y E (1.8 %) (Cuadro 7)

Cuadro 7. Grupos filogenéticos en cepas de *E. coli* aislada de casos de diarrea infantil en México.

Procedencia	Identificación Bioquímica	Serotipo	Número de Cepas	Genes de los grupos filogenéticos.				Grupo filogenético N (%)
				<i>arpA</i>	<i>chuA</i>	<i>yjaA</i>	<i>TspE</i>	
México (niños) 55 (63.2)	<i>E. coli</i>	OR ^S :NM*	7	+	-	-	-	A 26 (47.3)
		OR ^S :NM*	1	+	-	+	-	
		OR ^S :H10	2	+	-	+	-	
		OR ^S :H30	1	+	-	+	-	
		O32:H4	1	+	-	-	-	
		O124:H11	1	+	-	+	-	
		O152:NM*	1	+	-	+	-	
		O153:H34	1	+	-	+	-	
		O166:NM*	7	+	-	+	-	
		O167:NM*	1	+	-	+	-	
		O167:NM*	2	+	-	-	-	
		<i>S. dysenteriae</i> 11:NM*	1	+	-	+	-	
		O28ac:NM*	6	+	-	-	+	B1 23 (41.8)
		O29:NM*	1	+	-	-	+	
		O115:NM*	2	+	-	-	+	
		O152:NM*	2	+	-	-	+	
		O153:NM*	1	+	-	-	+	
		O159:NM*	4	+	-	-	+	
		O167:H? ^F	3	+	-	-	+	B2 3 (5.4)
		O167:H5	4	+	-	-	+	
O112ac:NM*	1	-	+	-	+			
O153:H? ^F	1	-	+	-	+	I 2 (3.6)		
O119:H6	1	-	+	+	-			
OR ^S :NM*	1	+	+	+	-	E 1 (1.8)		
O143:NM*	1	+	+	+	-			
OR ^S :NM*	1	+	+	-	-			
Total		55 (63.2)	52 (94.5)	6 (10.9)	19 (34.5)	25 (45.4)		

*NM: No móvil.

^SOR: Antígeno somático rugosa.

^FH?: Antígeno flagelar no determinado.

El análisis de los grupos filogenéticos de las cepas de *E. coli* aislada de diarrea infantil de Tailandia, con un total de 13 cepas, reveló al filogenético B1 como el principal grupo (Cuadro 8).

Cuadro 8. Grupos filogenéticos en cepas de *E. coli* aislada de casos de diarrea infantil de Tailandia.

Procedencia	Identificación Bioquímica	Serotipo	Número de Cepas	Genes de los grupos filogenéticos.				Grupo filogenético
				<i>arpA</i>	<i>chuA</i>	<i>yjaA</i>	<i>TspE</i>	N (%)
				N (%)				
Tailandia (niños) 13 (14.9)	<i>E. coli</i>	O28ac:NM*	11	+	-	-	+	B1 12 (92.3)
		O166:NM*	1	+	-	-	+	
		O28ac:H5	1	-	+	-	-	ND[^] 1 (7.7)
		Total	13 (14.9)	12 (92.3)	1 (7.7)	0	12 (92.3)	

[^]ND: No determinado

*NM: No móvil.

Por otra parte los resultados de la clasificación de grupo filogenético de las cepas aisladas de animales, con un total de 19 cepas, mostraron a los grupos A (24.1 %) y B1 (42.1 %) como las más frecuentes (Cuadro 9).

Cuadro 9. Grupos filogenéticos en cepas de *E. coli* aisladas de animales.

Procedencia	Identificación Bioquímica	Serotipo	Número de Cepas	Genes de los grupos filogenéticos.				Grupo filogenético
				<i>arpA</i>	<i>chuA</i>	<i>yjaA</i>	<i>TspE</i>	N (%)
				N (%)				
Animales 19 (21.8)	<i>E. coli</i>	OR ^S :NM*	1	+	-	-	-	A 8 (42.1)
		OR ^S :NM*	1	+	-	+	-	
		OR ^S :H7	1	+	-	+	-	
		O124:H43	1	+	-	-	-	
		O152:H? ^F	1	+	-	-	-	
		O153:H? ^F	1	+	-	-	-	
		O166:H4	1	+	-	+	-	
		<i>S. boydii</i> 18:NM*	1	+	-	+	-	B1 8 (42.1)
		O112ac:H7	2	+	-	-	+	
		O112ac:H2	1	+	-	-	+	
		OR ^S :H2	1	+	-	-	+	
		124:H2	1	+	-	-	+	
		O28ac:H? ^F	1	+	-	-	+	
		O159:H49	1	+	-	-	+	
		OR ^S :H12	1	+	-	-	+	E 1 (5.3)
		O29:H27	1	+	+	+	-	
O167:H4	1	-	+	-	-	F 2 (10.5)		
O167:H32	1	-	+	-	-			
		Total	19 (21.8)	17 (89.5)	3 (15.8)	5 (26.3)	8 (42.1)	

*NM: No móvil.

^SOR: Antígeno somático rugosa.

^FH?: Antígeno flagelar no determinado.

La clasificación del grupo filogenético de las cepas controles de *E. coli* y *Shigella*, con un total de 31 cepas, mostró que el grupo predominante fue el grupo A (64.5 %), (Cuadro 10).

Cuadro 10. Grupos filogenéticos en cepas controles de *Shigella* y *E. coli*.

Procedencia	Identificación Bioquímica	Serotipo	Número de cepas	Genes de los grupos filogenéticos.				Grupo filogenético
				<i>arpA</i>	<i>chuA</i>	<i>yjaA</i>	<i>TspE</i>	N (%)
				N (%)				
NCTC	<i>Shigella</i>	<i>S. boydii</i> 1:NM*	1	1	0	0	0	A 20 (64.5)
		<i>S. boydii</i> 3:NM*	1	1	0	0	0	
		<i>S. boydii</i> 8:NM*	1	1	0	0	0	
		<i>S. boydii</i> 18:NM*	1	1	0	0	0	
		<i>S. dysenteriae</i> 3:NM*	1	1	0	0	0	
		<i>S. dysenteriae</i> 6: NM*	1	1	0	0	0	
		<i>S. dysenteriae</i> 11:NM*	1	1	0	0	0	
		<i>S. dysenteriae</i> 13:NM*	1	1	0	0	0	
	OR ^S : NM*	5	5	0	0	0		
	<i>E. coli</i>	O28ab:NM*	1	1	0	0	0	B1 6 (19)
		O29:H10	1	1	0	0	0	
		O58:H27	1	1	0	0	0	
		O124:H30	1	1	0	0	0	
		O144:NM*	1	1	0	0	0	
		O149K91:H10	1	1	0	0	0	
		O152: NM*	1	1	0	0	0	
	<i>Shigella</i>	OR ^S : NM*	1	1	0	0	1	E 3 (10)
	<i>E. coli</i>	O28ac:NM*	1	1	0	0	1	
		O121: NM*	1	1	0	0	1	
		EO167:H5	1	1	0	0	1	
O168:H16		1	1	0	0	1		
44037	1	1	0	0	1	ND[^] 2 (6)		
<i>E. coli</i>	O112ab:H18	1	1	1	0		1	
	O112ac:NM*	1	1	1	0		1	
	O143K:NM*	1	1	1	0	1		
<i>Shigella</i>	<i>S. boydii</i> 16: NM*	1	0	0	0	1	ND[^] 2 (6)	
<i>E. coli</i>	64474:H32	1	0	0	0	1		
		TOTAL	31	29 (93.5)	3 (9.7)	0	11 (35.5)	

*NM: No móvil.

^SOR: Antígeno somático rugosa.

[^]ND: No determinado

La Figura 3, muestra la electroforesis en un gel de agarosa de los amplicones de 16 de muestras, dos controles (control 1: *E. coli* K12 positiva para *ArpA* 400 pb y control 2: *E. coli* 116979 positiva para *chuA* 288 pb, *yjA* 211pb y *TspE* 152 pb) y un marcador de peso molecular, además del blanco.

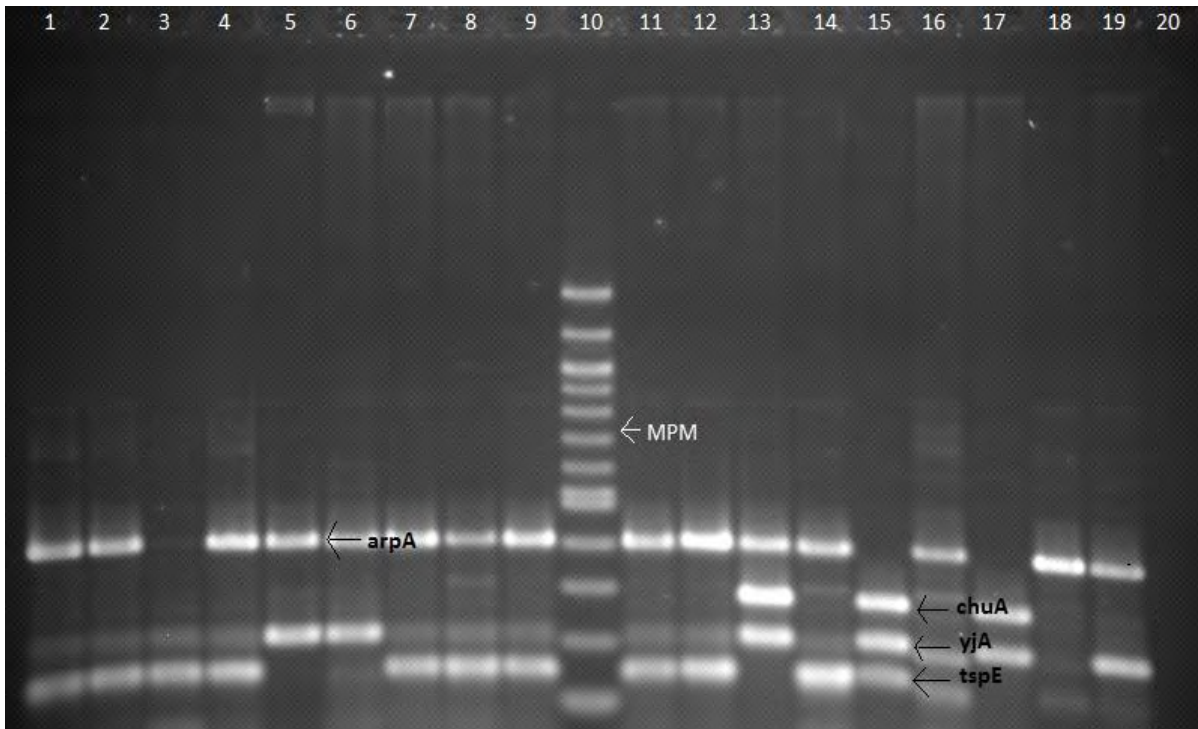


Figura 3. Electroforesis en geles de agarosa al 1.5 % de los amplicones para la agrupación filogenética. Carril 1-4 muestras: *E. coli* (93607, 93613, 93615 y 93617), carril 5 control 1 (*arpA*: 400pb), carriles 6-9 muestras: *E. coli* (93094, 45377, 45378 y 44210), carril 10 marcador de peso molecular (MPM), carriles 11-14 muestras: *E. coli* (44216, 44215, 69596 y 101254), carril 15 control 2 (*chuA* 288 pb, *yjA* 211 pb y *TspE* 152 pb), carriles 16-19 muestras: *E. coli* (116007, 99519, 43485 y 60801), carril 20 es el blanco. Los geles se fotografiaron en un fotodocumentador de imágenes BiosensSC805 Gel Imagine Systems.



5. Genes del operón de lactosa, citocromo oxidasa, glucoronidasa y de invasividad.

En general los resultados obtenidos para los genes *lacZ* y *lacY* en todas las cepas aisladas de diarrea infantil y animales 86 (98.8%) fueron positivas para el gen *lacZ* y *lacY*, en contraste con los controles de *Shigella* fueron negativas para estos mismos genes. Sin embargo se puede observar que los genes *uidA* y *cyd*, fueron identificados en 83 (95.4%) y 15 (100%) de las cepas de *E. coli* y *Shigella* respectivamente.

El análisis de genes para diferenciar cepas de *E. coli* y *Shigella* aisladas de diarrea infantil de México (55 cepas) , mostró la presencia de los genes *lacZ* (100 %), *uidA* (92.7 %), *cyd* (98.2 %), *lacY* (98.2 %) e *ipaH* (16.4 %) (Cuadro 11). Observando que el gen *ipaH* se identificó en 9 (16.4 %) de las cepas.

Cuadro 11. Genes para actividad metabólica y gen de invasividad en cepas de *E. coli* aislada de casos de diarrea infantil.

Procedencia	Grupo filogenético	Serotipo	Número de Cepas	Genes para la actividad metabólica				Gen de invasividad
				<i>lacZ</i>	<i>lacY</i>	<i>cyd</i>	<i>uidA</i>	<i>ipa H</i>
México 55 (63.22)	A 26 (47.27)	<i>S. dysenteriae</i> 11:NM*	1	+	+	+	+	+
		O32:H4	1	+	+	+	+	-
		O124:H11	1	+	+	+	+	-
		O152:NM*	1	+	+	+	+	-
		O153:H34	1	+	+	+	+	-
		O166:NM*	1	+	-	+	+	-
		O166:NM*	1	+	+	+	-	-
		O166:NM*	1	+	+	+	-	-
		O166:NM*	4	+	+	+	+	-
		O167:NM*	2	+	+	+	+	-
		O167:NM*	1	+	+	+	+	-
		OR ^S :H10	2	+	+	+	+	-
	OR ^S :H30	1	+	+	+	+	-	
	OR ^S :NM*	8	+	+	+	+	-	
	B1 23 (41.81)	O28ac:NM*	6	+	+	+	+	+
		O29:NM*	1	+	+	+	+	-
		O115:NM*	2	+	+	+	+	-
		O152:NM*	2	+	+	+	+	-
		O153:NM*	1	+	+	+	+	-
		O159:NM*	4	+	+	+	+	-
		O167:H5	4	+	+	+	+	-
	O167.H? ^F	3	+	+	+	+	-	
	B2 3 (5.45)	O112ac:NM*	1	+	+	+	+	+
		O153:H? ^F	1	+	+	-	-	-
		O119:H6	1	+	+	+	+	-
	I 2 (3.63)	OR ^S :NM*	1	+	+	+	-	-
		O143:NM*	1	+	+	+	+	-
E 1 (1.81)	OR ^S :NM*	1	+	+	+	+	+	
		Total	55 (100)	55 (100)	54 (98.2)	54 (98.2)	51 (92.7)	9 (16.4)

*NM: No móvil.

^SOR: Antígeno somático rugosa.

^FH?: Antígeno flagelar no determinado.

El mismo análisis de genes en las cepas de *E. coli* aisladas de diarrea infantil de Tailandia (13 cepas); en estas estuvieron presentes los genes *lacZ* (100 %), *uidA* (92.7 %), *cyd* (98.2 %), *lacY* (98.2 %) e *ipaH* (92.3 %) (Cuadro 12). Similarmente a las cepas de México el serotipo O28ac:NM presentó el gene *ipaH*. Por el hecho de que este serotipo fue el prevalente en este tipo de cepas se tuvo una mayor frecuencia del gen *ipaH*.

Cuadro 12. Genes para actividad metabólica y gen de invasividad en cepas de *E. coli* aislada de casos de diarrea infantil.

Procedencia	Grupo filogenético	Serotipo	Número de Cepas	Genes codificadores				Gen de invasividad
				<i>lacZ</i>	<i>lacY</i>	<i>cyd</i>	<i>uidA</i>	<i>ipa H</i>
Tailandia 13 (14.94)	^ND 1 (7.69)	O28ac:H5	1	+	+	+	+	-
	B1 12 (92.3)	O28ac:NM*	11	+	+	+	+	+
		O166:NM*	1	+	+	+	+	+
		Total	13 (100)	13 (100)	13 (100)	13 (100)	13 (100)	12 (92.3)

*NM: No móvil.

^ND: No determinado.

Con relación a las cepas de *E. coli* aislada de animales (19 cepas), en estas se identificaron los genes *lacZ* (100 %), *uidA* (94.7 %), *cyd* (100 %), *lacY* (100 %) e *ipaH* (5.3 %) (Cuadro 13).

Cuadro 13. Genes para actividad metabólica y gen de invasividad en cepas de *E. coli* aislada de animales.

Procedencia	Grupo filogenético	Serotipo	Número de Cepas	Genes codificadores				Gen de invasividad
				<i>lacZ</i>	<i>lacY</i>	<i>cyd</i>	<i>uidA</i>	<i>ipa H</i>
Animales 19 (20.69)	A	O153:H? ^F	1	-	+	-	+	-
		OR ^S :H7	1	+	+	+	+	-
		OR ^S :NM*	2	+	+	+	+	-
		O152:H? ^F	1	+	+	+	+	-
		O124:H43	1	+	+	+	+	-
		<i>S. boydii</i> 18:NM*	1	+	+	+	+	+
	B1	O166:H4	1	+	+	+	+	-
		O28ac:H? ^F	1	+	+	+	+	-
		O112ac:H7	2	+	+	+	+	-
		O112ac:H2	1	+	+	+	+	-
		124:H2	1	+	+	+	+	-
		O159:H49	1	+	+	+	+	-
		OR ^S :H2	1	+	+	+	+	-
	E	OR ^S :H12	1	+	+	+	+	-
		O29:H27	1	+	+	+	+	-
	F	O167:H4	1	+	+	+	+	-
O167:H32		1	+	+	+	+	-	
		Total	19 (100)	18 (94.73)	19 (100)	18 (94.73)	19 (100)	1 (5.26)

*NM: No móvil.

^SOR: Antígeno somático rugosa.

^FH?: Antígeno flagelar no determinado.

El mismo análisis de genes en las cepas controles de *Shigella* (15 cepas) mostró la presencia de los genes *uidA*, *cyd*, *lacY* e *ipaH* en todas las cepas (100 %), el gen *lacZ*, no se identificó y el gen *lacY* solo en una cepa (7.7 %) (Cuadro 14). Con respecto a controles de *E. coli* (16 cepas) los genes *uidA* y *cyd* se identificaron en todas las cepas (100 %), mientras que los genes *lacZ*, *lacY* e *ipaH* se identificaron en 17 (94.4 %), 13 (72.2 %) y 5 (38.5 %) cepas.

Cuadro 14. Genes del operón de lactosa y de invasividad en cepas de *Shigella* y *E. coli* controles de los ensayos.

Procedencia	Identificación Bioquímica	Serotipo	Número de Cepas	Genes del operón de lactosa y citocromo oxidasa y glucoronidasa.					Grupo filogenético N (%)
				<i>lacZ</i>	<i>lacY</i>	<i>cyd</i>	<i>uidA</i>	<i>ipaH</i>	
				N (%)					
Controles	<i>Shigella</i>	<i>S. boydii</i> 1 :NM*	1	0	0	1	1	1	A 20 (64.5)
		<i>S. boydii</i> 3:NM*	1	0	0	1	1	1	
		<i>S. boydii</i> 8:NM*	1	0	0	1	1	1	
		<i>S. boydii</i> 18:NM*	1	0	0	1	1	1	
		<i>S. dysenteriae</i> 3:NM*	1	0	0	1	1	1	
		<i>S. dysenteriae</i> 6:NM*	1	0	0	1	1	1	
		<i>S. dysenteriae</i> 11:NM*	1	0	0	1	1	1	
		<i>S. dysenteriae</i> 13:NM*	1	0	0	1	1	1	
		OR ⁵ :NM*	1	0	1	1	1	1	
	OR ⁵ :NM*	4	0	0	4	4	4		
	<i>E. coli</i>	O29:H10	1	1	1	1	1	0	
		O124:NM*	1	1	0	1	1	1	
		OR ⁵ :H27	1	1	1	1	1	0	
		OR ⁵ :H9	1	1	1	1	1	0	
		O144:NM*	1	1	0	1	1	1	
		O149:H10	1	1	1	1	1	0	
		O152:NM*	1	1	0	1	1	1	
		OR ⁵ :NM*	1	1	0	1	1	1	
	<i>Shigella</i>	OR ⁵ :NM*	1	1	0	1	1	1	B1 6 (19.3)
		<i>E. coli</i>	O121:NM*	1	1	1	1	1	
O28ac:NM*			1	1	1	1	1	0	
O168:H16			1	1	1	1	1	0	
44037:NM*			1	1	1	1	1	0	
O167:H5	1	1	1	1	1	0			
<i>Shigella</i>	<i>S. boydii</i> 16:NM*	1	0	0	1	1	1	ND [^] 2 (6.4)	
<i>E. coli</i>	64474:H32	1	1	1	1	1	0	E 3 (9.7)	
	OR ⁵ :NM*	1	1	1	1	1	0		
		O112ac:NM*	1	1	1	1	1	0	

*NM: No móvil.

⁵OR: Antígeno somático rugosa.

[^]ND: No determinado

La Figura 4, muestra la electroforesis en un gel de agarosa de 17 muestras, y el control 1: *E. coli* H10407 positiva para los genes *lacZ* 264 pb, *uidA* 319 pb, *cyd* 393 pb y *lacY* 463 pb.

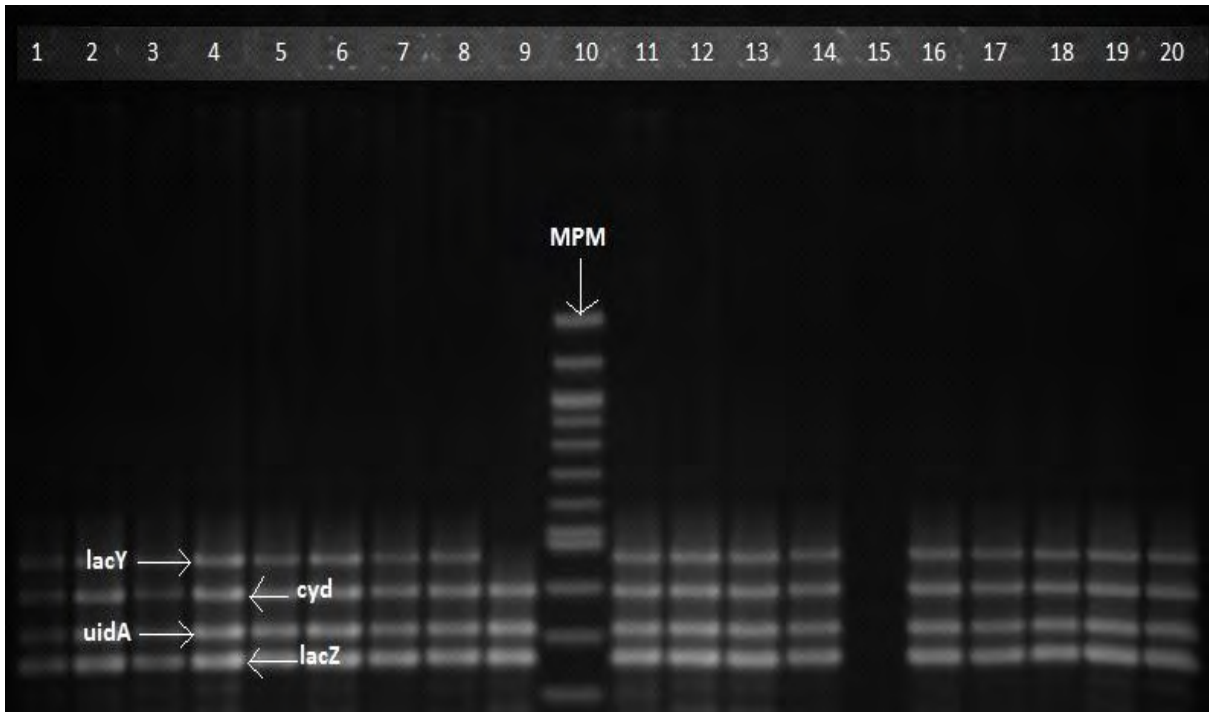


Figura 4. Electroforesis en geles de agarosa al 1.5 % de los amplicones *lacZ*, *uidA*, *cyd* y *lacY*. Carril 1-3 muestras: *E. coli* (95211, 111959 y 99105), carril 4 control 1 (*lacZ* 264 pb, *uidA* 319 pb, *cyd* 393 pb y *lacY* 463 pb), carriles 5-9 muestras: *E. coli* (90721, 93202, 69592,103312 y 192322) carril 10 marcador de peso molecular (MPM), carriles 11-14 muestras: *E. coli* (99119, 93057, 93605 y 93606), carril 15 blanco, carriles 16-20 muestras: *E. coli* (93094, 92200, 99074, 111347 y 95980). Los geles se fotografiaron en un fotodocumentador de imágenes BiosensSC805 Gel Imagine Systems.

La Figura 5, muestra la electroforesis en un gel de agarosa de 16 de muestras, control 1: *S. dysenteriae* 3 positiva para el gen *ipaH* 187 pb y control 2: *E. coli* 87780 O42 positiva para *lacY* 241 pb y un marcador de peso molecular, además del blanco.

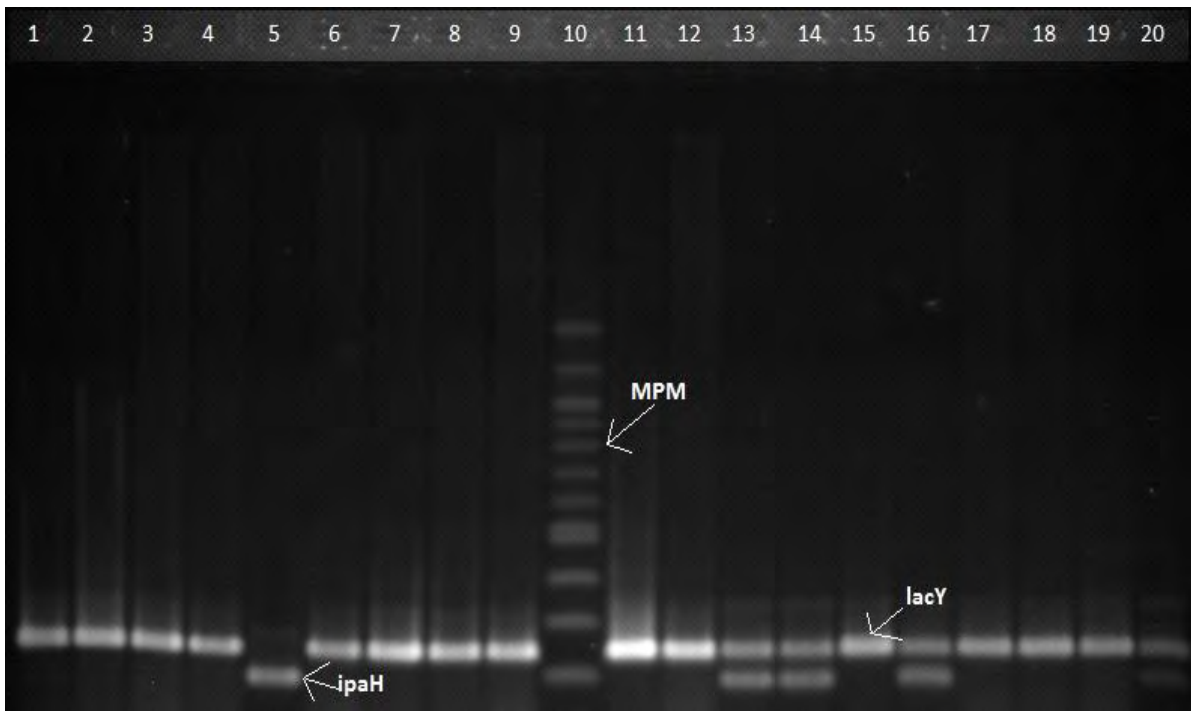


Figura 5. Electroforesis en geles de agarosa al 1.5 % de los amplicones de *ipaH* y *lacY*. Carril 1-4 muestras: *E. coli* (95211, 115418, 90457, y 103312), carril 5 control 1 (*ipaH* 187pb), carriles 6-9 muestras: *E. coli* (92512, 92514, 99105 y 99119), carril 10 marcador de peso molecular (MPM), carriles 11-14 muestras: *E. coli* (99893, 99895, 100759 y 100758), carril 15 control 2 (*lacY* 241pb), carriles 16-20 muestras: *E. coli* (94568, 45365, 67199, 67204 y 94567). Los geles se fotografiaron en un fotodocumentador de imágenes BiosensSC805 Gel Imagine Systems.

6. Resistencia a antimicrobianos.

El análisis de la sensibilidad a los antimicrobianos mostró que de las 87 cepas de *E. coli*, 45 (51.7%) presentaron resistencia a uno o más antimicrobianos, de las cuales 32 cepas fueron de México, 1 cepa de Tailandia y 12 cepas de animales. Dentro de estas, 36 (80%) cepas fueron resistentes a tetraciclina, 13 (28.9%) a ácido nalidíxico; 12 (26.7%) cepas a trimetroprim sulfametoxazol y las demás cepas tuvieron un porcentaje igual o menor a 6.6% de resistencia a alguno de los otros antibióticos. Por otra parte, para las 16 cepas control de *E. coli*, únicamente 5 (31.2%) cepas presentaron algún tipo de resistencia y en mayor porcentaje con 2 (40%) cepas resistentes fueron los antimicrobianos CAZ y ATM; con respecto a *Shigella* (15 cepas), únicamente 1 cepa presentó resistencia a TE (Cuadro 15).

Cuadro 15. Patrones de resistencia a los antimicrobianos en cepas control de *Shigella* y *E. coli*.

Clase de antimicrobiano	Antimicrobiano	Cepas control	Cepas aisladas
		<i>E.coli</i> (n=5)	<i>E. coli</i> (n= 45)
Tetraciclina	TE 30	0	36
Trimetroprim/ Sulfametoxazol	SXT	1	12
Fluoroquinolonas	CIP 5	1	3
	NA 30	1	13
	OFX 5	1	2
	NOR 10	1	3
	CAZ 30	2	3
	FEP 30	1	2
Cefalosporinas	CTX 30	1	1
	CRO 30	1	2
	FOX 30	1	2
β -lactámico	ATM 30	2	3

Los resultados de las cepas aisladas de diarrea infantil de México que presentaron resistencia a los antimicrobianos utilizados, mostraron que hay al menos una cepa con resistencia (Cuadro 16).

Cuadro 16. Resistencia a antimicrobianos en cepas de *E. coli* aislada de casos de diarrea infantil.

Origen	Serotipo	Número de cepas	Penicilina/ inhibidor de b- lactamasa	Cefalosporinas				Fluoroquinolonas				Tetraciclina	Trimetoprim/ Sulfametoxazol	Número de antimicrobianos resistentes	
			ATM	FOX	CAZ	FEP	CRO	NA	OFX	NOR	CIP	TE	STX		
México 32(58.2)	O152:NM*	1											1		1
	O166:NM*	4											4		1
	O167:H? ^F	1											1		1
	O153:NM*	1											1		1
	O167:NM*	1											1		1
	O28ac:NM*	5											5		1
	OR ^S :NM*	2											2		1
	O112ac:NM*	1											1		1
	O167:H5	1											1		1
	O153:H? ^F	1												1	1
	O159:NM*	3						3							1
	O166:NM*	1											1	1	2
	O167:NM*	1											1	1	2
	OR ^S :NM*	2											2	2	2
	OR ^S :H30	1											1	1	2
	OR ^S :NM*	1									1		1		2
	O28ac:NM*	1		1					1				1		3
	O29:NM*	1							1	1	1	1			4
	O166:NM*	1						1					1	1	3
O167:NM*	1	1		1	1							1	1	5	
<i>S. dysenteriae</i> 11:NM*	1											1			
Total	32 (58.2)	1 (3.1)	1 (3.1)	1 (3.1)	1 (3.1)	1 (3.1)	1 (3.1)	5 (15.6)	1 (3.1)	6 (6.2)	1 (3.1)	27 (84.4)	8 (25)		

*NM: No móvil.

^SOR: Antígeno somático rugosa.

^FH?: Antígeno flagelar no determinado.

Los resultados de las cepas aisladas de diarrea infantil provenientes de Tailandia que presentaron resistencia a los antibióticos utilizados, mostraron que una cepa presentó resistencia a TE (Cuadro 17).

Cuadro 17. Resistencia a antimicrobianos en cepas de *E. coli* aislada de casos de diarrea infantil.

Origen	Serotipo	Número de cepas	Tetraciclina	Número de antimicrobianos resistentes
			TE	
Tailandia 1(7.7)	O28ac/NM*	1	1	1
		1(7.7)	1(100)	

*NM: No móvil.

Los resultados de las cepas aisladas provenientes de animales que presentan resistencia a algunos de los antimicrobianos utilizados, mostraron que al menos una cepa presento resistencia (Cuadro 18).

Cuadro 18. Resistencia a antimicrobianos en cepas de *E. coli* de bovinos.

Origen	Serotipo	Número de cepas	Penicilina/ inhibidor de b-lactamsa	Cefalosporinas					Fluoroquinolonas				Tetraciclina	Trimethoprim/ Sulfamethoxazole	Número de antimicrobianos resistentes		
			ATM	FOX	CAZ	FEP	CRO	NA	OFX	NOR	CIP	TE	STX	CTX			
Animales 12 (63.1)	O29/H27	1							1	1	1	1	1	1		6	
	O124/H2	1										1				1	
	O124/H43	1							1							1	
	O152/H ^F	1							1				1			2	
	O153/H ^F	1	1		1		1	1								4	
	O159/H49	1										1				1	
	O167/H4	1							1			1				2	
	O167/H32	1							1			1				2	
	OR ^S /NM*	1		1					1	1			1	1			4
	OR ^S /H2	1											1				1
	OR ^S /H12	1	1		1	1			1			1		1	1		6
<i>S. boydii</i> 18/NM*	1											1				1	
		12 (63.1)	2 (16.7)	1 (8.3)	2 (16.7)	1 (8.3)	1 (8.3)	8 (66.7)	1 (8.3)	1 (8.3)	2 (16.7)	8 (66.7)	4 (33.3)	1 (8.3)			

*NM: No móvil.

*H?: Antígeno flagelar rugosa.

*OR: Antígeno somático rugosa.



VIII. DISCUSIÓN.

El estudio se enfocó principalmente a la caracterización fenotípica y genotípica de cepas de *E. coli* aisladas de casos de diarrea en niños menores de cinco años de México, Tailandia y cepas aisladas de hisopo rectal de bovinos lecheros. En las cepas analizadas se estableció la identificación bioquímica, el serotipo y la determinación del patotipo EIEC, además del patrón de resistencia a los antimicrobianos.

En la primera fase del estudio, se obtuvo el perfil bioquímico de cada una de las cepas, con el análisis de las pruebas bioquímicas se pudo observar que la característica más importante para diferenciar a *Shigella* y *E. coli* fue la fermentación de carbohidratos (lactosa, sorbitol, maltosa, rafinosa y xilosa). En el caso de las cepas de *E. coli*, fermentaron estos carbohidratos y en relación a cepas de *Shigella* estas no utilizaron los carbohidratos mencionados, inclusive no fermentaron lactosa característica importante que se utiliza para diferenciar entre estas dos enterobacterias (46).

Con respecto a la tipificación serológica se logró identificar 63 (72.4%) cepas como pertenecientes al patotipo EIEC, en las cuales se determinaron 8 serotipos diferentes, siendo estos O28ac:NM, O124:NM, O136:NM, O152:NM, O167:NM, O167:H5, *S. dysenteriae* 11 y *S. boydii* 18, mientras que 24 (27.6%) cepas fueron identificadas con un serotipo diferente a EIEC. Además 55 (63.2%) cepas fueron inmóviles, esta última característica que comparten EIEC y *Shigella*, aunque una proporción importante de las cepas (36.8%) presentaron movilidad. Los serotipos identificados (O28ac:NM, O124:NM, O136:NM, O152:NM, O167:NM, O167:H5, *S.*



dysenteriae 11 y *S. boydii* 18) corresponden al patotipo EIEC reportados previamente por diferentes autores (29).

La realización de la tipificación serológica permitió, observar la presencia de reacciones antigénicas cruzadas, en dichas reacciones cruzadas se establecieron títulos similares o cercanos a los que experimentalmente se determinaron en los serogrupos de *Shigella*, tal fue en el caso de los siguientes serogrupos, que además tuvieron correspondencia con las reacciones cruzadas reportados por diferentes autores y con la literatura consultada (29, 45): O124 presentó reacción cruzada con *S. dysenteriae* 3, O112ab con *S. boydii* 15, O112ac con *S. dysenteriae* 2, O29 con *S. dysenteriae* 11, O38 con *S. dysenteriae* 8, O7 con *S. boydii* 12, O53 con *S. boydii* 4, O49 con *S. boydii* 15, O167 con *S. boydii* 3, O143 con *S. boydii* 8. Por otro lado los serogrupos O166 y O32 presentaron reacción cruzada con *S. boydii* 14; O152 con *S. boydii* 4 y O153 con *S. dysenteriae* 12, esta últimas reacción antigénicas cruzadas no se encontraron reportados en la literatura, por lo que es importante señalar en este estudio la existencia de dichas reacciones cruzadas. Las reacciones antigénicas cruzadas entre ambos géneros de enterobacterias, es lo que dificulta diferenciar entre estos grupos, debido a que presentan una similitud antigénica y en particular cuando el serotipo presenta antígenos idénticos a los de *Shigella*, como fue el caso de dos cepas identificadas como *E. coli*, pero con antígeno somático similar a los de *S. dysenteriae* 11 y *S. boydii* 18.

Para ubicar las cepas en grupos filogenéticos de acuerdo a sistemas reportados previamente (31,32), se utilizaron cuatro marcadores genéticos *arpa*, *chuA*, *yjaA* y



TspE, con este sistema se determinan los grupos denominados A, B1, B2, E, F, C y I, además de otros grupos definidos como desconocidos o no determinado (ND): Con el sistema mencionado, 34 (39%) de las cepas se clasificaron dentro del grupo A y en el grupos B1 se ubicaron 43 (49.4%) cepas. Cabe mencionar que estudios con cepas de *E. coli* que se ubican en estos dos grupos se les define como cepas comensales (47). Una característica importante de las cepas comensales de *E. coli* es que presentan menos factores de virulencia y un genoma de menor tamaño. En contrastes con las cepas denominadas como patógenas, presentan un mayor número de factores de virulencia, que se encuentran principalmente en los grupos B2 y D (48). En nuestro estudio se encontró que un grupo reducido de cepas pertenecieron a estos grupos. Sin embargo, aunque las cepas del estudio se ubicaron principalmente en los grupos A y B1, estos se reportan como propios del intestino de los animales e inclusive de los humanos, en los cuales se ubican cepas productoras de la toxina Shiga (Stx), patógenos importantes en los humanos (48).

Como se refirió previamente, la tipificación serológica, debido a la existencia de reacciones antigénicas cruzadas presenta dificultades para diferenciar entre cepas de *Shigella* y *E. coli*, en particular con EIEC. Sin embargo, varios estudios proponen el uso de los genes *lacY*, *lacZ*, *uidA* y *cyd* para diferenciar entre *E. coli* y *Shigella* (34,49). Al respecto, en este estudio las cepas de *Shigella* carecieron de los genes *lacY* y *lacZ*, en contraste con lo anterior, *E. coli* tuvo variabilidad, aunque prevalecieron las cepas que presentaron ambos genes. En común *Shigella* y EIEC, comparten los genes *uidA* y *cyd*, mientras que el gen de *ipaH* de invasividad



estuvo presente únicamente en cepas EIEC y *Shigella*. Con la presencia y la identificación de este gen se llevó a cabo la determinación del patotipo de las cepas, con dicho análisis se encontró que una parte importante de las cepas (25%) se clasificaron propiamente como EIEC

La resistencia de las bacterias a los antimicrobianos se ha incrementado, no sólo por el abuso de la aplicación o incumplimiento de la dosis prescrita, sino también, en otro contexto más amplio, por la falta de medidas de higiene que da lugar a una mayor frecuencia de infecciones (presentes de manera crítica en comunidades marginadas); por ello, fue importante realizar el análisis de la resistencia a los antimicrobianos de las cepas de *E. coli* aisladas de diarrea infantil y animales, en dicho análisis se encontró que el 51.7 % de las cepas presentaron resistencia a uno o más de los antimicrobianos incluidos en el estudio de sensibilidad. De estas el 77.8% de las cepas presentaron resistencia a TE precedido por SXT. Cabe mencionar que estudios previos (50), con cepa de *E. coli* de diferentes fuentes presentaron la misma tendencia de resistencia a Tetraciclina. Este antimicrobiano, actúa inhibiendo la síntesis de proteínas a nivel ribosomal impidiendo la unión de aminoácidos a la cadena proteica y la resistencia que presentan las bacterias indica el uso descontrolado de este antimicrobiano que se presenta en México. En algunos casos su empleo empírico de los antimicrobianos no recomendado en el tratamiento de diarrea infecciosa, además de su uso extensivo para la engorda de animales destinados al consumo humano.



IX. CONCLUSIONES.

1. El análisis del perfil bioquímico de las cepas de estudio a nivel de utilización de carbohidratos permitió diferenciar entre cepas de *E. coli* y *Shigella*.
2. Con la combinación específica de los antígenos O y H de las cepas se pudo agrupar en serotipos, los cuales pertenecieron al patotipo EIEC. La mayoría de las cepas de *E. coli* fueron inmóviles (carecen de flagelos) característica fenotípica que comparten con *Shigella*.
3. La tipificación serológica de las cepas permitió identificar reacciones cruzadas entre *Shigella* y *E. coli*. En 10 serotipos de *E. coli* se determinaron reacciones cruzadas con *Shigella*, que correlacionan con los reportados en la literatura. Así mismo se detectaron reacciones cruzadas de tres serotipos (O166, O32 y O152), no reportados en la literatura.
4. Se logró ubicar a las cepas en grupos filogenéticos, las cuales tuvieron correspondencia con las cepas de referencia utilizadas como controles, agrupándose principalmente dentro de los grupos filogenéticos A y B1 consideradas como cepas comensales.
5. Los genes de virulencia *cyd* y *uidA* (presencia de β -glucoronidasa) se presentaron en *E. coli* y *Shigella* en la misma proporción; sin embargo, presentaron una variabilidad significativa con el gen *ipaH*, y con el cual se pudo diferenciar una cepa de *E. coli* típica de cepas EIEC y *Shigella*.

6. En las cepas del estudio se observó resistencia significativa a TE, NA y SXT, que pudiera estar relacionado con el empleo descontrolado y prescripción empírica de dichos antimicrobianos.

X.PERSPECTIVAS.

1. En México se tiene escasa información acerca de la prevalencia de las infecciones por EIEC y *Shigella*, por lo que se propone realizar estudios epidemiológicos para establecer su importancia en la etiología de las infecciones intestinales.

2. EIEC y *Shigella* se transmiten por medio del agua y alimentos contaminados, por lo que sería útil proponer un estudio de control de calidad de los alimentos para recomendar medidas preventivas de la transmisión de estos microorganismos.

3. Proponer el método utilizado de PCR con los iniciadores utilizados en el estudio para diferenciar cepas de EIEC y *Shigella* prevalentes en la población Mexicana.

4. Realizar pruebas de invasividad de las cepas EIEC y *Shigella* en cultivos celulares (HEp-2) para conocer sí presentan la capacidad invasividad en células epiteliales.



XI. BIBLIOGRAFÍA.

1. Bryce, J., Boschi-Pinto, C., Shibuya, K., Black, R. E., and WHO Child Health Epidemiology Reference Group. WHO estimates of the causes of death in children. *The Lancet*, 2005; 365: 1147-1152.
2. Kosek, M., Bern, C., and Guerrant, R. L. The global burden of diarrhoeal disease, as estimated from studies published between 1992 and 2000. *Bulletin WHO*, 2003; 81: 197-204.
3. Dirección General de Epidemiología (DGE). Anuarios de morbilidad. [En línea].; 2015 [citado 2015 Febrero 27]. Disponible en: <http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/anuario/html/anuarios.html>.
4. WHO, et al. Diarrhoea: Why children are still dying and what can be done. UNICEF, 2009; 58. Disponible en: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/44174/1/9789241598415_eng.pdf
5. Consejo de salubridad general, (GPC). Prevención, diagnóstico y tratamiento de la diarrea aguda en niños de dos meses a cinco años en el primero y segundo nivel de atención. (CMGPC): SSA-156-08. [En línea]; 2008 [citado por Secretaría de Salud, México 2008.]. Disponible en: http://www.cenetec.salud.gob.mx/descargas/gpc/CatalogoMaestro/156_GPC_ENFERMEDADDIARREICAAGUDAENNINOS/RERDiarreaAguda
6. Enterobacteriaceae (Enterobacteriaceae Subcommittee of the Nomenclature Committee of the International Association of Microbiological Societies, 1958).
7. Rompré, A., Servais, P., Baudart, J., de-Roubin, M. R., and Laurent, P. Detection and enumeration of coliforms in drinking water: current methods and emerging approaches. *J. Microbiol. Meth.*, 2002; 49: 31-54.
8. Walk, S. T., Alm, E. W., Calhoun, L. M., Mladonicky, J. M., and Whittam, T. S. Genetic diversity and population structure of *Escherichia coli* isolated from freshwater beaches. *Environ. Microbiol.*, 2007; 9: 2274-2288.
9. Speert, D.P. Antimicrobial resistance: implications for therapy of infections with common childhood pathogens. *Can. J. Infect. Dis.*, 1996; 7: 169.
10. Ewing, W. H.; Farmer, J., and Brenner, J. Proposal of Enterobacteriaceae fam. nov., nom. rev. to replace Enterobacteriaceae Rahn 1937, nom. fam. cons. (Opin. 15, *Jud. Comm.* 1958), which lost standing in nomenclature on 1 January 1980. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 1980; 30: 674-675.
11. Ewing, W.H. Edwards and Ewing's Identification of Enterobacteriaceae, 4th edition. Elsevier Science Publishing, Co., Inc., New York. 1986.
12. Nataro, J., and Kaper, J. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol. Rev.*, 1998; 11: 142-201.
13. Karper, J.B., Nataro, J.P., and Mobley H.L. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Rev. Microbiol.*, 2004; 2: 123-140.



14. Clements, A., Young, J.C., Constantinou, N., and Frankel, G. Infection strategies of enteric pathogenic *Escherichia coli*. *Gut Microbes*, 2012; 3: 71-87.
15. Torres, A. G. Current aspects of *Shigella* pathogenesis. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 2004; 46: 89-97.
16. DuPont, H.L., Levine, M.M., Hornick, R.B., and Formal, S.B. Inoculum size in shigellosis and implications for expected mode of transmission. *J. Infect. Dis.*, 1989; 159: 1126-1128.
17. Von Seidlein, L., Kim, D.R., Ali, M., Lee, H., Wang, X., Thiem, V.D., and Mason, C. A multicentre study of *Shigelladiarrhoea* in six Asian countries: disease burden, clinical manifestations, and microbiology. *PLoS Med*, 2006; 3: e353.
18. Li, Y., Cao, B., Liu, B., Liu, D., Gao, Q., Peng, X., and Wang, L. Molecular detection of all 34 distinct O-antigen forms of *Shigella*. *J. Med. Microbiol.*, 2009; 58 : 69-81.
19. Kotloff, K.L., Winickoff, J.P., Ivanoff, B., Clemens, J.D., Swerdlow, D.L., Sansonetti, P.J., and Levine, M.M. Global burden of *Shigella* infections: implications for vaccine development and implementation of control strategies. *Bulletin WHO*, 1999; 77: 651-666.
20. Parsot, C. *Shigella* spp. and enteroinvasive *Escherichia coli* pathogenicity factors. *FEMS Microbiol. Lett.*, 2005; 252: 11-18.
21. Sansonetti, P. J., d'Hauteville, H., Formal, S. B., and Toucas, M. Plasmid-mediated invasiveness of " *Shigella*-like" *Escherichia coli*. In *Annales de Microbiologie*. 1981; 133:351-355.
22. Lan, R., Alles, M.C., Donohoe, K., Martinez, M.B., and Reeves, P.R. Molecular evolutionary relationships of enteroinvasive *Escherichia coli* and *Shigella* spp. *Infect. Immun*, 2004; 72: 5080-5088.
23. Pupo, G.M., Lan, R., and Reeves, P.R. Multiple independent origins of *Shigella* clones of *Escherichia coli* and convergent evolution of many of their characteristics. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 2000; 97: 10567-10572.
24. Nataro, J.P., Bopp, C.A., Fields, P.I., Kaper, J.B., and Strockbine, N.A. *Escherichia*, *Shigella*, and *Salmonella*. In *Manual of Clinical Microbiology*, 2011; 10th Edition: 603-626. American Society of Microbiology, USA.
25. Silva, R.M., Toledo, M.R., and Trabulsi, L.R. Biochemical and cultural characteristics of invasive *Escherichia coli*. *J. Clin. Microbiol.*, 1980; 11 : 441-444.
26. Orskov, F. and Orskov. I. Serotyping of *Escherichiacoli*. *Meth. Microbiol. Academic. Press. Ltd, London* 1984; 14: 43-112.
27. Iguchi, A., Iyoda, S., Kikuchi, T., Ogura, Y., Katsura, K., Ohnishi, M., and Thomson, N. R. A complete view of the genetic diversity of the *Escherichia coli* O-antigen biosynthesis gene cluster. *DNA Research*, 2015; 22: 101-107.
28. Scheutz, F., Cheasty, T., Woodward, D. and Smith, H.R. Designation of O174 and O175 to temporary O groups OX3 and OX7, and six new *E. coli* O groups



- that include verocytotoxin-producing *E. coli* (VTEC): O176, O177, O178, O179, O180 and O181. *APMIS* 2004; 112: 569–584.
29. Cheasty, T., and Rowe, B. 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.*, 1983; 17: 681-684.
 30. Whittam, T., Ochman, H., and Selander, R. Multilocus genetic structure in natural populations of *Escherichia coli*. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 1983; 80: 1751-1755.
 31. Clermont, O., Bonacorsi, S., and Bingen, E. Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. *Appl. Microbiol.*, 2000; 66: 4555-4558.
 32. Clermont, O., Christeson, J., Denamur, E. and Gordon, D. The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylo-groups. *Environ. Microbiol. Rep.* 2013; 5: 58-65.
 33. Horáková, K., Mlejnková, H., and Mlejnek, P. Direct detection of bacterial faecal indicators in water samples using PCR. *Water Sci. Technol.*, 2006; 54: 135-140.
 34. Horakova, K., Mlejnkova, H. and Mlejnek, P. Specific detection of *Escherichia coli* isolated from water samples using polymerase chain reaction targeting four genes: cytochrome bd complex, lactose permease, β -d-glucuronidase, and β -d-galactosidase. *J. Appl. Microbiol.*, 2008; 105: 970–976.
 35. Schroeder, G., and Hilbi, H. Molecular pathogenesis of *Shigella* spp.: controlling host cell signaling, invasion, and death by type III secretion. *Clin. Microbiol. Rev.*, 2008; 21: 134-156.
 36. Hale, T.L. Genetic basis of virulence in *Shigella* species. *Microbiol. Rev.*, 1991; 55: 206-224.
 37. Demain, A., and Sanchez, S. Microbial drug discovery: 80 years of progress. *J. Antibiot.*, 2009; 62: 5-16.
 38. Meng, J., Zhao, S., Doyle, M., and Joseph, S. Antibiotic Resistance of *Escherichia coli* O157: H7 and O157: NM Isolated from Animals, Food, and Humans. *J. Food Protec.*, 1998; 61 : 1511-1514.
 39. Spellberg, B., Gidycz, R., Gilbert, D., Bradley, J., Boucher, H., Scheld, W., *et al.* The epidemic of antibiotic-resistant infections: a call to action for the medical community from the Infectious Diseases Society of America." *Clin. Infect. Dis.* 2008; 46: 155-164.
 40. Hooper, D. Mechanisms of action of antimicrobials: focus on fluoroquinolones. *Clin. Infect. Dis.*, 2001; 32 : S9-S15.
 41. Bado, I., García, V., Robino, L., Cordeiro, N., Seija, V., and Vignoli, R. Principales mecanismos de resistencia antibiótica, 1-11. Disponible en: <http://higiene1.higiene.edu.uy/DByV/Principales%20mecanismos%20de%20resistencia%20antibi%F3tica>.



42. Dever, L., and Dermody, T. Mechanisms of Bacterial Resistance to Antibiotics. *Arch. Intern. Med.*, 1991; 151: 886-895.
43. Barrow, G. and Feltham, R. *Cowan and Steel's Manual for the Identification of Medical Bacteria*, Cambridge University Press, 1993; 331. Available at: <https://www.cambridge.org/core/books/cowan-and-steels-manual-for-the-identification-of-medical> .
44. Islam, M.A., Heuvelink, A.E., Talukder, K.A., Zwietering, M.H., and De Boer, E. Evaluation of immunomagnetic separation and PCR for the detection of *Escherichia coli* O157 in animal feces and meats. *J. Food Protec.*, 2006; 69: 2865-2869.
45. Clinical and Laboratory Standard Institute. *Aproved standard M2-A10. (CLSI 2010): Performance standards for antimicrobial disk susceptibility test*, 10th ed. Wayne, Pa.
46. Ud-Din, A., and Syeda W. Relationship among *Shigella* spp. and enteroinvasive *Escherichiacoli* (EIEC) and their differentiation. *Braz. J. Microbiol.*, 2014; 45: 1131-1138.
47. Carlos, C., Pires, M., Stoppe, N.C., Hachich, E.M., Sato, M.I., Gomes, T.A., Amaral, L.A. and Ottoboni, L.M. *Escherichia coli* phylogenetic group determination and its application in the identification of the major animal source of fecal contamination. *BMC Microbiol.*, 2010; 10:161.
48. Girardeau, J., Dalmaso, A., Bertin, Y., Ducrot, C., Bord, S., Livrelli, V., and Martin, C. Association of Virulence Genotype with Phylogenetic Background in Comparison to Different Seropathotypes of Shiga Toxin-Producing *Escherichia Coli* Isolates." *J. Clin. Microbiol.*, 2005; 43: 6098–6107.
49. Pavlovic, M., Luze, A., Konrad, R., Berger, A., Sing, A., Busch, U., and Huber, I. Development of a duplex real-time PCR for differentiation between *E. coli* and *Shigella* spp. *J. Appl. Microbiol.*, 2011; 110: 1245-1251.
50. Rodríguez G. Relación antigénica entre *Shigella* y *E. coli* enteroinvasiva de diferentes zonas geográficas y su caracterización por métodos genotípicos. Tesis licenciatura 2016. Facultad de Química, UNAM.