



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA

**TESIS. DETERMINACIÓN DE GENES DE VIRULENCIA EN UNA POBLACIÓN DE
ESCHERICHIA COLI. COMENSAL AISLADA DE DOS NIÑOS DURANTE SUS PRIMEROS SEIS
MESES DE VIDA.**

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

PRESENTA

Luis Roberto Serrano García

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: Aurora Irma Ortegón Ávila

VOCAL: Profesor: Alejandro Camacho Cruz

SECRETARIO: Profesor: María del Rosario Morales Espinosa

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

2° SUPLENTE: Profesor: Tzvetanka Dimitrova Dinkova

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: FACULTAD DE MEDICINA UNAM. NUEVO EDIFICIO DE INVESTIGACIÓN. LABORATORIO DE GENÓMICA BACTERIANA

ASESOR DEL TEMA:

Dra. María del Rosario Morales Espinosa

SUPERVISOR TÉCNICO:

Dra. Gabriela Delgado Sapien

SUSTENTANTE

Luis Roberto Serrano García

Agradecimientos académicos.

Este trabajo de investigación fue apoyado por la Dirección General de Apoyo al Personal Académico, UNAM proyecto PAPIIT IN213816.

Indice.

Indice.....	5
1. Resumen.....	13
2. Marco Teorico.....	14
2.1. Microbiota humana.....	14
2.2. <i>Escherichia coli</i>	18
2.2.1. EPEC.....	19
2.2.1.1. Mecanismo de patogenicidad.....	20
2.2.1.2. Adherencia localizada.....	20
2.2.1.3. Transducción de señales.....	21
2.2.1.4. Adherencia estrecha.....	22
2.2.1.5. Toxinas.....	22
2.2.1.6. Genética de algunos factores de virulencia.....	22
2.2.1.7. Síntomas y consideraciones clínicas.....	23
2.2.2. ETEC.....	23
2.2.2.1. Mecanismo de patogenicidad.....	23
2.2.2.2. Factores de colonización.....	24
2.2.2.3. Toxina termolábil (LT).....	24
2.2.2.4. Toxina termoestable (ST).....	25
2.2.2.5. Genética de algunos factores de virulencia.....	26
2.2.2.6. Síntomas y consideraciones clínicas.....	27
2.2.3. EHEC.....	27
2.2.3.1. Mecanismo de patogenicidad.....	28
2.2.3.2. Toxina tipo Shiga.....	28
2.2.3.3. Toxina EAST1.....	29
2.2.3.4. Factores de adherencia intestinal.....	30
2.2.3.5. Transporte de Hierro.....	30

2.2.3.6. Factores de patogenicidad relacionados al plásmido pO157.....	30
2.2.3.7. Genética de algunos factores de virulencia.....	31
2.2.3.8. Síntomas y consideraciones clínicas.....	32
2.2.4. EAEC.....	33
2.2.4.1. Mecanismo de patogenicidad.....	34
2.2.4.2. Adherencia a la mucosa intestinal.....	34
2.2.4.3. Producción de toxinas y citotoxinas.....	35
2.2.4.4. Inflamación de la mucosa.....	37
2.2.4.5. Genética de algunos factores de virulencia.....	37
2.2.4.6. Síntomas y consideraciones clínicas.....	38
2.2.5. EIEC.....	38
2.2.5.1. Mecanismo de patogenicidad.....	39
2.2.5.2. Invasividad.....	39
2.2.5.3. Toxinas.....	41
2.2.5.4. Genética de algunos factores de virulencia.....	41
2.2.5.5. Síntomas y consideraciones clínicas.....	41
2.3. Transferencia Horizontal de Genes.....	41
2.3.1. Transformación.....	44
2.3.2. Conjugación.....	46
2.3.3. Transducción.....	47
2.3.4. Agentes de transferencia de genes.....	49
2.4. Dinámica genómica de <i>E. coli</i>	50
3. Justificación.....	51
4. Hipótesis.....	52
5. Objetivo general.....	53
6. Objetivos particulares.....	53
7. Materiales y métodos.....	54
7.1. Población de estudio.....	55

7.2. Conservación.....	55
7.2.1. Comprobación viabilidad de las cepas de <i>E. coli</i>	55
7.2.2. Aislamiento de <i>E. coli</i>	55
7.2.3. Conservación en gelosa especial y congelación.....	56
7.3. Fenotipificación.....	56
7.3.1. Morfología colonial.....	56
7.3.2. Pruebas bioquímicas.....	56
7.4. Genotipificación.....	57
7.4.1. Aislamiento de DNA bacteriano por método de GES.....	57
7.4.2. Aislamiento de DNA bacteriano por kit comercial.....	57
7.4.3. Determinación y estandarización de la concentración de DNA.....	58
7.4.4. Estandarización y condiciones de PCR de los genes de virulencia.....	58
7.4.5. Marcaje de los genes de virulencia.....	60
7.5. Diseño e impresión del macroarreglo.....	60
7.5.1. Diseño del macroarreglo.....	60
7.5.2. Impresión de la membrana.....	60
7.6. Hibridación.....	61
7.6.1. Prehibridación e hibridación.....	61
7.6.2. Lavados.....	61
7.6.3. Revelado.....	61
7.6.4. Análisis computacional.....	62
8. Resultados.....	63
8.1. Características generales.....	63
8.2. Determinación de los genes de virulencia presentes en cepas de <i>E. coli</i> aisladas de un niño sin episodios de diarrea durante sus primeros 6 meses de vida.....	63
8.3. Determinación de los genes de virulencia presentes en cepas de	

<i>E. coli</i> aisladas de un niño con episodios de diarrea durante sus Primeros 6 meses de vida.....	74
9. Discusión de resultados.....	87
9.1. Genes del patotipo ETEC en cepas comensales.....	87
9.2. Genes del patotipo EPEC en cepas comensales.....	89
9.3. Genes del patotipo EHEC en cepas comensales.....	90
9.4. Genes del patotipo EIEC en cepas comensales.....	91
9.5. Genes del patotipo EAEC en cepas comensales.....	92
9.6. Otros factores que pueden producir la diarrea.....	93
10. Conclusiones.....	95
11. Bibliografía.....	96
Apendice 1. Metodologías.....	109
Apendice 2. Medios de cultivo y soluciones.....	112
Apendice 3. Diseño del macroarreglo.....	120
Apendice 4. Determinación del punto de corte.....	121

Indice de tablas.

Tabla 2.1. Cambios importantes en algunos géneros que componen la microbiota humana.....	15
Tabla 2.2. CFA´s de cepas de ETEC humanas.....	24
Tabla 2.3. Diferentes genes de virulencia presentes en los diferentes patotipos de <i>E. coli</i> . Función y presencia del gen en elementos móviles.....	43
Tabla 7.1. Condiciones de PCR, iniciadores y tamaño del producto esperado para cada gen de virulencia.....	59
Tabla 8.1. Genotipos presentes en las poblaciones de <i>Escherichia coli</i> aisladas del segundo coprocultivo (12-October-1985).....	64
Tabla 8.2. Genotipos presentes en las poblaciones de <i>Escherichia coli</i> aisladas del tercer coprocultivo (9-1985).....	65
Tabla 8.3. Genotipos presentes en las poblaciones de <i>Escherichia coli</i> aisladas del cuarto coprocultivo (26-1985).....	66
Tabla 8.4. Genotipos presentes en las poblaciones de <i>Escherichia coli</i> aisladas del quinto coprocultivo (10-Diciembre-1985).....	67
Tabla 8.5. Genotipos presentes en las poblaciones de <i>Escherichia coli</i> aisladas del sexto coprocultivo (27-Diciembre-1985).....	68
Tabla 8.6. Genotipos presentes en las poblaciones de <i>Escherichia coli</i> aisladas del séptimo coprocultivo (15-Enero-1986).....	69
Tabla 8.7. Genotipos presentes en las poblaciones de <i>Escherichia coli</i> aisladas del octavo coprocultivo (25-Enero-1986).....	70
Tabla 8.8. Genotipos presentes en las poblaciones de <i>Escherichia coli</i> aisladas del noveno coprocultivo (10-Febrero-1986).....	71
Tabla 8.9. Genotipos presentes en las poblaciones de <i>Escherichia coli</i> aisladas del décimo coprocultivo (24-Febrero-1986).....	72
Tabla 8.10. Genotipos presentes en las poblaciones de <i>Escherichia coli</i> aisladas del undécimo coprocultivo (10-Marzo-1986).....	73

Tabla 8.11. Genotipos presentes en las poblaciones de <i>Escherichia coli</i> aisladas del primer coprocultivo del niño con episodios de diarrea (2-October-1985).....	74
Tabla 8.12. Genotipos presentes en las poblaciones de <i>Escherichia coli</i> aisladas del segundo coprocultivo donde existió el primer episodio diarreico (16-October-1985).....	75
Tabla 8.13. Genotipos presentes en las poblaciones de <i>Escherichia coli</i> aisladas del tercer coprocultivo (30-October-1985).....	76
Tabla 8.14. Genotipos presentes en las poblaciones de <i>Escherichia coli</i> aisladas del cuarto coprocultivo durante el segundo episodio diarreico (15-Noviembre-1985).....	77
Tabla 8.15. Genotipos presentes en las poblaciones de <i>Escherichia coli</i> aisladas del quinto coprocultivo donde existió el tercer episodio diarreico (27-Noviembre-1985).....	78
Tabla 8.16. Genotipos presentes en las poblaciones de <i>Escherichia coli</i> aisladas del sexto coprocultivo donde existió el cuarto episodio diarreico (2-Diciembre-1985).....	79
Tabla 8.17. Genotipos presentes en las poblaciones de <i>Escherichia coli</i> aisladas del septimo coprocultivo en donde ocurrió el quinto episodio diarreico (4-Diciembre-1985).....	80
Tabla 8.18. Genotipos presentes en las poblaciones de <i>Escherichia coli</i> aisladas del octavo coprocultivo (17-Diciembre-1985).....	81
Tabla 8.19. Genotipos presentes en las poblaciones de <i>Escherichia coli</i> aisladas del noveno coprocultivo (4-Enero-1986).....	82
Tabla 8.20. Genotipos presentes en las poblaciones de <i>Escherichia coli</i> aisladas del décimo coprocultivo (16-Enero-1986).....	83
Tabla 8.21. Cepas aisladas durante el mes de febrero con sus respectivos genotipos.....	84

Tabla 8.22. Genotipos presentes en las poblaciones de *Escherichia coli* aisladas del catorceavo coprocultivo (1-Abril-1986).....85

Tabla 8.23. Genotipos presentes en las poblaciones de *Escherichia coli* aisladas del quinceavo coprocultivo (18-Abril-1986).....86

Indice Figuras.

Figura 2.1. Predominancia de microorganismos en infantes de 6 semanas de nacido.....	17
Figura 2.2. Estructura tipo pedestal característica de la lesión de Adherencia y borrado (A/E).....	20
Figura 2.3. Fotomicrografía de íleon de un cerdo gnobiótico Alimentado con EAEC O42.....	34
Figura 7.1. Metodología empleada en este trabajo.....	54
Figura A1. Macroarreglo de los DNA's de las cepas aisladas de ambos niños.....	120
Figura A2. Hibridación de la membrana con la sonda <i>est1-a</i> ...	121
Figura A3. Imagen de la membrana ingresada al programa Bionumerics.....	122
Figura A4. Representación del área donde se medirá la intensidad luminosa.....	122
Figura A5. Establecimiento de los controles en el software....	123
Figura A6. Numeración de las muestras por analizar.....	123
Figura A7. Curva de calibración generada a partir de los controles.....	124
Figura A8. Simulación de la membrana para el gen <i>est1-a</i> por el programa Bionumerics.....	124
Figura A9. Valores numéricos obtenidos del programa Bionumerics.....	125

1. Resumen.

La microbiota natural del intestino contiene una gran diversidad de microorganismos los cuales ejercen una gran influencia sobre el estado de salud del hospedero, ya que llevan a cabo una gran variedad de reacciones metabólicas. Por ejemplo contribuyen a la síntesis de vitamina B12, vitamina K, ayudan al metabolismo de los ácidos biliares y síntesis de ácidos grasos de cadena corta. También se ha observado que la microbiota normal del intestino ayuda a la adaptación y maduración del sistema inmune ante ciertos agentes.

Escherichia coli es uno de los primeros microorganismos que se puede aislar de las heces de los recién nacidos y otros animales de sangre caliente. Esta bacteria suele formar parte de la microbiota natural del intestino de dichas especies. La adquisición de genes de virulencia a través de elementos móviles ha diferenciado a esta especie en 6 patotipos, que están relacionados con enfermedad diarreica. Los patotipos intestinales de *E. coli* se clasifican en: EPEC, ETEC, EIEC, EAEC, EHEC/STEC y DAEC dependiendo de los mecanismos de virulencia que poseen. Los genes que codifican para estos factores de virulencia suelen formar parte del genoma accesorio y pueden transferirse por transferencia horizontal a través de conjugación, transformación o transducción. El objetivo del presente trabajo fue caracterizar genéticamente una población de 309 cepas de *E. coli* comensales, aisladas de dos niños durante sus primeros 6 meses de vida, determinando la presencia de los principales genes de virulencia reportados en la literatura para cada patotipo de *E. coli* diarrogénico.

Metodología: Se construyó una macromembrana con los DNA's de cada cepa de *E. coli* y bajo un protocolo de hibridación se detectaron genes de virulencia utilizando como sonda los productos de PCR previamente marcados con digoxigenina de 15 genes presentes en 5 patotipos de *E. coli*.

Resultados: Se detectaron desde los primeros aislamientos genes de virulencia de los diferentes patotipos, donde predominaron genes de ETEC y EAEC; aislándose cepas durante los 6 meses.

Conclusión: La presencia de genes de virulencia en cepas de *E. coli*, no determina el estado clínico del niño.

2. Marco Teórico.

2.1. Microbiota humana.

Es bien sabido que el 90% de las células que están presentes en el cuerpo humano son células bacterianas (Candela, et al 2012). Estos microorganismos los podemos encontrar en diferentes partes del cuerpo como puede ser: tracto gastrointestinal, piel, región nasofaríngea, región bucal, área urogenital entre otras. El tracto gastrointestinal es sin duda la parte del cuerpo que posee mayor diversidad en especies bacterianas. En el podemos encontrar concentraciones de 10^{12} UFC/g de contenido intestinal (Candela, et al 2012). Estudios al gen 16S muestran que en el intestino hay 1000 especies diferentes de bacterias (Candela, et al 2012).

La microbiota juega un papel importantísimo en la salud y funcionamiento metabólico del hospedero ya que estos microorganismos ayudan en el metabolismo de algunos carbohidratos que son indigeribles para las enzimas humanas, produciendo ácidos grasos de cadena corta (propionato, acetato y butirato). Dichos metabolitos aportan el 10% de nuestro consumo total de calorías ya que son absorbidos por el colon y funcionan como nutrientes para los enterocitos (Surawicz. 2010). También se encarga de desconjugar sales biliares, reutilizar la urea, sintetizar aminoácidos, síntesis de vitamina B, K, de algunos cofactores y tiene un papel importante en el desarrollo del sistema inmune, a través de la activación y regulación de células T (Rook, G., Brunet, L. 2005), desarrollo del tejido linfoide asociado al intestino (GALT) (Kyung, Y., Mazmanian, S. 2010) y regulación de reacciones pro-inflamatorias (Ohnmacht, C., et al. 2011). Algunos estudios en ratones han mostrado que la microbiota también se encarga de sintonizar la respuesta del hospedero ante estímulos nocivos, además de que puede afectar la sinaptogénesis durante la respuesta cerebral (Heijtz, et al 2011). También ayuda a evitar la colonización de ciertos patógenos y que estos puedan expresar virulencia. Diferentes estudios han mostrado que un desbalance en la diversidad de la microbiota puede ocasionar obesidad y enfermedades relacionadas con ella.

De las 100 divisiones de bacterias que hay en el planeta solo 6 se encargan de colonizar el tracto gastrointestinal y en el adulto sano los podemos encontrar con una abundancia aproximada de: Firmicutes (65%), Bacteroidetes (25%), Actinobacteria (5%), Protobacteria (8%), Fusobacteria y Verrucomicrobia (1%). (Candela, et al 2012). En el adulto la microbiota que podemos encontrar está en géneros como: *Bacteroides*, *Eubacterium*,

Ruminococcus, *Clostridium*, *Butyrivibrio*, *Actinobacteria*, *Enterobacteria*, *Phascolarctobacterium*, *Verrucomicrobium*, *Sporomusa*, *Veillonella* y *Bifidobacterium* (Dore, Corthier 2010). Las proporciones de cada microorganismo pueden verse modificadas por: la región geográfica; ya que pueden existir otros microorganismos en dicha región que puedan interactuar en el tracto, o el cambio de dieta; ya que como se muestra en la tabla 2.1 la variación de un grupo de nutriente puede ocasionar cambios importantes en la composición de la microbiota y en consecuencia el desarrollo de alguna enfermedad. Aunque se debe tomar en cuenta que la microbiota del recién nacido es diferente.

Tipo de dieta o nutrientes	Respuesta de la microbiota
Dieta alta en almidones.	Aumenta la población de <i>Ruminococcaceae</i> , <i>Firmicutes</i> spp. <i>Eubacterium rectale</i> , el género <i>Roseburia</i> y <i>Oscillibacter valericigenes</i> .
Disminución de la ingesta de carbohidratos (dieta alta en proteínas).	Disminución de la población de <i>Firmicutes</i> spp, <i>Eubacterium rectale</i> , <i>Collinsella aerofaciens</i> . Aumento en la población de <i>Oscillibacter valericigenes</i> .
Alta en grasas	Aumento en <i>Bacteroidetes</i> y <i>Actinobacteria</i> . Disminución en <i>Firmicutes</i> y <i>Proteobacteria</i>
Alta en fibra	Disminución en <i>Bacteroidetes</i> y <i>Actinobacteria</i> . Aumento en <i>Firmicutes</i> y <i>Proteobacteria</i>
Alta en proteína animal, carbohidratos y azúcares simples	Asociado positivamente con <i>Bacteroidetes</i> y <i>Prevotella</i>

Tabla 2.1. Cambios importantes en algunos géneros que componen la microbiota humana normal modificar la dieta. Modificada de Candela, et al 2012.

Cuando el feto se está desarrollando dentro del útero materno, el tracto gastrointestinal se encuentra estéril. Pero al momento del nacimiento el sistema inmune aún no está desarrollado y los microorganismos pueden colonizar con cierta facilidad, pudiendo encontrar concentraciones de 10^{11} bacterias por gramo de heces (Dore, Corthier 2010). Las fuentes más importantes de bacterias para el infante provienen de la madre y del

ambiente. En el momento del nacimiento el primer contacto con bacterias se da cuando el recién nacido entra en contacto con la vagina de la madre, donde no existe mucha diversidad microbiana y podemos encontrar en su mayoría especies de *Lactobacillus* (Candela et al. 2012); esto siempre y cuando el nacimiento se dé por parto natural, porque si se da por cesárea no existe este primer contacto. Las primeras semanas después del nacimiento son cruciales para determinar la colonización del hospedero y es ahí donde el ambiente también juega un papel determinante. Existen una gran cantidad de reservorios microbianos tanto en el hospital o lugar donde se dio el nacimiento, como en el propio hogar del recién nacido; dándose así una exposición microbiana estocástica. Dos estudios (Fallaini 2010 y Sela 2010) muestran que la leche materna modifica la proporción de microorganismos del género *Bifidobacterium*, siendo esta la especie predominante en los primeros meses de vida con un 40% del total, después sigue *Bacteroides* con un 11.4%, las Enterobacterias con el 7.5%, *Clostridium coccooides* 5.5% mientras que *Clostridium perfringes* y *C. difficile* ocupan el 3%. (Fallaini 2010).

Esta tendencia no está dada para todos los infantes, ya que existen otros factores que determinan la proporción de microorganismos que colonizarán el tracto gastrointestinal. Por ejemplo el tipo de nacimiento como ya se mencionó anteriormente; o el hecho de que los infantes pueden estar en contacto con otro tipo de personas e incluso animales; también el país en el que nació, debido a factores geográficos e incluso a factores socioeconómicos. El hecho de que el menor haya nacido en un país desarrollado o de tercer mundo tiene implicaciones importantes, como puede ser: la higiene que existen en los hospitales y en el hogar del infante; la posibilidad de que el niño entre en contacto con animales de crianza, los cuales son portadores de algunas bacterias comensales diferentes a las que encontramos en humanos; o al hecho de que en los países desarrollados existen servicios básicos como: desagüe, agua potable, gas natural, lugares asfaltados, casas con techos y pisos adecuados.

Todas estas diferencias pueden ocasionar que la microbiota del infante pueda contener porcentajes de microorganismos muy diferentes a los presentados en la figura 2.1.

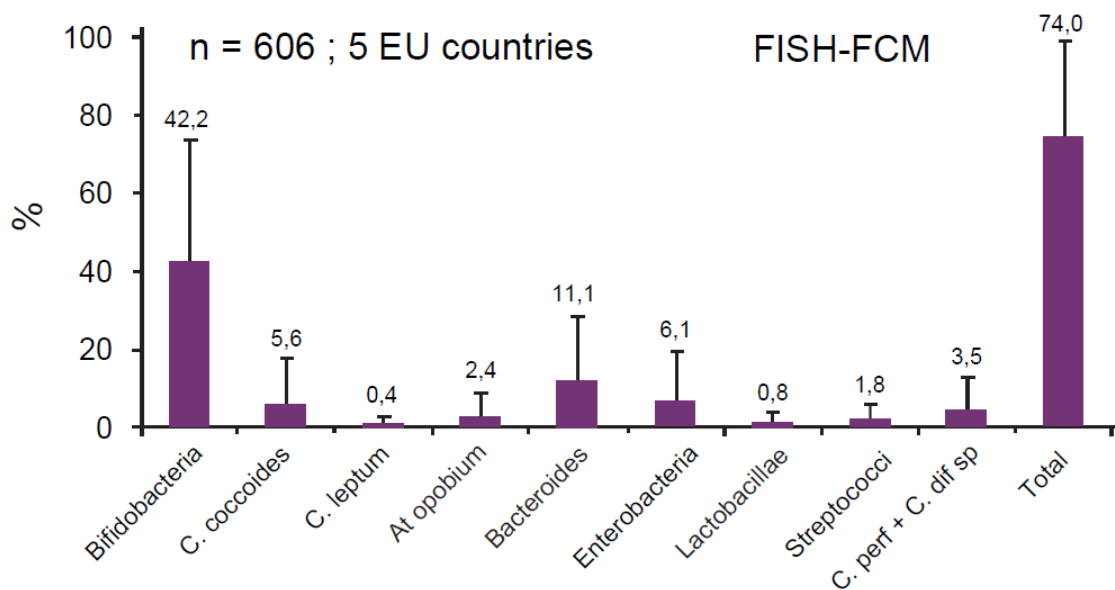


Figura 2.1. Predominancia de microorganismos en infantes de 6 semanas de nacido, editado de Dore, J., Corthier G. 2010.

Existen mecanismos o factores que pueden determinar si una bacteria puede ser capaz de colonizar o no el intestino, independientemente de que sea patógena o comensal. Algo muy importante es que la bacteria que quiera colonizar debe superar algunas barreras físicas y químicas del hospedero para llegar al intestino. El sistema inmune; la leche materna, la cual aportará ciertas inmunoglobulinas que servirán de protección para el infante; existe la mucosa, la cual es una importante barrera física para evitar la entrada de microorganismos; existen ciertos péptidos denominados defensinas, los cuales son secretados en el lumen y son producidas por las células de Paneth (Surawicz 2010) y se encargan de eliminar ciertas bacterias; los jugos gástricos, las enzimas pancreáticas y la motilidad intestinal sirven también como defensas para la entrada de cualquier microorganismo. Pero se debe considerar que en un recién nacido estas defensas no están del todo desarrolladas. Si una bacteria logra superar todo esto ahora debe lograr la adherencia a cualquier superficie del tracto gastrointestinal, para ello debe contar con adhesinas y/o fimbrias, o que pueda ser capaz de formar biofilms para poder mantenerse en las células intestinales y no sea desplazada por la motilidad y termine siendo eliminada en las heces.

2.2. *Escherichia coli*.

Esta bacteria es de las primeras que se encarga de colonizar el tracto gastrointestinal de los infantes, usualmente suele aparecer en las heces pocos días después del nacimiento (Nowrouzian, F 2003), puede estar presente en la sala de maternidad del hospital donde se da el nacimiento y se ha observado que si el infante permanece mucho tiempo en dicha área y además tiene mucho contacto con el personal médico puede haber una mayor cantidad de *E. coli* en el infante (Bettelheim, K. et al. 1974) Existen dos tipos de *E. coli* que colonizan, el primer tipo es capaz de permanecer durante varios meses y se le denomina cepa residente. Mientras que el otro solo puede durar algunas semanas en el intestino y se le conoce como cepa transitoria. La diferencia entre estos tipos radica en que las residentes son capaces de expresar fimbrias y se pueden adherir a las células epiteliales del colon (Nowrouzian, F 2003). En el estudio realizado por Nowrouzian (2003) se encontró que el 42% de los bebés fueron colonizados por *E. coli* durante los primeros 3 días de vida, y que sólo bastaron 2 semanas para que el 50% de los niños estudiados estuvieran colonizados. Este estudio fue realizado en Suecia, país que es considerado como desarrollado; esto significa que tienen reglas sanitarias más estrictas en los hospitales y tienen mayores servicios públicos. Por lo que la probabilidad de que este microorganismo colonice el tracto gastrointestinal es menor comparado con infantes de países en vías de desarrollo. Los estudios de Cravioto et al 1988, Nowrouzian, F., et al. 2003, Adlerberth, I., et al. 1998, Ochoa, T., et al. 2011 muestran que infantes de países en vías de desarrollo son colonizados por *E. coli* más rápidamente. En el estudio realizado por Nowrouzian, F. 2003 también se revisaron cuantas cepas diferentes de *E. coli* se encontraban por niño y se descubrieron que en promedio había 1.5 cepas de esta bacteria por niño. En países como Pakistán encontraron en promedio 8.5 cepas de *E. coli* por recién nacido, además de que todos los infantes del estudio adquirieron la bacteria durante la primer semana de vida (Adlerberth, I., et al. 1998). La comparación de estos estudios nos indica que existe una mayor probabilidad de que diferentes cepas de *E. coli* colonicen al bebé en sus primeros días de vida si éste se encuentra en un país en vías de desarrollo.

Las cepas de *Escherichia coli* son parte de la microbiota anaeróbica facultativa normal del tracto intestinal de los humanos y otros animales de sangre caliente (Doyle, M. 2002). Esta bacteria es un bacilo Gram negativo de la familia de los *Enterobacteriaceae* que puede recuperarse de heces usando medios selectivos como agar Mac Conkey o agar Eosina Azul de Metileno incubando a 37°C. La identificación se hace a través de reacciones bioquímicas ya sea con tubos individuales o usando kits comerciales. Las pruebas

positivas más representativas son: Lactosa (donde el 90% de las cepas da una reacción positiva), Indol positivo (99%) y Rojo metilo (95%); las pruebas negativas más representativas son Voges-Proskauer (95%), Citrato de Simmons (90%), Fenilalanina deaminasa (90%), Malonato (95%) y Gluconato (90%), la motilidad es variable con tendencia a ser positiva (Mac Faddin, 1991; Nataro, P., Kaper J. 1998). Se han podido tipificar a las cepas a partir de tres antígenos de superficie: el antígeno O (presente en el lipopolisacáridos), el antígeno H (flagelos) y el K (cápsula). La mayoría de las cepas de *E. coli* son comensales inofensivos, afectando solo a personas débiles e inmunocomprometidas o cuando las barreras gastrointestinales son violadas (Nataro, P., Kaper J. 1998), sin embargo existen algunas cepas que pueden provocar enfermedades diarreicas o de otro tipo.

Dichas cepas de *E. coli* patógenas, se pueden caracterizar según sus factores de virulencia, mecanismos de patogenicidad y sus serotipos; identificándose 9 diferentes patotipos: *E. coli* enteropatógenas (EPEC), *E. coli* enterotoxigénicas (ETEC), *E. coli* enteroinvasivas (EIEC), *E. coli* de adherencia difusa (DAEC), *E. coli* enteroagregantes (EAaggEC), *E. coli* enterohemorrágicas (EHEC) *E. coli* uropatógena (UPEC), *E. coli* causante de meningitis neonatal (MNEC) y *E. coli* adherente invasiva (AIEC) (Doyle, M. 2002, Croxen, M. et al. 2013 y Kaper, J. et al 2004).

2.2.1. EPEC.

La definición original de esta cepa es “*E. coli* diarreogénico que pertenece a serogrupos incriminados epidemiológicamente como patógenos pero cuyos mecanismos no se han demostrado que estén relacionados o con la toxina termolábil, o con la enterotoxina termoestable, o con capacidad invasora parecida a *Shigella*” (Doyle, M. 2002). Se ha demostrado que esta cepa induce las lesiones de adhesión y borrado A/E. Además puede poseer o no el plásmido EAF.

Este patotipo de *E. coli* tuvo gran importancia en el Reino Unido en el año de 1945 (Kaper. J., Nataro. J. 2004) por las altas tasas de mortalidad que se presentaron (del 25% al 50%). La infección causada por este microorganismo es muy común en infantes menores de 2 años, donde los bebés menores de 6 meses tienen mayor riesgo de presentar esta infección (Kaper. J., Nataro. J. 1998). En países en vías de desarrollo se han llegado a encontrar tasas de mortalidad de hasta el 30%. También se han presentado brotes que afectan a los adultos, como sucedió en Minnesota (Hedberg, C. et al. 1997) En países desarrollados este microorganismo puede presentarse en las salas de maternidad y

guarderías. La vía de transmisión de este patógeno es fecal-oral, pudiéndose encontrar en alimentos o el agua, incluso se ha podido aislar del polvo y se le puede encontrar en forma de aerosoles. En un estudio hecho a infantes menores de 2 años se encontró que existía un 20% de pacientes asintomáticos, donde el microorganismo fue aislado de las heces en los pacientes sanos (Levine, M., Edelman, R. 1984).

2.2.1.1. Mecanismo de patogenicidad.

Una de las principales características de la infección es la lesión de adherencia y borrado (A/E por sus siglas en ingles) que se caracteriza en un borrado de los microvellos del intestino y la bacteria se une fuertemente a la membrana celular epitelial del intestino. También existen cambios en el citoesqueleto de la célula epitelial la cual empieza a acumular actina polimerizada principalmente (también podemos encontrar α -actina, talina, ezrina y la cadena ligera de miosina), formando una estructura tipo pedestal debajo del microorganismo. Esta estructura tipo pedestal se extiende 10 μm por encima de la célula epitelial (Kaper. J., Nataro. J. 1998).

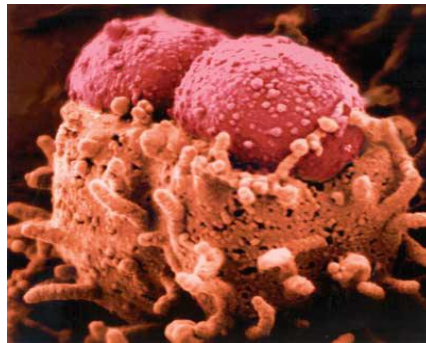


Figura 2.2. Estructura tipo pedestal característica de la lesión de adherencia y borrado (A/E.). Editado de (Kaper. J., Nataro. J. 2004).

El fenotipo de la lesión (A/E) no es exclusivo de EPEC, también se encuentra en otros microorganismos como: EHEC, *Hafnia alvei* y *Citrobacter freundii* biotipo 4280. Karper. (1998) estableció 3 etapas para explicar el mecanismo de patogenicidad de EPEC, los cuales consisten en: adherencia localizada, transducción de señales y adherencia estrecha.

2.2.1.2. Adherencia localizada.

Cravioto et al. 1979 describieron por primera vez la adherencia de EPEC a células HEp-2. Para que pueda existir adherencia se necesita la presencia de un plásmido de 60 MDa conocido como EAF (factor de adherencia de EPEC, por sus siglas en ingles).

Posteriormente Girón et al 1991, descubrieron una fimbria de 7 nm de diámetro que ocasionaba que EPEC tendiera a agregarse formando paquetes, por lo que sugirieron el nombre de BFP (pilus formador de paquetes por sus siglas en ingles) y está relacionado con la adherencia entre bacterias, aún no se sabe si esta fimbria está relacionada del todo con la unión entre bacterias y células epiteliales. El gen que codifica el BFP se conoce como *bfpA*. Para la regulación de la expresión y ensamble del BFP se requiere un clúster de 13 genes presentes en el plásmido EAF, la proteína que se encarga de regular globalmente la patogenicidad de EPEC (Per) y del gen cromosomal *dsbA*, la cual es una enzima periplásmica que ayuda a formar puentes disulfuro en proteínas que se están plegando.

2.2.1.3. Transducción de señales.

Los genes bacterianos encargados de la transducción de señales se encuentran en una isla de patogenicidad denominada locus de borrado de enterocito (LEE por sus siglas en ingles). La cual codifica un sistema de secreción tipo III (genes *sep* y *esc*), múltiples proteínas (genes *espA*, *espB* y *espD*) y una adhesina conocida como intimina (gen *eae*) (Kaper. J., Nataro. J. 1998). La infección con EPEC ocasiona un incremento en la concentración de Ca^{2+} intracelular, el cual proviene de depósitos sensibles al 1, 4, 5-inositol trifosfato (IP_3) de la propia célula o del exterior. Este aumento ocasiona cambios en el citoesqueleto, ya que existen proteínas dependientes de Ca^{2+} que se encargan de hidrolizar la actina. Además de esto el aumento de este ion inhibe la absorción del Na^+ y Cl^- provocando que este último ion sea secretado del enterocito, lo cual puede explicar la diarrea. La adherencia de EPEC también origina la fosforilación de diversas proteínas de las células epiteliales en sus residuos de Tirosina y Serina (Kaper. J., Nataro. J. 1998). La cinasa PKC (Cinasa de Proteínas C) induce cambios en la secreción de los electrolitos y el agua en el intestino, también se fosforila la subunidad ligera de la cadena de miosina ocasionando que aumente la permeabilidad de las uniones estrechas de los enterocitos, generando diarrea. Una de las proteínas que más se fosforila es la llamada Hp90 la cual tiene un peso de 90 kDa y se encuentra en la membrana celular, lo que hace inferir que esta proteína funge como receptor para la intimina.

La transducción de señales también ocasiona la migración de leucocitos polimorfonucleares (PMNs) lo cual solo se presenta cuando en las células intestinales están presentes organismos invasivos como *Salmonella* spp. (Mc Cormick, B. et al. 1993).

La unión de EPEC con la célula activa el factor de transcripción eucariótico NF- κ B, la cual regula la expresión de la citoquina IL-8 que a su vez es un quimio-atrayente de las PMNs.

2.2.1.4. Adherencia estrecha.

Como ya se mencionó anteriormente la proteína que se encarga de la adherencia estrecha entre EPEC y la célula epitelial es la intimina, la cual tiene un peso de 94-97 kDa y se codifica a partir del gen *eae*. Dicho gen lo podemos encontrar en otros microorganismos que son capaces de generar la lesión de A/E, de hecho la intimina de EPEC cepa E2348/69 y de EHEC O157:H7 cepa EDL933 tienen un 83% de identidad (Karper, J., Yu, J. 1992). La intimina por sí sola no es capaz de producir adherencia estrecha, necesita de una proteína receptora específica en la superficie de la célula epitelial (Tir); dicha proteína de 90 kDa necesita estar fosforilada en ciertas regiones donde hay residuos de Tirosina.

2.2.1.5. Toxinas.

Algunas cepas de EPEC son capaces de producir una toxina de bajo peso molecular termoestable denominada EAST1 (Savarino, S. et al. 1996). Dicha toxina fue descubierta primeramente en EAEC, el gen que se encarga de codificar esta proteína es conocido por *astA* y se han llegado a encontrar dos copias de este gen (uno en cromosoma y otro en plásmido) en algunas cepas de EPEC.

2.2.1.6. Genética de algunos factores de virulencia.

Para poder identificar a una cepa como EPEC hay que determinar algunos genes relacionados con la isla de patogenicidad LEE la cual se relaciona con el fenotipo de la lesión de A/E. Por ello para este estudio se analizará al gen *eaeA* el cual codifica para la intimina que conlleva a la adherencia estrecha. Aunque se debe considerar el hecho de que el patotipo de EHEC también es capaz de causar la lesión de A/E, por lo que, si alguna cepa da positivo para el gen de la intimina, hay que determinar si produce alguna de las toxinas tipo Shiga (genes *stx1* o *stx2*). Otra característica importante de las cepas de EPEC es la presencia o ausencia del plásmido EAF (denominadas EPEC típicas o atípicas respectivamente), para ello se analizarán los genes *bfpA* y *eaf*. El primer gen codifica para el pili formador de paquetes, el cual se encarga de la adherencia entre bacterias en un patrón característico. El segundo gen es utilizado para el diagnóstico del plásmido EAF, el cual es una zona característica de la mayoría de los plásmidos (Kaper, J., Nataro, J. 1998).

Se utilizan ambos genes porque hay ocasiones en las que se observan cepas que pueden tener el plásmido incompleto, y pueden dar positivo para el BFP y no dar reacción para la prueba EAF mientras que otras pueden dar positivo para el gen de EAF y no formen BFP (Croxen, M. et al. 2013).

2.2.1.7 Síntomas y consideraciones clínicas.

Como principales síntomas podemos encontrar: diarrea acuosa profusa, vómito y fiebre moderada; en algunos casos se llegan a presentar leucocitos fecales. (Kaper. J., Nataro. J. 1998). Al paciente se le deben suministrar sueros para controlar sus niveles electrolíticos y evitar una deshidratación El hecho de que se presente la lesión A/E puede provocar una mala absorción de nutrientes por el borrado de las microvellosidades, lo que puede provocar desnutrición y daños en el intestino, para esto se requiere que la infección dure mucho tiempo, y en dichos casos se debe suministrar nutrientes vía parental.

2.2.2. ETEC.

Principal causante de diarrea infantil en los países en desarrollo, causante de la diarrea del “viajero”. El periodo de incubación es relativamente corto (de 14 a 50 horas), pero se requiere de una dosis alta para que se presente una infección (10^8 UFC, en adultos) (Kaper. J., Nataro. J. 1998). En algunas regiones este microorganismo es endémico, se puede encontrar en pacientes asintomáticos y la gente residente suele presentar inmunidad ante ETEC. Las regiones donde existe mayor probabilidad de ser infectado es en lugares de clima caliente y se presenta en meses con lluvias y humedad debido a que el microorganismo puede reproducirse con mayor eficacia. La forma de transmisión es a partir de alimentos y agua, no se han reportado casos donde la transmisión sea de persona a persona. Según un estudio se cree que del 20% al 60% de los viajeros presentan diarrea, de estos, de un 20% a 40% presentan infección por ETEC. (Arduino, R, DuPont, H. 1993). Además de los viajeros los niños recién nacidos y las personas inmunocomprometidas tienen riesgo de presentar infección por este patotipo.

2.2.2.1 Mecanismo de patogenicidad.

Este patógeno debe primero colonizar y adherirse a la superficie mucosa del intestino delgado donde posteriormente produce una o más enterotoxinas, las más representativas son la toxina termolábil (LT) y la toxina termoestable (ST).

2.2.2.2 Factores de colonización.

Como se mencionó anteriormente, para que exista diarrea se requiere en primer lugar la colonización de la bacteria a la mucosa del intestino delgado. Para ello existen fimbrias, las cuales presentan diferentes morfologías y se pueden presentar más de un tipo en la misma célula. Se ha determinado una nomenclatura para poder distinguirlas y podemos encontrar los antígenos de colonización (CFA's), los antígenos de superficie de *coli* (CS) o los factores de colonización putativa (PCF). Los genes que codifican estos antígenos de colonización suelen encontrarse en plásmidos y los más comunes para ETEC suelen ser: CFAI, CFAll y CFAIV (Croxen, M. et al. 2013). La siguiente tabla muestra algunos ejemplos de estas fimbrias y que estructuras presentan.

Designación original	Designación CS	Diámetro (nm)	Designación original	Designación CS	Diámetro (nm)
Varillas rígidas			Fibrilar		
CFA/I	CFA/I	7	CS3	CS3	2-3
CS1	CS1	7	CS5	CS5	5
CS2	CS2	7	PCFO148	CS11	3
CS4	CS4	6	PCFO9	CS13	
PCFO159	CS12	7			
PCFO166	CS14	7	No fibrilares		
CS17	CS17	7	CS6	CS6	
PCFO20	CS18	7	2230	CS10	
CS19	CS19	7	8786	CS15	
CS20	CS20	7			
Formación paquetes					
CFA/III	CS8	7			
Longus	CS21	7			

Tabla 2.2. CFA's de cepas de ETEC humanas. Modificada de Kaper. J., Nataro. J. 1998

2.2.2.3. Toxina termolábil (LT).

Son toxinas oligoméricas que guardan cierta semejanza en estructura y función con la toxina CT de *Vibrio cholera*. Está codificada por los clúster de genes *elt*. Existen dos grupos: LT-I que se expresa en cepas de ETEC que infectan tanto humanos como animales y la LT-II que suele presentarse sólo en animales.

LT-I. Toxina oligomérica de 86 kDa que contiene una subunidad A de 28 kDa y 5 idénticas subunidades B de 11.5 kDa cada una. Las subunidades B están acomodadas de tal

manera que forman un anillo, el cual se encarga de unirse fuertemente al gangliosido de superficie celular GM₁ y también se une al GD1b, pero de manera más débil. Una vez anclada la toxina, la subunidad A es la encargada de llevar a cabo la actividad catalítica de la toxina, está formada por dos péptidos denominados A₁ y A₂. Para que ocurran sus efectos, la toxina debe ser endocitada a través de la célula, proceso en el cual participa el aparato de Golgi. El objetivo de esta toxina es la adenilato ciclasa, la cual se localiza en la membrana basolateral de las células epiteliales intestinales. El péptido A₁ contiene actividad ADP-ribosiltransferasa la cual se encarga de transferir un grupo ADP-ribosil a la subunidad α de la proteína de unión a GTP (G_S), ocasionando que permanezca activa la adenilato ciclasa. Estos cambios originan que incrementen los niveles intracelulares del AMP cíclico, aumentando la actividad de cinasas dependientes de AMP cíclico (cinasa A), que a su vez, fosforilan más de lo normal a los canales de Cl⁻ (el más común es el denominado CTRF que es un regulador de la conductancia membranal) presentes en el extremo superior de las membranas celulares epiteliales. La secreción del Cl⁻ produce la inhibición de la absorción de NaCl, ocasionando que haya un desbalance osmótico, por lo que la célula debe excretar agua, resultando en una diarrea osmótica.

LT-II. Esta toxina presenta de un 55% a un 57% de identidad respecto a LT-I y CT en la subunidad A, sin embargo la subunidad B no presenta homología respecto a las toxinas LT-1 y CT. Podemos encontrar dos variantes antigénicas para la LT-II, las cuales se conocen como LT-IIa y LT-IIb, las cuales comparten 71 y 66% de identidad respectivamente con las subunidades A y B de la toxina LT-II. El mecanismo de acción de esta toxina es similar a la que presenta LT-I, porque aumenta los niveles de AMP cíclico, con la diferencia de que LT-II usa como receptor mayoritario a GD1 en vez de GM₁.

2.2.2.4. Toxina termoestable (ST).

A comparación de las LT's esta toxina es monomérica y de bajo peso molecular, contiene múltiples residuos de cisteína que le permite generar enlaces disulfuro proporcionándole estabilidad a altas temperaturas. Existen dos grupos de toxinas ST (ST-a porcina y ST-b humanos); que difieren tanto en estructura como en mecanismo de acción. Los genes que codifican esta toxina se encuentran en plásmidos y se denominan *est1-a* y *est1-b* respectivamente, algunos de estos genes se han encontrado en transposones. Por si esto fuera poco, algunas cepas de ETEC son capaces de expresar también la EAST-1.

ST-a. Esta toxina no es exclusiva de cepas de ETEC, también la podemos encontrar en *Yersinia enterocolitica* y *Vibrio cholera* no O-1. Esta toxina guarda un 50% de identidad con

la toxina termoestable EAST-1 de EAEC (Kaper. J., Nataro. J. 1998). STa es expresada inicialmente como un precursor de 72 aminoácidos, la cual es hidrolizada por la peptidasa señal 1 formando un péptido de 53 aminoácidos. De esta forma viaja por el periplasma donde después la proteína DsbA (el gen que codifica dicha proteína se encuentra en el cromosoma bacteriano) se encarga de formar los puentes disulfuro. Para que al final una proteasa (que aún no está definida) se encargue de formar la toxina madura de 18 o 19 aminoácidos, la cual es excretada de la bacteria por medio de difusión a través de la membrana externa.

El receptor de ST-a es la enzima transmembranal llamada guanilato ciclasa C (GC-C), la cual se ubica en el ápice de la membrana de las células epiteliales. Existe una proteína de 15 aminoácidos que contiene 4 puentes disulfuro denominada Guanilina, la cual se cree, juega un rol importante en la homeostasis del intestino. La ST-a puede funcionar como un agonista para la Guanilina. Una vez que ST-a se ha unido con GC-C empiezan a incrementarse los niveles de GMP cíclico ocasionando el aumento en la actividad del canal de Cl⁻ CFTR, provocando la secreción de este ion de la célula. En comparación a las LT's la ST-a actúa más rápido debido a que el receptor se encuentra más próximo (ápice de la membrana) respecto al receptor de las LT's (membrana basolateral).

ST-b. Esta toxina fue aislada primeramente en cerdos pero algunas cepas aisladas de humanos son capaces de expresar esta proteína. Se sintetiza inicialmente como un precursor de 71 aminoácidos, la cual es procesada para formar una proteína madura de 48 aminoácidos y 5.1 kDa. A diferencia de ST-a, esta toxina causa daños en el epitelio intestinal, debido a que hay pérdida o daño en las microvellosidades. Otras diferencias importantes es que ST-b estimula la secreción de bicarbonato de las células y no de Cl⁻, no se conoce un receptor específico para la toxina, y no se estimula el incremento intracelular ni del AMP_c ni del GMP_c, estimulando el incremento del Ca²⁺ intracelular a partir de fuentes extracelulares.

2.2.2.5. Genética de algunos factores de virulencia.

Para poder identificar a un microorganismo como ETEC debemos observar uno o varios antígenos de factores de colonización (CFA's) así como las toxinas termolábil y termoestable, en conjunto o por separado. Como se mencionó anteriormente los CFA's más comunes son el I y II, por consiguiente se analizarán los genes respectivos *cfaI*, *CS1* *CS3* (en conjunto para CFAII) respectivamente. Para el caso de las toxinas se analizarán

los genes *eltA*, *est1a* y *est1b*, los cuales corresponden a la subunidad A de la toxina termolábil, toxina termoestable humana y toxina termoestable de cerdos respectivamente.

2.2.2.6. Síntomas y consideraciones clínicas.

La infección por ETEC suele causar diarrea leve o diarrea acuosa parecida a la que surge en el cólera, por lo que para esos casos se requiere de la ingestión de sueros para evitar una deshidratación. También suelen presentarse dolores de cabeza, fiebre, calambres abdominales, náusea y vómito (Croxen, M. et al. 2013). Cuando se trata de niños menores de dos años se pueden complicar los síntomas dependiendo del estado nutricional del infante. La diarrea suele durar de 3 a 5 días llegando a durar hasta 1 semana.

Para el tratamiento solo se recomienda mantener un buen equilibrio electrolítico y reposo. En casos donde hay complicaciones suelen recetarse drogas antisecretorias como la loperamida y se combinan con antibióticos como las fluoroquinolonas, azitromicina y rifamixina. Aunque se ha observado que existen cepas de ETEC que se han vuelto resistentes a la tetraciclina, trimetoprima-sulfametoxazola y ciprofloxacina.

2.2.3. EHEC.

Este microorganismo fue reconocido como patógeno en el año de 1982 por dos brotes en EUA que estuvieron relacionados con el consumo de carne para hamburguesa mal cocida y suele causar casos de disentería en países desarrollados, de hecho este microorganismo suele ser más común en países desarrollados que otros patotipos de *E. coli*. Esta infección causa la denominada colitis hemorrágica (HC) que se caracteriza por fuertes dolores abdominales, calambres, diarrea acuosa seguida de diarrea sanguinolenta (aproximadamente el 90% de los casos (Rotariu, O. et al. 2011)). También se puede presentar el llamado síndrome urémico hemolítico (HUS de 10 a 15% de los casos (Rotariu, O. et al. 2011) el cual causa falla renal, trombocitopenia y anemia microangiopática hemolítica (Nataro. J., Kaper. J. 1998). Este microorganismo puede hallarse como parte del tracto gastrointestinal del ganado y otros animales del campo, haciendo que la carne sea el principal vehículo de transmisión, aunque puede diseminarse por una gran variedad de alimentos como: vegetales, frutas, jugos de manzana sin pasteurizar, mayonesas, productos cárnicos fermentados, entre otros. Se puede dar la transmisión de persona a persona ya que la dosis infectiva es muy baja (100 a 200 células (Nataro. J., Kaper. J. 1998).

En un principio el microorganismo aislado de estos brotes se denominó *Escherichia coli* O157:H7 y se observó que este serotipo era capaz de producir una citotoxina que es semejante a la toxina de *Shigella dysenteriae* denominada Verotoxina, la cual provoca el HUS y es codificado por el gen *stx*. Este serotipo suele causar entre el 50 y el 80% de las infecciones por EHEC (Nataro. J., Kaper. J. 1998). Además las cepas O157:H7 son muy parecidas a las cepas de EPEC O55:H7 por lo que para que se pueda definir a una cepa como EHEC se requiere: que exprese alguno de los genes de *stx*, producir la lesión de adherencia y borrado de enterocitos (A/E) y poseer un plásmido de 60MDa; existen los “EHEC atípicos” que son cepas que no producen la lesión (A/E) y/o no poseen el plásmido de 60 MDa. Por otra parte pueden existir cepas de *Escherichia coli* que puedan poseer solamente el gen *stx*. A estos microorganismos se les conoce como STEC o VTEC y no todas estas cepas son patógenas (Nataro. J., Kaper. J. 1998).

2.2.3.1. Mecanismo de patogenicidad.

Al igual que en el caso de EPEC, este microorganismo es capaz de producir la lesión de A/E ya que puede poseer la isla de patogenicidad LEE la cual puede causar sus efectos en las primeras etapas de la infección, causando el aumento de los niveles de IP_3 y del Ca^{2+} intracelular. Aunque a diferencia de EPEC, este patógeno no es capaz de inducir la fosforilación de los residuos de Tirosina de las proteínas de las células epiteliales (las cuales tienen que ver con la adherencia íntima de la bacteria con la célula). Existe un cierto tipo de EHEC que no poseen el gen *eae* pero son capaces de aumentar los niveles de calcio intracelular, sin embargo no se puede observar la lesión A/E.

2.2.3.2. Toxina tipo Shiga.

Podemos encontrar dos grupos de esta citotoxina los cuales se conocen como Stx1 y Stx2. La toxina Stx1 es idéntica o presenta un solo residuo diferente a la toxina de *S. dysenteriae* (Stx) y se encuentra altamente conservado. Mientras que en el caso de Stx2 existen diferentes subgrupos los cuales son: Stx2c, Stx2d, Stx2d-activable, Stx2e y Stx2f (Fraser, M. et al. 2004), ya que estos presentan diferencias en su secuencia de aminoácidos.

Las Stx's pertenecen a la familia de las toxinas AB_5 donde encontramos una subunidad A (32 kDa) la cual presenta una región A_1 (28 kDa) donde se lleva a cabo la actividad catalítica de la toxina y la región A_2 (4 kDa) la cual se une por un puente disulfuro a la región A_1 con la finalidad de unir todo el complejo A con el pentámero de subunidades idénticas B (7.7 kDa c/u) las cuales a su vez se encargan de reconocer y unir a la toxina

con un receptor glicolipídico específico de la superficie celular denominado globotriaosilceramida (Gb₃). Una vez que ocurrió la unión toxina-célula se lleva a cabo la internalización, la cual está mediada por la formación de vesículas con revestimientos de clatrina, las cuales viajan en forma de endosomas al aparato de Golgi y posteriormente son enviadas al retículo endoplásmico donde tienen su actividad principal. La subunidad A actuará sobre la subunidad 60S ribosomal, A₁ que es translocada hacia el citosol contiene una N-glicosidasa que remueve un residuo de Adenina de la subunidad 28S, causando la inhibición de la síntesis de proteínas que a su vez provocará la muerte de las células endoteliales. La toxina no incrementa la secreción de Cl⁻ por lo que la presencia de diarrea se debe a otros mecanismos. Es probable que la toxina que se produce en el intestino pueda pasar a la circulación sanguínea ya que Stx puede atravesar la monocapa celular epitelial (aunque hasta el momento no se ha detectado Stx en la sangre de un paciente con HUS) (Nataro. J., Kaper. J. 1998), causando que todas las células que contengan altas concentraciones de Gb₃ puedan sufrir daño, dado que el tejido renal contiene grandes cantidades de Gb₃ hay afectaciones en el glomérulo que causan el estrechamiento de los capilares por la acumulación de fibrina y plaquetas, además de que hay una obstrucción de la microvascularización glomerular provocando que los eritrocitos se lesionen conllevando a una anemia. Todo esto en conjunto causa una disminución en la filtración glomerular provocando falla renal, la cual es fundamental para diagnosticar HUS.

Stx purificada puede inducir la expresión de citoquinas proinflamatorias, del factor de necrosis tumoral α (TNF- α) y de la interleucina 6 (IL-6). Estas últimas dos más el lipopolisacárido de la bacteria pueden inducir la expresión de más Gb₃ provocando que más Stx entre en las células y el daño sea más severo (Nataro. J., Kaper. J. 1998).

2.2.3.3. Toxina EAST1.

Esta toxina que fue descrita primeramente en cepas de EAEC también se ha llegado a encontrar en cepas de EHEC. En un estudio de Savarino, S. et al. 1996 se buscó la presencia del gen que codifica para la toxina EAST1 (*astA*) en diversos patotipos de *E. coli*. Para el caso de las EHEC O157:H7 las 75 cepas analizadas presentaban el gen y en la mayoría de los casos había dos copias de dicho gen en el genoma bacteriano. Para el caso de las STEC; 8 de 9 cepas O26:H11 presentaban el gen y 12 de 23 cepas que no pertenecen al serotipo O157 ni O26 contenían *astA*.

2.2.3.4. Factores de adherencia intestinal.

Además de la intimina (94-97 kDa) la cual es indispensable para producir la lesión A/E, pueden existir otras fimbrias y/o factores de adherencia que ayudan a EHEC a colonizar, ya que aunque la cepa pierda el gen *eae* puede seguir provocando diarrea sanguinolenta y HUS. Se han propuesto algunas adhesinas para explicar este fenómeno; un ejemplo sería una proteína de 362 kDa denominada ToxB la cual está codificada en un plásmido de 93 kb denominado pO157; también podemos encontrar a la proteína Efa-1 que está implicada en la adhesión de cepas de EHEC que no pertenecen al serotipo O157:H7 (Karper, J. Nataro, J. 2004). Además se pueden encontrar otros factores de adherencia como pueden ser: Eha, que es una proteína de autotransporte implicada en la formación de biofilms para la cepa O157:H7; Sab la cual es también una proteína de autotransporte, pero relacionada con cepas STEC; LpfAO113 que es una fimbria polar larga; Hcp que es un pili de *E. coli* hemorrágica; Elf que es un factor de adherencia ubicuo en *E. coli*; Sfp que es una fimbria relacionada con cepas de EHEC O157:H7 que son capaces de fermentar el sorbitol (Cadona, J. et al. 2013).

2.2.3.5. Transporte de hierro.

E. coli O157:H7 contiene un sistema especializado para el transporte de hierro para ello produce una proteína de membrana externa de 69 kDa la cual es codificada por el gen *chuA*, este gen se activa cuando el Fe^{2+} está limitado en el medio. Además de esta proteína se requieren de hemolisinas las cuales se encargan de lisar a los eritrocitos para que el grupo hemo salga y pueda ser captada por la bacteria. La producción de la toxina Stx1 se reprime por la presencia de Fe^{2+} en la bacteria mientras que la Stx 2 no reprime su producción ante este hecho (Nataro. J., Kaper. J. 1998).

2.2.3.6. Factores de patogenicidad relacionados al plásmido pO157.

Casi todas las cepas de O157:H7 contienen un plásmido altamente conservado denominado pO157 (99% Levine, M. et al 1987) el cual tiene un tamaño entre 93.6 y 104 kDa. Este plásmido también se puede encontrar en el serotipo O26:H11 (77% Levine, M. et al 1987), e incluso en algunas cepas STEC (81% Levine, M. et al 1987) aisladas de humanos. Dentro de este podemos encontrar diferentes genes que codifican diversas proteínas que contribuyen a la patogenicidad de estas cepas.

Existe una hemolisina denominada enterohemolisina la cual está codificada por el gen *ehxA* y guarda un 60% de identidad con la hemolisina de UPEC HlyA (Nataro. J., Kaper. J. 1998). Esta enterohemolisina pertenece a la familia de las citolisinas formadoras de poros la cual se piensa ayuda a lisar a los eritrocitos para que el Fe^{2+} del grupo hemo pueda ser aprovechado por la bacteria.

Otra enzima importante es una catalasa-peroxidasa periplásmica la cual según predicciones del gen *katP* tiene 736 aminoácidos y una masa molecular de 81.8 kDa (Brunder, W. et al. 1996). Al igual que otras catalasas en patógenos, se sospecha que esta contribuye a proteger a estos microorganismos del daño oxidativo causado por moléculas reactivas de oxígeno, que son producidas por los fagocitos o las células hospederas durante el proceso de infección.

En este plásmido podemos encontrar el gen *espP* el cual codifica una proteína de aproximadamente 1300 aminoácidos que en un principio se sintetiza como un precursor y antes de ser secretada es procesada en las regiones N- y C- terminal. Esta enzima es una serina proteasa la cual es capaz de romper la pepsina A y el factor de coagulación V, este hecho puede contribuir a la colitis hemorrágica en los pacientes (Brunder, W. et al. 1997) que son infectados por EHEC.

El factor de colonización ToxB también se encuentra en el plásmido pO157 y como se mencionó anteriormente funciona como un factor de adhesión a las células hospederas.

Dentro del mismo plásmido podemos encontrar todo un clúster que codifica para un sistema de secreción del tipo II, los genes se denominan *etp* y van desde la letra C hasta la O. Sistemas de secreción de este tipo los podemos encontrar en algunos patógenos Gram-negativos como: *Klebsiella oxytoca* y *K. pneumoniae* en los genes *pul*, los genes *out* de *Erwinia chrysanthemi* y *E. carotovora* y los genes del operón *exe* de *Aeromonas hydrophila* (Schmidt, H. et al. 1997).

Algunos estudios en conejos y cerdos han mostrado que la presencia o la ausencia del plásmido no están relacionados con la severidad de la diarrea, la histopatología del intestino o el transporte iónico en el intestino (Nataro. J., Kaper. J. 1998). Aunque estudios epidemiológicos muestran una fuerte correlación entre la presencia del plásmido con el desarrollo de HUS más que con la diarrea (Nataro. J., Kaper. J. 1998).

2.2.3.7. Genética de algunos factores de virulencia.

Como se mencionó anteriormente las características más importantes para poder identificar a un microorganismo como EHEC O157:H7 son: producción de la toxina Stx1 y/o

Stx2, producir la lesión de adherencia y borrado de las microvellosidades y poseer el plásmido pO157. Aunque hay que recordar que existen cepas STEC las cuales igualmente pueden producir la toxina Stx1 y/o Stx2, pero pueden o no poseer el plásmido pO157 o causar la lesión A/E.

Por lo que el factor principal para saber si una cepa corresponde a una EHEC es determinar si posee el gen que codifica para las toxinas tipo Shiga. El gen que codifica para esta toxina se denomina *stx1* o *stx2* (dependiendo del tipo de toxina) y se encuentran dentro del cromosoma bacteriano. La característica importante de estos genes es que fueron adquiridos por transducción. Perna, N. et al. 2001 dilucidaron la secuencia del genoma de *E. coli* O157:H7 y encontraron que había 18 regiones del genoma que estaban relacionados con el genoma de bacteriófagos. Stx2 proviene del fago933 W. El gen se transcribe para que los fagos puedan ser liberados de la célula una vez que comienza el ciclo lítico, por eso este gen tiene su máxima acción cuando la célula se está lisando (Plunkett III, G. et al. 1999). Para el caso de *stx1* el gen se encuentra en el profago críptico CP-933V. Este hecho hace que la toxina pueda ser adquirida por bacteriófagos por lo que se pueden originar cepas STEC por transferencia horizontal, aunque hay que recordar que el simple hecho de que exista el gen *stx1* y/o *stx2* no determina que la cepa sea patógena, se requieren de otros factores de virulencia.

Para saber si la cepa contiene el plásmido pO157 se puede determinar la presencia de los genes *hlyA* (hemolisina), *katP* (catalasa-peroxidasa), *espP* (serina proteasa), *toxB* (adhesina), o el clúster *etp*. Para este estudio se eligió el gen *etpD* ya que el clúster *etp* se encuentra obligatoriamente en el 100% de las EHEC pertenecientes al serogrupo O157 y que solo el 10% de las STEC aisladas de heces bovinas contenían dicho operón (Schmidt, H. 1997). Pero más importante que esto es que ninguno de los otros patotipos de *E. coli* (EPEC, EAEC, EIEC, ETEC) contiene el clúster *etp* (Schmidt, H. 1997), por tanto éstos están restringidos a cepas de *E. coli* capaces de producir la toxina tipo Shiga y podremos saber si pertenecen al serogrupo O157 o si son solo STEC.

2.2.3.8. Síntomas y consideraciones clínicas.

El periodo de incubación de la bacteria es de 3 a 4 días, el síntoma inicial es diarrea no sanguinolenta, seguida por calambres abdominales, algunos episodios de fiebre y/o vómito. Después de 1 o 2 días la diarrea pasa a ser sanguinolenta y el paciente sufre dolores abdominales intensos, la infección puede pasar al HUS, el cual se caracteriza por: anemia hemolítica, trombocitopenia y falla renal, causando en el paciente oliguria o incluso

anuria, edema, palidez y en algunas ocasiones convulsiones. En el caso de los infantes, del 3 al 5% de los casos resulta mortal y del 12 al 30% de los pacientes infantiles sufre alguna secuela, como puede ser: discapacidad renal, hipertensión y fallas en el sistema nervioso central.

Respecto al tratamiento, las cepas de EHEC suelen ser susceptibles a los antibióticos, respondiendo de mejor manera en las etapas iniciales de la infección aunque el uso de macrolidos y quinolonas como antibióticos puede incrementar la expresión de las toxinas Stx's. (Perna. et al. 2001). Además de que el uso de antibióticos puede disminuir la concentración de otras bacterias intracolónicas, provocando que la absorción sistémica de la toxina sea mayor (Nataro. J., Kaper. J. 1998), razones por las cuales no se recomienda el uso de antibióticos. Parte del tratamiento se basa en aplicar: diálisis, hemofiltraciones, transfusión de eritrocitos y plaquetas. Cuando el daño renal es grande se requiere realizar un trasplante de riñón.

2.2.4. EAEC.

Se define como cepas de *E. coli*. que no secretan las toxinas LT o ST (características de ETEC) y que son capaces de adherirse a las células HEp-2 en un patrón conocido como auto-agregativo en el cual las bacterias se adhieren unas a otras en una configuración de "ladrillos apilados" (Figura 2.3) (Kaper, J. Nataro, J. 2004).

Existen algunos estudios que demuestran que la población infantil de países en vías en desarrollo e industrializados son afectados por estas cepas (Ochoa, T. et al. 2011, Henry, F. et al. 1992, González, R. et al. 1997, Croxen, M. et al.2013), la cual tiene como característica la presencia de diarrea mucoide persistente (≥ 14 días Henry, F. et al. 1992) tras la evolución de la infección se producen citotoxinas las cuales causan: acortamiento de los vellos intestinales, necrosis hemorrágica en la punta de los microvellos y respuesta inflamatoria con edema e infiltración mononuclear en la submucosa La transmisión de esta bacteria se puede dar a través de agua contaminada y los alimentos. Para que se presenten los efectos tóxicos se requiere la presencia de un plásmido de 65 MDa denominado pAA (Nataro, J. Karper, J. 1998).

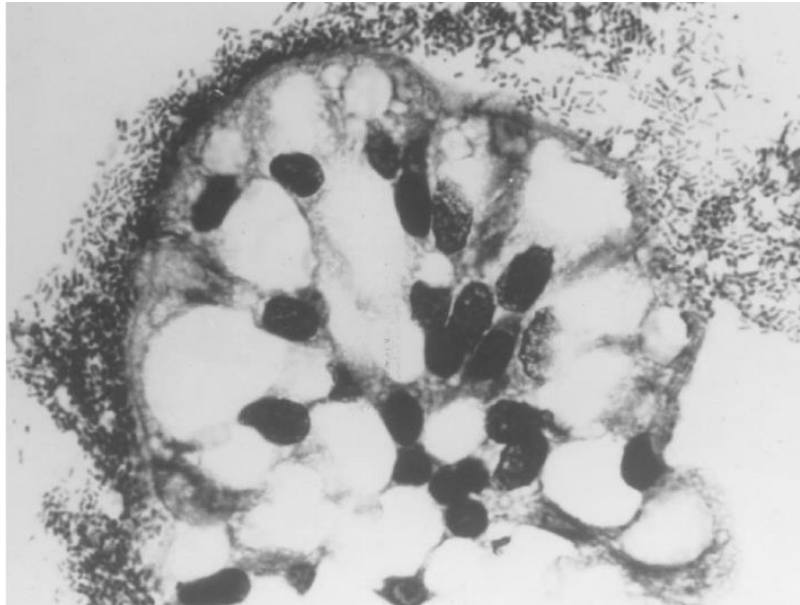


Figura 2.3. Fotomicrografía del íleon de un cerdo gnotobiotico alimentado con EAEC O42, se puede observar la colonización tipo "ladrillos apilados". Tomado de Kaper, J. Nataro, J. 1998.

2.2.4.1. Mecanismo de patogenicidad.

El sitio de adhesión de EAEC aún no está del todo claro pero en el estudio de Hicks, S. et al. 1996 se observa que estas cepas se adhieren al yeyuno íleon y colon. Se han propuesto tres etapas para describir el mecanismo de patogenicidad de EAEC las cuales son: adherencia a la mucosa intestinal, elaboración de múltiples toxinas y citotoxinas e inflamación de la mucosa. (Navarro, F., Elias, W. 2011).

2.2.4.2 Adherencia a la mucosa intestinal.

Existen una gran variedad de estructuras que ayudan a la colonización de EAEC a la mucosa. Las más importantes son las denominadas fimbrias de adherencia agregativa (AAF). Dentro de esta familia podemos encontrar AAF/I (codificada por el gen *aggA*); la cual es una fimbria flexible formadora de paquetes. Los genes que codifican dicha fimbria se encuentran en el plásmido pAA en dos regiones: La primera región es la que se encarga de la formación y ensamblaje de la fimbria y la segunda es donde encontramos al gen que codifica al regulador (*aggR*) (Navarro, F., Elias, W. 2011), el cual es un factor de transcripción que se encarga de regular la biogénesis de las AAF (Croxen, M. et al. 2013). AAF/II (codificada por *aafA*) se descubrió que es capaz de colonizar la mucosa del colon (ya que se puede unir a la fibronectina, laminina y al colágeno tipo IV) (Navarro, F., Elias, W. 2011) y que también funciona para la formación del biofilm. Esta fimbria se observa

como racimos semirrígidos y los genes que codifican esta fimbria igualmente se encuentran en 2 regiones del plásmido pAA; pero con la diferencia de que en la primera región encontramos al gen regulador, mientras que en la segunda hay un gen que ayuda al ensamble de la fimbria. Existe una proteína denominada dispersina la cual es secretada hacia la superficie celular para unirse no covalentemente a los lipopolisacáridos (Velarde, J. et al. 2007), con la finalidad de evitar la agregación bacteriana, debido a que el AAF/II tiene carga positiva y la superficie bacteriana al contener las dispersinas enmascara la carga negativa evitando así la agregación entre células. AAF/III (codificada por *agg3A*) la podemos encontrar como filamentos individuales flexibles y también está relacionado con la agregación bacteriana (Navarro, F., Elias, W. 2011). Los genes que se encargan de codificarla también están organizados en dos regiones; las cuales son semejantes a la de AAF/I. En un brote de EAEC en Noruega reportado por Boisen, N. et al. 2008 encontraron una fimbria denominada Hda la cual proponen renombrarla como AAF/IV (codificada por *agg4A*).

Otros factores de colonización son proteínas de membrana externa (no necesariamente fimbrias) que tienen un peso molecular de 18 a 58 kDa (Navarro, F., Elias, W. 2011) y el pilus común de *E. coli*. (ECP). Podemos encontrar además la aglutinina termorresistente 1 (codificada por el gen *hra1*) el cual fue reportado en cepas de *Escherichia coli* Uropatogénica, en ETEC O9:H10:K99 y *E. coli* causante de meningitis neonatal (NMEC) (Bhargava, S. et al. 2009), la cual está relacionada con la aglutinación adherente y la formación del biofilm.

2.2.4.3. Producción de toxinas y citotoxinas.

Existe una toxina denominada Pet (toxina codificada en plásmido) de 104 kDa (Navarro, F., Elias, W. 2011) esta proteína pertenece a la misma familia de EspC (EPEC) denominada autotransportadores serina proteasa de las *Enterobacteriaceae* (SPATE) (Navarro, F. et al. 2010) la cual media su propia secreción mediante un mecanismo del tipo V. La proteína Pet madura tiene un peso molecular de 104 kDa y proviene de la hidrólisis de los residuos 53 y 1018 (Navarro, F. et al. 2010) de la proteína original. Una vez ocurrido esto la proteína se internaliza gracias al recubrimiento de claritrina. El endosoma pasa al aparato de Golgi y de este al retículo endoplasmico donde encuentra un poro de translocación Sec61p (Navarro, F. et al. 2010) para pasar al citosol. En el citosol encontramos a la fodrina, la cual es una proteína heterodímera con una subunidad α de 280 kDa y una subunidad β de 246 kDa que en condiciones normales interactúa con la actina y se encarga de proveer

organización estructural en el citoesqueleto. Pet hidroliza a la fodrina (producto de 120 kDa), provocando la pérdida de la interacción actina-fodrina. Lo que conlleva a la contracción del citoesqueleto de actina, pérdida de la tensión de las fibras de actina de la célula, redondeo de la célula, separación de la célula lo que puede causar el desmontaje de las microvellosidades (Navarro, F. et al. 2010).

La proteína involucrada en la colonización (Pic) es otro miembro de las SPATE, codificado por el gen *pic* y se encuentra en el cromosoma bacteriano. Es una proteasa que se encarga de hidrolizar a la mucina y se cree que aparece en las primeras etapas de la infección, con la finalidad de inducir una hipersecreción de moco para la formación del biofilm y colonizar el intestino (Navarro, F. et al. 2010). Su presencia explica la diarrea con moco en los pacientes con alguna infección por EAEC.

La enterotoxina de *Shigella* 1 (ShET1) no ha sido estudiada en EAEC pero en el caso de *Shigella flexneri* 2a se ha observado que causa acumulación de fluido en muestras de íleon de conejo, cuando la bacteria crece en medios carentes de hierro (Navarro, F. et al. 2010). Aunque el mecanismo de acción de la toxina no está del todo dilucidado se piensa que actúa sobre la adenosina monofosfato cíclica (cAMP) y sobre la guanosina monofosfato cíclica (cGMP). Los genes que se encargan de codificar a la proteína se denominan *set1A* y *set1B*. Lo curioso de estos genes es que se encuentran dentro del gen *pic* pero en la cadena complementaria (Navarro, F. et al. 2010).

La hemolisina E es una proteína de 34 kDa en la cual predominan las α -hélices, que al oligomerizar en estructuras de mayores ordenes, forma una toxina formadora de poros, la cual tiene efectos citotóxicos y citopatológicos en células humanas (Navarro, F. et al. 2010). El gen que lo codifica se denomina *hlyE*. Y esta hemolisina se ha llegado a encontrar en cepas de: STEC, EAEC y ETEC (Navarro, F. et al. 2010).

La toxina termoestable enteroagregativa 1 (EAST1) es un péptido de 38 aminoácidos (4.1 kDa) que es similar a la toxina termoestable de ETEC (STa) ya que ambas contienen 2 enlaces disulfuro (lo cual hace creer que el mecanismo de acción es similar al de STa), aunque inmunológicamente existen diferencias entre ambas toxinas. La presencia de EAST1 en la cepa EAEC 17-2 no causó diarrea en voluntarios y no existen diferencias entre las toxinas de esta cepa y la EAEC O42, la cual sí causa diarrea (Navarro, F. et al. 2010), por lo que su presencia no determina que vayan a existir episodios de diarrea. En un estudio de Savarino et al. 1996 se buscó la presencia del gen que codifica la toxina (*astA*) en otras cepas de *E. coli* comensales y patógenas. Observaron que el gen se

encuentra en cepas de: EHEC O157:H7, ETEC O8:H10, EPEC O86:H61, ETEC O75:H9, EPEC O128:H7, EPEC O142:H6 y *E. coli* O48:H.

2.2.4.4. Inflamación de la mucosa.

La inflamación se desarrolla por la actividad del sistema inmune innato, debido a que existen múltiples factores en EAEC que desencadenan la acción del sistema inmune. Una de ellas es la flagelina la cual es codificada por el gen *fliC* la cual ocasiona la liberación de interleucina 8 (IL-8) por la unión con los receptores tipo Toll 5 (TLR5) y es el mayor estímulo pro-inflamatorio (Navarro, F. et al. 2010), TLR5 manda señales a través de la cinasa de proteínas activada por mitógenos (MAPK) y el factor nuclear κ B (NF κ B) para inducir la transcripción de citoquinas pro-inflamatorias en células epiteliales y monocíticas. La AAF/II puede provocar la liberación basolateral de IL-8 de las células epiteliales del colon. Además de que es capaz de inducir la infiltración de neutrófilos poliformonucleares (PMN) (Croxen, et al. 2013) por la liberación de un quimioatrayente eicosanoide, el cual se produce por la lipoxigenasa 12/15. Además de esto también podemos encontrar niveles elevados de citoquinas fecales, interleucinas (IL-1 α , IL-1 β), α -interferón (IFN- α), lactoferrina y leucocitos fecales (Croxen, et al. 2013).

2.2.4.5. Genética de algunos factores de virulencia.

La característica fenotípica más importante para poder identificar a una cepa de EAEC es la adherencia agregativa, por lo que se puede pensar que si encontramos el gen que codifica para las AAF podremos decir si es o no una EAEC. Desafortunadamente existen varias AAF's con distintos genes que se encargan de codificarlas y para no tener que hibridar cada uno de estos genes podemos usar uno que esté implicado con varios genes de patogenicidad en EAEC. Ahí encontramos un gen del plásmido pAA denominado *aggR*. Este factor transcripcional participa en la regulación de una gran cantidad de genes como son: *aggA* (fimbria AAF/I), *aap* (proteína de superficie dispersina), regula al sistema de secreción Aat el cual se encarga de transportar a la dispersina hacia la superficie bacteriana, también activa la expresión de Aai el cual es un sistema de secreción tipo VI (Morin et al. 2013). Existen estudios epidemiológicos los cuales relacionan la expresión del gen *aggR* con episodios de diarrea (Morin et al. 2013). Por estas razones se usó este gen para poder identificar a las cepas de EAEC.

El otro gen empleado también se encuentra en el plásmido pAA *astA* el cual codifica la toxina EAST1 ya que como se mencionó anteriormente está ampliamente distribuido en

diversos patotipos de *E. coli* y su presencia se puede relacionar con esos patotipos. La presencia de los genes *aggR* y *astA* podría indicarnos la presencia de una cepa de EAEC.

2.2.4.6. Síntomas y consideraciones clínicas.

Los pacientes infectados por estas cepas presentan diarrea acuosa algunas veces con moco, la cual está acompañada de fiebre ligera, náusea, vómito y dolor abdominal. Puede afectar tanto adultos como a niños y puede causar diarrea persistente en pacientes inmunocomprometidos. La diarrea persistente en niños puede causar lento desarrollo y desnutrición ya que el epitelio intestinal está dañado y se reduce la capacidad del intestino para absorber nutrientes.

El tratamiento dependerá de la edad y situación del paciente. A la gran mayoría se les recomienda el uso de antibióticos, pero la selección dependerá de la región en la que se encuentre el paciente, ya que existen cepas que son sumamente resistentes a algunos antibióticos. Por ejemplo en el sur de la India existen cepas de EAEC que son resistentes a las quinolonas (Croxen, M. et al. 2013). Para los pacientes inmunocomprometidos ha resultado muy benéfico el uso de ciprofloxacina.

2.2.5. EIEC.

Son bioquímicamente y patogénicamente parecidas a *Shigella* spp, ya que generalmente son lisina descarboxilasa negativo, inmóviles y no son capaces de fermentar la lactosa. Además ambas suelen causar disentería en los pacientes infectados, ya que ambos géneros son capaces de invadir las células del colon. Los brotes que han surgido por este microorganismo se han originado por el consumo de alimentos o agua contaminados, además de que se puede dar la transmisión de persona a persona vía fecal-oral. La dosis infectiva para *Shigella* llega a ser de 10 a 100 CFU, para el caso de EIEC suele ser un poco mayor (Croxen, M. et al 2013).

Estudios de diversidad filogenética muestran que especies de *Shigella flexneri* son más parecidas a cepas de *E. coli* que a otras especies de *Shigella*; de hecho 36 genes *housekeeping* fueron analizados por Lan, R. y Reeves, P. 2002 para observar las diferencias en la secuencia. Los resultados mostraron que el promedio de distancia entre *E. coli* K-12 y *S. flexneri* 2A es de solo 1.12% mientras que el promedio de diferencia entre *E. coli* K-12 y *E. coli* O157:H7 es del 1.44%.

Durante los últimos años no se han presentado muchos brotes de EIEC, en el año de 1985 hubo un brote relacionado al consumo de alimentos contaminados en Texas EUA y en la

última década solo se han presentado 10 casos de infección por este microorganismo en Centroamérica, Sudamérica, África y Asia (Croxen, M. et al 2013). Cabe destacar que del 30 al 50% de los casos de disentería bacilar son causados por cepas de *Shigella*.

2.2.5.1. Mecanismo de patogenicidad.

El mecanismo de patogenicidad de EIEC es muy similar al de *Shigella* spp. Ya que se caracterizan por invadir las células epiteliales del colon debido a la presencia de un plásmido de 220 kb denominado pInV (Nataro, J. Kaper, J. 1998) el cual contiene toda la maquinaria necesaria para la invasión, sobrevivencia dentro de la célula y apoptosis de los macrófagos (Croxen, M. et al. 2010) y pueden producir enterotoxinas las cuales juegan un papel importante en la patogenicidad.

2.2.5.2. Invasividad.

Se basa en cinco diferentes etapas las cuales son: penetración de la célula epitelial, lisis de la vacuola endocítica, reproducción intracelular, movilización dentro del citoplasma y extensión hacia la célula epitelial adyacente.

Como se mencionó anteriormente la infección comienza en el colon donde la bacteria pasa a través de las células M (las cuales son células epiteliales especializadas, que se encargan de presentar antígenos por transporte vesicular transepitelial a los linfocitos intraepiteliales y tejidos linfoides subepiteliales) (Croxen, M. et al. 2010) por transcitosis, una vez que se encuentra en la submucosa es fagocitada por un macrófago. Para poder liberarse del fagosoma se requiere del sistema de secreción tipo III (T3SS) Mxi-Spa y de las proteínas IpaB, IpaC e IpaD (Schroeder, G. Hilbi, H. 2008). Se considera que IpaC es el factor determinante para la liberación del fagosoma, ya que se encarga de desorganizar la vesícula fosfolipídica del fagosoma. IpaB se encarga de formar trímeros de fosfolípidos, alterando la integridad de la bicapa lipídica. La proteína IpaH_{7,8} también contribuye a la liberación de la bacteria del fagosoma, aunque su mecanismo de acción aún no se conoce. La bacteria aunque ya logró escapar del sistema fagosoma-lisosoma aún no se ha liberado del macrófago, por lo que para inducir su apoptosis requiere de la proteína IpaB la cual provoca la activación de una proteína promotora de la apoptosis denominada caspasa-1. La activación de esta proteína causa la condensación de la cromatina, fragmentación del DNA, pérdida de la integridad de la membrana plasmática, disminución de la concentración del ATP intracelular, formación de ampollas en el citoplasma y vacuolización (Schroeder, G. Hilbi, H. 2008) llevando a la muerte celular. Cuando se está llevando a cabo la

apoptosis del macrófago existe la ruptura de pro-IL-1 β y pro-IL-18 produciendo las formas activadas de ambas interleucinas, las cuales son liberadas del macrófago y se caracterizan por ser agentes pro-inflamatorios.

Una vez que se encuentran fuera del macrófago la bacteria se encarga de invadir desde el lado basolateral de las células epiteliales del colón gracias al sistema de secreción tipo III y a algunas proteínas efectoras. Para ingresar a la célula del colon se requiere la reorganización del citoesqueleto, para que la bacteria sea rodeada y pueda entrar. IpaC, IpgB1 y VirA se encargan de inducir a Rac1 y Cdc42, las cuales son proteínas que polimerizan actina, ocasionando que la célula sea rodeada. IpgD promueve la disociación de actina del citoesqueleto de la membrana plasmática, lo que facilita la reorganización de la célula para que pueda rodear a la bacteria. IpaA se encarga de despolimerizar actina. Con todo esto la bacteria ingresa a la célula en un fagosoma, del cual puede escapar usando el mecanismo que se mencionó anteriormente.

Cuando la bacteria se encuentra en el interior de la célula debe evitar ser detectada por el sistema inmune y además evitar que la célula que invadió induzca su apoptosis, para así contar con un nicho donde pueda reproducirse. Para lo cual podemos encontrar proteínas como: IpaB, la cual tiene como blanco a MAD2L2, cuya función es la de actuar como un inhibidor de la anafase, evitando así una renovación celular; OspE es una proteína que interactúa con las cinasas vinculadas a integrina (ILK), que se encarga de evitar el desprendimiento de las células epiteliales; IpgD estimula las cinasas 3 fosfoinositida, las cuales a su vez activan a las proteínas Akt, que se encargan de regular la sobrevivencia celular (Croxen, M. Finlay, B. 2010) y evitar la apoptosis; OspG se une a proteínas ubiquitinadas E2 previniendo la degradación del inhibidor del factor nuclear κ B (NF- κ B); OspF se encarga de desfosforilar irreversiblemente a las cinasas de proteínas activada por mitógenos (MAPK), las cuales son requeridas para la transcripción de los genes regulados por NF- κ B. OspB actúa con OspF para reducir los niveles de IL-8 e IpaH_{9,8} se encarga de interferir en la expresión de citoquinas inflamatorias.

Hay que recordar que las cepas de EIEC son inmóviles, así que para pasar a la siguiente célula requieren de la proteína IcsA, la cual se localiza en un polo de la bacteria (Schroeder, G. Hilbi, H. 2008) cuya función es la de acarrear y activar al complejo Arp2/Arp3 y a la proteína neuronal relacionada al síndrome Wiskott-Aldrich (N-WASP) (Schroeder, G. Hilbi, H. 2008) ocasionando la formación de un centro de unión para la polimerización de actina. Para poder abrirse camino a través de la red de microtúbulos se produce en el polo opuesto de IcsA, VirA, la cual se encarga de degradar la red de

microtúbulos y así poder propulsarse a la frontera de la célula invadida. IscB es una proteína que se encarga de proteger a la bacteria, ya que IscA contiene una región que induce la autofagia y si no se encontrara rodeada por IscB se podría detener el movimiento de la bacteria porque quedaría atrapada.

2.2.5.3. Toxinas.

Podemos encontrar a las denominadas enterotoxinas de *Shigella* 1 y 2 (ShET1 y ShET2 mencionadas en EAEC). La toxina ShET2 se puede encontrar en diferentes cepas de *Shigella* y en algunos serotipos de EIEC (Croxen, M. et al. 2013). Nataro et al. 1995 clonaron y secuenciaron un gen perteneciente al plásmido pInV el cual codifica para una proteína de 63 kDa la cual tiene efectos en la conductancia del tejido, esta toxina fue denominada Sen. El mecanismo de acción de la toxina no se conoce pero su presencia puede explicar la presencia de diarrea acuosa en EIEC (Nataro, J., Kaper, J. 1998).

2.2.5.4. Genética de algunos factores de virulencia.

La característica más importante de las cepas de EIEC es su capacidad de invasión, para nuestro estudio decidimos utilizar el gen *senB* el cual es una región de la toxina Sen, los genes que se encargan de codificar esta toxina se encuentran en el plásmido pInV. Esta enterotoxina se encontró en el 75% de las cepas de EIEC y en el 83% de las cepas de *Shigella* en el estudio de Nataro, J. et al. 1995.

2.2.5.5. Síntomas y consideraciones clínicas.

Los síntomas de infección por EIEC son menos graves en comparación con *Shigella*, ya que en el primer caso sólo se observa diarrea acuosa y rara vez se pueden observar síntomas de shigellosis. Por tanto el tratamiento solo se basa en mantener al paciente rehidratado.

2.3. Transferencia Horizontal de Genes.

La transferencia horizontal de genes son una serie de mecanismos y procesos mediante los cuales una bacteria puede adquirir material genético (DNA) y brindarle alguna ventaja adaptativa sobre otros microorganismos, por lo que estos mecanismos han ayudado a las bacterias a evolucionar e incluso a desarrollar nuevas cepas capaces de causar infecciones por la diseminación de mecanismos de virulencia (Popa, O., Dagan, T. 2011).

Los principales mecanismos para transferir material genético de manera horizontal son: transformación, conjugación, transducción y elementos móviles (Popa, O., Dagan, T. 2011). Cada tipo de mecanismo requiere de ciertas condiciones y tiene varias limitantes para poder llevarse a cabo. A continuación se mostraran las características más importantes de cada mecanismo.

Gen(es) de virulencia	Función	Presencia del gen y posible mecanismo de transferencia implicado	Referencia
<i>Elt</i> <i>st1a</i> <i>st1b</i>	Toxina termolábil Toxina termoestable porcina Toxina termoestable humana	Relacionado a diferentes plásmidos donde se pueden presentar uno o varios con diferentes CFA's	(2)(4) (31) (49)
<i>cfaI</i> <i>CS1</i> <i>CS3</i> <i>CS2</i> <i>CS6</i>	Diferentes factores de colonización para ETEC del grupo CFA	Conjugación a partir de diferentes plásmidos los cuales pueden tener a las toxinas lábil y/o termoestable	(2) (4) (19) (49)
<i>bfpA</i>	Pilus formadora de paquetes para la colonización de EPEC	Conjugación. Presente en el plásmido EAF	(2) (4) (20) (48) (49)
<i>espA</i> <i>espB</i> <i>espD</i>	Se relacionan con la transducción de señales para producir la lesión A/E	Forma parte de la isla de patogenicidad LEE (locus borrado enterocito) puede transmitirse por conjugación o transformación	(2) (48) (49)
<i>Sep</i> <i>Esc</i>	Sistema de secreción tipo III	Forma parte de la isla de patogenicidad LEE (locus borrado enterocito)) puede transmitirse por conjugación o transformación	(2) (4) (49)
<i>eaeA</i>	Intimina para la unión entre EPEC o EHEC y enterocito	Forma parte de la isla de patogenicidad LEE (locus borrado enterocito)) puede transmitirse por conjugación o transformación	(2) (4) (23) (41) (48) (49)
<i>perA</i> <i>perB</i> <i>perC</i>	Reguladores transcripcionales de algunos genes de virulencia en EPEC	Presente en el plásmido EAF	(2) (49)
<i>astA</i>	Toxina termoestable de EAEC	Puede presentarse en diversos plásmidos de varios patotipos de <i>E. coli</i>	(2) (4) (24) (46) (49)

Tabla 2.3. Diferentes genes de virulencia presentes en los diferentes patotipos de *E. coli*. Función y presencia del gen en elementos móviles.

Gen(es) de virulencia	Función	Presencia del gen y posible mecanismo de transferencia implicado	Referencia
<i>stx1</i> <i>stx2</i>	Toxina tipo Shiga de EHEC causante del síndrome urémico hemolítico	Se transmite por transducción. <i>stx2</i> presente en el fago BP-933W, el fago CP-933V contiene el gen <i>stx1</i>	(2) (35) (41) (42) (49)
<i>ehxC</i>	Hemolisina de EHEC	Presente en el plásmido pO157	(2) (41) (49)
<i>aagA</i> <i>aaf</i> <i>agg3A</i> <i>agg4A</i>	Diferentes tipos de fimbrias de adherencia agregativa de EAEC	Presentes en plásmido pAA	(2) (4) (46) (48) (49)
<i>Mxi</i> <i>spa</i>	Sistema de secreción tipo III para <i>Shigella</i> spp. y EIEC	Presente en plásmido pInv en estas especies contiene elementos de inserción	(2) (4)
<i>katP</i>	Catalasa-peroxidasa de EHEC	Presente en el plásmido pO157	(37) (41)
<i>Aap</i>	Dispersina para EAEC	Presente en el plásmido pAA	(46)
<i>aggR</i>	Regulador de la expresión de las fimbrias de adherencia agregativa de EAEC	Presente en el plásmido de pAA	(49) (53)

Tabla 2.4. Diferentes genes de virulencia presentes en los diferentes patotipos de *E. coli*. Función y presencia del gen (Continuación).

2.3.1. Transformación.

Este mecanismo implica la captación de DNA del ambiente por parte de la célula receptora, integración del material genético y expresión del DNA incorporado (Thomas, C. Nielsen, K. 2005). Una característica muy importante para que este mecanismo se lleve a cabo es que la célula tiene que desarrollar un estado fisiológico denominado competencia, en el cual están implicadas de 20 a 50 proteínas (Thomas, C. Nielsen, K. 2005), esto como respuesta a ciertas condiciones ambientales y de crecimiento desfavorables. Por esta razón solamente algunos géneros bacterianos son capaces de llevar a cabo este mecanismo y se les denomina bacterias naturalmente transformables, un ejemplo de este tipo de microorganismo es *Acinetobacter baylyi* el cual es usado en experimentos de transformación (Petersen, S. et al. 2013, Domingues, S. et al. 2012 y Thomas, C. Nielsen, K. 2005).

Otra característica que determinará la efectividad del proceso de transformación es la estabilidad e integridad del DNA que entrará a la célula receptora. El DNA que se encuentra fragmentado o dañado químicamente puede funcionar como una fuente de nutrimentos. En el trabajo de Petersen, S. et al 2013 se analizó la capacidad de *A. baylyi* de tomar DNA dañado, fragmentado y antiguo. Descubriendo que este material podía ser viable para transformación genética. Lo cual es de suma importancia debido a que se puede adquirir material genético entre microorganismos que se encuentran en un mismo nicho en diferentes tiempos. Por ejemplo; durante una infección el sistema inmune puede lisis a un patógeno y su material genético puede ser degradado por las DNAsas humanas y quedar expuesto, pero para que la degradación sea total tienen que pasar alrededor de 4 horas (Thomas, C. Nielsen, K. 2005) por lo que el DNA puede permanecer tiempo suficiente para que otro microorganismo incorpore DNA extraño en su genoma por el proceso de transformación.

El DNA libre para que sea captado por la bacteria requiere de ciertos receptores en la superficie bacteriana que unen el DNA no covalentemente. *Streptococcus pneumoniae* y *A. baylyi* poseen entre 30 y 80 de estos receptores de DNA para transformación ((Thomas, C. Nielsen, K. 2005). Una vez que el DNA se une a estos receptores se transloca para ingresar por la membrana, regularmente solo una de las hebras es la que se introduce para así evitar su degradación por las DNAsas propias de la bacteria. El acoplamiento del DNA "foráneo" al genoma del hospedero puede suceder mediante diferentes mecanismos. Uno de ellos es la recombinación homóloga dependiente de la proteína RecA, para que se lleve exitosamente la recombinación se requiere que el fragmento de DNA presente alta similitud con la región de DNA del hospedero, Thomas, C. Nielsen, K. 2005 expresan que la recombinación se da si existe menos del 25% de divergencia entre los fragmentos de DNA y menos de 200 bp son los que se recombinan. La recombinación de este tipo suele darse de manera muy poco frecuente, ya que podría causar serios problemas metabólicos a la bacteria si se vieran implicados genes indispensables para su desarrollo. Esto sugiere que existen más mecanismos por los cuales se puede dar la transformación.

El DNA que ingresa por transformación puede acoplarse enteramente al cromosoma bacteriano a través de la integración aditiva, esto a través de diferentes mecanismos. En el genoma de la bacteria transformante pueden existir zonas denominadas de recombinación ilegítima por homología facilitada (HFIR), las cuales son regiones de aproximadamente 200 bp las cuales sirven como secuencias de similitud para que se pueda iniciar la

recombinación y dar paso a la integración de fragmentos de DNA de más de 1000 bp del donante (Thomas, C. Nielsen, K. 2005).

En ciertas porciones de DNA podemos encontrar transposones, integrones y casetes genéticos. Dichas regiones ayudan al movimiento e integración de porciones de material genético e incluso de genes. Los integrones contienen la información para que se pueda llevar a cabo la recombinación en una región específica y promueve la expresión de los casetes genéticos (Domingues, S. et al. 2012). Los casetes genéticos contienen los genes que son de interés para la bacteria, se ha observado que muchos casetes contienen la información necesaria para la resistencia a ciertos antibióticos (Domingues, S. et al. 2012). Esta información puede ingresar a partir de transformación. Para que los integrones puedan unir el material genético requieren identificar ciertas regiones específicas en el genoma bacteriano, por tanto la información puede ser pasada entre especies diferentes pero existen ciertas limitantes.

Aunque *E. coli* no es reconocido como un microorganismo transformable natural (a menos que se aplique algún tratamiento artificial) no debería descartarse el hecho de que en algún momento pueda llevar a cabo este mecanismo. Por ejemplo Baur, B. et al. 1996 comprobaron que *E. coli* es capaz de convertirse en un microorganismo competente cuando se encuentra en agua calcáreas donde con una concentración mínima de 1mM en aguas de manantial y aguas de río.

2.3.2. Conjugación.

Este mecanismo comprende la transferencia de DNA a través de plásmidos, dicha transferencia es mediada por la formación de una unión entre la célula donadora y receptora, la cual forma un túnel de origen proteico que ayuda al paso de DNA (Popa, O y Dagan, T. 2011). La conjugación en las bacterias Gram-negativas implica la formación de un puente de apareamiento o un poro entre las células, para que posteriormente ocurra el transporte de DNA que se encuentra en una sola hebra y está unido covalentemente con la relaxasa que permite dicha transferencia, posteriormente las hebras se recircularizan, después se replica la doble hebra para que al final se pueda establecer el plásmido dentro de la célula receptora.

Existe gran eficiencia en la transferencia de plásmidos, ya que para el caso del plásmido F se pueden detectar las primeras transferencias del plásmido 9 min después de que se mezclan células receptoras con donadoras, de hecho el 100% de células receptoras se convierte en células donadoras a los 30 minutos. (Arutyunov, D y Frost, L. 2013). La unión

entre las células donadora y receptora se puede ver afectado por el uso de dodecil sulfato de sodio al 0.01% (SDS) y por fuerzas de cizalla (Arutyunov, D y Frost, L. 2013).

La cantidad de información que puede acarrear un plásmido es enorme, lo cual nos ha llevado a pensar que es el mecanismo más importante en la transferencia horizontal de genes. Dentro de los plásmidos podemos encontrar otros elementos genéticos como pueden ser transposones, secuencias de inserción (Thomas, C. Nielsen, K. 2005), casetes genéticos e incluso hasta islas de patogenicidad (Hacker, J., Kaper, J. 2000). Dichos elementos móviles pueden permanecer dentro del plásmido o incluso pueden integrarse al genoma bacteriano.

En un estudio realizado por Stecher, B. et al 2012 querían comprobar si el hecho de que exista inflamación en el intestino a causa de una infección puede desencadenar transferencia horizontal de genes, para eso usaron como modelos a *Salmonella entérica* serotipo *typhimurium* y *E. coli*. La manera en que se transmitió la información genética fue a través de conjugación y llegaron a la conclusión de que los episodios de infección pueden desencadenar la evolución no solo de patógenos sino también de los microorganismos comensales lo cual puede derivar en el surgimiento de cepas comensales con fenotipos alterados (Stecher, B. et al 2012).

Aunque la conjugación parece ser un mecanismo muy efectivo para la transferencia horizontal de genes, presenta algunas limitantes. Para el caso de los plásmidos F podemos encontrar 2 proteínas. La primera se denomina TraT (244 aa como proteína inmadura y 233 cuando se corta el péptido líder) (Arutyunov, D y Frost, L. 2013) esta es una lipoproteína que se encuentra en la membrana externa y se cree que forma un anillo de cinco miembros que interrumpe el apareamiento entre las dos células reduciendo la capacidad de apareamiento de unas 10 a unas 50 veces. Existe otra proteína denominada TrasS (149 aa) (Arutyunov, D y Frost, L. 2013) que se expresa mucho menos en comparación con la proteína TraT y cuya función es la de prevenir la síntesis del DNA en la célula receptora y transportar dicha hebra a la célula donadora. Otra característica de la conjugación es que requiere que la célula donadora y receptora se encuentren en el mismo espacio geográfico al mismo tiempo para que se pueda dar el apareamiento.

2.3.3. Transducción.

Es el proceso por el cual se adquiere material genético “ajeno” a partir de la infección por fagos (Popa, O y Dagan, T. 2011). Los fagos tienen un genoma suficientemente grande para poder codificar alrededor de 150 genes de tamaño medio (Klug, W., Cummings, M.

1999). Los fagos están formados por una cabeza proteica la cual puede tener diversas formas (puede encontrarse un virus desnudo o envuelto. El virus puede tener una forma icosaédrica o helicoidal), la cual puede estar unida o no a una cola que contienen un collar y una vaina contráctil que rodea a un eje central. En la cola existen fibras las que se encargan de reconocer áreas específicas en la superficie de la bacteria que está por ser infectada. Una vez que ocurre el reconocimiento hay una contracción (dependiente de ATP) en la vaina de la cola, permitiendo que el eje central penetre en la pared celular y pueda introducirse el material genético del fago al citoplasma bacteriano. Después de esto pueden ocurrir dos cosas; el DNA vírico puede tomar el control de la célula y toda su maquinaria enzimática para iniciar la síntesis de moléculas víricas y posteriormente formar nuevos fagos los cuales serán liberados de la célula tras su lisis (proceso denominado fase lítica), o el material genético vírico se integrará al cromosoma bacteriano (fase lisogénica). En la fase lítica ocurre un periodo latente en el cual se inhibe la acción del DNA, RNA y proteínas bacterianas para que se lleve a cabo la síntesis de todo lo necesario para la síntesis de los nuevos fagos. Una de las primeras enzimas que se sintetiza es un DNAsa que se encarga de degradar el material genético bacteriano, el cromosoma del fago está protegido de la acción de esta enzima porque sus residuos de citosina están modificados en la forma 5-hidroximetilcitosina ocasionando que el enzima no lo pueda reconocer e integrar a su sitio activo. Posteriormente se inicia la síntesis de todas las partes que conforman al fago. Una vez que ocurre esto el DNA vírico puede recombinarse con el resto del material genético presente, al final ocurre el empaquetamiento del DNA en las cabezas víricas y el ensamblaje de los demás componentes. La liberación de los nuevos fagos se da por la producción de lisozima.

En el caso del ciclo lisogénico el DNA vírico se integra al cromosoma (denominado profago) y cada vez que este se replica igualmente lo hace el DNA vírico y pasa a la descendencia tras la división. Los factores que pueden desencadenar el ciclo lítico pueden ser estímulos como el tratamiento con sustancias químicas o luz ultravioleta (Klug, W., Cummings, M. 1999). A la hora del empaquetamiento se pueden cometer errores y se puede empaquetar DNA bacteriano, el cual si no está totalmente degradado puede contener uno o varios genes, hay veces en el que solamente se puede empaquetar DNA bacteriano y como la infección del fago depende solamente de la parte proteica (cabeza, cola, eje central y fibras) se puede introducir dicho material genético en otra célula.

El DNA ajeno que se empaqueta en el fago y es introducido a una nueva célula puede permanecer en el citoplasma sin replicarse, posteriormente se puede dar la división celular

originando dos células y solamente una de ellas contendrá al DNA ajeno, este proceso se denomina transducción abortiva. En cambio cuando el DNA ajeno logra introducirse al cromosoma bacteriano y este es replicado cada vez que se da la división celular generando dos células con dicho material genético, se tendrá una transducción completa. Las limitantes que existen para este mecanismo de transferencia horizontal de genes dependen de la especificidad de los fagos para infectar solamente cierto tipo de bacterias. Las fibras que se localizan en la cola de los fagos son específicas para cada tipo de especie microbiana. Otro impedimento tiene que ver con el tamaño del gen que puede ser empaquetado, la cabeza del fago tiene cierto tamaño (el cual depende del bacteriófago. Por ejemplo del bacteriófago λ puede aceptar hasta 48514 bp y fago ϕ X174 acepta hasta 5386 bp) por lo tanto genes que codifican proteínas muy grandes, policistrones o islas de patogenicidad difícilmente pueden ser transferidos por transducción. Otra limitante tiene que ver con el hecho de que una célula que ya ha sido infectada por un fago no puede ser invadida por otro, así que la transducción no se puede dar entre células con alguna infección previa.

2.3.4. Agentes de transferencia de genes.

Este mecanismo es semejante a la transducción, pero para este caso no existe una infección a partir de bacteriófagos. Este mecanismo se ha observado en especies de *Rhodobacter* y *Roseobacter* las cuales desarrollan importantes papeles para mantener el equilibrio biogeoquímico de ambientes marinos (Zhao, Y. et al. 2009). Estos tipos de fitoplancton son capaces de sintetizar una cápside proteica por la cual pueden empaquetar material genético y poder pasarla a otra célula. Cada partícula puede contener hasta 4.5 kb de material genético (Zhao, Y. et al. 2009). Una vez ingresado el DNA a la célula se da una recombinación a partir de RecA (Popa, O., Dagan, T. 2011). Los agentes de transferencia de genes no solo se encuentran en las α -proteobacterias también se ha descubierto en algunas arqueobacterias y espiroquetas (Popa, O., Dagan, T. 2011).

Algunas bacterias son capaces de empaquetar moléculas como: moléculas de Quorum sensing, factores antimicrobianos, toxinas y DNA, a través de vesículas membranales (Dubey, G. Ben-Yehuda, S. 2011) o por la formación de nanotubos la cual sería una interacción entre dos células vecinas. En el trabajo de Dubey, G. Ben-Yehuda, S. 2011 estudian la capacidad de *Bacillus subtilis* para poder formar nanotubos y que estos interaccionen con otra célula de la misma especie o incluso con otras, por ejemplo con *E. coli*. observaron que a través de este mecanismo es posible la transferencia de material

genético perteneciente a plásmido sin necesidad de que se lleva a cabo la conjugación. Por tanto esta forma de intercambio de moléculas puede tener gran importancia en la transferencia horizontal de genes.

2.4. Dinámica genómica de *E. coli*.

Todos los mecanismos mencionados con anterioridad han ayudado a la evolución de este microorganismo, ya sea por la pérdida, ganancia o rearrreglo de genes, llevándolo incluso, a contar con una amplia gama de genes de virulencia. El tamaño del genoma de *E. coli* varía desde 4.6 a 5.6 Mb y se puede decir que está dividido en una región denominada genoma central y en otra conocida como genoma flexible (Dobrindt, U., Hacker, J. 2001). Donde los elementos de transferencia horizontal (islas genómicas, bacteriófagos, plásmidos y transposones) los podemos encontrar en la región flexible del genoma.

Existen factores que determinan si el DNA foráneo puede ser retenido en el genoma de *E. coli*. Uno de ellos implica el hecho de qué tanto se transcribe o qué tan efectivo es dicho proceso de transcripción. Por ejemplo algunos microorganismos patógenos pueden disminuir su capacidad de virulencia si crecen en condiciones de laboratorio y no son inoculados en animales (Madingan, M. et al. 2004), al no ser usados los genes de virulencia la bacteria tenderá a desecharlos. Otro factor importante tiene que ver con la existencia y la cercanía del gen con su promotor y con la existencia de los tRNA adecuados para la construcción de la proteína (Popa, O., Dagan, T. 2011).

La información mostrada hace referencia a que la mayoría de los genes que son transferidos de manera horizontal tienen que ser de tamaño pequeño y/o deben contar con toda la maquinaria que les permita integrarse al genoma, expresarse una vez integrado y ser capaz de regularse. La proteína resultante tiene que ser funcional, ya que la bacteria tenderá a desechar todo aquello que no le sea funcional. La retención de los genes adquiridos también dependerá de las condiciones ambientales a las que sea sometido el microorganismo, y a que tenderán a eliminar todo aquello que no le sea útil.

3. Justificación.

Diversos estudios han mostrado que en los países en vías de desarrollo la colonización por *E coli* en un recién nacido se da en menor tiempo y existe una mayor variedad de cepas de esta especie que colonizan al neonato respecto a los países desarrollados. La transferencia horizontal de genes puede explicar la presencia de estos diversos genotipos en cepas de *E. coli*. Sin embargo no existen trabajos que muestren el establecimiento y variación de estas diversas poblaciones en un recién nacido a lo largo de sus primeros 6 meses de vida.

4. Hipótesis.

Debido a la plasticidad genética que presentan las cepas *E. coli*, los genes de virulencia de los patotipos entéricos de esta cepa se pueden transferir por transferencia horizontal, por tanto puede ocurrir que cepas comensales que colonizan a un neonato presenten algunos de estos genes de virulencia. A pesar de esto, una verdadera cepa patógena de *E. coli* debe presentar una combinación de genes de virulencia característica de algún patotipo que le permita causar un episodio diarreico.

5. Objetivo general.

Caracterizar genéticamente una población de cepas de *E. coli* comensal aisladas del intestino de dos niños durante sus primeros 6 meses de vida, determinando la presencia de los principales genes de virulencia reportados en la literatura para cada patotipo de *E. coli* diarrogénico.

6. Objetivos particulares.

- Diseñar un arreglo con cada uno de los DNA's de las cepas comensales de *E. coli* aisladas de ambos niños en una membrana de nylon.
- Determinar para cada cepa los genes de virulencia que presentan a partir de ensayos individuales de hibridación con sondas marcadas con digoxigenina.
- Comparar los perfiles de virulencia de cada población a lo largo de los 6 meses de vida en ambos niños.

7. Materiales y métodos.

La metodología se dividirá en las siguientes etapas.

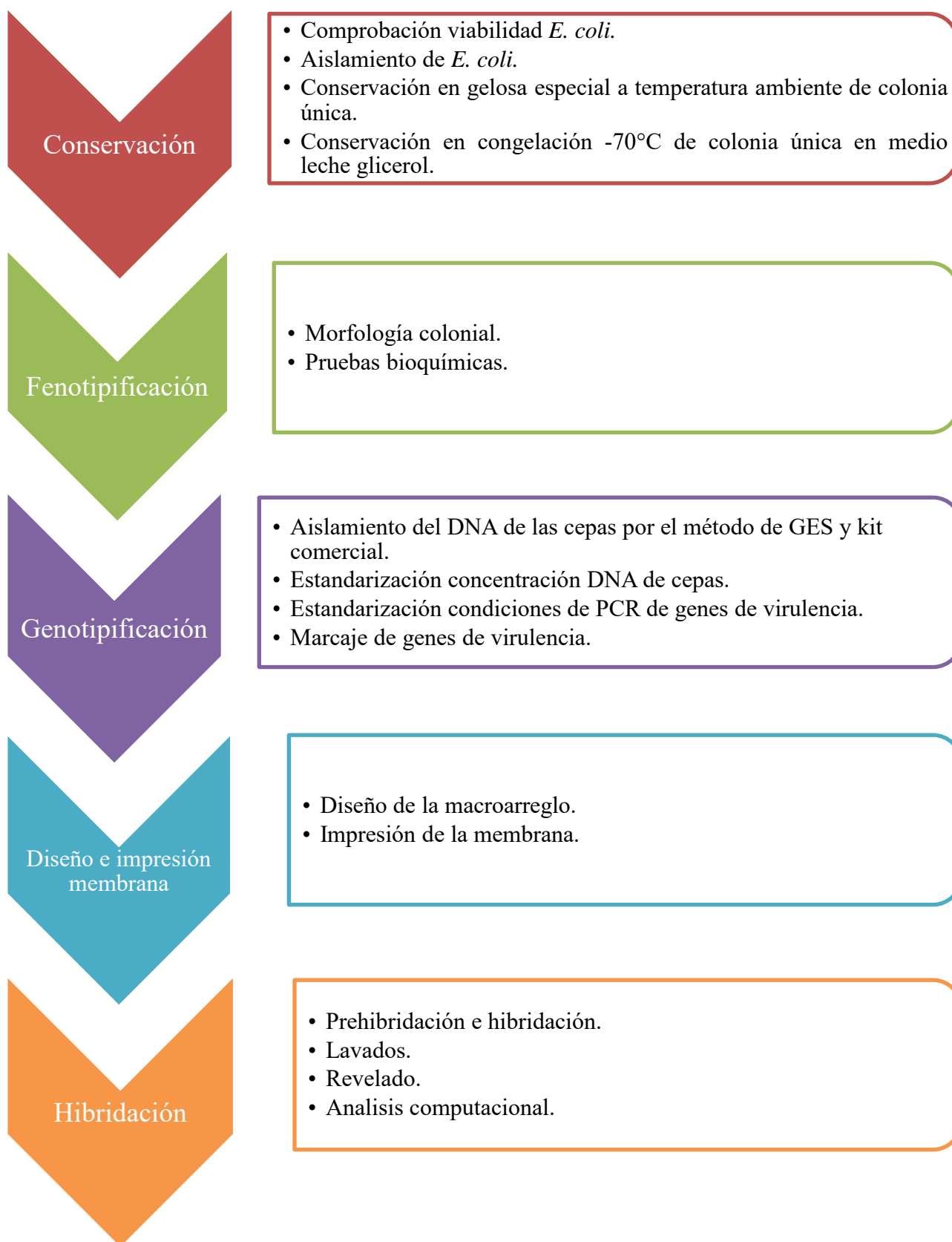


Figura 7.1. Metodología empleada en este trabajo

7.1. Población de estudio.

Las muestras provienen del estudio de Cravioto et al. 1990 donde se analizó longitudinalmente la frecuencia de diarrea en 75 niños durante el primer año de vida y se relacionó con la colonización de diversos microorganismos patógenos como son: EPEC, ETEC, EIEC, EHEC, *Salmonella* sp., *Shigella* sp., *Campylobacter jejuni* y Rotavirus, estos menores residían en el pueblo Lugar Sobre la Tierra Blanca ubicado en la Ciudad de Morelos. Para ello a partir del copro se aislaba al microorganismo y posteriormente se realizaban ensayos de hibridación en membrana con sondas marcadas con radioisótopos de cada uno de los genes de virulencia de cada patógeno. Las muestras se tomaron cada 15 días o cada vez que el niño presentaba algún episodio de diarrea.

7.2. Conservación.

Las cepas originales de los años 1985 y 1986 del estudio de Cravioto et al. 1990, permanecieron almacenadas en viales con medio gelosa especial, lo primero que se determinó fue la viabilidad de éstas. Dichas cepas forman parte del cepario de patógenos entéricos de la Facultad de Medicina de la UNAM.

- **7.2.1. Comprobación viabilidad de las cepas de *E. coli*.**

Se tomó una asada del desarrollo bacteriano del medio gelosa especial y se sembró por cuadrante radial en cajas Petri con Agar Mac Conkey y Agar Sangre respectivamente, dejando incubar a $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 18 horas. En algunos casos el medio de conservación (gelosa especial) se encontraba seco, para recuperar las bacterias se agregó 5 mL de caldo BHI con 500 μL de Isovitalex® dejando en incubación desde 24 horas hasta 1 semana. Posteriormente se tomó una muestra y se sembró en agar sangre y Mac Conkey para obtener células viables.

- **7.2.2. Aislamiento de *E. coli*.**

Una vez que se comprobó la viabilidad de *E. coli* se obtuvieron cultivos frescos tomando colonias únicas de cada cultivo al mismo tiempo de que se registraba su morfología.

- **7.2.3. Conservación en gelosa especial y congelación.**

Cada colonia única fue sembrada en la superficie inclinada de agar gelosa especial, permitiendo su crecimiento durante 18 horas a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, con este cultivo bacteriano se trabajó las pruebas bioquímicas y la extracción del DNA. Además se obtuvo una copia extra en medio de agar gelosa especial para guardarla en conservación en el cepario, y una más en agar Casoy incubándolas a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 18 horas. El crecimiento obtenido en el agar Casoy fue transferido a tubos eppendorf de 2 mL que contenían medio leche glicerol para su conservación a -70°C .

7.3. Fenotipificación.

- **7.3.1. Morfología colonial.**

En esta etapa se registraron las observaciones macroscópicas de las colonias aisladas que se obtuvieron en agar Mac Conkey (forma de la colonia, tamaño, color, bordes, etc.); en el caso de observar colonias diferentes se obtuvo un cultivo fresco y se reetiquetó la cepa.

- **7.3.2. Pruebas bioquímicas.**

Del medio de gelosa se tomó una pequeña muestra y se resembró en agua peptonada al 2% dejando incubar a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 18 h. Después se inoculó en las pruebas bioquímicas de: Kligler, Citrato de Simmons, Rojo de Metilo-Voges Proskauer (RMVP), Gluconato, Malonato y Sulfuro Indol Movilidad (SIM). Todas las pruebas bioquímicas fueron incubadas a 37°C , variando el tiempo según la prueba; Kligler y Malonato de 18-24 horas; RMVP, SIM, Gluconato y Agua peptonada 48 horas; y Citrato de Simmons hasta 96 horas.

En algunos casos se tuvieron que realizar más pruebas bioquímicas (API-20E®) para confirmar que se trataban de cepas de *E. coli*. Por lo que adicionalmente se sembraron las pruebas de OF-O y OF-F incubando a 37°C por 48 h. Posteriormente los códigos numéricos se ingresaron en la base de datos del proveedor de las tiras API-20E apiweb™ (<https://apiweb.biomerieux.com>). Esta base de datos nos identifica al microorganismo en cuestión, según el código numérico dado por el API.

7.4. Genotipificación.

Ya que se contaba con las cepas fenotipificadas se procedió a la genotipificación para ello primero se debía obtener el DNA de cada cepa, se usó el método de GES y un kit comercial para obtenerlo.

- **7.4.1. Aislamiento de DNA bacteriano por método de GES.**

Se cultivó un pequeño inoculo de cada una de las muestras en caldo luria por 18 h. Los cultivos se cosecharon en tubos eppendorf y se centrifugaron para obtener el paquete bacteriano. Posteriormente el botón se resuspendió en buffer TE, para desestabilizar la membrana celular e inhibir las DNAsas, ya que al contener EDTA compleja metales como el Ca^{2+} . A continuación se adicionó el reactivo de GES, (este reactivo contiene: detergentes que disuelven la bicapa lipídica de las bacterias y. tiocianato de guanidina que desestabiliza aún más a las proteínas e inactiva a las nucleasas). Después se agregó acetato de amonio 7.5 M (frio) para que precipiten las proteínas y el DNA presentes para su posterior separación. Se dejó en hielo por 5 min agitando constante y suavemente. Se adicionó cloroformo-alcohol isoamílico (24:1) frio, se mezcló suavemente para limpiar la muestra de cualquier residuo lipídico. Después de la centrifugación se observaron 3 fases, en la parte superior es donde permaneció el DNA. La fase acuosa (aprox 600 μL) se transfirió a otro tubo eppendorf limpio. El ADN se precipitó con isopropanol absoluto. Se realizaron 2 lavados consecutivos con etanol al 70%, cada lavado es seguido por una centrifugación, se eliminó el alcohol por decantación. Una vez finalizados los lavados, se dejó secar la pastilla de DNA a temperatura ambiente. Se resuspendió el DNA en 50 μL de agua bidestilada libre de nucleasas. Para determinar la calidad y cantidad de DNA se agregaron 4 μL de la solución en un gel de agarosa al 1% con TBE 0.5X y se dejó correr a 100 V por 30 min (se agregó a cada muestra 2 μL de buffer de carga y se mezcló antes de colocar la muestra en el gel).

- **7.4.2. Aislamiento de DNA bacteriano por kit comercial.**

Se cultivó un pequeño inóculo de *E. coli* proveniente del medio gelosa en caldo Luria. Para el aislamiento del DNA se usó el kit comercial DNeasy blood and tissue de la marca Quiagen®. En la primera etapa se hace el uso de proteinasa K, buffer de lisis y sustancias que ayudan a la lisis de la célula bacteriana. Posteriormente se adicionó etanol absoluto y toda la mezcla fue transferida a una minicolumna, la cual se encarga de atrapar el DNA

debido a que posee gran afinidad por este polímero y todo lo demás se quedará en la fase líquida. La siguiente etapa comprende los lavados del DNA para eliminar las impurezas que llegaran a permanecer unidas al material genético usando dos soluciones presentes en el kit. Finalmente el DNA se resuspendió usando agua bidestilada libre de nucleasas (200 μ L). Para determinar la calidad y cantidad de ADN se agregaron 4 μ L de la solución en un gel de agarosa al 1% con TBE 0.5X y se dejó correr a 100 V por 30 min (agregó a cada muestra 2 μ L de buffer de carga y se mezcló antes de colocar en el gel).

- **7.4.3. Determinación y estandarización de la concentración de DNA.**

Para determinar la concentración del DNA se corrió un gel con 4 μ L de cada muestra y se comparó con el marcador de concentración. Para determinar la concentración de la solución de ADN se usó el programa Molecular Imaging Software Standard Edition de Kodak®. Se realizó el cálculo para determinar la cantidad de solución y agua bidestilada libre de nucleasas que se tenía que agregar para tener 50 μ L de DNA a una concentración entre 250 ng/ μ L.

- **7.4.4. Estandarización y condiciones de PCR de los genes de virulencia.**

Esta etapa comprendió el obtener los productos de PCR para cada gen de virulencia del estudio. En la mayoría de los genes de virulencia, los iniciadores, las condiciones del PCR y los microorganismos control ya estaban estandarizados. Sin embargo, con algunos genes como: *senB* y *astA* se tuvo que recurrir a las bases de datos de Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) (<http://www.genome.jp/kegg/>) y del GenBank presente en la página electrónica de la NCBI (National Center for Biotechnology Information <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>) para obtener las secuencias del gen de interés a partir del genoma completo del microorganismo control. Una vez que se tuvo la secuencia, ésta fue editada y guardada en la computadora usando el programa DNASTAR® Lasergene EditSeq, con la finalidad de poder usar la secuencia con el programa DNASTAR® Lasergene Primer Select y diseñar un juego de iniciadores y también obtener las condiciones de amplificación por PCR de un fragmento de DNA del gen de virulencia. La sensibilidad y especificidad de los iniciadores se confirmó realizando un PCR in silico con ayuda de la página electrónica (<http://insilico.ehu.es/PCR/>).

Las PCR se realizaron a diversas condiciones, los únicos parámetros que fueron constantes fueron la temperatura y tiempo de acción para la enzima taq Polimerasa (72°C durante 1 min) y la temperatura de desnaturalización inicial (94°C; excepto en *stx1* y *stx2* que fue 95°C). El siguiente cuadro resume las condiciones de cada PCR realizado para cada gen de virulencia implicado en el estudio.

Gen de virulencia	Temperatura y tiempo de alineamiento por ciclo	Número de ciclos	Primer Forward	Primer Reverse	Producto (pb)
<i>est1-a</i>	51°C 1 min	35	TCTGTATTATCTTTCCCTC	ATAACATCCAGCACAGGC	186
<i>est1-b</i>	51°C 1 min	35	CCCTCAGGATGCTAAACCAG	TTAATAGCACCCGGTACAAGC	166
<i>eltA</i>	51°C 1 min	35	GGCGACAGATTATACCGTGC	CCGAATTCTGTTATATATGTC	700
<i>cfal</i>	51.4°C 1 min	35	GGTGCAATGGCTCTGACCACA	GTCATTACAAGAGATACTACT	479
<i>CS1</i>	52°C 1 min	35	GCTCACACCATCAACACCGTT	CGTTGACTTAGTCAGGATAAT	325
<i>CS3</i>	50°C 1 min	30	GGGCCACTCTAACCAAAGAA	CGGTAATTACCTGAAACTAAA	401
<i>eaeA</i>	57°C 1 min	35	TTCTGTGCAATGGTCAGGTGGT	ACCAGAAGAAGCATCCACCGA	788
<i>eaf</i>	51.6°C 1 min	35	CAGGGTAAAAGAAAGATGATAA	TATGGGGACCATGTATTATCA	397
<i>bfpA</i>	54.4°C 1 min	30	AATGGTGCTTGCCTTGCTGC	GCCGCTTTATCCAACCTGGTA	321
<i>stx1</i>	94°C 40 seg	35	GTACGGGGATGCAGATAAATCGC	AGCAGTCATTACATAAGAACGTCCACT	209
<i>stx2</i>	94°C 40 seg	35	GGCACTGTCTGAAACTGCTCCTGT CGCTGTCTGAGGCATCTCCGCT	ATTAAACTGCACTTCAGCAAATCC TAAACTTCACCTGGGCAAAGCC	627 625
<i>etpD</i>	62.5°C 1 min	35	TCCCGGGACTGGTGATGAGGT	GATGATACGCTGTTGGGAGATTGG	400
<i>senB</i>	53.5°C 1 min	30	CCTGATGAAGGCGTCTATGA	GTATCGGAATCCTGGCTGTA	362
<i>aggR</i>	57.5°C 30 seg	30	CTAATTGTACAATCGATGTA	ATGAAGTAATTCTTGAAT	411
<i>astA</i>	52.1°C 1 min	30	CCATCAACACAGTATATCCGA	GGTCGCGAGTGACGGCTTTGT	111

Tabla 7.1. Condiciones de PCR, iniciadores y tamaño del producto esperado para cada gen de virulencia.

- **7.4.5. Marcaje de los genes de virulencia.**

Se tomaron por separado 16 μL del producto de PCR de cada uno de los genes de virulencia y se calentaron en un baño de agua hirviendo durante 10 minutos con la finalidad de abrir la doble cadena de DNA. Posteriormente los tubos se colocaron en hielo y se le agregó a cada uno 4 μL de un coctel de marcaje previamente centrifugado a 10000 rpm que contiene DIG (digoxigenina esteroide aislado de las plantas *Digitalis purpurea* y *Digitalis lanata* la cual está enlazada en la posición C5 de la base nitrogenada Uracilo mediante un brazo que contiene 11 átomos de carbono), también contiene a la enzima Klenow la cual se encarga de polimerizar con el nucleótido complementario las cadenas sencillas de DNA adicionando también a la DIG-dUTP. Se dejó en incubación durante toda la noche a 37 °C, la reacción se detuvo agregando 2 μL de EDTA 0.2 M. Al final se adicionó 4.8 mL de buffer de pre-hibridación para tener la sonda diluida en un medio que cubra toda la membrana (buffer de hibridación).

7.5. Diseño e impresión del macroarreglo.

Una vez que se contaban con las sondas marcadas de los genes de virulencia y los DNA's de las cepas de *E. coli* se prosiguió a diseñar el acomodo de cada uno de los DNA's en el macroarreglo.

- **7.5.1. Diseño del macroarreglo.**

El formato del diseño del arreglo se diseñó primero manualmente sobre una hoja de papel, para así asignar la posición del DNA de cada una de las cepas, así como también se les asignó posición a los controles positivos y negativos sobre la membrana. Después en una placa de 384 pozos se colocaron 40 μL de cada uno de los DNA y de los controles, teniendo como plantilla el formato del diseño realizado previamente, de tal forma que el arreglo de los DNA en la placa quedó igual que en el papel y por lo tanto en la impresión de las membranas. En el apéndice 2 se puede observar dicho diseño.

- **7.5.2. Impresión de la membrana.**

Se colocaron las membranas en charolas para que se hiciera una réplica de la impresión por medio del robot Virtek®. Posteriormente las membranas eran colocadas en vapor de agua en ebullición durante 10 min para que el DNA estuviera completamente lineal y se fijara de esta manera en la membrana En otra charola se colocó una cama de papel filtro

humedecido con una solución de NaCl 1.5 M +NaOH 0.5 M (para que el DNA se desenrolle y se desnaturalice exponiendo las cadenas sencillas) sobre esta cama de papel filtro se colocaron las membranas recién impresas durante 5 min. Con agua destilada estéril se eliminó el exceso de líquido y se cubrieron con otro papel filtro humedecido con un buffer de neutralización NaCl 1.5 M+-Tris-HCl 0.5M durante 15 min. Finalmente las membranas se enjuagaron con agua destilada estéril para eliminar los excesos de la solución neutralizante y las sales remanentes, se dejaron secar, y posteriormente se fijó el DNA impreso en un Crosslinker (UV) para poder llevar a cabo la hibridación.

7.6. Hibridación.

- **7.6.1. Prehibridación e hibridación.**

La membrana se colocó en un tubo de hibridación donde se le agregó buffer de pre-hibridación. Se colocó en un horno de hibridación a 48 °C por 30 min a 4 rpm, pasado el tiempo de pre-hibridación, se eliminó el buffer y se agregaron nuevamente 5 mL del buffer de hibridación dejando incubar toda la noche a 48 °C a 4rpm.

- **7.6.2. Lavados.**

Una vez que concluyó la hibridación se hicieron dos lavados con 50 mL del buffer de lavado SSC 2X + SDS 0.1% en agitación (120 rpm). Posteriormente se hicieron otros dos lavados a 60°C por 20 min con 50 mL de la solución SSC0.5X +SDS 0.1% colocando los tubos con las membranas en el horno de hibridación a 20 rpm. Por último se efectuó un lavado más con otros 50 mL de SSC0.5X -SDS 0.1% a 60°C por 20 min a 120 rpm. La finalidad de estos lavados era eliminar las cadenas que llegaron a hibridar parcialmente y que solo quedaran las cadenas complementarias unidas.

- **7.6.3. Revelado.**

Se lavaron las membranas por 5 min a temperatura ambiente en agitación con 50 mL de buffer de lavado, para eliminar los excesos de buffer de lavado que hayan quedado en la membrana. Se agregaron 20 mL de una solución de bloqueo, se incubó a temperatura ambiente por 1 h a 120 rpm, para evitar que los anticuerpos reaccionen con partes de la membrana que no contienen DNA hibridado. Se preparó la solución de anticuerpos para que se llevara cabo la reacción antígeno-anticuerpo y se observara en cuales DNA's ha

ocurrido la hibridación. Se agregó la solución de anticuerpos a la membrana y se incubó 30 min a temperatura ambiente en agitación suave. Se realizaron dos lavados con 50 mL de buffer de lavado por 15 min a 120 rpm para eliminar el exceso de anticuerpos sin unir que hayan quedado en la membrana. Por último se equilibró la membrana con 20 mL de buffer de detección, agitando por 5 minutos a temperatura ambiente para que la membrana tuviera las condiciones necesarias para que la enzima unida al anticuerpo tuviera su actividad óptima. Se agregó el fenil fostato disodio 3-(4-metoxispiro (1,2 dioxenato-3,2'-(5'cloro) triciclo (3.3.1.1^{3,7}) decan)-4-il)(CSPD) que funciona como sustrato para la enzima y la membrana se guardó en una bolsa estéril y se dejó incubando durante 10 minutos a 37 °C en la oscuridad. Se sacó la membrana y en la oscuridad se colocó una placa para rayos X dejando la membrana de 45 min a 4 horas exponiendo, para que al final se revelara y se pudieran observar las señales de hibridación en cada una de las membranas.

- **7.6.4. Análisis computacional.**

Las placas reveladas fueron escaneadas para obtener una imagen electrónica (versión TIFF), la cual se analizó con el programa Bionumerics® Versión 6.0 AppliedMaths. Este programa determina las intensidades de señal de las hibridaciones de las muestras y les asigna un valor numérico a cada uno de los DNA's presentes en la membrana. Para asignar el punto de corte (el valor mínimo para dar positiva una muestra) se tomó en cuenta el valor numérico de los diferentes controles positivos y controles negativos. El tomar en cuenta ambos valores (+ y -) hizo que se pudiera determinar y eliminar el trasfondo o ruido en la hibridación y así tener el valor mínimo positivo, evitando así la inclusión de falsos positivos.

Se tomaron como positivos aquellos DNA's cuyo valor fuera igual o mayor al punto de corte establecido para cada uno de los genes estudiados (Apéndice 4).

8. Resultados.

8.1 Características generales.

De las 309 cepas aisladas de ambos niños, 164 (53.1%) no presentaron hibridación con ningún gen de virulencia, 76 fueron aisladas del niño control (sin episodio de diarrea durante sus primeros 6 meses de edad) y 88 del niño que presentó varios episodios de diarrea. La caracterización de las cepas aisladas de ambos niños mostró que el contenido de genes de virulencia fue muy variable, encontrando que la mayor frecuencia fue para el gen *astA* del patotipo EAEC presente en el 29.1% de las cepas; el gen *est1-b* del patotipo ETEC presente en el 20.7% y los genes *est1-a* y *cfal* también del patotipo ETEC presente en el 20.7% y 15.2% de cepas respectivamente. Los demás genes estuvieron presentes en menor frecuencia: el 12.3% de las cepas presentaron el factor de colonización *CS1*, el 9.1% *bfpA*; 8.1% *aggR*; 7.8% *eaf*; 5.2% *eaeA*; 3.2% *stxI*; 2.6% *senB*; 4.23%; 1.9% *etpD*; 1.6%; 1.6% *CS3* y el 0.7% presentaron los genes *eltA* y *stxII*.

8.2 Determinación de los genes de virulencia presentes en cepas de *E. coli* aisladas de un niño sin episodios de diarrea durante sus primeros 6 meses de vida.

En el caso del niño que no presentó diarrea en sus primeros 6 meses de estudio, la primera muestra de heces fue tomada el 11 de septiembre de 1985, dos días después de su nacimiento. De esta muestra se aislaron tres cepas de *Escherichia coli* con un perfil de virulencia diferente, la cepa 29094 no presentó ningún factor de virulencia; la cepa 29093 dio positivo para los genes *est1-a* y *est1-b* que corresponden a subtipos de la enterotoxina termolábil de ETEC y los genes *bfpA* y *eaeA* que codifican para una fimbria y una intimina de EPEC y la cepa 29095 que presentó los genes de las toxinas termoestable porcina y humana (*est1-a*, *est1-b*), pero a diferencia de la anterior, presentó además, los antígenos de colonización *CS1*, *CS3* y *cfal* de ETEC, en esta última cepa también se detectó el gen *etpD* de EHEC, un gen presente en el plásmido pO157 de EHEC serotipo O157:H7 (Levine, M. et al. 1986, Perna, N. et al. 2001, Schmidt, H. et al. 1997) y el gen *astA* característico del patotipo EAEC.

Genotipo 1 (3 cepas)	Genotipo 2 (3 cepas)	Genotipo 3 (1 cepa)	Genotipo 4 (1 cepa)	Genotipo 5 (2 cepas)	Genotipo 6 (1 cepa)	Genotipo 7 (1 cepa)	Genotipo 8 (1 cepa)	Genotipo 9 (1 cepa)
<i>est1-a, est1-b, cfaI, astA</i>	<i>est1-b, astA</i>	<i>est1-b, CSI, astA</i>	<i>est1-b, cfaI, eltA, eaf, stxI, astA</i>	<i>astA</i>	<i>est1-b, cfaI, CS3, bfpA, stxI</i>	<i>est1-a, est1-b, cfaI, CSI, astA</i>	<i>cfaI, eaf, astA</i>	<i>est1-a, bfpA, eaf</i>

Tabla 8.1. Genotipos presentes en las poblaciones de *Escherichia coli* aisladas del segundo coprocultivo del niño que no presentó diarrea (12-October-1985).

La segunda muestra fue tomada el 12 de octubre de 1985, un mes y tres días después del nacimiento del menor, en este caso se aislaron 19 colonias que presentaron diferente morfología con 10 genotipos diferentes (Tabla 8.1). Un genotipo correspondió a 5 (26.3%) cepas que no presentaron ningún gen de virulencia, los otros 9 presentan diferentes perfiles de genes de virulencia, que son diferentes a los genotipos detectados en el primer coprocultivo (Tabla 8.1). Diez cepas comparten entre ellas el gen *est-1b*; 5 cepas comparten entre sí el genes *est-1a*; 4 *cfa1* y 2 CS1 del patotipo ETEC; 3 cepas presentaron los genes *bfpA* y/o *eaf* del patotipo EPEC; en 2 cepas se detectó el gen *stx1* que codifica para la toxina de tipo Shiga del patotipo EHEC; 12 cepas presentaron el gen *astA* que codifica para una enterotoxina del patotipo EAEC; los genes CS3 y *eltA* fueron detectados cada uno en una cepa. A diferencia de los genotipos presentes en el primer coprocultivo, en este grupo de cepas no se detecta los genes *eaeA* y *etpD*, aunque si se encuentran presentes todos los genes anteriormente detectados.

Genotipo 1 (4 cepas)	Genotipo 2 (1 cepa)	Genotipo 3 (2 cepas)	Genotipo 4 (2 cepas)	Genotipo 5 (1 cepa)	Genotipo 6 (1 cepa)	Genotipo 7 (1 cepa)	Genotipo 8 (1 cepa)
Sin genes de virulencia	<i>est1-b</i> , <i>eaeA</i>	<i>est1-a</i> , <i>est1-b</i> , <i>astA</i>	<i>cfaI</i>	<i>cfaI</i> , <i>eaeA</i> , <i>astA</i>	<i>est1-a</i> , <i>cfaI</i> , <i>astA</i>	<i>est1-a</i> , <i>cfaI</i> , <i>CS1</i> , <i>eaeA</i> , <i>astA</i>	<i>est1-a</i> ,

Tabla 8.2. Genotipos presentes en las poblaciones de *Escherichia coli* aisladas del tercer coprocultivo del niño que no presentó diarrea (9-Noviembre-1985).

La siguiente muestra fue tomada el 9 de noviembre de 1985, dos meses después del nacimiento. En comparación con la población aislada del coprocultivo anterior, en esta muestra se aislaron 13 cepas con 8 genotipos diferentes (Tabla 8.2). Cuatro cepas (30.48%) presentaron un genotipo (sin detección de genes de virulencia) y 7 tuvieron cada una un genotipo diferente dado por diferentes combinaciones de genes de virulencia. Cinco cepas presentaron el gen *est-1a*, 2 el gen *est-1b* y 4 *cfaI*, (patotipo ETEC); 3 cepas presentaron el gen *eaeA* del patotipo EPEC; 5 cepas presentaron el gen *astA* de EAEC. Los genes *CS1* y *eaeA* fueron detectados cada uno en una sola cepa.

El gen *eaeA* vuelve a presentarse en cepas aisladas de esta tercera muestra, como en una cepa aislada del primer coprocultivo (11-Septiembre-1985). Las cepas aisladas de este coprocultivo no presentan los genes *stxI* (EHEC); *eltA* y *CS3* (ETEC); *eaf*, y *bfpA* (EPEC) los cuales si se encontraron presentes en cepas aisladas del coprocultivo anterior (12 de octubre).

Genotipo 1 (8 cepas)	Genotipo 2 (1 cepa)	Genotipo 3 (1 cepas)	Genotipo 4 (1 cepa)	Genotipo 5 (1 cepa)	Genotipo 6 (1 cepa)	Genotipo 7 (1 cepa)	Genotipo 8 (1 cepa)
Sin genes de virulencia	<i>est1-a</i> , <i>senB</i>	<i>est1-b</i> , <i>cfal</i> , <i>senB</i> , <i>astA</i>	<i>senB</i>	<i>est1-b</i> , <i>cfal</i> , <i>senB</i>	<i>est1-a</i>	<i>astA</i>	<i>est1-b</i> ,

Tabla 8.3. Genotipos presentes en las poblaciones de *Escherichia coli* aisladas del cuarto coprocultivo del niño que no presentó diarrea (26-Noviembre-1985).

La cuarta muestra fue tomada el 26 de noviembre de 1985, dos meses y 17 días después del nacimiento. De esta muestra se aislaron 15 colonias que presentaron diferente morfología con 8 genotipos diferentes (Tabla 8.3). Ocho (53.3%) cepas no presentaron genes de virulencia. Cada una de las 7 cepas restantes presentan un genotipo distinto, sin embargo, 2 cepas comparten entre si el gen *est1-a*; 3 *est1-b* y 2 *cfal* de ETEC; 4 cepas presentaron el gen *senB* de EIEC y 2 cepas comparten el gen *astA* de EAEC.

En comparación con las cepas aisladas de las muestras anteriores, es la primera vez que se aíslan cepas que presentan el gen *senB* del patotipo EIEC. De este coprocultivo se aíslan cepas que comparten los genes *est1-a*, *est1-b*, *cfal* de ETEC y *astA* de EAEC, con cepas del coprocultivo anterior. Además, una cepa mantiene el mismo perfil (solo el gen *est1-a*) presente en una cepa de la muestra anterior. Cepas con solo el gen *astA* se siguen aislando a lo largo de estas muestras. Sin embargo, las cepas de este coprocultivo no conservaron los genes *eaeA* de EPEC y *CS1* de ETEC en relación con las cepas aisladas del tercer coprocultivo.

Genotipo 1 (8 cepas)	Genotipo 2 (1 cepa)	Genotipo 3 (1 cepas)	Genotipo 4 (1 cepa)
Sin genes de virulencia	<i>est1-a</i> , <i>est1-b</i> , <i>senB</i> , <i>astA</i>	<i>est1-a</i> , <i>senB</i> , <i>astA</i>	<i>est1-a</i> , <i>est1-b</i> , <i>cfaI</i> , <i>senB</i> , <i>astA</i>

Tabla 8.4. Genotipos presentes en las poblaciones de *Escherichia coli* aisladas del quinto coprocultivo del niño que no presentó diarrea (10-Diciembre-1985).

El quinto coprocultivo fue reaizado el 10 de diciembre de 1985, 3 meses y 1 día después del nacimiento. De este coprocultivo se aislaron 11 cepas y se identificaron 4 genotipos (Tabla 8.4). Hubo 8 (72.7%) cepas que no presentaron ningún gen de virulencia. Cada una de las tres cepas restantes presento un genotipo. Las tres cepas compartieron los genes *est1-a* de ETEC; *senB* de EIEC y *astA* de EAEC. Además, dos cepas presentaron el gen *est1-b* de ETEC.

Las cepas aisladas de este coprocultivo mantienen la presencia del gen *senB* de EIEC y los genes *est1-a*, *est1-b* y *cfaI* de ETEC, así como el gen *astA* de EAEC. Sin embargo no se repite algún genotipo entre las cepas aisladas de ambos coprocultivos (Tabla 8.3 y 8.4).

Genotipo 1 (11 cepas)	Genotipo 2 (1 cepa)	Genotipo 3 (1 cepa)	Genotipo 4 (2 cepa)	Genotipo 5 (1 cepa)	Genotipo 6 (1 cepa)	Genotipo 7 (1 cepa)	Genotipo 8 (1 cepa)	Genotipo 9 (1 cepa)
Sin genes de virulencia	<i>eaf</i>	<i>est1-a</i> , <i>CSI</i> , <i>bfpA</i>	<i>eaeA</i>	<i>est1-a</i>	<i>est1-b</i> , <i>cfaI</i> , <i>bfpA</i> , <i>eaf</i> , <i>astA</i>	<i>est1-a</i> , <i>est1-b</i> , <i>cfaI</i>	<i>est1-a</i> , <i>est1-b</i> , <i>cfaI</i> , <i>CSI</i> , <i>bfpA</i> , <i>astA</i>	<i>est1-b</i> , <i>bfpA</i>

Tabla 8.5. Genotipos presentes en las poblaciones de *Escherichia coli* aisladas del sexto coprocultivo del niño que no presentó diarrea (27-Diciembre-1985).

El sexto coprocultivo se realizó el 27 de diciembre de 1985, pasados 3 meses y 18 días del nacimiento del infante. Se obtuvieron 20 cepas y 9 genotipos diferentes (Tabla 8.5). Once (55%) cepas no presentaron ningún gen de virulencia. Cuatro cepas compartieron el gen *est1-a*; 4 el gen *est1-b*; 3 *cfaI* y 2 *CS1* de ETEC; 4 cepas presentaron *bfpA*; 2 *eaf*; 2 *eaeA* de EPEC; 2 cepas compartieron el gen *astA* de EAEC. Es importante mencionar que hubo algunos cambios en la presencia de ciertos genes respecto a la población del coprocultivo pasado. El gen *senB* de EIEC ya no se detectó en ninguna otra aislada después de los tres meses del nacimiento del bebé, también se puede observar la reaparición de los genes *bfpA*, *eaf* y *eaeA* de EPEC los cuales no se habían presentado desde hace más de 2 meses, los genes de ETEC (*est1-a*, *est1-b* y *cfaI*) y *astA* de EAEC se mantienen como una constante en cada una de las poblaciones de cada coprocultivo. Una de las cepas de esta población tiene el mismo genotipo (*est1-a* solamente) que dos cepas aisladas el 9 y 26 de noviembre respectivamente (Ver tablas 8.2, 8.3 y 8.5).

Genotipo 1 (5 cepas)	Genotipo 2 (1 cepa)	Genotipo 3 (1 cepas)	Genotipo 4 (1 cepa)
Sin genes de virulencia	<i>CS1</i>	<i>est1-a</i> , <i>CS1</i> , <i>bfpA</i>	<i>astA</i>

Tabla 8.6. Genotipos presentes en las poblaciones de *Escherichia coli* aisladas del séptimo coprocultivo del niño que no presentó diarrea (15-Enero-1986).

La séptima muestra de heces se tomó el 15 de enero de 1986, 4 meses y 6 días después del nacimiento del menor. Esta población de *Escherichia coli* estuvo conformada por 8 colonias y 4 genotipos diferentes. En el primer genotipo podemos encontrar que 5 (62.5%) cepas no presentó ningún gen de virulencia. En esta ocasión solamente se compartió al gen *CS1* de ETEC entre 2 cepas. Los genes *est1-a* y *CS1* de ETEC; *bfpA* de EPEC y *astA* de EAEC se mantuvieron presentes en estas cepas respecto a las cepas del coprocultivo anterior. En cambio, los genes *cfal* y *est1-b* ya no se presentaron en ninguna cepa de esta población, algo que no había ocurrido en cepas de coprocultivos anteriores. Una de las cepas de esta población tuvo el mismo genotipo (*astA* solamente) que tres cepas aisladas el 12 de Octubre (1 mes de nacido) y 26 de noviembre (2 meses y 15 días de edad) (Tabla 8.1, 8.3 y 8.6). Otra cepa de este coprocultivo presentó el mismo perfil de genes (*est1-a*, *CS1* y *bfpA*) que una cepa obtenida de la muestra de heces del 27 de diciembre (Tabla 8.5 y 8.6).

Genotipo 1 (6 cepas)	Genotipo 2 (1 cepa)	Genotipo 3 (1 cepas)
Sin genes de virulencia	<i>astA</i>	<i>CSI, bfpA</i>

Tabla 8.7. Genotipos presentes en las poblaciones de *Escherichia coli* aisladas del octavo coprocultivo del niño que no presentó diarrea (25-Enero-1986).

La octava muestra fue tomada el 25 de enero de 1986, 4 meses y 16 días después del nacimiento del bebé. De esta muestra se lograron aislar 8 cepas, de las cuales solo presentaron 3 genotipos (Tabla 8.7). Seis (75%) cepas no contenían ninguno de los genes de virulencia analizados en este trabajo. Las dos cepas restantes no compartieron genes entre ellas (Tabla 8.7). Sin embargo, son genes que se presentan en cepas del coprocultivo anterior, perdiéndose solamente el gen *est1-a* (Tabla 8.6 y 8.7).

Genotipo 1 (16 cepas)	Genotipo 2 (1 cepa)	Genotipo 3 (1 cepa)	Genotipo 4 (1 cepa)	Genotipo 5 (1 cepa)	Genotipo 6 (1 cepa)	Genotipo 7 (1 cepa)	Genotipo 8 (1 cepa)	Genotipo 9 (2 cepas)
Sin genes de virulencia	<i>est1-b</i> , <i>bfpA</i> , <i>astA</i>	<i>cfaI</i> , <i>astA</i>	<i>cfaI</i> , <i>CS1</i> , <i>astA</i>	<i>astA</i>	<i>est1-b</i> , <i>CS1</i> , <i>eaf</i> , <i>etpD</i>	<i>CS1</i> , <i>eaf</i> , <i>stxI</i> , <i>astA</i>	<i>est1-b</i> , <i>astA</i>	<i>CS1</i>

Tabla 8.8. Genotipos presentes en las poblaciones de *Escherichia coli* aisladas del noveno coprocultivo del niño que no presentó diarrea (10-Febrero-1986).

El siguiente coprocultivo fue realizado el 10 de febrero de 1986, 5 meses y 1 día después del nacimiento del bebé. Esta población contó con 25 cepas agrupadas en 9 genotipos. Dieciséis (64%) cepas no contaron con genes de virulencia. Por otra parte, en esta población 3 cepas comparten entre ellas el gen *est1-b*; 2 *cfaI*; 5 *CS1* de ETEC; 2 compartieron *eaf* de EPEC; 6 cepas poseían el gen *astA* de EAEC; solamente una cepa poseía el gen *bfpA* de EPEC. Es de particular importancia notar que en esta población dos cepas presentaron genes EHEC; una de ellas contenía *etpD* mientras que la otra poseía *stxI*, algo que no sucedía desde los primeros dos coprocultivos (11-Septiembre-1985 y 12-October).

Al igual que en casos anteriores se detectó una cepa con el genotipo *astA* y dos cepas más presentaron un genotipo (solamente el gen *CS1*) que había sido detectado el 15 de enero de 1986 (Tabla 8.6 y 8.8).

Genotipo 1 (5 cepas)	Genotipo 2 (1 cepa)
Sin genes de virulencia	<i>est1-b</i> , <i>CS1</i> , <i>bfpA</i> , <i>etpD</i>

Tabla 8.9. Genotipos presentes en las poblaciones de *Escherichia coli* aisladas del décimo coprocultivo del niño que no presentó diarrea (24-Febrero-1986).

El décimo coprocultivo fue tomado el 24 de febrero de 1986, 5 meses y 15 días después del nacimiento del menor. De este coprocultivo se aislaron 6 cepas con 2 genotipos. De las 6 cepas solamente una presentó genes de virulencia, la cual presenta los genes: *est1-b* y *CS1* de ETEC; *bfpA* de EPEC y *etpD* de EHEC al igual que las cepas detectadas en la muestra anterior (Tabla 8.8 y 8.9).

Genotipo 1	Genotipo 2	Genotipo 3	Genotipo 4	Genotipo 5	Genotipo 6
(7 cepas)	(1 cepa)	(1 cepa)	(2 cepas)	(1 cepa)	(1 cepa)
Sin genes de virulencia	<i>est1-a, est1-b, cfaI, CS1, bfpA, stxI, aggR, astA</i>	<i>est1-b, aggR, astA</i>	<i>astA</i>	<i>est1-b, bfpA, eaf</i>	<i>cfaI, bfpA, aggR, astA</i>

Tabla 8.10. Genotipos presentes en las poblaciones de *Escherichia coli* aisladas del undécimo coprocultivo del niño que no presentó diarrea (10-Marzo-1986).

El onceavo coprocultivo fue tomado el 10 de marzo de 1986, 6 meses y un día después del nacimiento del bebé. De éste se lograron aislar un total de 13 cepas agrupadas en 6 genotipos. 7 cepas no presentaron ningún gen de virulencia. 3 cepas compartieron el gen *est1-b*; 2 *cfaI* de ETEC; 3 presentaron el gen *bfpA* de EPEC; 3 compartieron el gen *aggR*; 5 *astA* de EAEC. Al igual que en los coprocultivos del 12 de Octubre 85 (1 mes de edad), 26 de Noviembre (2 mes y 15 días), 15 y 25 de enero 86 (4 meses) y 10 de Febrero (5 meses), se detectaron cepas con el genotipo que contiene únicamente el gen *astA* de EAEC. Además se aislaron cepas que presentaron los genes *est1-b*; *CS1* de ETEC y *bfpA* de EPEC ya detectados en cepas de coprocultivos anteriores. De esta población se aislaron tres cepas de diferente genotipo, pero que presentaron por primera vez el gen *aggR* (no detectado anteriormente), el cual codifica para un activador transcripcional de genes relacionados a la patogenicidad de cepas EAEC. Ya que en ninguna otra muestra de heces anterior se aislaron colonias con el gen *aggR*. Sería interesante determinar si este gen se mantuvo en los siguientes meses o sólo fue transitorio; como sucedió con *senB* de EIEC. Si se comparan los genotipos de este coprocultivo con el primero realizado el 11 de Septiembre de 1985 (recién nacido), se puede observar que los genes *est1-a*; *est1-b*; *cfaI*, *CS1* de ETEC; *bfpA* de EPEC y *astA* de EAEC se presentan entre las cepas de los dos coprocultivos, manteniéndose presentes en las cepas aisladas durante estos 6 primeros meses de edad.

8.3. Determinación de los genes de virulencia presentes en cepas de *E. coli* aisladas de un niño con episodios de diarrea durante sus primeros 6 meses de vida.

Genotipo 1 (2 cepas)	Genotipo 2 (1 cepa)	Genotipo 3 (2 cepas)	Genotipo 4 (1 cepa)	Genotipo 5 (1 cepa)	Genotipo 6 (1 cepa)	Genotipo 7 (1 cepa)	Genotipo 8 (1 cepa)
<i>cfaI, astA</i>	<i>astA</i>	<i>est1-a est1-b, cfaI, CS1, astA</i>	<i>est1-a est1-b, CS1, CS3, bfpA, stx1</i>	<i>est1-a, est1-b, cfaI, astA</i>	<i>est1-b</i>	<i>cfaI</i>	<i>est1-a, est1-b, CS1</i>

Tabla 8.11. Genotipos presentes en las poblaciones de *Escherichia coli* aisladas del primer coprocultivo del niño con episodios de diarrea (2-October-1985).

El menor que presentó episodios de diarrea nació el día 1ero de Octubre de 1985, el primer coprocultivo fue realizado un día después de su nacimiento. De éste se lograron aislar un total de 10 cepas agrupadas en 8 genotipos. Se puede observar que 5 cepas comparten el gen *est1-a*; 6 *est1-b*; 6 *cfaI*; 4 *CS1* de ETEC; 6 contienen el gen *astA* de EAEC. Además una cepa presentó los genes *CS3* de ETEC; *bfpA* de EPEC y *stx1* del patotipo EHEC Una diferencia muy importante respecto al niño que no presentó episodios diarreicos es que toda la población de *Escherichia coli* de esta primera muestra de heces presentó al menos un gen de virulencia, este hecho no se detectó en ninguna de las poblaciones aisladas del niño control durante los primeros 6 meses de vida.

Genotipo 1 (3 cepas)	Genotipo 2 (1 cepa)	Genotipo 3 (1 cepa)	Genotipo 4 (1 cepa)
Sin genes de virulencia	<i>bfpA</i> , <i>eaf</i> , <i>eaeA</i>	<i>est1-b</i> , <i>cfaI</i>	<i>est1-a</i> , <i>cfaI</i> , <i>astA</i>

Tabla 8.12. Genotipos presentes en las poblaciones de *Escherichia coli* aisladas del segundo coprocultivo donde existió el primer episodio diarreico (16-October-1985).

La siguiente muestra fue tomada el 16 de Octubre de 1985, dos semanas después del nacimiento del bebé. En esta fecha el recién nacido presentó su primer episodio diarreico. De este coprocultivo se aislaron 6 cepas con 4 genotipos diferentes (Tabla 8.12). Tres cepas (50%) presentaron un genotipo (sin detección de genes de virulencia) y 3 tuvieron cada una un genotipo diferente, dado por diferentes combinaciones de genes de virulencia. En esta población se observa que solamente 2 cepas comparten el gen *cfaI* de ETEC. Si se comparan los genes detectados en esta población respecto a la del coprocultivo pasado podemos observar la aparición de los genes *eaeA* y *eaf* del patotipo EPEC. Se conservaron los genes *est1-a*; *est1-b*; *cfaI* de ETEC; *bfpA* de EPEC y *astA* de EAEC, por otra parte los genes *CS1*; *CS3* de ETEC y *stxI* de EHEC ya no fueron detectados en esta población (Tabla 8.11 y 8.12). Cabe destacar que una cepa presentó un genotipo con los tres genes de EPEC usados en esta metodología (*bfpA*, *eaf* y *eaeA*); este hecho no se presentó en ninguna de las cepas aisladas del niño que no presentó diarrea.

Genotipo 1 (4 cepas)	Genotipo 2 (1 cepa)	Genotipo 3 (1 cepa)	Genotipo 4 (1 cepa)
Sin genes de virulencia	<i>est1-a</i> , <i>est1-b</i> , <i>CS1</i> , <i>CS3</i> , <i>bfpA</i> , <i>eaf</i> , <i>eaeA</i> , <i>stxI</i> , <i>etpD</i> , <i>senB</i>	<i>astA</i>	<i>aggR</i>

Tabla 8.13. Genotipos presentes en las poblaciones de *Escherichia coli* aisladas del tercer coprocultivo del niño con episodios de diarrea (30-October-1985).

El tercer coprocultivo fue tomado el 30 de Octubre de 1985, 29 días después del nacimiento del bebé. En este periodo no se presentó la diarrea y habían pasado 14 días desde el último episodio diarreico. De éste se lograron aislar un total de 7 cepas agrupadas en 4 genotipos. 4 (57.1%) cepas no presentaron ningún gen de virulencia. Las 3 restantes no compartieron ningún gen. En comparación con el coprocultivo anterior se puede observar que se mantienen los genes *est1-a*; *est1-b* de ETEC; *bfpA*; *eaf*; *eaeA* de EPEC y *astA* de EAEC. Los genes *etpD* de EHEC; *senB* de EIEC y *aggR* de EAEC aparecieron por primera vez en cepas aisladas de este menor. El gen *stxI* de EHEC volvió a aparecer en una cepa, algo que no sucedía desde el primer coprocultivo de este menor. Una de estas cepas tuvo el mismo genotipo (únicamente gen *astA*) que una cepa aislada de la muestra de materia fecal del 2 de Octubre (recién nacido). Es importante mencionar que la cepa con el genotipo 2 (Tabla 8.13) presentó 10 genes de virulencia. Sin embargo, a pesar de la gran cantidad de genes de virulencia el menor no presentó diarrea.

Genotipo 1 (10 cepas)	Genotipo 2 (1 cepa)
Sin genes de virulencia	<i>est1-b</i>

Tabla 8.14. Genotipos presentes en las poblaciones de *Escherichia coli* aisladas del cuarto coprocultivo durante el segundo episodio diarreico (15-Noviembre-1985).

El cuarto coprocultivo fue tomado el 15 de Noviembre de 1985 durante el segundo episodio diarreico, 1 mes y 11 días después del nacimiento del bebé y 30 días después de la última diarrea. De éste se lograron aislar un total de 11 cepas agrupadas solamente en 2 genotipos. 10 (90.9%) cepas no presentaron ningún gen de virulencia. La cepa restante solamente presentó al gen *est1-b* de ETEC, el cual ha sido detectado en al menos una cepa de todos los coprocultivos anteriores.

Genotipo 1 (7 cepas)	Genotipo 2 (1 cepa)	Genotipo 3 (2 cepas)	Genotipo 4 (1 cepa)	Genotipo 5 (1 cepa)
Sin genes de virulencia	<i>est1-a, est1-b, cfaI, CSI, bfpA, eaf, stxI, etpD, aggR, astA</i>	<i>aggR</i>	<i>astA</i>	<i>est1-a, cfaI, CSI, aggR, astA</i>

Tabla 8.15. Genotipos presentes en las poblaciones de *Escherichia coli* aisladas del quinto coprocultivo donde existió el tercer episodio diarreico (27-Noviembre-1985).

El siguiente coprocultivo fue realizado el 27 de noviembre de 1985 durante el tercer episodio diarreico, 1 mes y 26 días después del nacimiento del bebé y 12 días después del último episodio de diarrea. Esta población contó con 12 cepas agrupadas en 5 genotipos. Siete (58.3%) cepas no contaron con genes de virulencia. Por otra parte, en esta población 2 cepas comparten entre ellas el gen *est1-a*; 2 *cfaI*; 2 *CS1* de ETEC; 4 comparten entre si *aggR* y 3 *astA* de EAEC. Respecto al coprocultivo pasado podemos observar que se conserva el gen *est1-b*. Los genes *bfpA*; *eaf* de EPEC; *stxI*; *etpD* de EHEC y *aggR* de EAEC volvieron a aparecer en las cepas, cosa que no ocurría desde el 30 de octubre (periodo en el que no hubo diarrea). Es importante mencionar que al igual que el 30 de octubre se descubrió una cepa con 10 genes de virulencia (Tabla 8.13 y 8.15), sin embargo genotípicamente son diferentes, ya que la cepa del 30 de octubre no posee los genes *cfaI* de ETEC; *aggR* y *astA* de EAEC y en su lugar contiene a los genes *eaeA* (EPEC); *senB* (EIEC) y *CS3* (ETEC).

Genotipo 1 (12 cepas)	Genotipo 2 (1 cepa)	Genotipo 3 (5 cepas)	Genotipo 4 (2 cepas)	Genotipo 5 (2 cepas)	Genotipo 6 (1 cepa)
Sin genes de virulencia	<i>CS1, bfpA</i>	<i>astA</i>	<i>CS1</i>	<i>est1-b</i>	<i>est1-b, cfaI, CS1, stxI, astA</i>

Tabla 8.16. Genotipos presentes en las poblaciones de *Escherichia coli* aisladas del sexto coprocultivo en donde ocurrió el cuarto episodio diarreico (2-Diciembre-1985).

El siguiente coprocultivo fue realizado el 2 de diciembre de 1985 durante el cuarto episodio diarreico, 2 meses y un día después del nacimiento del bebé y 5 días después del último episodio de diarrea. Esta población contó con 23 cepas agrupadas en 6 genotipos. Doce (52.2%) cepas no contaron con genes de virulencia. Por otra parte, en esta población 3 cepas compartieron entre ellas el gen *est1-b*; 4 *CS1* de ETEC y 6 cepas compartieron el gen *astA* de EAEC. Respecto al coprocultivo anterior podemos observar que solamente se perdieron los genes *est1-a* de ETEC, *eaf* de EPEC y *aggR* de EAEC. 5 cepas de esta población presentaron el genotipo que contiene únicamente al gen *astA*, el cual se ha repetido en reiteradas ocasiones en las poblaciones de ambos niños.

Genotipo 1 (2 cepas)	Genotipo 2 (1 cepa)	Genotipo 3 (2 cepas)
Sin genes de virulencia	<i>est1-a</i> , <i>est1-b</i> , <i>cfaI</i> , <i>CS1</i> , <i>CS3</i> , <i>bfpA</i> , <i>eaf</i> , <i>stxII</i> , <i>etpD</i> , <i>aggR</i> , <i>astA</i>	<i>astA</i>

Tabla 8.17. Genotipos presentes en las poblaciones de *Escherichia coli* aisladas del séptimo coprocultivo en donde ocurrió el quinto episodio diarreico (4-Diciembre-1985).

El siguiente coprocultivo fue tomado dos días después (4 diciembre 1985) del anterior, ya que el menor presentó su quinto episodio diarreico. En esta ocasión se lograron aislar 5 cepas con 3 genotipos diferentes. Dos (40%) cepas no contaron con genes de virulencia. Por otra parte, en esta población solamente 3 cepas compartieron entre ellas el gen *astA* de EAEC. Respecto a la población obtenida de la muestra de heces pasada se observa que todos los genes se conservan excepto *stxI*. En esta ocasión aparecieron los genes *est1-a*; *CS3* de ETEC; *eaf* de EPEC; *aggR* de EAEC; *etpD* y *stxII* de EHEC.

Genotipo 1 (5 cepas)	Genotipo 2 (1 cepa)	Genotipo 3 (1 cepa)	Genotipo 4 (1 cepa)	Genotipo 5 (1 cepa)	Genotipo 6 (1 cepa)	Genotipo 7 (1 cepa)
Sin genes de virulencia	<i>est1-b, eaeA</i>	<i>est1-b, eaf, eaeA</i>	<i>cfaI, aggR, astA</i>	<i>est1-b</i>	<i>eaf, aggR</i>	<i>est1-b, aggR, astA</i>
Genotipo 8 (1 cepa)	Genotipo 9 (1 cepa)	Genotipo 10 (1 cepa)	Genotipo 11 (1 cepa)	Genotipo 12 (1 cepa)	Genotipo 13 (2 cepas)	Genotipo 14 (1 cepa)
<i>aggR</i>	<i>est1-b, CS1, eaf</i>	<i>eaf, aggR, astA</i>	<i>astA</i>	<i>aggR, astA</i>	<i>est1-b, cfaI, eaf, aggR, astA</i>	<i>est1-a, est1-b, aggR</i>

Tabla 8.18. Genotipos presentes en las poblaciones de *Escherichia coli* aisladas del octavo coprocultivo del niño con episodios de diarrea (17-Diciembre-1985).

El octavo coprocultivo fue obtenido el 17 de diciembre de 1986, 2 meses y 16 días después del nacimiento del menor, a partir de este momento ya no se detectó ningún episodio diarreico dentro de los primeros 6 meses. La población de *Escherichia coli* de este coprocultivo estaba conformada por 19 cepas agrupadas en 14 genotipos. Un genotipo correspondió a 5 (26.3%) cepas que no presentaron ningún gen de virulencia. Mientras que los otros mostraron diversas combinaciones entre los genes *est1-b*, *eaf*, *aggR* y *astA* principalmente. 8 cepas presentaron el gen *est1-b*; 3 *cfaI* de ETEC; 6 compartieron entre ellas el gen *eaf*; 2 *eaeA* de EPEC; 9 poseían el gen *aggR*; 7 *astA* de EAEC. Respecto al coprocultivo anterior podemos observar que se conservan los genes *est1-a*; *est1-b*; *cfaI*; *CS1* de ETEC; *eaf* de EPEC; *aggR* y *astA* de EAEC. Sin embargo podemos observar la ausencia del gen *stxII*; *etpD* de EHEC; *CS3* de ETEC y *bfpA* de EPEC. Es importante mencionar que los genes de EHEC anteriormente mencionados no volvieron a ser detectados en este menor a lo largo de este estudio.

Genotipo 1 (6 cepas)	Genotipo 2 (1 cepa)	Genotipo 3 (1 cepa)	Genotipo 4 (1 cepa)	Genotipo 5 (2 cepas)	Genotipo 6 (1 cepa)	Genotipo 7 (1 cepa)	Genotipo 8 (1 cepa)
<i>Sin genes de virulencia</i>	<i>astA</i>	<i>est1-b, cfaI, aggR, astA</i>	<i>est1-a est1-b, CSI, bfpA,</i>	<i>aggR, astA</i>	<i>est1-b, astA</i>	<i>est1-b, CSI, bfpA, aggR, astA</i>	<i>est1-a, est1-b, cfaI, CSI, bfpA, aggR, astA</i>

Tabla 8.19. Genotipos presentes en las poblaciones de *Escherichia coli* aisladas del noveno coprocultivo del niño con episodios de diarrea (4-Enero-1986).

La siguiente muestra de heces fue tomada el 4 de enero de 1986, 3 meses y 3 días después del nacimiento del bebé. De este coprocultivo se lograron aislar 14 cepas y se identificaron 8 genotipos diversos. 6 (42.9%) cepas no presentaron ningún factor de virulencia. 2 cepas compartieron entre ellas el gen *est1-a*; 5 *est1-b*; 2 *cfaI*; 3 *CSI* de ETEC; 3 cepas presentaron el gen *bfpA* de EPEC; 5 cepas presentaron el gen *aggR* y 7 compartieron *astA* de EAEC. Respecto al coprocultivo pasado se puede observar que se conservan todos los genes excepto *eaeA* y *eaf* de EPEC, sin embargo ocurrió la reaparición del gen *bfpA* en cepas de esta población.

Genotipo 1 (16 cepas)	Genotipo 2 (5 cepas)	Genotipo 3 (1 cepa)	Genotipo 4 (1 cepa)
Sin genes de virulencia	<i>astA</i>	<i>cfaI, astA</i>	<i>eaeA</i>

Tabla 8.20. Genotipos presentes en las poblaciones de *Escherichia coli* aisladas del décimo coprocultivo del niño con episodios de diarrea (16-Enero-1986).

El siguiente coprocultivo fue realizado el 16 de enero de 1986, 3 meses y 15 días después del nacimiento del menor. Se lograron aislar 23 cepas que estaban agrupadas en 4 genotipos. Del total de cepas, 16 (69.6%) no presentaron ningún factor de virulencia. Entre los demás genotipos solamente se compartió el gen *astA* de EAEC entre 6 cepas. Respecto a la muestra de heces pasada, las cepas aisladas conservaron solamente los genes *cfaI* de ETEC y *astA* de EAEC; el gen *eaeA* de EPEC reapareció en una cepa de esta población, algo que no sucedía desde el 17 de diciembre de 1985.

Numero coprocultivo	Coprocultivo 11	Coprocultivo 12	Coprocultivo 13
Fecha	1-febrero-86	18-febrero-86	27-febrero-86
Genotipo 1	Sin genes de virulencia (2 cepas)	Sin genes de virulencia (6 cepas)	Sin genes de virulencia (15 cepas)
Genotipo 2	<i>aggR</i> (1 cepa)	CS1 (1 cepa)	<i>astA</i> (1 cepa)
Genotipo 3	<i>est1-b</i> , CS1, <i>astA</i> (1 cepa)		

Tabla 8.21. Cepas aisladas durante el mes de febrero con sus respectivos genotipos del niño con episodios de diarrea.

En el mes de febrero se realizaron 3 coprocultivos; a los 4 meses; 4 meses y 17 días y 4 meses y 26 días después del nacimiento del menor respectivamente. En total se lograron aislar 27 cepas, de las cuales 23 (85.2%) no presentaron ningún gen de virulencia. De las 4 cepas restantes 2 compartieron el gen *astA* de EAEC y otras 2 CS1 de ETEC. Respecto a la población de cepas del coprocultivo del 16 de enero, se puede observar que se conserva el gen *astA*. Los genes *aggR*, *est1-b* y CS1 reaparecieron durante el mes de febrero, algo que no sucedía desde el 4 de enero.

Genotipo 1 (1 cepa)	Genotipo 2 (1 cepa)
<i>cfal, eaf, astA</i>	<i>est1-a, est1-b, cfal, CSI, bfpA, eaf, stxI</i>

Tabla 8.22. Genotipos presentes en las poblaciones de *Escherichia coli* aisladas del catorceavo coprocultivo del niño con episodios de diarrea (1-Abril-1986).

El catorceavo coprocultivo se realizó el 1ero de abril de 1986, 6 meses después del nacimiento del menor. Se lograron aislar solamente dos cepas con genotipos diferentes, pero que comparten los genes *cfal* de ETEC y *eaf* de EPEC. Estas dos cepas comparten los mismos genes que las cepas del mes de febrero a excepción de *aggR* que ya no se presentó en este coprocultivo. Cabe destacar la reaparición del gen *stxI*, el cual no se presentaba en alguna cepa desde el 2 de diciembre de 1985. También reaparecieron los genes *est1-a*, *cfal*, *bfpA* y *eaf*, los cuales no fueron detectados en el mes de febrero.

Genotipo 1 (1 cepa)	Genotipo 2 (1 cepa)	Genotipo 3 (1 cepa)	Genotipo 4 (1 cepa)	Genotipo 5 (1 cepas)	Genotipo 6 (2 cepa)	Genotipo 7 (1 cepa)	Genotipo 8 (1 cepa)
<i>est1-a, est1-b, astA</i>	<i>eaeA, astA</i>	<i>est1-a est1-b, cfaI, CS1, bfpA, eaf, astA</i>	<i>est1-a cfaI, bfpA, stxI, aggR, astA</i>	<i>est1-a, est1-b, bfpA, astA</i>	<i>eaeA, astA</i>	<i>cfaI, CS1, bfpA, eaeA, astA</i>	<i>est1-a, est1-b, cfaI, bfpA, eaeA, astA</i>

Tabla 8.23. Genotipos presentes en las poblaciones de *Escherichia coli* aisladas del quinceavo coprocultivo del niño con episodios de diarrea (18-Abril-1986).

El quinceavo coprocultivo fue tomado el 18 de abril de 1986, 6 meses y 17 días después del nacimiento del bebé. De éste se lograron aislar un total de 9 cepas agrupadas en 8 genotipos. Todas presentaron genes de virulencia. 5 cepas compartieron el gen *est1-a*; 4 *est1-b*; 4 *cfaI*; 3 *CS1* de ETEC; 5 presentaron el gen *bfpA*; 5 *eaeA* de EPEC; 9 compartieron el gen *astA* de EAEC. Respecto al coprocultivo anterior se observa que se conservan todos los genes, aunque en esta ocasión reaparecieron los genes *aggR* y *eaeA*, los cuales no se presentaban desde febrero y enero respectivamente. Si se comparan los genotipos de este coprocultivo con el primero realizado el 2 de Octubre de 1985, se puede observar que los genes *est1-a*; *est1-b*; *cfaI*, *CS1* de ETEC; *bfpA* de EPEC; *stxI* de EHEC y *astA* de EAEC se presentan en las cepas de los dos coprocultivos.

9. Discusión de resultados.

Escherichia coli es un microorganismo que está presente en el ambiente y en nuestro tracto gastrointestinal como parte de nuestra microbiota. También es bien sabido que existen ciertas cepas de este microorganismo que son capaces de producir enfermedades intestinales y extraintestinales (Karper. J, Nataro, J., Mobley. H. 2004, Croxen, M. et al. 2013). La diferencia principal entre las cepas ambientales, de la microbiota y las patógenas radica en el contenido del denominado genoma accesorio (Dobrindt, U. et al. 2010), también gracias a otros eventos como pérdida de información genética, rearrreglos en la molécula de DNA y mutaciones puntuales (Dobrindt, U. et al. 2010) se pueden dar estas diferencias. La transferencia horizontal de genes y la recombinación han sido fenómenos muy importantes que han ayudado a esta especie a poder adaptarse a diferentes ambientes y son eventos que suelen darse con relativa facilidad (Thomas, C., Nielsen, K. 2005, Feil, E., Spratt, B. 2001). En este trabajo se estudiaron cepas de *E. coli* aisladas de dos bebés durante sus primeros 6 meses de vida, para determinar si podían existir cepas con genes de virulencia y observar qué efectos causaron estas cepas sobre el menor. Para un recién nacido la principal fuente de *E. coli* proviene de la madre, en los siguientes meses el ambiente y la alimentación empezarán a jugar papeles más importantes (Munyaka, P. et al 2014, Thompson, O., Maldonado, J., 2007, Nowrouzian, F. et al 2003). Es a partir de este momento donde puede existir contaminación con cepas patógenas provocando un episodio diarreico.

9.1 Genes del patotipo ETEC en cepas comensales.

En ambos bebés se detectó una alta frecuencia de los genes *est1-b*, *cfal*, *CS1* y *est1-a*, se ha reportado que estos genes suelen encontrarse en diversos plásmidos, algunos de éstos son autotransferibles como sucede con pCoo (Johnson, T., Nolan, L. 2009), mientras que otros no son movilizables por sí solos, tal es el caso del plásmido presente en el serotipo O128ac:H12 el cual contiene los genes que codifican para la toxina termoestable y para el CFA/I (Reis, M. et al. 1980), mismo caso se presenta con el plásmido pH10407_95, que contiene el gen *cfal* y una zona trunca en la región que codifica para el pilus F (Johnson, T., Nolan, L. 2009). Para que puedan transferirse esta clase de plásmidos se requiere de la ayuda de otros que si son capaces de automovilizarse con frecuencias de éxito de hasta el 30% (Henriqueta, M. et al. 1980).

Plásmidos secuenciados de las cepas ETEC H10407 y E1392/75 (pETEC948, pETEC666, pETEC1018, pETEC746, pETEC557) presentan diversos elementos de inserción, siendo principalmente las IS1, IS2, IS3 y la IS1414 (Crossman, L. et al 2010). Esta gran variedad de plásmidos incrementa la posibilidad de que una cepa no necesariamente patógena presente uno o varios genes de este patotipo dentro de su genoma, también puede ocurrir que a partir de transposición los genes de virulencia presentes en los plásmidos de cepas de ETEC pasen a plásmidos que en un principio no poseían estos genes. En muchos estudios y revisiones acerca de los patotipos de *E. coli* se ha reportado que las cepas de ETEC y de EPEC se presentan con mucha regularidad en países en vías de desarrollo (Nataro, J., Kaper, J. 1998, Kaper, J., Nataro, J. 2004, Cravioto, A. et al. 1988, Ochoa, T. et al. 2011, Croxen, M., Finlay, B. 2010, Croxen, M. et al 2013) con lo cual se puede explicar la presencia de estos genes en cepas comensales con una alta frecuencia.

En ambos niños a lo largo de los primeros 6 meses se pudieron detectar cepas cuyo genotipo presentaba un perfil que según la literatura se ha relacionado con episodios diarreicos asociados al patotipo ETEC, esta combinación de genes está conformada por la toxina termolábil (*eltA*) y/o toxina termoestable (*est1-a* y/o *est1-b*), más algún factor de colonización (*CS1*, *CS3* y *cfal*) (Croxen, M. et al. 2013; Nataro, J., Kaper, J. 1998; Kaper, J. et al. 2004; Arduino, R., DuPont, H. 1993; Croxen, M., Finlay, B. 2010; Neeser, J. et al. 1989; Binsztein, N. et al. 1991; Gonzales, L. et al. 2013; Joffré, E. et al. 2014; Rivera, F. et al 2012; Mansour, A. et al. 2014). Sin embargo, en ambos niños hubo la presencia de cepas con estos genes sin ocurrir episodios de diarrea, muy probablemente porque se requiere de una red regulatoria para la expresión de un factor de virulencia. Por ejemplo, en la cepa ETEC H10407 para que se expresen los genes *cfal* o *CS1* se requiere de los genes *cfar* y *rns* respectivamente; estos genes reguladores suelen encontrarse en el mismo u otro plásmido, o inclusive en el cromosoma bacteriano (Johnson, T., Nolan, L. 2009), tal es el caso de *rns* que suele encontrarse en el pETEC_80 (Caron, J. et al. 1989). Además estos factores de colonización requieren de proteínas chaperonas y “ushers” para poder ayudar a la estabilización, plegamiento y ensamblaje correcto (Nataro, J., Kaper, J. 1998) por lo que la detección por PCR y/o hibridación de una región de DNA de estos factores de colonización no es determinante para caracterizar a una cepa como patógena de ETEC, la baja frecuencia del gen *eltA* explicaría la ausencia de diarrea acuosa en estos niños asociados a cepas que expresan la toxina termolábil (Croxen, M. et al. 2013; Nataro,

J., Kaper, J. 1998), la cual tiene un mecanismo de acción y efectos fisiológicos similares a la toxina del cólera (CT) (Kaper, J. et al. 2004) causando diarrea severa.

La alta frecuencia de cepas que presentaron genes de virulencia de ETEC nos sugiere que el fenómeno de transferencia horizontal de genes de este patotipo entre cepas de *E. coli* es frecuente. No podemos explicar si la presencia de genes de ETEC confiere ventaja a las bacterias comensales, pero si se comprobó la persistencia de estos genes (*est1-b*, *est1-a* y *cfal*) en cepas aisladas durante los primeros 6 meses en ambos niños. Sería interesante determinar si existe alguna función de estos genes en cepas comensales, ya que en diversos estudios en pacientes sanos ya sean adultos o menores se han presentado cepas con estos genes sin que los pacientes presenten síntomas (Arduino, R., DuPont, H. 1993; Croxen, M., Finlay, B. 2010; Neeser, J. et al. 1989; Binsztein, N. et al. 1991; Gonzales, L. et al. 2013; Joffré, E. et al. 2014; Rivera, F. et al 2012; Mansour, A. et al. 2014), sugiriendo que la presencia de diarrea no está determinada solamente por cepas denominadas como “patógenas”, sino que otros elementos relacionados al hospedero son también importantes para determinar una enfermedad infecciosa.

9.2 Genes del patotipo EPEC en cepas comensales.

Los genes del patotipo EPEC más frecuentes fueron *bfpA* más *eaf* en las cepas caracterizadas. Estos genes han sido descritos en el plásmido *eaf*, como pMAR7, pMAR2 y pB171 (Johnson, T., Nolan, L. 2009) (Johnson, T., Nolan, L. 2009, Nataro, J., Kaper, J. 1998). Se ha reportado que algunas cepas que producen el BFP dan un resultado negativo para la presencia de la secuencia *eaf*, mientras que otras cepas dan positivo para esta secuencia sin formar el BFP (Croxen, M. et al. 2013). Las cepas comensales aisladas de estos niños presentaron estas mismas características. Dentro de los plásmidos *eaf* se ha detectado un operón *perABC* relacionado con la virulencia (Croxen, M. et al. 2013); éste funciona como regulador para la expresión de los genes *bfp* y de él mismo (Croxen, M. et al. 2013). También para la regulación de la expresión de la fimbria y los genes *perABC* se requiere de la proteína reguladora asociada al locus LEE denominada Ler (Croxen, M. et al. 2013). Todos estos genes relacionados muestran una combinación de interacción que obliga a una cepa patógena a tener la presencia de todos ellos. El gen *eaeA* está relacionado con la adherencia íntima y la lesión A/E (Kaper, J. et al. 2004, Croxen, M. et al. 2013), éste gen se ha tomado como un marcador de la presencia de la isla de patogenicidad LEE, sin embargo, sería interesante determinar los genes que codifican para

el aparato de secreción tipo III (*esc* o *sep*), o genes de las proteínas efectoras (*espA*, *espB* y *espD*), además del gen regulador del locus LEE, denominado *ler* (Croxen, M. et al. 2013, Nataro, J., Kaper, J. 1998). El gen *eaeA* está presente dentro de la isla de patogenicidad LEE (Croxen, M. et al. 2013) y se ha demostrado que puede insertarse por recombinación específica de sitio dentro del cromosoma de la cepa *E. coli* K12, en una región donde encontramos un gen que codifica para un tRNA de Selenocisteína (*selC*); en este mismo locus puede insertarse una PAI de UPEC que contiene genes para una hemolisina (*hly*) y una fimbria (*prf*) (Nataro, J., Kaper, J. 1998), mostrando que las cepas de *E. coli* presentan un sitio de inserción propenso a la inserción de DNA ectópico.

En el niño con episodios de diarrea, se detectaron dos cepas que dieron positivo para tres genes de EPEC (*bfpA*, *eaf* y *eaeA*). Estas cepas se aislaron el mes de Octubre y una fue aislada durante un episodio de diarrea (16-October 1985) (recién nacido). No podríamos decir que este tipo de cepas fueron las responsables de la diarrea en este niño, ya que una cepa aislada el 30 de Octubre (1 mes de nacido), además de los genes de EPEC también presentó *est1-a*, *est1-b*, *CS1* y *CS3* de ETEC; *stxI* y *etpD* de EHEC y *senB* de EIEC y el niño se encontraba asintomático.

9.3 Genes del patotipo EHEC en cepas comensales.

En el menor sin episodios de diarrea las cepas comensales no presentaron más de un gen de EHEC. Los marcadores genéticos usados para identificar al patotipo EHEC/STEC son los relacionados a la toxina tipo Shiga (*stxI* y/o *stxII*), estos genes también están presentes en bacteriófagos (Croxen, M. et al. 2013, Nataro, J., Kaper, J. 1998, Perna, N. et al. 2001) y pueden pasar a ser parte del genoma de *E. coli* durante el ciclo lisogénico, ya que, en el ciclo lítico se dará la producción y liberación de la toxina por parte del bacteriofago (Croxen, M. et al. 2013). Es probable que las cepas aisladas de este niño hayan poseído el fago con el gen *stxI* en estado lisogénico, explicando la falta de diarrea.

Por otro lado, en el niño con episodios de diarrea se detectaron 3 cepas con la combinación *stx* y *etpD* (codificado por un gen presente en un plasmido), estos genes se han asociado con cepas STEC (Croxen, M. et al. 2013), aunque hubo una cepa aislada el 30 de octubre (1 mes de edad) que presentó esta combinación no fue aislada de diarrea, en este caso es muy probable que el estado físico del niño fue lo que determinó la ausencia de diarrea y no el genotipo de la cepa, es conocido que factores intrínsecos del huésped aumenten la expresión de las toxinas tipo Shiga como la deficiencia de hierro y la reducción en la temperatura (Croxen, M. et al. 2013, Nataro, J., Kaper, J. 1998). En este

mismo bebé, se aisló una cepa con el gen *stxII* el 4 de diciembre de 1985 (2 meses de nacido) durante un episodio diarreico, un hallazgo sorprendente fue que en ésta cepa se detectaron los genes *est1-a*, *est1-b*, *cfal*, *CS1* y *CS3* de ETEC; *bfpA* y *eaf* de EPEC; *etpD* de EHEC, *aggR* y *astA* de EAEC, indicando una transferencia horizontal de genes muy activa. Se han reportados cepas híbridas con una combinación de genes de STEC con EAEC implicadas en síndrome urémico hemolítico (Boisen, N. et al. 2015). Sin embargo, actualmente ésta cepa está siendo bien caracterizada y asegurarse que realmente presenta esta carga genética para mandarla a secuenciar.

Para confirmar la presencia de cepas EHEC/STEC, no sólo basta con detectar los genes de las toxinas tipo Shiga, ya que se cree que no todas las cepas STEC son patógenas (Nataro, J., Kaper, J. 1998). La detección de otros genes de este patotipo puede servir para la identificación de una cepa patógena. Para determinar una cepa de *E. coli* patotipo STEC, es necesario que presente además de los genes *stxI*, *stxII*, *etpD* otros genes presentes en el plásmido pO157 como el gen de la hemolisina (*ehx*) y la catalasa-peroxidasa codificada por el gen *katP* y los relacionados con la lesión de adherencia y borrado de microvellosidades.

9.4 Genes del patotipo EIEC en cepas comensales.

El gen *senB* del patotipo EIEC se detectó en 7 cepas obtenidas de 2 coprocultivos consecutivos (26 de noviembre (2 meses) y 10 de diciembre de 1985 (3 meses de edad)) del niño sin episodios de diarrea. El gen que codifica para la toxina Sen cuyo mecanismo de acción no está descrito, pero se sabe que está presente en el plásmido plNv (Nataro, J., Kaper, J. 1998) y está asociado con diarrea. Durante los 14 días que estuvo presente este tipo de cepa, el bebé no presentó diarrea y no se detectó el gen en cepas aisladas posteriormente. Nowrouzian, F. y col. en el 2003, realizaron un estudio donde observaron la variación de las poblaciones de *E. coli* que colonizan el tracto intestinal de menores; a partir de sus resultados pudieron clasificar a las poblaciones de *E. coli* en dos grandes grupos. Las cepas transitorias son aquellas *E. coli* que solo permanecían en el intestino durante algunas semanas y las cepas residentes son aquellas que pueden estar presentes durante meses o años. Cepas con genes del patotipo EIEC sólo pudieron ser detectadas en un periodo de 14 días a lo largo de los 6 meses, en cambio sí se pudieron detectar con más regularidad cepas con genes de los patotipos ETEC, EPEC y EAEC. Es probable que cepas portadoras del gen *senB* hayan sido transitorias y en una proporción muy baja, ya

que el niño no registró diarrea. Sería importante analizar en estas cepas la presencia de otros genes del plasmido *plnv*, y determinar el fenotipo de invasión del enterocito e investigar cual fue el motivo de que el menor no haya presentado síntomas.

En el menor con episodios de diarrea solamente una cepa presentó el gen *senB* del patotipo EIEC la cual se aisló el 30 de octubre de 1985 (1er mes) en un periodo donde el menor no presentó diarrea, por tanto la presencia de este gen en las dos poblaciones difícilmente podrá usarse como marcador entre cepas comensales y patógenas.

9.5 Genes del patotipo EAEC en cepas comensales.

La virulencia en cepas EAEC se atribuye a una serie de plásmidos que contienen genes que codifican para fimbrias que muestran un patrón de adherencia agregativa (Croxen, M. et al. 2013), un gen que codifica para un regulador positivo (*aggR*), la proteína dispersina codificada por el gen *aap* y una serie de toxinas que pueden estar presentes o no (Pet, EAST-1, Pic y ShET 1). Se conocen las secuencias completas de tres plásmidos con estas características denominados pO42, p55989 y pO86A1 (Johnson, T., Nolan, L. 2009), pero en la realidad, existe una enorme variabilidad genotípica y fenotípica en las cepas EAEC. Por ejemplo, existen cepas que presentan los patrones de adherencia agregativa y la diarrea no se presenta (Croxen, M. et al. 2013); por el contrario pueden presentarse cepas patógenas que no contienen el gen regulador *aggR* (Croxen, M. et al. 2013). En este estudio podemos encontrar cepas que poseen tanto *aggR* como *astA* y fueron aisladas del niño sin evento de diarrea. En algunos estudios muestran el aislamiento de cepas con el gen *aggR* de personas sanas (Croxen, M. et al. 2013) y documentan que algunos individuos presentan los nucleótidos AA en la posición -251 del gen que codifica para la interleucina 8, ocasionando una respuesta exacerbada ante cepas EAEC, sugiriéndonos que las condiciones intrínsecas y/o extrínsecas del hospedero pueden ser determinantes para que un microorganismo produzca enfermedad.

Respecto al gen *astA* (EAEC) un estudio realizado por Savarino et al. 1996, muestra que el 38% de cepas aisladas de niños sin diarrea presentan dicho gen. También Mc Veigh et al. 2000, ha reportado que el gen se encuentra embebido dentro del IS1414, por tanto, puede movilizarse y dispersarse por transferencia horizontal entre la población bacteriana, este evento genético explicaría la razón por la que se detectó con tanta frecuencia en nuestras cepas aisladas de ambos bebés.

La regulación de genes de virulencia del patotipo EAEC no solamente depende de *aggR*. Se ha estudiado la presencia del gen *aar* en este microorganismo y su papel en la regulación de genes de virulencia; se ha observado que mutaciones en *aar* ocasionan una mayor expresión de *aggR* (Santiago, A. et al. 2014) y en consecuencia una mayor expresión de cada uno de los factores de virulencia de EAEC. Proteínas similares a Aar se han detectado en otros patógenos Gram-negativo como: ETEC, STEC, EPEC o *C. rodentium* (Santiago, A. et al. 2014). Sin embargo aún no se conocen muchos datos acerca de estos genes así como la relación de éstos con la patogenicidad en estos microorganismos.

9.6 Otros factores que pueden producir diarrea.

Hasta este momento solamente se ha hablado de la relación que podría existir entre el contenido de genes de virulencia y la presencia de diarrea; sin embargo falta considerar otros factores que también pueden estar jugando papeles importantes para determinar la presencia de diarrea en el infante. Es bien sabido que *E. coli* es de los primeros microorganismos que coloniza el tracto gastrointestinal de un recién nacido, también se sabe que existe una gran tasa de transferencia horizontal y recombinación entre cepas Gram-negativo (Thomas, C., Nielsen, K. 2005), no es sorprendente que cepas comensales puedan poseer genes de virulencia, ya que al momento de nacimiento si es por parto natural, las cepas de la madre pasan al menor, ocasionando que puedan existir cepas con genes de virulencia que se puedan transmitir a cepas comensales. Es probable que estos microorganismos no expresen estos genes debido a que su genoma y regulación estén más relacionados con un estilo de vida como comensal que al estilo de vida como patógeno, se ha observado que las cepas comensales residentes poseen genes que codifican para varias adhesinas, bacteriocinas (Abraham, S. et al. 2012) y aerobactinas (Östblom, A. et al. 2011), ocasionado que la bacteria se encuentre estable en el hospedero y los genes de virulencia no se expresen. Sin embargo cierta alteración en el ambiente intestinal podría ocasionar un episodio diarreico debido a un cambio en la adaptabilidad del microorganismo llevándolo a la activación de genes. Por ejemplo, la cepa comensal K12 de *E. coli* posee una proteína tipo histona que tras sufrir dos cambios en su secuencia de aminoácidos (lisina por glutamina en el aminoácido 38 y leucina por valina en el aminoácido 42) adquiere un estilo de vida como patógeno, esto debido a que se modifica su perfil de transcripción llevándolo a ser un microorganismo invasivo. Se ha podido observar que la cepa K12 posee un fenotipo de intracelularidad haciéndolo capaz de poder

escapar del fagosoma y poder replicarse intracelularmente (Koli, P. et al. 2011). A partir de este hecho adquiere gran importancia el estudio de la regulación genética cuando un microorganismo cambia de ambiente o éstas son adversas para su desarrollo. Otro factor importante tendría que ver con el sistema inmune del hospedero debido a que *E. coli* es de los primeros microorganismos que colonizan el tracto gastrointestinal jugando un papel importante en la maduración del sistema inmune, ocasionando que el microorganismo pueda permanecer como parte de la microbiota gracias a un fenómeno denominado tolerancia (Bezirtzoglou, E., Stravtopoulou, E. 2011); por lo que, si estas cepas están adaptadas a un estilo de vida como comensal y el sistema inmune lo reconoce como tal, quedarán sin causar daño en el intestino. Sin embargo si por algún motivo el sistema inmune no reconoce a la bacteria como parte de la microbiota normal y la ataca, ésta podría cambiar su estilo de vida volviéndola patógena y en consecuencia desencadenando la enfermedad infecciosa en el hospedero. Todos estos eventos y datos nos muestran la importancia de estudiar todos los factores que determinarán la presencia de diarrea por cepas de *E. coli* y no solamente sus genes de virulencia.

10. Conclusiones.

Se logró determinar el perfil de genes de virulencia de cepas de *E. coli* aisladas de dos niños durante sus primeros 6 meses de vida. Aunque solamente uno de los bebés presentó episodios de diarrea durante el periodo de estudio en ambos menores se aislaron gran número de cepas comensales con genes de virulencia de diversos patotipos de *Escherichia coli*. Este tipo de cepas se logró detectar desde los primeros días después del nacimiento; por lo que se puede sugerir que la presencia de genes de virulencia no basta para poder determinar si una cepa terminará por causar algún síntoma en el hospedero. Otros factores tanto del ambiente, como del microorganismo, incluso del mismo hospedero, pueden ser determinantes en desencadenar algún episodio de diarrea. Genes relacionados con la toxina de Shiga y *etpD* presentes en el patotipo EHEC; el gen *eltA* y CS3 del patotipo ETEC; *eaeA* de EPEC y *aggR* de EAEC, casi no están presentes en estas cepas de tipo comensal, confirmando lo documentado, que estos genes son verdaderos marcadores de virulencia de un tipo de *E. coli* patógena asociada a una enfermedad infecciosa. Sin embargo es muy importante establecer qué combinación de genes de virulencia están correlacionados con cepas virulentas. Este trabajo muestra que los genes de virulencia pueden estar presentes en cualquier cepa de *E. coli*.

11. Bibliografía.

- (1) Rajkhowa. S., Scaria. J., García. D., Musser. K., Akey. B., Chang. Y. Analysis of *Escherichia coli* O157 clinical isolates by sequence typing. BMC Research Notes, 2010, Vol. 3, pp. 343-354.
- (2) Nataro. J., Kaper. J. Diarrheogenic *Escherichia coli*. Clinical Microbiology Reviews, 1998, Vol. 11 No. 1, pp. 142-201.
- (3) Cravioto. A., Reyes. R., Ortega. R., Fernández. G., Hernández. R., López. D. Prospective study of diarrhoeal disease in a cohort of rural Mexican children: incidence and isolated pathogens during the first two years of life. Epidemiology and Infection, 1988, Vol. 101, pp. 123-134.
- (4) Kaper. J., Nataro. J., Mobley. H. Pathogenic *Escherichia coli*. Nature Reviews Microbiology, 2004, Vol. 2, pp. 123-140.
- (5) Feil. E., Spratt. B. Recombination and the Population Structures of Bacterial Pathogens. Annual Reviews Microbiology, 2001, Vol. 55, pp 61-90.
- (6) Doyle, M., 2002. *Escherichia coli* O157:H7. En: Doyle, P., Zhao, T., Meng, J., Zhao, S. eds. Microbiología de los alimentos. Fundamentos y fronteras. Zaragoza: Acribia, pp. 177-198.
- (7) Mac Faddin, J. 1991. Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. Distrito Federal. Médica Panamericana.
- (8) Dore, J., Corthier, G. The human intestinal microbiota. Gastroentérologie Clinique et Biologique, 2010, Vol 34, pp. S7-S15.
- (9) Candela, M., Biagi, E., Maccaferri, S., Turrone, S., Brigidi, P. Intestinal microbiota is a plastic factor responding to environmental changes. Trends in Microbiology, 2012, Vol 20, pp. 385-391.
- (10) Surawicz, C. The microbiota and infectious diarrhea. Gastroentérologie Clinique et Biologique, 2010, Vol 34, pp. S29-S36

- (11) Fallani, M., Young, D., Scott, J., Norin, E., Amarri, S., Rüdiger A, et al. The intestinal microbiota of 6 weeks old infants across Europe: Geographic influence beyond delivery mode, breastfeeding and antibiotics. *Journal of Pediatric Gastroenterology*, 2010;
- (12) Nowrouzian, F., Hesselmar, B., Saalman, R., Strannegard, I., Aberg, N., Wold, A., Adlerberth, I. *Escherichia coli* in infants Intestinal Microflora: Colonization Rate, Strain Turnover, and Virulence Gene Carriage. *Pediatric Research*, 2003, Vol 54 pp. 8-14.
- (13) Sela, D., Mills, D. Nursing our microbiota: molecular linkages between bifidobacteria and milk oligosaccharides. *Trends in Microbiology*, 2010, Vol. 18, pp. 298-307.
- (14) Heijtz, R., Wang, S., Anuar, F., Qian, Y., Björkholm, B., Samuelsson, A., Hibberd, M., Forssberg, H., Pettersson, S. Normal gut microbiota modulates brain development and behavior. *PNAS*, 2011, Vol. 108, pp. 3047-3052.
- (15) Bettelheim, K., Breadon, A., Faiers, M., O'Farrell, S., Shooter, R. The origin of O serotypes of *Escherichia coli* in babies after normal delivery. *Journal of Hygiene*, 1974, Vol. 72, pp. 67-70.
- (16) Adlerberth, I., Jalil, F., Carlsson, B., Mellander, L., Hanson, L., Larsson, P., Khalil, K., Wold, A. High turnover rate of *Escherichia coli* strains in the intestinal flora of infants in Pakistan. *Journal of Infectology*, 1998, Vol. 121, pp. 587-598.
- (17) Levine, M., Edelman, R. Enteropathogenic *Escherichia coli* of classic serotypes associated with infant diarrhea: epidemiology and pathogenesis. *Epidemiology Reviews*, 1984, Vol. 6 pp. 31-51.
- (18) Hedberg, C., Savarino, S., Besser, J., Paulus, C., Thelen, V., Myers, L., Cameron, D., Barrett, T., Kaper, J., Osterholm, M. An outbreak of foodborne illness caused by *Escherichia coli* O39-NM; an agent not fitting into the existing scheme for classifying diarrheogenic *E coli*. *Journal of Infectious Diseases*, 1997, Vol. 176 pp. 1625-1628.
- (19) Cravioto, A., Gross, J., Scotland, M., Rowe, B. An adhesive factor found in strains of *Escherichia coli* belonging to the traditional infantile enteropathogenic serotypes. *Current Microbiology*, 1979, Vol. 3 pp. 95-99.
- (20) Girón, J., Ho, A., Schoolnik, G. An inducible bundle-forming pilus of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Science*, 1991, Vol. 254, pp. 710-713.

- (21) Mc Cormick, B., Colgan, S., Delp-Archer, C., Miller, S., Madara, J. *Salmonella typhimurium* attachment to human intestinal epithelial monolayers: transcellular signalling to subepithelial neutrophils. *Journal of Cell Biology*, 1993, Vol. 123, pp. 895-907.
- (22) Sears, H., Brownlee, I. Further observations on the persistence of individual strains of *Escherichia coli* in the intestinal tract of man. *Journal of Bacteriology*, 1951, Vol. 63, pp. 47-57.
- (24) Kaper, J., Yu, J. Cloning and characterization of the *eae* gene of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Molecular Microbiology*, 1992, Vol. 6, pp. 411-417.
- (25) Savarino, S., McVeigh, A., Watson, J., Cravioto, A., Molina, J., Echeverria, P., Bhan, M., Levine, M., Fasano, A. Enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin is not restricted to Enteroaggregative *E. coli*. *Journal of Infectious Diseases*, 1996, Vol. 173, pp. 1019-1022.
- (26) Arduino, R., DuPont, H. Traveler's diarrhea. *Baillieres Clinic Gastroenterology*, 1993, Vol. 7, pp. 365-385.
- (27) Kyung, Y., Mazmanian, S. Has the microbiota played a critical role in the evolution of the adaptive immune system? *Science*, 2010, Vol. 330, pp. 1768-1773.
- (28) Ohnmacht, C., Marques, R., Presley, L., Sawa, S., Lochner, M., Eberl, G. Intestinal microbiota, evolution of the immune system and the bad reputation of pro-inflammatory immunity. *Cellular Microbiology*, 2011, Vol. 13, pp. 653-659.
- (29) Rook, G., Brunet, L. Microbes, immunoregulation, and the gut. *Gut*, 2005, Vol. 54, pp. 317-320.
- (30) Ochoa, T., Mercado, E., Durand, D., Rivera, F., Mosquito, S., Contreras, C., Riveros, M., Lluque, A., Barletta, F., Prada, A., Ruiz, J. Frecuencia y patotipos de *Escherichia coli* diarrogénica en niños peruanos con y sin diarrea. *Revista Peruana de Medicina Experimental en Salud Pública*, 2011, Vol. 28, pp. 13-20.
- (31) Reid, S., Herbelin, J., Bumbaugh, A., Selander, R., Whittam, S. Parallel evolution of virulence in pathogenic *Escherichia coli*. *Nature*, 2000, Vol. 406, pp. 64-67.
- (32) Mc Veigh, A., Fasano, A., Scott, D., Jelacic, S., Moseley, S., Robertson, D., Savarino, S. IS414 an *Escherichia coli* insertion sequence with a Heat-Stable enterotoxin gene

embedded in a transposase-like gene. *Infection and immunity*, 2000, Vol. 68, pp. 5710-5715.

(33) Weissman, S., Moseley, S., Dykhuizen, D., Sokurenko, E. Enterobacterial adhesins and the case for studying SNPs in bacteria. *Trends in microbiology*, 2003, Vol. 11, pp. 115-117.

(34) Maurelli, A., Fernández, R., Bloch, C., Rode, C., Fasano, A. "Black holes" and bacterial pathogenicity: A large genomic deletion that enhances the virulence of *Shigella* spp. And enteroinvasive *Escherichia coli*. *Proceedings of the national academy of sciences*, 1998, Vol. 95, pp. 3943-3948.

(35) Rotariu, O., Ogden, I., Mac Ritchie, L., Forbes, K., Williams, P., Cross, P., Hunter, C., Teunis, P., Strachan, J. Combining risk assessment and epidemiological risk factors to elucidate the sources of human *E. coli* O157 infection. *Epidemiology and infection*, 2011, Vol. 140, pp. 1414-1429.

(36) Fraser, M., Fujinaga, M., Cherney, M., Melton-Celsa, A., Twiddy, E., O'Brien, A., James, M. Structure of Shiga Toxin Type 2 (Stx2) from *Escherichia coli* O157:H7. *The journal of Biological Chemistry*, 2004, Vol. 279, pp. 27511-27517.

(37) Cadona, J., Bustamante, A., Parma, A., Lucchesi, P., Sanso, A. Distribution of additional virulence factors related to adhesion and toxicity in Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from raw products in Argentina. *Letters in Applied Microbiology*, 2013, Vol. 56, pp. 449-455.

(38) Brunder, W., Schmidt, H., Karch, H. *katP*, a novel catalase-peroxidase encoded by the large plasmid of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Microbiology*, 1996, Vol. 142, pp. 3305-3315.

(39) Brunder, W., Schmidt, H., Karch, H. *espP*, a novel extracellular serine protease of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 cleaves human coagulation factor V. *Molecular Microbiology*, 1997, Vol. 24, pp.767-778.

(40) Schmidt, H., Henkel, B., Karch, H. A gene cluster closely related to type II secretion pathway operons of Gram-negative bacteria is located on the large plasmid of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 strains. *FEMS Microbiology Letters*, 1997, Vol. 148, pp. 265-272.

- (41) Levine, M., Xu, J., Kaper, J., Lior, H., Prado, V., Tall, B., Nataro, J., Karch, H., Wachsmuth, K. A DNA probe to identify enterohemorrhagic *Escherichia coli* of O157:H7 and other serotypes that cause hemorrhagic colitis and hemolytic uremic syndrome, 1986. *The journal of infectious diseases*, Vol. 156, pp. 175-182.
- (42) Perna, N., Plunkett III, G., Burland, B., Mau, B., Glasner, J., Rose, D., Mayhew, G., Evans, P., Gregor, J., Kirkpatrick, H., Posfais, G., Hackett, J., Klink, S., Boutin, A., Shao, Y., Miller, L., Grotbeck, E., Davis, N., Lim, A., Dimalantal, E., Potamouisis, K., Apodaca, J., Anantharaman, T., Lin, J., Yen, G., Schwartz, D., Welch, R., Blattner, F. Genome sequence of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. 2001 *Nature*, Vol. 409, pp. 529-533.
- (43) Plunkett III, G., Rose, D., Dufree, T., Blattner, F. Sequence of shiga toxin 2 phage 933W from *Escherichia coli* O157:H7: Shiga toxin as a phage late-gene product. *Journal of bacteriology*, 1999, Vol. 181, pp. 1767-1778.
- (44) Henry, F., Udoy, A., Wanke, C., Aziz, K. Epidemiology of persistent diarrhea and etiologic agents in Mirzapur, Bangladesh. *Acta Paediatrica Supplement*, 1992, Vol. 381, pp. 27-31.
- (45) González, R., Díaz, C., Mariño, M., Pequenezze, M., Pérez-Schael, I. Age-specific prevalence of *Escherichia coli* with localized and aggregative adherence in Venezuelan infants with acute diarrhea. *Journal of Clinical Microbiology*, 1997, Vol. 35, pp. 1103-1107.
- (46) Hicks, S., Candy, D., Phillips, D. Adhesion of enteroaggregative *Escherichia coli* to pediatric intestinal mucosa in vitro. *Infection and Immunity*, 1996, Vol. 64, pp. 4751-4760.
- (47) Navarro, F., Elias, W. Autotransporters and virulence of enteroaggregative *E. coli*. *Gut Microbes*, 2011, Vol. 2, pp. 13-24.
- (48) Velarde, J., Varney, K., Inman, K., Farfán, M., Dudley, E., Fletcher, J., Weber, D., Nataro, J. Solution structure of the novel dispersin protein of enteroaggregative *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*, 2007, Vol. 66, pp. 1123-1135.
- (49) Croxen, M., Finlay, B. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. *Nature*, 2010, Vol. 8, pp. 26-38.

- (50) Croxen, M., Law, R., Scholz, R., Keeney, K., Wlodarska, M., Finlay, B. Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews*, 2013, Vol. 26, pp. 823-879.
- (51) Boisen, N., Struve, C., Scheutz, F., Krogfelt, K., Nataro, J. New adhesion of enteroaggregative *Escherichia coli* related to the Afa/Dr/AAF family. *Infection and Immunity*, 2008, Vol. 76, pp. 3281-3292.
- (52) Bhargava, S., Johnson, B., Hwang, J., Harris, T., George, A., Muir, A., Dorff, J., Okeke, I. Heat-resistant agglutinin 1 is an accessory enteroaggregative *Escherichia coli* colonization factor. *Journal of bacteriology*, 2009, Vol. 191, pp. 4934-4942.
- (53) Navarro, F., Sonnested, M., Teter, K. Host-toxin interactions involving EspC and Pet, two serine protease autotransporters of the *Enterobacteriaceae*. *Toxins*, 2010, Vol. 2, pp. 1134-1147.
- (54) Morin, N., Santiago, A., Ernst, R., Guillot, J., Nataro, J. Characterization of the AggR regulon in Enteroaggregative *Escherichia coli*. *Infection and immunity*, 2013, Vol. 81, pp. 122-132.
- (55) Lan, R., Reeves, P. *Escherichia coli* in disguise: molecular origins of *Shigella*. *Microbes and infection*. 2002, Vol. 4, pp. 1125-1132.
- (56) Schroeder G., Hilbi, H. Molecular pathogenesis of *Shigella* spp. Controlling host cell signaling, invasion, and death by type III secretion. *Clinical Microbiology Reviews*. 2008, Vol. 21, pp. 134-156.
- (57) Nataro, J., Seriwatana, J., Fasano, A., Maneval, D., Guers, L., Noriega, F., Dubovsky, F., Levine, M., Morris, J. Identification and cloning of a novel plasmid-encoded enterotoxin of enteroinvasive *Escherichia coli* and *Shigella* strains. *Infection and Immunity*. 1993, Vol. 63, pp. 4721-4728.
- (58) Dobrindt, U., Geddamm, M., Krumbholz, G., Hacker, J. Genome dynamics and its impact on evolution of *Escherichia coli*. *Medical microbiology and immunology*. 2010, Vol. 199, pp. 145-154.
- (59) De la Cruz, F., Frost, L., Meyer, R., Zechner, E. Conjugative DNA metabolism in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*. 2009, Vol. 34, pp. 18-40.

- (60) Stecher, B., Denzler, R., Maier, L., Bernet, F., Sanders, M., Pickard, D., Barthel, M., Westendorf, A., Krogfelt, K., Walker, A., Ackermann, M., Dobrindt, U., Thomson, N., Hardt, W. Gut inflammation can boost horizontal gene transfer between pathogenic and commensal *Enterobacteriaceae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2012, Vol. 109, pp. 1269-1274.
- (61) Arutyunov, D., Frost, L. F conjugation: Back to the beginning. *Plasmid*. 2013, Vol. 70, pp. 18-32.
- (62) Petersen, S., Harms, K., Orlando, L., Moreno, J., Rasmussen, S., Dahl, T., Rosing, M., Poole, A., Sicheritz, T., Brunak, S., Inselmann, S., Vries, J., Wackernagel, W., Pybus, O., Nielsen, R., Johnsen, P., Magne, K., Willerslev, E. Bacterial natural transformation by highly fragmented and damaged DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2013, Vol. 110, pp. 19860-19865.
- (63) Popa, O., Dagan, T. Trends and barriers to lateral gene transfer in prokaryotes. *Current Opinion in Microbiology*. 2011, Vol. 14, pp. 615-623.
- (64) Dobrindt, U., Hacker, J. Whole genome plasticity in pathogenic bacteria. *Current Opinion in Microbiology*. 2001, Vol. 4, pp. 550-557.
- (65) Thomas, C., Nielsen, K. Mechanisms of, and barriers to, horizontal gene transfer between bacteria. *Nature Reviews*. 2005, Vol. 3, pp. 711-721.
- (66) Domingues, S., Harms, K., Fricke, W., Johnsen, P., Da Silva, G., Nielsen, K. Natural transformation facilitates transfer of transposons, integrons and gene cassettes between bacterial species. *PLoS Pathogens*. 2012, Vol. 8, pp. 1-15.
- (67) Hacker, J., Kaper, J. Pathogenicity islands and the evolution of microbes. *Annual Review of Microbiology*. 2000, Vol. 54, pp. 641-679.
- (68) Baur, B., Hanselmann, K., Schlimme, W., Jenni, B. Genetic transformation in freshwater: *Escherichia coli* is able to develop natural competence. *Applied and Environmental Microbiology*. 1996, Vol. 62, pp. 3673-3678.
- (69) Klug, W., Cummings, M. *Conceptos de genética*. Prentice Hall. 1999. Madrid, Quinta Edición, pp. 170-182.

- (70) Zhao, Y., Wang, K., Budinoff, C., Buchan, A., Lang, A., Jiao, N., Chen, F. Gene transfer agent (GTA) genes reveal diverse and dynamic *Roseobacter* and *Rhodobacter* populations in the Chesapeake bay. *The International Society for Microbial Ecology*. 2009, Vol. 3, pp. 364-373.
- (71) Dubey, G., Ben-Yehuda, S. Intercellular nanotubes mediate bacterial communication. *Cell*. 2011, Vol. 144, pp. 590-600.
- (72) Madigan, M., Martinko, J., Parker, J. *Brock Biología de los microorganismos*. Pearson Prantice Hall. 2004, 10ma edición, Madrid, pp. 729-733.
- (73) Cravioto, A., Reyes, R., Trujillo, F., Uribe, F., Navarro, A., De la Roca, J., Hernández, J., Pérez, G., Vázquez. Risk of diarrhea during the first year of life associated with initial and subsequent colonization by specific enteropathogens. *American journal of epidemiology*. 1990, Vol. 131, pp. 886-904.
- (74) Martín, R., Jiménez, E., Heilig, H., Fernández, L., Marín, M., Zoetendal, E., Rodríguez, J. Isolation of *Bifidobacteria* from breast milk and assessment of the bifidobacterial population by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis and quantitative real-time PCR. *Applied and environmental microbiology*. 2009, Vol. 75, pp. 965-969.
- (75) Martín, R., Heilig, H., Zoetendal, E., Smidt, H., Rodríguez, J. Diversity of the *Lactobacillus* group in breast milk and vagina of healthy women and potential role in the colonization of the infant gut. *Journal of applied microbiology*. 2007, Vol. 103, pp. 2638-2644.
- (76) Lara, F., Olivares, O., Sierra, S., Rodríguez, J., Boza, J., Xaus, J. Beneficial effects of probiotic bacteria isolated from breast milk. *British journal of nutrition*. 2007, Vol. 98, pp. S96-S100.
- (77) Martín, R., Heilig, H., Zoetendal, E., Jiménez, E., Fernández, L., Smidt, H., Rodríguez, J. Cultivation-independent assessment of the bacterial diversity of breast milk among healthy women. *Research in microbiology*. 2007, Vol. 158, pp. 31-37.
- (78) Cabrera, R., Collado, M., Laitinen, K., Salminen, S., Isolauri, E., Mira, A. The human milk microbiome changes over lactation and is shaped by maternal weight and mode of delivery. *American journal of clinical nutrition*. 2012, Vol. 96, pp. 544-551.

- (79) Thompson, O., Maldonado, J. Colonization and impact of disease and other factors on intestinal microbiota. *Digestive diseases and sciences*. 2007, Vol. 52, pp. 2069-2077.
- (80) Neeser, J., Chambaz, A., Golliard, M., Link, H., Fryder, V., Kolodziejczyk, E. Adhesion of colonization factor antigen II-positive enterotoxigenic *Escherichia coli* strains to human enterocytelike differentiated HT-29 cells: a basis for host pathogen interactions in the gut. *Infection and immunity*. 1989, Vol. 57, pp. 3727-3734.
- (81) Darmon, E., Leach, D. Bacterial genome instability. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 2014, Vol. 78, pp. 1-39.
- (82) Murray, B., Evans, D., Penaranda, M., Evans, D. *cfa/I*-ST plasmids: comparison of enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) of serogroups O25, O63, O78, y O128 and mobilization from an R factor-containing epidemic ETEC isolate. *Journal of bacteriology*. 1983, Vol. 153, pp. 566-570.
- (83) Willshaw, G, Smith, H., McConnell, M., Barclay, E., Krnjulac, J., Rowe, B. Genetic and molecular studies of plasmids coding for colonization factor antigen I and heat-stable enterotoxin in several *Escherichia coli* serotypes. *Infection and immunity*. 1982, Vol. 37, pp. 858-868.
- (84) Rouxel, T., Vigier, P., Hénaut, A. Evidence for horizontal gene transfer in *Escherichia coli* speciation. *Journal of Molecular Biology*. 1991, Vol. 222, pp. 851-856.
- (85) Smith, H., Willshaw, G., Rowe, B. Mapping of a plasmid, coding for colonization, factor antigen I and heat-stable enterotoxin production, isolated from an enterotoxigenic strain of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*. 1982, Vol. 149, pp 264-275.
- (86) Willshaw, G., Barclay, E., Smith, H., McConnell, M., Rowe, B. Molecular comparison of plasmids encoding heat-labile enterotoxin isolated from *Escherichia coli* strains of human origin. *Journal of Bacteriology*. 1980, Vol. 143, pp. 168-175.
- (87) McConnell, M., Smith, H., Willshaw, G., Field, A., Rowe, B. Plasmids coding for colonization factor antigen I and heat-stable enterotoxin production isolated from enterotoxigenic *Escherichia coli*: comparison of their properties. *Infection and Immunity*. 1981, Vol. 32, pp. 927-936.

- (88) Dionisio, F., Matic, I, Radman, M., Rodrigues, O., Taddei, F. Plasmids spread very fast in heterogeneous bacteria communities. *Genetics*. 2002, Vol. 162, pp. 1525-1532.
- (89) Smith, H., Scotland, S., Rowe, B. Plasmids that code for production for colonization factor antigen II and enterotoxin production in strains of *Escherichia coli*. *Infection and immunity*. 1983, Vol. 40, pp. 1236-1239.
- (90) Binsztein, N., Jouve, M., Viboud, G., Moral, L., Rivas, M., Ørskov, I., Åhrén, C., Svennerholm, A. Colonization factors of Enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from children with diarrhea in Argentina. *Journal of clinical microbiology*. 1991, Vol. 29, pp. 1893-1898.
- (91) Grewal, H., Sommerfelt, H. Genotypic detection of Enterotoxigenic *Escherichia coli* colonization factors. *Acta Pathologica Microbiologica et Immunologica Scandinavica*. 2001, Vol. 109, pp. 447-453.
- (92) Gonzales, L., Sanchez, S., Zambrana, S., Iñiguez, V., Wiklund, G., Svennerholm, A., Sjöling, Åsa. Molecular characterization of Enterotoxigenic *Escherichia coli* isolates recovered from children with diarrhea during a 4 year period (2007 to 2010) in Bolivia. *Journal of American Society for Microbiology*. 2013, Vol. 51, pp. 1219-1225.
- (93) Mansour, A., Shaheen, H., Amine, M., Hassan, K., Sanders, J., Riddle, M., Armstrong, A., Svennerholm, A., Sebeny, P., Klena, J., Young, S., Frenck, R. Pathogenicity and phenotypic characterization of Enterotoxigenic *Escherichia coli* isolates from a birth cohort of children in rural Egypt. *Journal of American Society for Microbiology*. 2014, Vol. 52, pp. 587-591.
- (94) Vilchez, S., Becker, S., Amaya, E., Perez, C., Paniagua, M, Reyes, D., Espinoza, F., Weintraub, A. Characterization of enterotoxigenic *Escherichia coli* strains isolated from Nicaraguan children in hospital, primary care and community settings. *Journal of Medical Microbiology*. 2014, Vol. 63, pp. 729-734.
- (95) Joffré, E., Mentzer, A., El Ghany, M., Oezguen, N., Savidge, T., Dougan, G., Svennerholm, A., Sjöling, A. Allele variants of Enterotoxigenic *Escherichia coli* heat-labile toxin are globally transmitted and associated with colonization factors. *Journal of Bacteriology*. 2015, Vol. 197, pp. 392-403.

- (96) Johnson, T., Nolan, L. Pathogenomics of the virulence plasmids of *Escherichia coli*. *Microbiology and Molecular Biology reviews*. 2009, Vol. 73, pp. 750-774.
- (97) Froehlich, B., Parkhill, J., Sanders, M., Orvail, M., Scott, J. The pCoo plasmid of Enterotoxigenic *Escherichia coli* is a mosaic cointegrate. *Journal of Bacteriology*. 2005, Vol. 187, pp. 6509-6516.
- (98) Caron, J., Coffield, L., Scott, J. A plasmid-encoded regulatory gene, *rns*, required for expression of the CS1 and CS2 adhesins of Enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1989, Vol. 86, pp. 963-967.
- (99) Henriqueta, M., Reis, L., Heloiza, M., Affonso, T., Trabulsi, L., Mazaitis, A., Maas, R., Maas, W. Transfer of a CfaI-ST plasmid promoted by a conjugative plasmid in a strain of *Escherichia coli* of serotype O128:H12. *Infection and Immunity*. 1980, Vol. 29, pp. 140-143.
- (100) Crossman, L, Chaudhuri, R, Beatson, S., Wells, T, Desvaux, M, Cunningham, A., Petty, N., Mahon, V., Brinkley, C., Hobman, J., Savarino, S., Turner, S., Pallen, M., Penn, C., Parkhill, J., Turner, A., Johnson, T., Thomson, N., Smith, S., Henderson, I. A commensal gone bad: Complete genome sequence of the prototypical Enterotoxigenic *Escherichia coli* strain H10407. *Journal of bacteriology*. 2010, Vol 192, pp. 5822-5831.
- (101) Willshaw, G., Smith, H, Mc Connell, M. Barclay, E., Krnjulac, J., Rowe, B. Genetic and molecular studies of plasmids coding for colonization factor antigen I and heat-stable enterotoxin in several *Escherichia coli* serotypes. *Infection and Immunity*. 1982, Vol. 37, pp. 858-868.
- (102) Echeverria, P., Seriwatana, J., Taylor, D., Changchawalit, S., Smith, C., Twohig, J., Rowe, B. Plasmids coding for colonization factor antigens I and II, heat-labile enterotoxin and heat-stable enterotoxin A2 in *Escherichia coli*. *Infection and Immunity*. 1986, Vol. 51, pp. 626-630.
- (103) Mc Connell, M., Smith, H., Willshaw, G., Field, A., Rowe, B. Plasmids coding for colonization factor antigen I and heat-stable enterotoxin production isolated from Enterotoxigenic *Escherichia coli*: comparison of their properties. *Infection and Immunity*. 1981, Vol. 32, pp. 927-936.

- (104) So, M., Mc Carthy, B. Nucleotide sequence of the bacterial transposon Tn1681 encoding a heat-stable (ST) toxin and its identification in Enterotoxigenic *Escherichia coli* strains. Proceedings of the National Academy of Sciences. 1980, Vol. 77, pp. 4011-4015.
- (105) Bölin, I., Wiklund, G., Qadri, F., Torres, O., Bourgeois, A., Savarino, S., Svennerholm, A. Enterotoxigenic *Escherichia coli* with Sth and Stp genotypes is associated with diarrhea both in children un areas of endemicity and in traveler's. Journal of clinical Microbiology. 2006, Vol. 44, pp. 3872-3877.
- (106) Rivera, F., Medina, A., Aldasoro, E., Sangil, A., Gascon, J., Ochoa, T., Vila, J., Ruiz, J. Genotypic characterization of Enterotoxigenic *Escherichia coli* strains causing traveler's diarrhea. Journal of clinical Microbiology. 2012, Vol. 51, pp. 633-635.
- (107) Munyaka, P., Khafipour, E., Ghia, J. External influence of early early childhood establishment of gut microbiota and subsequeute health implications. Frontiers in pediatrics. 2014, Vol. 2, pp. 1-9.
- (108) Reis, M., Heloiza, M., Affonso, T., Trabulsi, L., Mazaitis, A., Maas, R., Maas, W. Transfer of a CFA/I-ST plasmid promoted by a conjugative plasmid in a strain of *Escherichia coli* of serotype O128ac:H12. Infection and Immunity. 1980, Vol. 29, pp. 140-143.
- (109) Santiago, A., Ruiz, F. Jo, N., Vijayakumar, V. Gong, M., Nataro, J. A large family of antivirulence regulators modulates the effects of transcriptional activators in Gram-negative pathogenic bacteria. PLOS pathogens. 2014, Vol. 10, pp. 1-15.
- (110) Östblom, A., Adlerberth, I., Wold, A., Nowrouzian, F. Pathogenicity island markers, virulence determinants *malX* and *usp*, and the capacity of *Escherichia coli* to persist in infant commensal microbiotas. American Society for Microbiology. 2011, Vol. 77, pp. 2303-2308.
- (111) Abraham, S., Gordon, D., Chin, J., Brouwers, H., Njuguna, P., Groves, M., Zhang, R. Chapman, T. Molecular characterization of commensal *Escherichia coli* adapted to different compartments of the porcine gastrointestinal tract. Applied and Enviromental Microbiology, Vol. 78. 2012, pp. 6799-6803.

(112) Koli, P., Sudan, S. Fitzgerald D., Adhya, S. Kar, S. Conversion of commensal *Escherichia coli* K-12 to an invasive form via expression of a mutant histone like protein. American Society for Microbiology. 2011, Vol. 2, pp. 1-13.

(113) Bezirtzoglou, E., Stavropoulou, E. Immunology and probiotic impact of the newborn and young children intestinal microflora. Anaerobe. 2011, Vol. 17, pp. 369-374.

(114) Boisen, N, Melton, A. Scheutz, F., O'Brien, A., Nataro, J. Shiga toxin 2a and Enterohaggative *Escherichia coli* a deadly combination. Gut microbes. 2015, Vol. 6, pp. 272-278.

Apéndice 1. Metodologías.

Extracción de DNA por el método de GES.

Se cultivó un pequeño inóculo de cada una de las muestras en 3 mL de caldo luria pH= 7.2 a 37°C por 18 h en agitación (150 rpm). Los cultivos se cosecharon a tubos eppendorf y se centrifugó a 13000 rpm 3 min, una vez removido el sobrenadante, se repitió este paso. Posteriormente se resuspendió el botón en 100 µL de buffer TE (buffer tris-EDTA pH= 8.0). Se adicionaron 500 µL del reactivo de GES, agitando suavemente a temperatura ambiente por 5 min y se colocó en hielo. Después se adicionó 250 µL de acetato de amonio 7.5 M (frio) y se dejó en hielo por 5 min agitando constante y suavemente. Se agregaron 750 µL de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1) frio, se mezcló suavemente. Se centrifugó a 13000 rpm por 15 min. Al finalizar este proceso se observaron 3 fases, en la parte superior es donde el ADN permaneció disuelto. La fase acuosa (aprox 600 µL) se transfirió a otro tubo eppendorf limpio. El DNA se precipitó con 350 µL de isopropanol, mezclando suavemente a temperatura ambiente por 5 min, se dejó en hielo durante 10 min para su completa precipitación. Posteriormente se centrifugó durante 5 min a 13000 rpm para formar la pastilla de DNA. Se eliminó el isopropanol, y se realizaron 2 lavados consecutivos con etanol al 70% (500 µL), cada lavado es seguido por una centrifugación (3 min a 13000 rpm) se eliminó el alcohol por decantación. Una vez finalizados los lavados, se dejaron secar a temperatura ambiente los DNA. Se invirtió el tubo sobre papel. Se resuspendió el DNA en 50 µL de agua bidestilada libre de nucleasas. Para determinar la calidad y cantidad de DNA se corrieron 4 µL de la solución en un gel de agarosa al 1% con TBE 0.5X a 100 V por 30 min (se agregó a cada muestra 2 µL de buffer de carga y se mezcló antes de colocar en el gel).

Aislamiento de DNA bacteriano por kit comercial DNeasy Blood and Tissue Quiagen®.

Se cultivó un pequeño inóculo de *E. coli* proveniente del medio gelosa en un tubo eppendorf con 1 mL de caldo Luria a 37°C durante 18 h en agitación (150 rpm). En un inicio se centrifugaron los tubos eppendorf a 7500 rpm (5000 g) durante 10 min. A continuación se desechó el sobrenadante y se resuspendió el paquete celular con 200 µL de buffer ATL. Posteriormente se adicionó 25 µL de proteinasa K y 200 µL de buffer AL, se mezcló usando un vortex y se incubó a 70°C durante 30 min. Una vez concluida la incubación se añadieron 200 µL de etanol absoluto y se mezcló usando el vortex, la

solución obtenida era transferida a una mini columna y se realizó una centrifugación a 8000 rpm (6000 g) durante 1 min para que después el sobrenadante fuera desechado. Después a la mini columna se le adicionaron 500 μ L del buffer AW1 y se centrifugó a 8000 rpm durante 1 min, desechando el sobrenadante, se repitió este paso pero adicionando 500 μ L del buffer AW2 y centrifugando a 14000 rpm (20000 g) por 3 min, después de desechar el sobrenadante se volvió a centrifugar a 14000 rpm durante 1 min. Al final a cada mini columna se le adicionó 200 μ L de agua bidestilada libre de nucleasas y se les colocó un tubo de colecta, se dejó reposar durante 1 min y se centrifugó a 8000 rpm durante 1 min, se repitió este paso pero dejando reposar durante 3 min la minicolumna con el agua bidestilada estéril. Para determinar la calidad y cantidad de DNA se agregaron 4 μ L de la solución en un gel de agarosa al 1% con TBE 0.5X y se dejó correr a 100 V por 30 min (se agregó a cada muestra 2 μ L de loading buffer y se mezcló antes de colocar en el gel).

Impresión de la membrana

En una placa de 398 pozos se colocaron 40 μ L de los DNA y 30 μ L de los controles teniendo como plantilla el formato del diseño que se hizo previamente. Por otra parte se cortaron papeles filtro al tamaño de una placa para membrana, por cada membrana para imprimir se remojaron 3 filtros con una solución SSC 3X + 0.2M de NaOH, se eliminó el exceso de líquido y se colocaron sobre la placa para membrana. Se eliminaron las burbujas atrapadas entre los papeles filtro y finalmente se colocaron las membranas de nylon sobre esta cama de papeles filtro. Se colocaron las membranas en el robot Virtek® y este adicionó por duplicado 2 nL de cada DNA sobre la membrana. Una vez concluida la impresión las membranas fueron expuestas a vapor de agua durante 10 min. En una charola se colocó una cama de papel filtro humedecido con una solución de NaCl 1.5 M +NaOH 0.5 M y ahí se colocaron las membranas recién impresas durante 5 min. Se enjuagaron con agua destilada estéril se eliminó el exceso de líquido y se colocaron sobre otro papel filtro pero ahora con un buffer de neutralización NaCl 1.5 M+Tris-HCl 0.5 M durante 15 min. Finalmente las membranas se enjuagaron con agua destilada estéril para eliminar los excesos de la solución neutralizante y las sales remanentes, se dejaron secar y se fijó el DNA a la membrana en un Crosslinker UV.

Hibridación.

La membrana se colocó en un tubo de hibridación donde se le agregaron 5 mL del buffer de pre-hibridación y se dejó incubar en un horno de hibridación a 55°C por 30 min a 4 rpm, pasado el tiempo de pre-hibridación, se eliminó el buffer de pre hibridación y se agregó 5 mL del buffer de hibridación, este se incubó toda la noche a 55°C a 4 rpm. Una vez que concluyó la hibridación se hicieron dos lavados con 50 mL del buffer de lavado SSC 2X + SDS 0.1% en agitación (120rpm) por 5 min Posteriormente se hicieron otros dos lavados a 60°C por 20 min con 50 mL de la solución SSC0.5X +SDS 0.1% en el horno de hibridación a 20 rpm. Por último se efectuó un lavado más con otros 50 mL de SSC0.5X -SDS 0.1% a 60°C por 20 min a 120 rpm. Posteriormente se lavaron las membranas por 5 min a temperatura ambiente en agitación con 50 mL de Washing buffer. Se agregaron 20 mL de una solución de bloqueo con 200 µL de esperma de salmón previamente desnaturalizado, se incubó a temperatura ambiente por 1 h a 120 rpm. Se preparó la solución de anticuerpos y esta se agregó a la membrana, dejando incubar durante 30 min a temperatura ambiente en agitación suave. Se realizaron dos lavados con 50 mL de Washing buffer por 15 min a 120 rpm. Por último se equilibró la membrana con 20 mL de buffer de detección por 5 minutos a temperatura ambiente, se agregó el CSPD y la membrana se guardó en una bolsa estéril dejando incubar durante 10 minutos a 37°C en la oscuridad. Se sacó la membrana y en la oscuridad se colocó una placa de rayos X dejándola expuesta a la membrana de 1 a 3 horas para que al final se revelara y se pudieran observar las señales de hibridación en cada una de las membranas.

Apéndice 2. Medios de cultivo y soluciones.

- **Medio gelosa especial.**

Agar bacteriológico	15 g.
Extracto de carne	1.5 g.
Base Agar Sangre	20 g.

Disolver todos los ingredientes en 1 L de agua, ajustar pH a 7.2 y ebulir agitando constantemente, temperar en baño María a 70°C y agregar 5 mL a cada vial o 4 mL si se usan tubos de ensayo. Esterilizar a 121°C durante 30 min y dejar solidificar inclinando los viales y/o tubos.

- **Agar Mac Conkey.**

Proteasa peptona	8 g.
Peptona	17 g.
Lactosa	10 g.
Sales biliares	1.5 g.
NaCl	5 g.
Rojo neutro	0.03 g.
Cristal violeta	0.001 g.
Agar bacteriológico	13.5 g.

Disolver los ingredientes en 1 L de agua, calentar a ebullición. Ajustar pH a 7.1 y esterilizar a 121°C durante 15 min. Vaciar en condiciones asépticas en cajas Petri.

- **Agar Sangre.**

Base agar sangre	40 g.
Por cada 1 L tenemos:	
Extracto de levadura	5 g.
Infusión de músculo cardíaco	2 g.
Peptona de caseína	13 g.
NaCl	5 g.
Agar bacteriológico	15 g.
Sangre estéril desfibrinada	50 mL.

Suspender la base de agar sangre en 1 L de agua. Calentar con agitación frecuente y hervir durante un minuto. Esterilizar a 121°C durante 15 min. Dejar enfriar de 45-50°C y adicionar la sangre estéril desfibrinada en condiciones de esterilidad. Homogenizar y verter en cajas Petri.

- **Caldo BHI.**

Infusión de cerebro de ternera	200 mL.
Infusión de corazón de res	250 mL.
Peptona de gelatina	10 g.
NaCl	5 g.
NaH ₂ PO ₃ · 12H ₂ O	2.5 g.
Glucosa	2 g.

Agregar los ingredientes en un matraz aforado de 1 L, aforar con agua destilada. Esterilizar a 121°C durante 15 min.

- **Medio leche glicerol.**

Leche en polvo descremada	10 g.
Glicerol	15 mL.

Disolver la leche en polvo en 85 mL de agua destilada, hervir la leche durante 1 min con agitación constante, adicionar el glicerol y mezclar. Esterilizar a 121°C durante 10 min.

- **Agar Casoy.**

Peptona de caseína	15 g.
Peptona de harina de soya	5 g.
NaCl	5 g.
Agar bacteriológico	13 g.

Disolver los ingredientes en 1 L de agua destilada, hervir hasta completa disolución. Esterilizar en autoclave a 121°C por 15 min.

- **Agua petonada 2%.**

Peptona	2 g.
---------	------

Adicionar la peptona a 100 mL de agua, disolver y ajustar el pH a 7.4. Esterilizar a 121°C por 15 min.

- **Agar Kligler.**

Extracto de carne	3 g.
Extracto de levadura	3 g.
Peptona	15 g.
Proteasa peptona	5 g.
Lactosa	10 g.
Glucosa	1 g.
FeSO ₄ · 7H ₂ O	0.2 g.
NaCl	5 g.
Na ₂ S ₂ O ₃	0.3 g.
Rojo fenol	0.024 g.
Agar	12 g.

Disolver los ingredientes en 1 L de agua. Calentar hasta ebullición y agregar 3 mL en tubos de ensayo de 13x100 con tapón de rosca. Esterilizar a 121°C por 15 min. Dejar enfriar dejando los tubos inclinados.

- **Agar Citrato de Simmons.**

MgSO ₄	0.2 g.
NH ₄ H ₂ PO ₄	1 g.
K ₂ HPO ₄	1 g.
Na ₃ C ₃ H ₅ O(COO) ₃	2 g.
NaCl	5 g.
Azul de bromotimol	0.08 g.
Agar bacteriológico	15 g.

Disolver los ingredientes en 1 L de agua, calentar hasta ebullición. Agregar 3 mL en tubos de ensayo de 13x100 con tapón de rosca. Esterilizar a 121°C por 15 min. Dejar enfriar inclinando los tubos.

- **Caldo RM-VP.**

Peptona	7 g.
Glucosa	5 g.
K ₂ HPO ₄	5 g.

Disolver los ingredientes en 1 L de agua destilada con calentamiento suave si es necesario. Distribuir en tubos de ensayo de 13x100 con tapón adicionando 3 mL a cada uno. Esterilizar a 121°C por 15 min.

- **Caldo Gluconato.**

Peptona	1.5 g.
Extracto de levadura	1 g.
K ₂ PO ₄	1 g.
Gluconato de potasio	40 g.

Adicionar los ingredientes y aforar con 1 L de agua destilada, verter 2 mL en tubos de ensayo de 13x100. Esterilizar a 121°C durante 15min.

- **Caldo Malonato.**

Extracto de levadura	1 g.
(NH ₄) ₂ SO ₄	2 g.
K ₂ HPO ₄	0.6 g.
KH ₂ PO ₄	0.4 g.
NaCl	2 g.
Malonato de sodio	3 g.
Glucosa	0.25 g.
Azul de bromotimol	0.025 g.

Rehidratar con 1 L de agua destilada. Calentar la solución suavemente. Colocar aproximadamente 2 mL en tubos de 12x75. Esterilizar a 121°C durante 15min.

- **Agar SIM.**

Peptona de caseína	20 g.
Peptona de carne	6.1 g.
Sulfato de Hierro y Amonio	0.2 g.
Na ₂ S ₂ O ₃	0.2 g.
Agar	3.5 g.

Adicionar 1 L de agua destilada y calentar a ebullición hasta disolver el agar. Verter 3 mL en tubos de 13x100 con tapón de rosca. Esterilizar a 121°C por 15 min.

- **Agar O-F.**

Peptona	2 g.
Extracto de levadura	0.5 g.
NaCl	2 g.
Dextrosa	10 g.
Purpura de bromocresol	0.015 g.
Agar	3 g.

Suspender los ingredientes en 1 L de agua y hervir hasta que se disuelva el agar. Colocar 3 mL en tubos de 13x100 y esterilizar a 121°C por 15min. A la mitad de los tubos se les puede adicionar 1mL de aceite mineral estéril.

- **Caldo Luria.**

Peptona de caseína	10 g.
Extracto de levadura	5 g.
NaCl	5 g.

Adicionar 1 L de agua destilada. Calentar agitando frecuentemente hasta completa disolución. Esterilizar en autoclave a 121°C por 15 min. En condiciones de asepsia agregar 1 mL en tubos eppendorf de 2 mL.

- **Buffer TE.**

Tris·OH 1M pH= 8	10 mL.
EDTA 0.5M pH= 8	2 mL.

Aforar a 1 L con agua desionizada estéril. No esterilizar

- **Reactivo GES.**

Tiocianato de guanidina	60 g.
0.5M EDTA pH= 8.	20 mL
Sarcosinato lauril de sodio al 10%	5 mL.

Disolver con aproximadamente 20 mL de agua destilada estéril el tiocinato de guanidina y el EDTA, calentar a 65°C hasta que se disuelva completamente. Añadir el sarcosinato y aforar a 100 mL. No esterilizar

- **Tris·HCl 1M pH=8.**
Trizma·OH 121.1 g.

Adicionar 800 mL de agua destilada estéril, ajustar el pH a 8. Aforar a 1 L. No esterilizar

- **Acetato de amonio 7.5 M.**
Acetato de amonio 144.38 g.

Aforar a 250 mL con agua destilada estéril. No esterilizar.

- **Sarcosinato Lauril de Sodio al 10%.**
Sarcosinato lauril de sodio 10 g.

Adicionar 90 mL de agua destilada estéril, agitar constantemente hasta que todo el soluto esté inmerso en el líquido. Colocar en baño de agua a 50°C hasta que se disuelva completamente el detergente.

- **Cloroformo-alcohol isoamílico (24:1).**
Cloroformo 48 mL.
Alcohol isoamílico 2 mL.

Mezclar los reactivos.

- **Etanol 70%.**
Etanol absoluto 70 mL.

Adicionar 30 mL de agua destilada estéril.

- **EDTA 0.5M pH=8.**
EDTA disódico dihidratado 186.1 g.

Adicionar aproximadamente 800 mL de agua destilada y ajustar el pH a 8, conforme se va acercando al pH indicado se va disolviendo. Aforar a 1000 mL y esterilizar a 121°C por 15 min.

- **TBE 5X.**
Trizma·OH 54 g.
Borato de sodio 27.5 g.
EDTA 0.5M pH=8 10 mL.

Mezclar los reactivos y aforar a 1 L con agua destilada estéril.

- **TBE 0.5X.**
TBE 5X 100 mL.

Aforar a 1 L con agua desionizada estéril.

- **EDTA 0.2 M pH=8.**
EDTA disódico dihidratado 74.44 g.

Adicionar aproximadamente 800 mL de agua destilada y ajustar el pH a 8, conforme se va acercando al pH indicado se va disolviendo. Aforar a 1000 mL y esterilizar a 121°C por 15 min.

- **SSC 20X.**
Citrato de sodio dihidratado 88.2 g.
NaCl 175.3 g.

Adicionar aproximadamente 800 mL de agua destilada ajustar el pH a 7, aforar a 1 L y esterilizar a 121°C por 15 min.

- **SDS 20%.**
Dodecil sulfato de sodio 20 g.

Adicionar 80 mL de agua destilada estéril, agitar constantemente hasta que todo el soluto esté inmerso en el líquido. Colocar en baño de agua a 50°C hasta que se disuelva completamente el detergente.

- **SSC 3X + 0.2 M NaOH.**
SSC 20X 150 mL.
NaOH (perlas) 8 g.

Disolver el NaOH con 300 mL de agua destilada estéril. Posteriormente adicionar el SSC 20X y aforar a 1 L.

- **NaCl 1.5 M + NaOH 0.5 M.**
NaCl 87.66 g.
NaOH (perlas) 20 g.

Disolver los ingredientes en agua destilada estéril y aforar a 1 L.

- **NaCl 1.5 M + Tris-HCl 0.5 M pH= 7.5.**
NaCl 87.66 g.
Trizma base 60.56 g.

Disolver los ingredientes en 800 mL de agua destilada estéril, ajustar el pH a 7.5 y aforar a 1 L.

- **SSC 2X + SDS 0.1%.**
SSC 20X 100 mL.
SDS 20% 5 mL.

Disolver los ingredientes en agua destilada estéril y aforar a 1 L.

- **SSC 0.5X + SDS 0.1%.**
SSC 20X 25 mL.
SDS 20% 5 mL.

Disolver los ingredientes en agua destilada estéril y aforar a 1 L.

- **Buffer de lavado.**
Tween 20 3 mL.

Aforar a 1 L con Ácido maleico 0.1 M-0.15 M NaCl pH=7.5

- **Solución de bloqueo.**
10X Solución de bloqueo (Roche®) 2 mL.
Ácido Maleico 0.1 M-0.15 M NaCl pH= 7.5 18 mL.
DNA de esperma de salmón 200 µL.

Mezclar el Ácido Maleico con los 2 mL de solución de bloqueo. Antes de adicionar el DNA de esperma de salmón colocarlo en baño de agua hirviendo durante 10 min.

- **Solución de anticuerpos.**
10X Solución de bloqueo (Roche®) 1 mL.
Ácido Maleico 0.1 M-0.15 M NaCl pH= 7.5 9 mL.
DNA de esperma de salmón 100 µL.
Anti-digoxigenina-AP 1 µL.

Mezclar el Ácido Maleico con los 2 mL de solución de bloqueo. Antes de adicionar el DNA de esperma de salmón colocarlo en baño de agua hirviendo durante 10 min. Antes de adicionar la Anti-digoxigenina-AP centrifugarlo a 13 000 rpm durante 10 min, tomar 1 µL de la superficie de la solución de anticuerpos.

- **Buffer de detección pH= 9.5.**
Trizma base 12.11 g.
NaCl 5.84 g.

Adicionar los ingredientes en 800 mL de agua destilada. Ajustar el pH, aforar a 1 L y esterilizar a 121°C por 15 min.

- **DNA de esperma de Salmón.**

DNA de esperma de salmón tipo D-1632 altamente polimerizado 500 mg

Mezclar el DNA con 50 mL de agua desionizada estéril y se disolverá por calentamiento colocándolo en un baño con agua a 50°C de 2 a 4 horas. Posteriormente se hervirá la solución y se pasará a través de una jeringa con ajuga con los números 18 20 y 22. Se almacenará a -20°C.

- **Ácido Maleico 0.1 M-0.15 M NaCl pH=7.5**

Ácido maleico	11.61 g.
---------------	----------

NaCl	8.77 g.
------	---------

Mezclar los ingredientes en 800 mL de agua destilada estéril. Ajustar el pH, aforar a 1 L. No esterilizar.

Apendice 3. Diseño del macroarreglo

29093	29094	29095	ETEC 89241	030433	030434	030435	030436	EHEC D2653	031559	031560	031561	031562	ETEC 112114	032476/1	032476/2	032477		EPEC E2349	035047/1	035048	035049	035049/1	ETEC 89241
29679	29680	29682	29682/1	030437	030438	030439	030440	030441	031563	031564	031565	031566	031567	033467	033468	033468/1	033469	033470	035050	035051	035051/1	035052	X
29683	29685	29685/1	29685/2	030442	030444	030445	030446		031568	031569		032466/1	032466/2	033471	033472	033473		034156	035052/1	035053	035054	035054/1	EHEC D2653
29686	29686/1	29687	29687/1	030952	030953	030955	030956	030957	032467	032468	032469/1	032469/2	032470	034156	034157	034158	034159/1	034159/2	035055	035055/1	035056	035056/1	X
29688	29689	29691	29691/1	030958	030959	030960	030961	030961/1	032472/1	032472/2	032474/1	032474/2	032474/3	034160/1	034160/2		035043	035043/1	035057	035058	035829	035829/1	X
29692	29693	29694	ETEC 112114	030962	030962/1	030963	030964	030965	032474/4	032474/5	032474/6	032475/1	032475/2	035044	035045	035046	035046/1	035047	035830	035833	035834	035835	EPEC E2349
036863	035864	036865	036866	29429	29429/1	29430	29430/1	EPEC E2349	30035	30036	30037	30038	30039	031027/1	031027/2	031028	031029	031030/1	031091	031092	031092/1	031093	X
036869	036870	036870/1	036871	29432	29433	29434	29435	29436	30040	30041		30614	30615	031030/2	031031	031032	031033/1	031033/2	031093/1	031093/2	031094	031094/1	X
036871/1	036872	036872/1	EPEC E2349	29436/1		29726	29727	ETEC 89241	30616	30617	30618	30619	EHEC D2653	031034	031035		036066	ETEC 89241	031095	031095/1	031096	031096/1	ETEC 89241
036874	036874/1		031312	29728	29729	29730	29731	30620	30621	30622	30623	30624	EPEC E2349	036066/1	036066/2	036067	036068	036069	031098	031100	031101	031102	X
031314	031315/1	031315/2	031315/3	032746	032747	032748	032749	033587/1	033587/2	033587/3	033588	033590/1	033590/2	036069/1	036069/2	036070	036070/1	ETEC 112114	031103	031104	031105	031106	X
031972	031973	031974	031975	032750	032751	032752	032754	033591	033592/1	033592/2	033593/1	033593/2	033593/3	38223	38223/1		38969	38969/1	031107	031108	031109		X
031976/1	032976/2	031977/1	031977/2	032755	032757	032758	032759	033594/1	033594/2		034361	034362	034363	38971	38971/1	38972	38973	38975					X
031978/1	031978/2	031979/1	031979/2	032760	032761			033583/1	034365		035303	035304	035304/1	035305	38976	38977			EHEC D2653				X
031980	031981/1	031981/2	031982/1	033583/2	033584/1	033584/2	033585/1	035305/1	035305/2	035306		036063	036063/1				EPEC 0127	EAEC O42	S. sonnei	S. boydii		DNA BACILLUS	X
032982/2	031983/1	031983/2	EHEC D2653	033585/2	033586/1	033586/2	033586/3	ETEC 112114	036064	036064/1	036065	036065/1	ETEC 89241										ETEC 112114

Figura A1. Macroarreglo de los DNA's de las cepas aisladas de ambos niños. Los números dentro de los cuadros de colores representan los DNAs de las cepas aisladas del niño control. Los números que están a colores representan a los DNA's de las cepas aisladas del niño con episodios de diarrea. Cada color representa a un coprocultivo diferente. Los DNA's de las cepas control están representados con su nombre clave. El control negativo de hibridación está representado por el DNA de *Bacillus*.

Apéndice 4. Determinación del punto de corte.

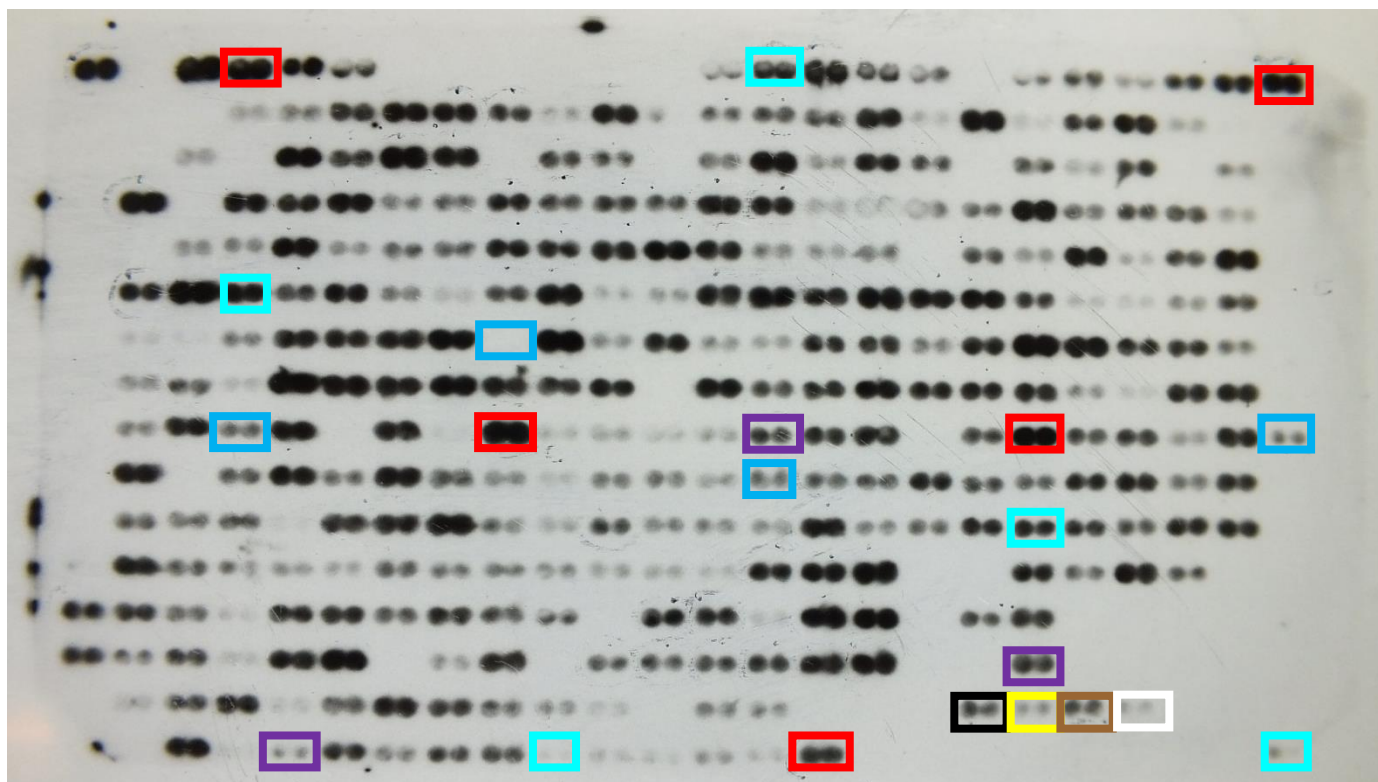


Figura A2. Hibridación de la membrana con la sonda est1-a, tras dejar hibridar a 48°C durante toda la noche, realizando los lavados a 68°C y dejando exponer en una placa de rayos X durante 1h con 30min. Los recuadros rojos muestran la hibridación de la sonda con el DNA de una ETEC 89241 (Control positivo), los demás recuadros muestran los demás DNA's de los controles. Azul (EPEC E2348), Morado (EHEC D2653), Aguamarina (ETEC 112114), Negro (EPEC O127), Amarillo (EAEC O42), Café (Shigella sonnei), Blanco (Shigella boydi 16).

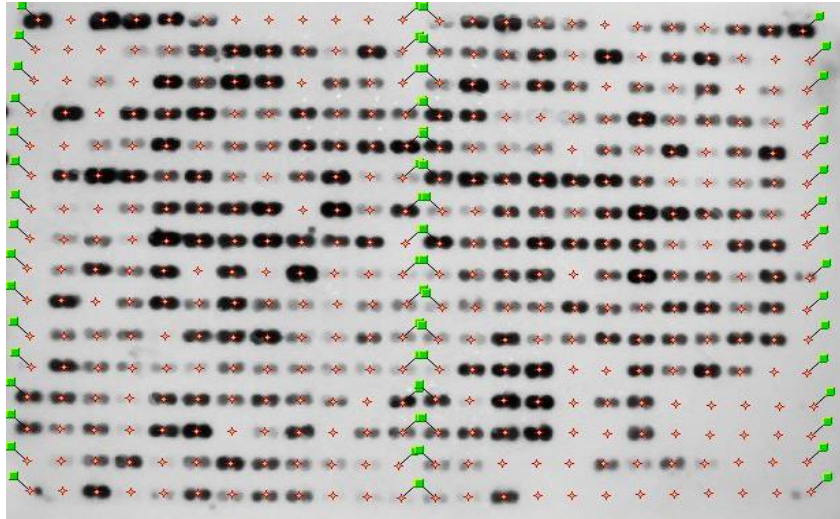


Figura A3. Membrana ingresada al programa Bionumerics, en esta etapa del análisis se seleccionan todas las partes a las que se les medirá la intensidad luminosa, el punto rojo tiene que estar entre las marcas.

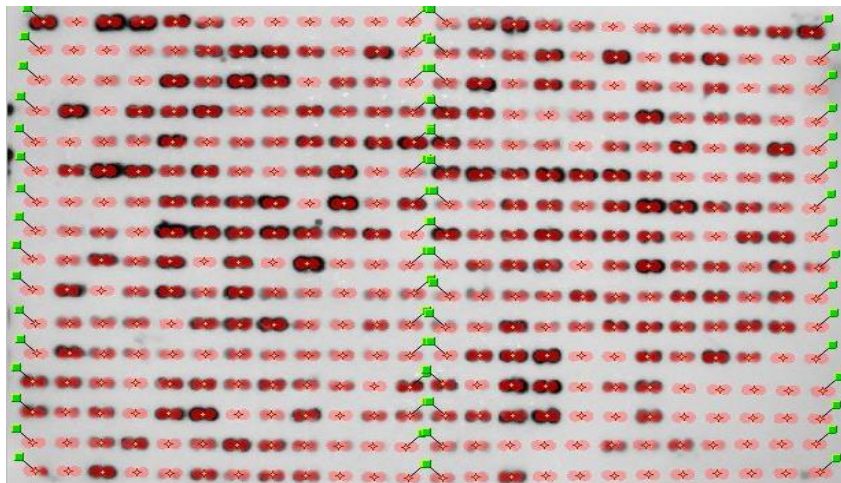


Figura A4. Representación del área donde se medirá la intensidad luminosa. En esta sección se delimita el área a la que se medirá la intensidad luminosa la cual está representada por los círculos rojos.

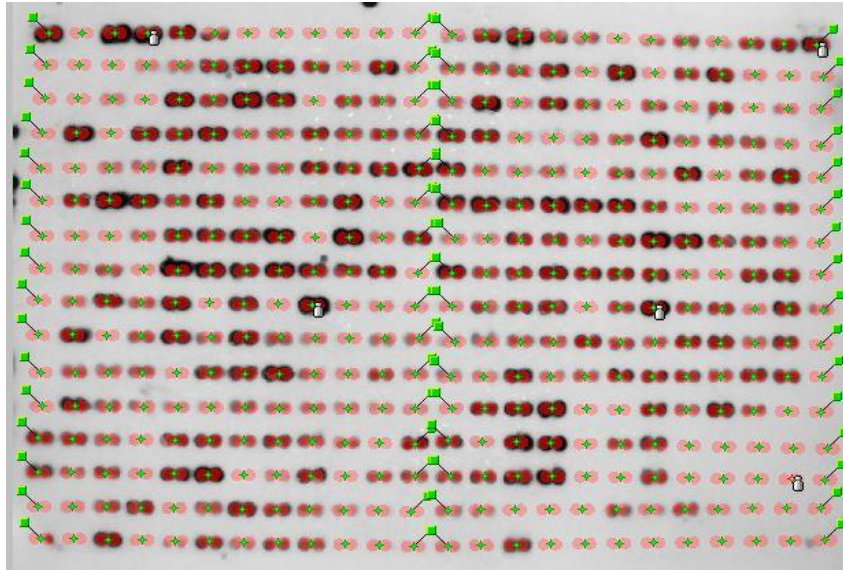


Figura A5. En esta sección se marcan los controles tanto positivos (100% hibridación) como el control negativo (0% hibridación), estos valores de referencia serán analizados por el software y se compararán con todas las muestras para asignarles un valor numérico.

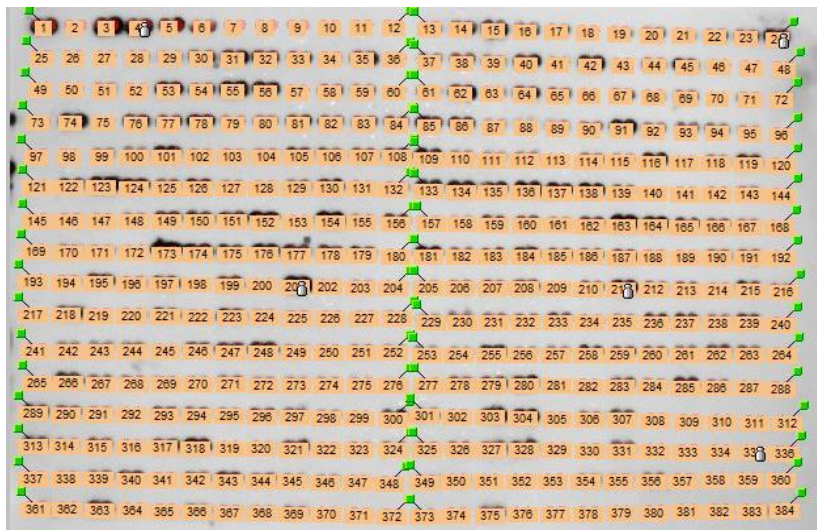


Figura A6. Numeración de las muestras por analizar.

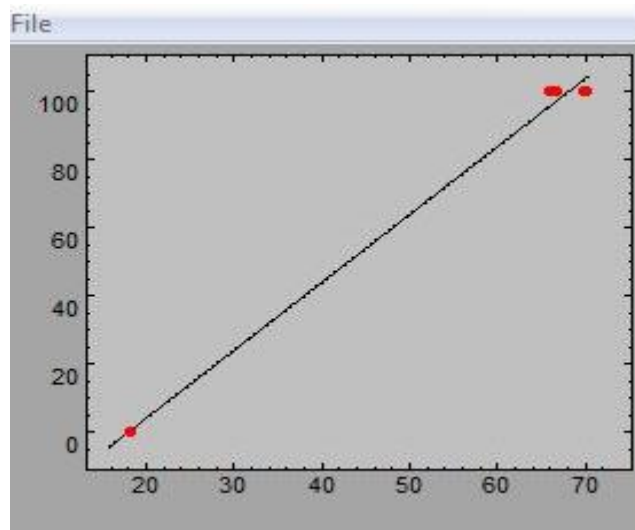


Figura A7. Curva de calibración generada a partir de los controles. El eje de las abscisas es una representación relativa de los pixeles del conjunto de puntos por muestra que hibridaron en la membrana. A medida que los puntos tienen mayor intensidad, mayor será la cantidad de pixeles generados. El eje de las ordenadas representa el valor numérico asignado.

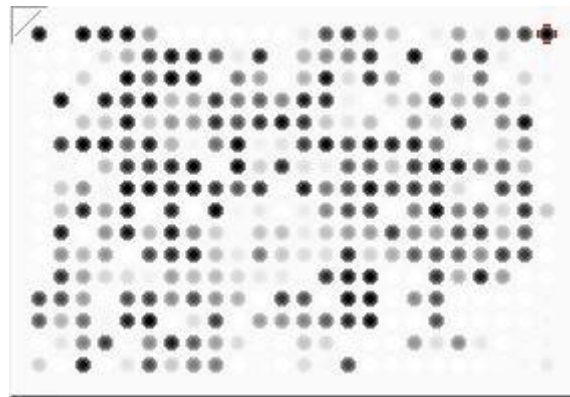


Figura A8. Simulación para el gen est1-a donde el programa Bionumerics muestra los valores de hibridación para cada una de las muestras, 100.0 representa muestras que tuvieron la misma intensidad luminosa que los controles positivos y 0.0 representa las muestras que son iguales al control negativo.

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	
1	97.24	-1.01	-2.34	-1.11	1.16	-2	-3.58	-2.63	-4.25	-3.2	-3.55	1.96	78.19	74.03	-0.45	9.27	1
2	-1.27	-3	-3.27	-2.48	100.96	83.75	2.08	20.96	25.08	92.14	42.23	88.25	69.15	30.02	9.43	0.6	2
3	101.71	-4.12	16.64	22.69	-3.23	104.73	-1.82	40.5	87.39	-6.58	32.64	41.25	35.9	59.01	51.3	87.92	3
4	100.37	13.35	-3.68	27.97	92.28	97.94	24.14	3.3	37.32	40.38	46.58	20.36	-0.19	2.96	75.84	-0.46	4
5	83.94	30.33	102.81	99.15	84.87	62.14	84.3	104.76	94.15	90.56	-3.44	14.29	70.37	82	1.22	11.31	5
6	47.66	75.97	65.59	20.44	94.73	87.32	82.94	98.87	-7.15	28.07	73.72	7.23	70.98	98.78	46.89	70.87	6
7	-6.97	97.56	104.6	37.34	24.66	28.09	89.63	91.43	88.75	94.65	84.91	42.93	42.88	-7.7	84.46	19.98	7
8	-6.97	91.67	94.84	41.91	30.23	3.55	102.6	103.24	-2.78	47.55	95.96	27.5	67.79	9.28	60.72	47.18	8
9	-7.49	65.08	-5.52	85.83	65.55	56.95	-7.01	87.89	104.81	20.5	25.33	27.48	47.36	73.59	32.68	46.4	9
10	-6.9	7.15	56.35	77.16	40.83	98.57	106.53	72.68	2.96	2.17	6.83	16.34	26.79	-7.57	13.71	-3.38	10
11	-8.17	90.25	38.26	83.85	49.94	4.03	18.89	85.77	7.47	24.53	45.67	9.16	-7.81	31.04	0.44	0.59	11
12	-8.93	1.99	-8.61	97.64	32.84	10.08	78.8	-10.17	-2.01	22.92	19.45	7.01	76.39	39.88	-7.15	-2.48	12
13	6.33	26.54	31.41	80.12	81.2	82.47	11.91	93.77	5.07	8.7	18.04	0.13	76.37	46.17	21.5	8.35	13
14	48.55	41.2	98.58	19.43	74.42	99.86	7.56	47.12	44.54	28.69	9.43	77.63	-0.42	62.32	14.99	1.61	14
15	69.82	47	13.59	8.88	3.44	73.91	61.96	67.99	59.38	29.02	80.79	89.51	102.58	84.34	-6.58	69.82	15
16	27.9	83.86	84.91	22.75	-1.56	91.61	52.99	95.06	73.1	30.14	14.24	100.7	103.02	98.72	-7.23	-7.64	16
17	13.45	1.95	39.17	-9.82	14.74	88.38	17.41	69.49	-10.46	55.55	27	-9.03	-7.82	-7.58	-7.84	-7.57	17
18	-10.39	94.49	-10.22	33.61	28.11	93.51	67.78	76.57	41.21	24.33	58.52	-8.22	46.54	-7.51	47.15	-6.35	18
19	5.34	-2.72	42.02	11.56	93.25	55.11	97.82	70.77	94.46	25.32	58.36	79.54	74.01	69.1	15.16	-4.66	19
20	29.83	60.76	5.4	84.21	31.89	-0.15	92.09	13.7	43.3	56.73	54.8	32.52	-6.94	-5.01	48.32	-2.23	20
21	5.35	84.8	60.42	0.91	48.03	-1.98	60.1	-1.75	55.83	69.9	41.53	92.4	-5.06	-4.26	8.25	-1.43	21
22	49.68	7.33	-9.52	50.57	49.24	15.3	65.59	78.81	12.48	25.61	74.42	40.55	-3.69	-2.47	-1.49	0.54	22
23	76.39	-6.02	13.75	91.43	9.87	49.89	25.4	79.61	84.04	71.74	77.11	-2.92	-1.85	-0.25	1.54	2.07	23
24	99.82	1.27	4.4	-3.4	-3.9	-3.62	-4.35	-3.7	24.97	-2.7	-1.81	-0.2	2.23	2.37	2.87	7.88	24
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	

Figura A9. Valores numéricos obtenidos del programa Bionumerics® Version 6.0 AppliedMaths para el gen est1-a. Los números en rojo muestran el valor de intensidad luminosa para ETEC 89241 (Control positivo), los valores de los demás controles se representan: Azul (EPEC E2348), Morado (EHEC D2653), Aguamarina (ETEC 112114), Negro (EPEC O127), Amarillo (EAEC O42), Café (Shigella sonnei), Blanco (Shigella boydi 16). Los valores que se encuentran en negritas corresponden a los DNA de las cepas que fueron consideradas como positivas para el gen. La localización de la muestra dentro la membrana se ubica determinando la letra que está en la columna y cruzándola perpendicularmente con el número en la fila correspondiente. Por ejemplo para el control 89241 que está en el extremo inferior izquierdo con un valor de 99.82 le corresponde la posición A24 dentro de la membrana.

En todos los casos se observa que los valores que se consideraron como positivo tienen que ser igual o mayor a 90, ya que la hibridación con el respectivo DNA control tuvo ese valor.