



---

---

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**FACULTAD DE QUÍMICA**

**ANÁLISIS COMPARATIVO DE CEPAS DE *Escherichia coli***  
**AISLADA DE NIÑOS MENORES DE CINCO AÑOS Y CEPAS DE**  
***Escherichia coli* AISLADA DE GANADO LECHERO**

***T E S I S***

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

**PRESENTA:**  
**BETZY ESTRADA JIMÉNEZ**



**Ciudad Universitaria, CDMX**

**Mayo 2018**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

**JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:** NORMA ANGÉLICA CASTELLANOS CHÁVEZ

**VOCAL:** ALEIDA MINA CETINA

**SECRETARIO:** ARMANDO NAVARRO OCAÑA

**1er. SUPLENTE:** ELSI IDELI JUÁREZ ARROYO

**2° SUPLENTE:** GENARO JIMÉNEZ REYES

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

**LABORATORIO DE SALUD PÚBLICA  
3ER. PISO EDIFICIO DE INVESTIGACIÓN  
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM**

**ASESOR DEL TEMA:**

Dr. Armando Navarro Ocaña

**SUSTENTANTE:**

Betzy Estrada Jiménez

Agradezco el apoyo de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA), Programa de Innovación Tecnológica (PAPIIT), con el que contó éste trabajo y que fue proporcionado a través del Proyecto “Búsqueda de inmunógenos protectores contra *Salmonella* y *Escherichia coli* bacterias involucradas en la patogénesis de infecciones intestinales”, clave IN216417.

## ÍNDICE DE CONTENIDO

Índice de contenido .....	4
ÍNDICE DE CUADROS .....	6
ÍNDICE DE FIGURAS .....	6
RESUMEN .....	7
1. MARCO TEÓRICO .....	9
1.1 Enfermedades diarreicas en niños <5 años.....	9
1.2 Situación en México .....	11
1.3 Familia Enterobacteriaceae.....	12
1.4 <i>Escherichia coli</i> .....	12
<b>1.4.1 Historia</b> .....	12
<b>1.4.2 Características Bioquímicas.</b> .....	13
<b>1.4.3 Grupos Patógenos-Patotipos</b> .....	14
1.5 <i>Escherichia coli</i> enteropatógena (EPEC).....	16
<b>1.5.1 Definición</b> .....	16
<b>1.5.2 Patogénesis.</b> .....	18
<b>1.5.3 Otros factores de virulencia <i>EspP</i> y <i>EspC</i></b> .....	22
1.6 <i>Escherichia coli</i> productora de la toxina de Shiga (STEC).....	23
<b>1.6.1 Definición</b> .....	23
<b>1.6.2 Epidemiología</b> .....	26
<b>1.6.3 STEC en México</b> .....	26
1.7 EPEC y STEC, modelo de patogénesis.....	27
1.8 Antimicrobianos. ....	28
1.9 Familias de antimicrobianos.....	29
1.10 Resistencia a los antimicrobianos. ....	32
1.11 Mecanismo de resistencia de las bombas de eflujo en los antimicrobianos.....	32
1.12 Mecanismo de acción de las bombas.....	33
1.13 Grupos filogenéticos. ....	35
2. JUSTIFICACIÓN.....	38
2.1 Hipótesis.....	38
2.2 Objetivos .....	39

<b>2.2.1 Objetivos generales</b> .....	39
<b>2.2.2 Objetivos específicos</b> .....	39
<b>3. MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	<b>40</b>
3.1 Flujograma de Trabajo .....	40
3.2 Origen de las cepas bacterianas.....	41
3.3 Confirmación bioquímica .....	41
3.4 Preparación de antígenos somáticos (O) y flagelares (H) .....	41
<b>3.4.1 Preparación de antígeno somático (O)</b> .....	41
<b>3.4.2 Identificación de antígeno (O)</b> .....	42
<b>3.4.3 Preparación de antígeno flagelar (H)</b> .....	42
<b>3.4.4 Identificación antígeno (H)</b> .....	42
3.5 Obtención de ADN por el método de ebullición .....	43
3.6 Determinación de grupos filogenéticos y genes de virulencia .....	44
3.7 Condiciones de la PCR .....	46
<b>3.7.1 Condiciones de la PCR en el termociclador</b> .....	47
<b>3.7.2 Electroforesis en geles de agarosa</b> .....	47
3.8 Resistencia a los antimicrobianos por el método de difusión en agar (Kirby-Bauer) .....	48
<b>3.8.1 Día 1</b> .....	48
<b>3.8.2 Día 2</b> .....	49
<b>4. RESULTADOS</b> .....	<b>50</b>
4.1 Origen de las cepas bacterianas.....	50
4.2 Confirmación bioquímica .....	50
4.3 Tipificación serológica .....	51
4.4 Grupos filogenéticos .....	52
4.5 Genes de virulencia .....	55
4.6 Determinación del subtipo EPEC.....	58
4.7 Patrones de resistencia .....	58
4.8 Cepas de <i>E. coli</i> aislada de ganado lechero.....	60
<b>5. DISCUSIÓN</b> .....	<b>62</b>
<b>6. CONCLUSIONES</b> .....	<b>67</b>
<b>7. PERSPECTIVAS</b> .....	<b>69</b>
<b>8. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>70</b>

## ÍNDICE DE CUADROS

<b>Cuadro 1.</b> Clasificación de serotipos de cepas típicas y atípicas de EPEC..	17
<b>Cuadro 2.</b> Serotipos comunes de STEC.....	25
<b>Cuadro 3.</b> Secuencia de nucleótidos de los iniciadores.....	45
<b>Cuadro 4.</b> Composición de la mezcla de reactivos utilizados para cada una de la reacción de PCR.....	46
<b>Cuadro 5.</b> Condiciones PCR para la amplificación de cada uno de los genes.....	47
<b>Cuadro 6.</b> <i>E. coli</i> aislada de casos de diarrea infantil en 5 áreas geográficas. ....	50
<b>Cuadro 7.</b> Serotipos de <i>E. coli</i> aislada de casos de diarrea infantil en México y otros países.....	52
<b>Cuadro 8.</b> Distribución de grupos filogenéticos en cepas de <i>E. coli</i> aisladas de casos de diarrea en México y otros países. ....	54
<b>Cuadro 9.</b> Grupos filogenéticos determinados en las cepas de estudios.....	55
<b>Cuadro 10.</b> Caracterización genotípica de <i>E. coli</i> aislada de casos de diarrea infantil en México .....	56
<b>Cuadro 11.</b> Caracterización genotípica de <i>E. coli</i> aislada de casos de diarrea infantil en otros países. ....	57
<b>Cuadro 12.</b> Relación entre el serotipo y la resistencia a los antibióticos en cepas de <i>E. coli</i> aislada de diarrea infantil en México y en otros países .....	60
<b>Cuadro 13.</b> Serotipos de grupos filogenéticos, factores de virulencia y patrones de resistencia de cepas de <i>E. coli</i> aisladas de bovinos del Estado de México y Jalisco .....	61

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Mortalidad global por diarrea en niños menores de 5 años en 2010.....	10
<b>Figura 2.</b> Mortalidad en el mundo en niños de 0-4 años.....	10
<b>Figura 3.</b> Modelo de patogénesis de EPEC.....	19
<b>Figura 4.</b> Adherencia localizada EPEC.....	21
<b>Figura 5.</b> Diagrama de Venn.....	28
<b>Figura 6.</b> Algunos mecanismos de resistencia que presentan algunas bacterias.....	34
<b>Figura 7.</b> Árbol de decisión dicotómico para la determinación de grupos filogenéticos de <i>E. coli</i> .....	37
<b>Figura 8.</b> Electroforesis en gel de agarosa al 1.8% de los amplicones <i>arpa</i> (400pb), <i>chuA</i> (288pb), <i>yjaA</i> (211pb) y <i>TspE</i> (152pb).....	53
<b>Figura 9.</b> Electroforesis en gel de agarosa al 1.0% de los amplicones del gen <i>eae</i> de <i>E. coli</i> .....	57
<b>Figura 10.</b> Halos de inhibición y de resistencia a STX, NA y TE.....	59

## RESUMEN

*Escherichia coli* se clasifica en 6 patotipos, estos son definidos por sus factores de virulencia, el cuadro clínico que producen y su distribución epidemiológica, estos son *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), enterotoxigénica (ETEC), enteroagregativa (EAEC), adherencia difusa (DAEC), productora de la toxina de Shiga (STEC) y enteropatógena (EPEC). Por los factores de virulencia que presenta este último patotipo se puede clasificar como EPEC típica (EPEC-t) y EPEC atípica (EPEC-a). La finalidad de este trabajo consiste en caracterizar cepas de *E. coli* obtenidas de niños menores de 5 años que presentaron diarrea, de 5 zonas geográficas, así como cepas de *E. coli* obtenidas de hatos de bovinos. En este estudio se incluyeron 91 cepas de *E. coli*, de estas, 72 fueron obtenidas de heces de niños menores de 5 años y 19 cepas de ganado vacuno. Para confirmar la pureza de las cepas, se inocularon en agar MacConkey y se realizó la identificación bioquímica con pruebas estándar preparadas en el laboratorio. La tipificación serológica se realizó utilizando 187 antisueros obtenidos en conejo (SERUNAM) contra el antígeno somático (O) y 53 antisueros contra el antígeno flagelar (H). El DNA de las cepas se obtuvo por el método de ebullición. Se usó la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para identificar el grupo filogenético mediante los iniciadores *arpA*, *chuA*, *yjA*, *TspE*, usando la misma técnica se identificaron genes de virulencia de los patotipos STEC y EPEC (*stx1*, *stx2*, *eae* universal, *bfp*, *ehxA*, *eaf*, *espC* y *espP*) y con el método de difusión en agar (Kirby-Bauer) se evaluó la sensibilidad a antimicrobianos. El análisis de las 72 cepas aisladas de casos de diarrea infantil de las 5 zonas geográficas mostró que 2 (2.8%) fueron de Argentina, 2 (2.8%) de Egipto, 3 (4.2%) de Tailandia, 5 (6.9%) de Perú y 56 (77.8%) de México. De las cepas aisladas de bovinos 16 (84.2%) fueron del Estado de México y 3 (15.8%) del estado de Jalisco. La tipificación serológica de *E. coli* identificó 20 serotipos. Los serotipos más frecuentes fueron: O26:H11 con 12 (16.6%) cepas; O111ab:NM (no móvil) 10 (13.9%) cepas; OR:NM y O157:NM con 8 (11.1%) cepas cada uno; O26:NM, 6 (8.3%) cepas; O103:NM y O103:H7 4 (5.5%) cepas respectivamente. Los siguientes serotipos cada uno con 1 cepa OR:H11, O103:NM, O111ab:H12, O172:H27, O174:H2; O184 presentó 5 antígenos flagelares diferentes NM, H2, H7, H11 y H32, finalmente O187:NM, este grupo de cepas representaron el 28%. El estudio de los genes de virulencia de las cepas de México mostró lo siguiente: 27 (48.2%) presentaron *eae*, 11 (19.6%) *ehxA*, 9 (16.1%) *bfp*, 10 (17.8%) *eaf* y 2 (3.57%) *espP*. El análisis anterior permitió agrupar a 8 (14.3%) cepas en el subtipo EPEC-t y 18 (32.1%) en el subtipo EPEC-a. Los grupos filogenéticos

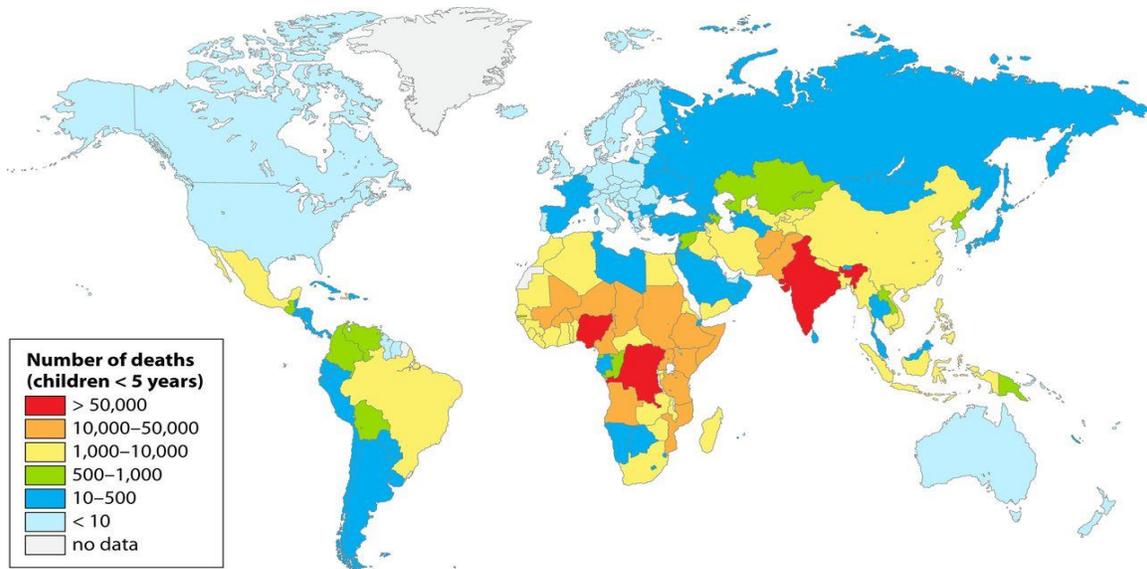
identificados en las mismas cepas fueron, del grupo B1, 31 (55.4%); en A, 18 (32.1%); B2 con 4 (7.1%) y en F, 1 (1.8%). En las 12 cepas del extranjero, se identificaron los genes *eae*, *ehxA*, y *espP*, con 1 (8.3%), 3 (25%) y 2 (12.5%) respectivamente y 6 (50%) cepas fueron negativas para todos los genes de virulencia. Estas cepas se ubicaron en los grupos filogenéticos B1 y B2, con 10 (87.5%) y 2 (12.5%). Con respecto al análisis de 19 cepas de bovinos, en 16 (100%) cepas del Estado de México, se identificó el serotipo O111:NM y se clasificaron en el grupo filogenético B1. Los genes de virulencia identificados fueron *stx1* en 11 (68.8%) cepas, *eae* en las 16 (100%) y *ehxA* en 14 (87.4%). Por lo que 11 (68.8%) de las cepas fueron clasificadas como STEC y 5 (31.2%) como EPEC-a. Con respecto a las 3 cepas del Estado de Jalisco, en esta se identificó el serotipo O157:H7, en las cuales presentaron los genes *stx2*, *eae* y *ehxA*, correspondiendo al patotipo STEC (EHEC), estas cepas se ubicaron en el filogrupo D. En las cepas aisladas de niños de México, se observó la coexistencia de EPEC-t y EPEC-a, y en bovinos cepas STEC. Los grupos B1 y A considerados como microorganismos de la microbiota intestinal de animales herbívoros fueron los prevalentes en las cepas estudiadas. Sin embargo, en los bovinos prevalecieron las cepas STEC, entre ellas *E. coli* O157:H7 del grupo D, patógeno importante para la población humana. Las cepas aisladas de bovinos y de niños mostraron en común resistencia a tetraciclina. En las cepas aisladas de niños de México, se observó la coexistencia de EPEC-t y EPEC-a y en bovinos cepas STEC. Los grupos B1 y A considerados como microorganismos de la microbiota intestinal de animales herbívoros fueron los prevalentes en las cepas estudiadas. Sin embargo, en los bovinos prevalecieron las cepas STEC, entre ellas *E. coli* O157:H7 del grupo D, patógeno importante para la población humana. Las cepas aisladas de bovinos y de niños mostraron en común resistencia a tetraciclina.

## 1. MARCO TEÓRICO

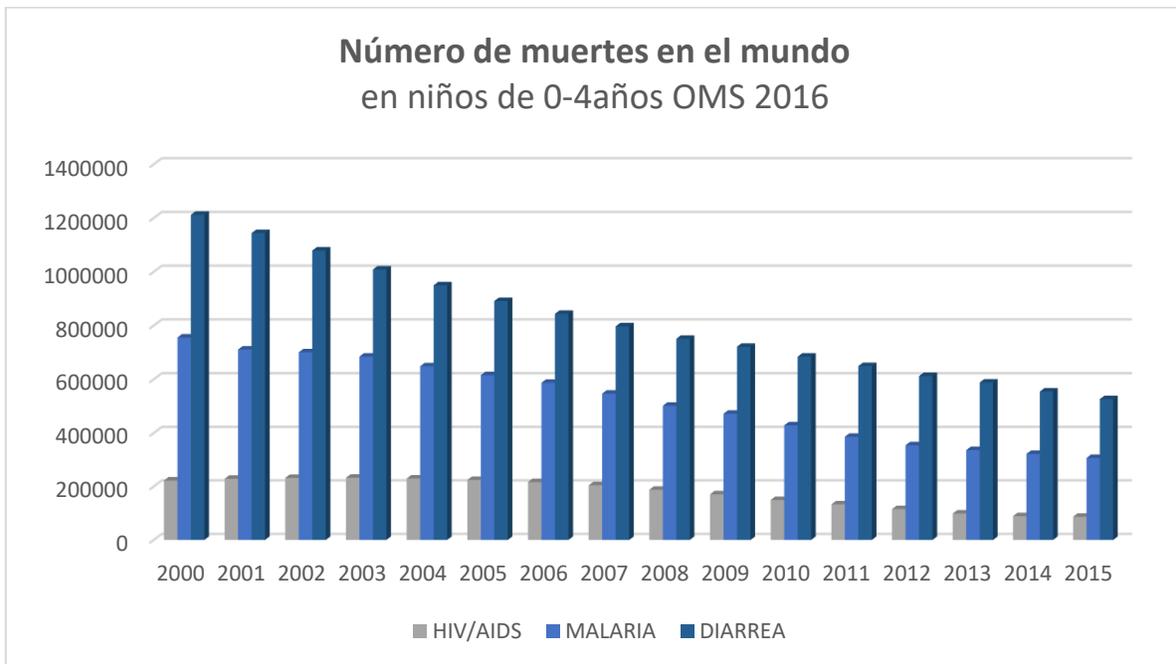
### 1.1 *Enfermedades diarreicas en niños <5 años.*

La diarrea se define como la evacuación de tres o más veces al día de heces sueltas o líquidas. La diarrea es un síntoma de una infección del tracto gastrointestinal, que puede ser ocasionada por diversos microorganismos como bacterias, virus y parásitos. La infección se transmite por una deficiente higiene del agua o por medio de alimentos contaminados. Las enfermedades diarreicas son la segunda causa de muerte de niños menores de cinco años (1) (**Figura 1**).

Las enfermedades diarreicas presentan gran impacto en la población humana alrededor del mundo, especialmente en los países en vías de desarrollo y desafortunadamente alrededor del 90% de las muertes relacionadas con la diarrea se registran en niños menores de 5 años. De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS) (1), cada año se producen alrededor de 1,700 millones de casos de enfermedades diarreicas en todo el mundo, de los cuales, aproximadamente 760,000 casos terminan siendo mortales en niños menores de 5 años (**Figura 2**). A pesar de que el índice de mortalidad por diarrea ha mostrado una disminución a razón de 4 % al año, este índice aún continúa siendo alto (2).



**Figura 1. Mortalidad global por diarrea en niños menores de 5 años en 2010. Las estimaciones de la mortalidad por diarrea específica entre los niños menores de 5 años de cada país reflejan una elevada mortalidad en los países en desarrollo, con los porcentajes más altos en los países del África subsahariana y del Asia meridional. Varios agentes etiológicos, incluyendo *E. coli* patógena, son los responsables de la mortalidad relacionada con la diarrea en estos niños. OMS 2012 (3).**



**Figura 2. Mortalidad en el mundo en niños de 0-4 años OMS, 2016 (1).**

## **1.2 Situación en México**

En la década de los 40's en forma independiente Varela, Aguirre y Carrillo (4), asociaron a *E. coli* con casos de gastroenteritis infantil. En México las enfermedades gastrointestinales son uno de los principales problemas de Salud Pública. Se transmiten, principalmente por la vía fecal-oral o bien por el consumo de agua y/o alimentos contaminados. Afectan principalmente a la población infantil, por lo que su incidencia como su prevalencia depende del nivel socioeconómico de los pacientes.

Estudios posteriores demostraron que los casos de diarrea en infantes eran causados por un grupo relativamente pequeño de serogrupos, los cuales se denominaron enteropatógenos. Durante varios años se creyó que solo estos grupos eran capaces de causar diarrea en niños y rara vez en adultos; O26, O111, O125, O126, O148 principalmente (5).

La búsqueda e identificación de patógenos, en los laboratorios clínicos, se enfoca principalmente a *Salmonella spp.*, *Shigella spp.*, *E. coli*, *Vibrio cholerae*, y *Campylobacter spp.* *E. coli* se presenta principalmente en niños menores de 5 años y en el 42% de los casos de diarrea del viajero, de los cuales el 16% son STEC y el 4% EPEC y el resto ETEC. (6)

### **1.3 Familia Enterobacteriaceae.**

El nombre *Enterobacteriaceae* fue propuesto por Rahn en 1937, dicho nombre es derivado del latín “enterobacterium” cuyo significado es bacteria intestinal. Los miembros de esta familia se caracterizan generalmente por ser bacilos cortos Gram-negativos, carecen de oxidasa y ureasa, no forman esporas, son anaerobios facultativos y pueden ser inmóviles o móviles por medio de flagelos peritricos (7). Inicialmente esta familia comprendía un solo género llamado *Enterobacter* y numerosas bacterias que compartían la capacidad de fermentar glucosa y lactosa con la producción de gas, mismas que pertenecen a los géneros *Erwinia*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, *Serratia* y *Shigella*. Actualmente la familia *Enterobacteriaceae* comprende al menos 44 géneros y 176 especies, *Escherichia* es el género tipo de esta familia (8).

### **1.4 Escherichia coli**

#### **1.4.1 Historia**

Theodor Escherich bacteriólogo alemán fue el primero en aislar y describir a *E. coli* como pequeños bastones presentes en las heces de los niños, las cuales denominó *Bacterium coli commune* en su publicación de 1885 (9). A pesar de que dicho microorganismo fue descrito ampliamente por diferentes investigadores, el nombre de *E. coli* fue reconocido 69 años después, esto fue en el año 1954 (10) como un microorganismo comensal e inofensivo presente en el tracto gastrointestinal de animales de sangre caliente.

El género *Escherichia* y la especie *E. coli* han sido registrados por más de un siglo. En 1985, Farmer y colegas describieron otra especie en el género

*Escherichia*, la que nombraron *E. fergusonii* (11). En 2003, Huys y sus colegas refirieron la segunda nueva especie, *E. albertii* (12). Hyma (13) puntualizó la evolución de *E. albertii* con *E. coli* y su semejanza con los serotipos 7 y 13 de *Shigella boydii*.

#### **1.4.2 Características Bioquímicas.**

*E. coli* es un bacilo Gram-negativo, en forma de bastón (2.0 - 6.0 µm de longitud y 1.1 - 1.5 µm de ancho), no formadora de esporas. Su motilidad es variable y las cepas van desde inmóviles hasta muy móviles, esto debido a la presencia de flagelos peritricos. Es una bacteria anaerobia facultativa, presenta un metabolismo fermentativo, adaptable a hábitats específicos, no requiere de factores especiales para su crecimiento en el laboratorio [ (14) (15)].

*E. coli* crece rápidamente en 24 horas en medios bacteriológicos comunes como Agar Sangre o Agar MacConkey, en un intervalo de temperatura que va de los 20°C a 40 °C. Fermenta la glucosa, lactosa y maltosa, entre otros azúcares. Tiene un olor característico descrito como seminal, esto se debe a la fermentación de azúcares, a la producción de ácido láctico y en menor producción ácido fórmico y ácido acético. Es catalasa positiva, oxidasa negativa y anaerobio facultativo. La mayoría de las cepas son fermentadoras de lactosa. Rojo de metilo positiva debido a la fermentación de glucosa con producción de gas, Voges-Prokauer negativa, citrato de sodio negativa y la mayoría de las cepas son indol positivas (16).

*E. coli* se clasifica mediante pruebas serológicas en las cuales se consideran el antígeno somático O (formado por fosfolípidos y polisacáridos) y un antígeno flagelar, denominado H. Para determinar el grupo patógeno Kauffman en 1944 desarrolló, un esquema de serotipificación. El antígeno O es el responsable del serogrupo; la determinación del antígeno somático y flagelar (O:H) indica el serotipo, en cual en diversas ocasiones se asocian con un cuadro clínico en particular [ (17) (18)].

El lipopolisacárido (LPS), es el antígeno somático O de la bacteria, es estable al calor, por lo que resiste el calentamiento a temperatura entre 100°C y 120°C (19). El antígeno O puede ser rugoso (R) esto significa que las cepas han perdido su especificidad antigénica, ya que presentan auto aglutinación en solución fisiológica y por lo tanto no se puede determinar un serotipo mediante procedimiento serológicos habituales (20). Los antígenos flagelares H representan distintos determinantes antigénicos encontrados en la flagelina, la proteína que constituye el flagelo de los organismos móviles. Existen más de 180 serogrupos O y 53 flagelares que generan 10,000 posibles combinaciones, esto es por la asociación de antígeno somático con antígeno flagelar para obtener serotipos O:H (21).

#### **1.4.3 Grupos Patógenos-Patotipos.**

Debido a la diversidad que tiene *E. coli* para producir enfermedad, así como los factores de virulencia, patogenicidad y cuadro clínico que produce, esta se clasifica en seis grupos denominados patotipos, los cuales son:

***E. coli* enteropatógena (EPEC)** que es responsable de diarrea acuosa en los lactantes. Produce vómito, fiebre y diarrea acuosa, con moco pero sin sangre.

Coloniza las microvellosidades del intestino, produciendo una lesión denominada de adherencia y borrado (A/E) en el borde de cepillo de la membrana de las microvellosidades.

***E. coli* enterotoxigénica (ETEC)** responsable principalmente de la llamada diarrea del viajero, causa diarrea acuosa y con fiebre. Coloniza la mucosa del intestino delgado por medio de pilis o fimbrias, la contaminación fecal de agua y alimento es la principal fuente de infección.

***E. coli* productora de la toxina Shiga (STEC)** se presenta con diarrea con sangre, colitis hemorrágica (CH), síndrome urémico hemolítico (SUH) y dolor abdominal, es productora de una citotoxina denominada Vero nombrada así por el daño que causa en células de riñón de mono verde, el serotipo O157:H7 es el representativo de este grupo bacteriano.

***E. coli* enteroinvasiva (EIEC)** provoca fiebre y diarrea profusa con heces que presentan moco con presencia de sangre, invade las células epiteliales del colon adhiriéndose a las vellosidades de la mucosa por acción de mucinasas y adhesinas, para posteriormente multiplicarse y diseminarse a las células adyacentes.

***E. coli* enteroagregativa (EAEC)** se presenta con diarrea líquida, verdosa, con moco y sin sangre. Nataro y Kaper (22) fueron quienes describieron este patotipo, ellos encontraron cepas aisladas de pacientes con diarrea, las cuales presentaban una serología que no correspondía al grupo de EPEC, pero que presentaban un patrón de adherencia que denominaron agregativo y carecían del gen *eaf* (Factor

de adherencia de EPEC). El sitio blanco de EAEC se presenta en la mucosa del intestino grueso y delgado.

Finalmente, ***E. coli* con adherencia difusa (DAEC)** se presenta con diarrea acuosa sin sangre y sin leucocitos.

### **1.5 *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC)**

#### **1.5.1 Definición**

En la década de 1930, se usaron métodos serológicos para describir las infecciones por *E. coli* en lactantes, pero la importancia de *E. coli* en las enfermedades diarreicas no fue tomada en cuenta hasta 1945 (23). La primera información sobre las propiedades de las cepas perteneciente a *E. coli* que causan diarrea grave en infantes, se describieron en la literatura médica en la década de 1940. Bray (24) en Inglaterra y Varela, Aguirre y Carrillo en México (4). La divulgación de una representación serológica para antígenos somáticos y flagelares de *E. coli* (25) consintió en poder clasificar a las cepas aisladas de un grupo de personas que presentaban diarrea como referentes a un grupo reducido de serotipos. El grupo de *E. coli* enteropatógena (EPEC) fue propuesto por Neter y Schumway (26) para diferenciar a estas cepas de *E. coli* presente en la microbiota normal del intestino. Bray asoció al grupo EPEC, que más tarde fue denominado como serogrupo O111, con casos de diarrea infantil y esto dio lugar rápidamente a la difusión por medio de publicaciones que establecieron la importancia de O111 y extendiéndose a otros serogrupos como O55, O26 y O119 (24). En la década de los 50's, se implementó una metodología para pruebas serológicas aceptada internacionalmente, con la cual se llegó a la conclusión de que el patotipo EPEC

estaba distribuida mundialmente. Con estos hallazgos la OMS reconoció 12 serotipos de EPEC, incluyendo EPEC típicas y atípicas (**Cuadro 1**) [ (27) (28)].

	<b>Serotipos</b>	
<b>Grupo</b>	<b>Móvil</b>	<b>No-Móvil</b>
<b>Típico</b>	O86:H34, O114:H2, O127:H6, O127:H40, O142:H6, O142:H34	O55:H6, O55:NM, O111:NM, O111:H2, O119:H6
<b>Atípico</b>	O55:H34, O86:H8, O111:H25, O119:H2, O125ac:H6, O128ab:H2	O26:H11 O55:H7, O111:H8, O111:H9

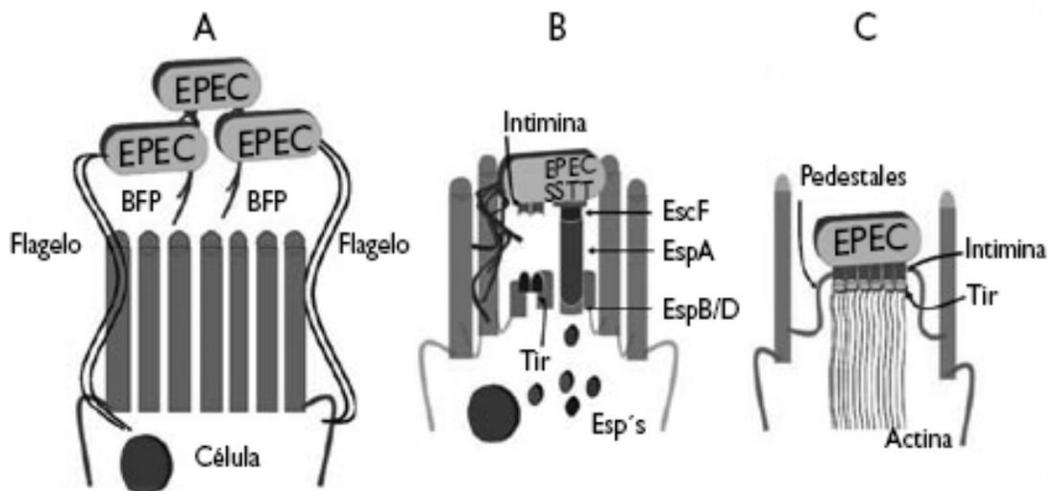
**Cuadro 1. Clasificación de serotipos de cepas típicas y atípicas de EPEC. En estos subgrupos se incluyen cepas con y sin movilidad. Cuadro realizado con información de Croxen MA et al., 2013 (29).**

EPEC pertenece a un grupo de bacterias conocido colectivamente como productoras de la lesión A/E del enterocito, son patógenos basados en su capacidad de formar lesiones características en la membrana celular del epitelio intestinal (IECS). EPEC fue el primer patotipo que se identificó serológicamente con lo cual se establecieron serotipos de la bacteria. El termino EPEC fue usado por primera vez en 1955 (30) para describir la epidemiología de la cepas de *E. coli* relacionada con una serie de brotes de diarrea infantil en los años 1940's y 1950's. [ (24) (31)] originalmente definido por el serotipo, las cepas EPEC se clasifican en función de sus características patogénicas siendo la adherencia su factor principal de patogenicidad.

### 1.5.2 Patogénesis.

EPEC es el principal causante de cuadros de diarrea en humanos alrededor del mundo (32). La diarrea producida por EPEC no es mediada por la producción de toxinas a diferencia del patotipo STEC. Sin embargo, el gen que codifica para la enterotoxina *east1* (toxina termoestable de *E. coli*) ha sido encontrado en diversas cepas de *E. coli* diarreagénicas así como en cepas comensales no patógenas (33). EPEC puede subsistir en el intestino delgado presentando resistencia a la fagocitosis (34) observándose una disminución de la respuesta inmune del huésped. El mecanismo exacto de la producción de diarrea de EPEC no se conoce con detalle y probablemente involucra una combinación de diferentes mecanismos.

La rapidez con la que se presenta la diarrea implica la intervención de un mecanismo secretor en lugar de una mala absorción como la causa más probable de la diarrea. Sin embargo, la eliminación de las microvellosidades en los sitios de anclaje de la bacteria puede conducir a una disminución de las superficies absorbentes, alterando los canales de agua y de iones por acción de los efectores del sistema de secreción tipo 3 (T3SS) en el epitelio intestinal atribuyéndose este mecanismo a la diarrea inducida por EPEC (35) **(Figura 3)**.



**Figura 3. Modelo de patogénesis de EPEC. Figura tomada de Vidal *et al.*, 2006 (36).**

(A) Los BFP (pili formador de penachos) favorece que las bacterias interactúen entre ellas, dando lugar a la formación de una microcolonia. Los flagelos establecen el contacto inicial de la microcolonia con la célula epitelial. (B) Una vez adherida a la célula, EPEC inyecta factores de virulencia (Esp) mediante el SSTT-translocón, entre ellos Tir, que se inserta en la membrana de la célula y expone una región en el espacio extracelular. (C) La intimina (una proteína de membrana externa) se une con firmeza a Tir y se induce el reacomodo del citoesqueleto, lo cual favorece la formación de los pedestales de actina y al borramiento de las microvellosidades; lo anterior da lugar a la formación de la lesión A/E (36).

A lo largo de los años, se han logrado identificar diversos factores de virulencia comprobados que ayudan a facilitar la colonización del epitelio intestinal por EPEC. La expresión, secreción y translocación de las proteínas efectoras permiten a las bacterias intervenir en las vías de señalización de las células huésped causando enfermedad. Estos elementos se encuentran codificados en el plásmido *eaf* (factor de adherencia de EPEC) así como en la isla de patogenicidad del locus de borrado del enterocito (LEE) (37). El diagnóstico de EPEC tiene múltiples etapas, como en cualquier patotipo de *E. coli*, la bacteria es aislada de heces en medios selectivos y diferenciales. Sin embargo, cuando se sospecha de un brote epidémico se requiere diferenciar los aislamientos de EPEC de la microbiota

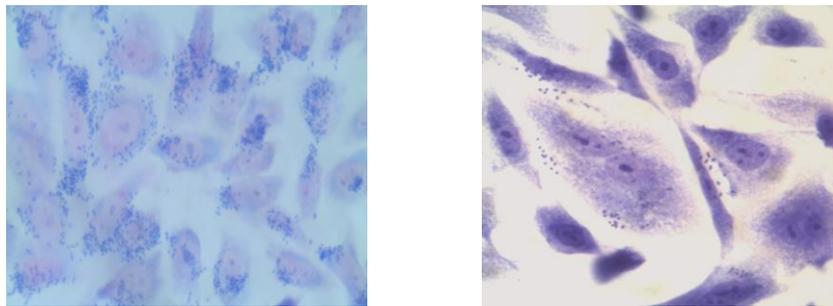
normal, para ello es necesario realizar pruebas adicionales a las bioquímicas utilizadas en los laboratorios clínicos (38) (39). Para el diagnóstico de EPEC existen las siguientes metodologías: A) serotipificación, B) ensayo de adherencia con células HEp-2 (células de carcinoma Humano), C) Prueba de FAS (tinción fluorescente para actina) y D) técnicas de biología molecular [ (38) (40)].

La mayoría de las cepas EPEC pueden ser serotipificadas, pero la designación del serotipo actualmente no es suficiente para que la cepa sea considerada EPEC, sino que se requieren de conocer las características patogénicas y genotípicas que las distinguen de otros patotipos de *E. coli* y a su vez se permite clasificar a EPEC en típicas (EPEC-t) o atípicas (EPEC-a). Las cepas EPEC se consideran típicas cuando tienen los genes *eae* para la intimina, que participa en la producción de la lesión A/E, y el plásmido *eaf* que codifica el gen *bfp* (pili formador de penachos); se dice que son atípicas cuando solo presenta los genes *eae* pero no presenta el plásmido *eaf* (22).

Cravioto y col. demostraron limitaciones del análisis serológico de cepas EPEC aisladas de infantes en México ya que las cepas aisladas no eran de patotipos comunes; sin embargo, las lograron identificar como EPEC mediante el ensayo de adherencia a células HEp-2 (41). El ensayo de adherencia desarrollado por Cravioto y col., consiste en desarrollar células HEp-2 en cultivo las cuales se infectan durante tres horas con cultivos de la bacteria y se fijan con metanol al 70% y posteriormente son teñidas con Giemsa. Las células EPEC se diferencian por formar microcolonias sobre las células HEp-2 que le han llamado de forma localizada (LA) y dicha prueba se incluye para el estudio factores de patogenicidad

como el efecto de la lesión de adherencia y borrado A/E, la presencia de plásmidos y fimbrias [ (17) (42)].

El plásmido *eaf* tiene una longitud de 50-70MDa y se encuentra presente en las cepas EPEC típicas ya que es necesario para desarrollar la adherencia localizada, **(Figura 4)** (43) la secuencia para el análisis del plásmido *eaf* se hace en base a la cepa control de *E. coli* E2348/69, del serotipo O127:H6.



**Figura 4. Adherencia localizada de EPEC. Tomada de Al-Mamun 2013 (44).**

Hay dos locus de patogenicidad importantes en el plásmido *eaf*, uno es el grupo de genes tipo IV (*bfp*) y el segundo el que codifica para los activadores transcripcionales. El plásmido *eaf* regula la expresión del gen *eae* (codificador de la intimina), localizado en el locus LEE (45), en el cromosoma de la bacteria. El BFP es de las fimbrias clase IV-B, que se presentan en bacterias patógenas Gram negativas como son ETEC, *Salmonella Typhi* y *Vibrio cholerae*. Los BFP´s forman agrupaciones tipo penacho que se extienden sobre la superficie celular de EPEC típicas (46). Los pilis son factores de virulencia necesarios para la adherencia localizada en las células epiteliales (47). El operón *bfp* consta de 14 genes los cuales son necesarios para su biogénesis (48), el primer gen de este operón es *bfpA*, que codifica para la subunidad principal de la bundilina, otros genes

importantes es *bfpP*, el cual codifica para una peptidasa necesaria producir un agrupamiento maduro del BFP.

### **1.5.3 Otros factores de virulencia *EspP* y *EspC***

*EspC* es una proteína secretada codificada en una isla de patogenicidad en EPEC, ésta es una proteína autotransportadora de proteasa de serina que actúa como enterotoxina, causando efectos citopáticos en cultivo de células. Dicha isla de patogenicidad, ha sido identificada en patógenos del tipo EPEC-t. Diferentes estudios muestran que el gen *espC* es uno de los genes de mayor prevalencia que codifica proteínas autotransportadoras en cepas EPEC típicas y atípicas (49).

La regulación de *espC* esta acoplada al sistema global Ler (regulador global codificado LEE) presente en el locus LEE que es la que controla la expresión génica de factores de virulencia durante la patogénesis de EPEC incluyendo genes que codifican a las proteínas T3SS, *EspC*, *Tir* e intimina [ (50) (51)]. Uno de los genes más estudiados es *Tir* que codifica para el receptor translocado *Tir*. *Tir* se localiza en la cresta del pedestal, donde opera como receptor celular de la proteína bacteriana transmembranal intimina (52). La intimina interviene en la exclusión de microvellosidades, así como la incorporación de las proteínas del citoesqueleto para la formación de pedestales [ (35) (53)].

Se ha demostrado que durante la infección por EPEC en las células epiteliales la primera proteína encontrada en el sobrenadante es *espC* (60 min) y T3SS (90 min). *EspC* es ineficiente en el proceso de internalización cuando se encuentra como proteína purificada esto es en condiciones no fisiológicas, ya que no hay ningún receptor involucrado en su regulación y por lo tanto no requiere de tránsito

intracelular. Sin embargo, espC fisiológicamente secretada por EPEC, en cual se enriquece en medio de cultivo tisular y por contacto celular, se internaliza eficientemente durante la interacción EPEC con las células epiteliales (36).

EspP (extracelullar serine protease plasmid-encoded) forma parte de las serina proteasas autotransportadas por las enterobacterias (SPATE) y son secretadas por un mecanismo cooperativo del T3SS y el sistema de secreción tipo 5 (T5SS) (29).

Esta proteína están compuestas por tres dominios: 1) Una secuencia señal en el extremo amino terminal que promueve la secreción a través de la membrana interna; 2) Un extremo carboxilo terminal que forma un poro en forma de barril en la membrana externa y 3) un dominio central de la proteína que está al alcance de la superficie de la célula bacteriana [ (54) (55)].

EspP se ha encontrado principalmente en cepas de STEC. Sin embargo, ha habido estudios en los cuales EspP también se ha encontrado en cepas de EPEC- a [ (49) (56) (57)]. Se ha encontrado que espC y espP causan efectos citotóxicos, incluyendo el daño al citoesqueleto, a la espectrina, pepsina y factor V de coagulación. Además de que se observa comúnmente adhesión y formación de pedestal (58).

## **1.6 *Escherichia coli* productora de la toxina de Shiga STEC**

### **1.6.1 Definición**

*E. coli* O157:H7 se puede encontrar en el intestino de los bovinos siendo estos los reservorios naturales de la bacteria, aunque se puede encontrar con menos frecuencia en cabras, borregos, cerdos y pollos (18). También se ha logrado

recuperar de lechuga, rábanos, alfalfa; además de productos industrializados como mayonesa y jugos de naranja y manzana no pasteurizados. La transmisión de O157:H7 puede ser por ingerir carne cruda o mal cocida, leche bronca, agua contaminada (59).

STEC presenta un cuadro clínico que va desde una diarrea acuosa leve hasta diarrea con sangre y representa un riesgo para el desarrollo del síndrome urémico hemolítico (SUH) (60). STEC se caracteriza por la producción de las toxinas Shiga (Stx1 y Stx2), codificada por un bacteriófago  $\lambda$  insertados en el cromosoma de la bacteria. La toxina Stx pertenece a una familia de proteínas estructural y funcionalmente relacionadas con la toxina Shiga sintetizada por la *Shigella dysenteriae*. Ellas son designadas por un número o una combinación de números y letras. La toxina Shiga tipo 1 (*stx1*) difiere en un sólo aminoácido de la toxina Shiga de *S. dysenteriae*, mientras que la tipo 2 (*stx2*) tiene solo 56% de identidad con *stx*. Además, algunas variantes de *stx2* son más virulentas en humanos, tal es el caso de *stx2c* y ciertas formas de *stx2d*, que pueden ser activadas por la elastasa presente en el mucus humano. Si bien las infecciones por STEC están asociadas a *stx1*, *stx2* o ambas, la producción de *stx2* aumenta el riesgo de SUH (61). Las toxinas Shiga (*stx1*, *stx2*) actúan inhibiendo la síntesis proteica dentro de células blanco, después de entrar a una célula, la proteína funciona como una N-glicosidasa, hidrolizando varios nucleótidos del ARN del ribosoma, deteniendo de tal modo la síntesis de proteínas (62).

Las cepas STEC como las cepas EPEC, son capaces de unirse íntimamente a las células epiteliales, provocando el borrado de las microvellosidades y produciendo

la formación de pedestales que son compuestos de proteínas del citoesqueleto de dichas células. Además de las toxinas la bacteria es capaz de sintetizar un amplio número de factores de virulencia como la toxina citoletal distensora (CDT), *cdtABC*, la hemolisina de *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) llamada EHEC-hlyA o *ehx*, una proteasas de serina autotransportadoras, *espP*, etc (38).

Por el hecho de que STEC O157:H7 ha sido clasificada como un contaminante de la carne, el Departamento de Agricultura de Estados Unidos (USDA) declaró recientemente 6 serogrupos más de EHEC, que incluye los serogrupos, O26, O45, O103, O111, O121, O145. Estos seis serogrupos son conocidos como los “6 grandes”, debido a que fueron encontrados más comúnmente en el patotipo STEC no-O157 que son cepas asociadas con una infección grave en los humanos, muchas veces produciendo CH y SUH. Sin embargo, la prevalencia de las infecciones por cepas STEC no-O157 difiere geográficamente (63). **(Cuadro 2).**

O Serogrupo	H Antígeno	<i>eae</i>	Seropatotipo
O26	NM, H11	+	B
O45	NM	+	B
O91	NM, H21	-	C
O103	NM, H2	+	B
O111	NM, H8	+	B
O113	H21	-	C
O121	H19	+	B
O145	NM, H25, H28	+	B
O157	NM, H7	+	A

**Cuadro 2. Serotipos comunes de STEC: Cuadro modificado de Croxen MA et al., 2013 (29).**

### **1.6.2 Epidemiología**

STEC también es frecuente en países como Argentina que está en vías de desarrollo, ha sido detallado en la literatura con la incidencia mundial más alta de SUH en niños menores de 5 años (64). Esto se debe a una exposición excesiva a factores de riesgo conocidos asociados con infecciones por STEC, incluyendo el consumo de carne, agua recreativa y una higiene personal deficiente (65). En contraste, Brasil tiene una incidencia baja de SUH (66), y los casos de STEC O157: H7 son poco frecuentes (67). Aunque las infecciones por STEC se identifican en otros países en desarrollo [ (68) (69)], la vigilancia general y el diagnóstico clínico son escasos.

### **1.6.3 STEC en México**

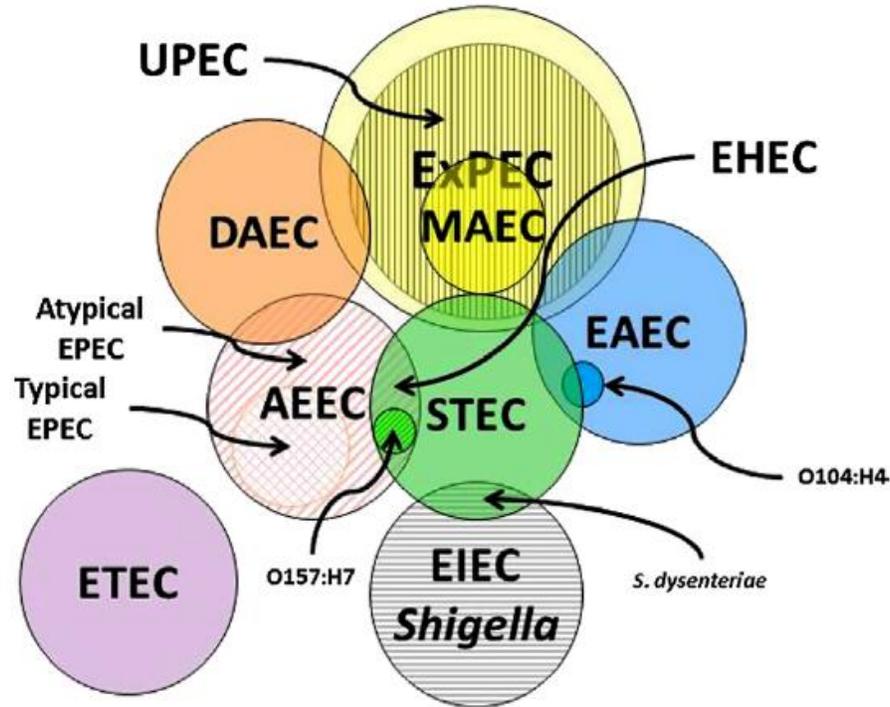
Otros estudios realizados en México, con el propósito de establecer la prevalencia de *E. coli* O157:H7 en nuestro país, han mostrado la presencia de la bacteria, en canales de reses [ (70), (71)] de rastros de los estados de México y Jalisco, respectivamente. En los estudios mencionado, reportaron el aislamiento de cepas de *E. coli* O157:NM y O157:H7 (5% y 2.7% el primero y 16% el segundo). Así mismo, un estudio realizado por Callaway [2004] (72), reportó el aislamiento de cepas de *E. coli* O157:NM en el 1.25% y 2.1% de muestras de heces de bovinos y cerdos respectivamente. Ninguno de los aislados referidos presentaba *stx1* y *stx2*, genes relacionados con la expresión de las toxinas Shiga. Aunque, *E. coli* O157:H7 se ha aislado de bovinos de diferentes zonas geográficas del país, hasta el momento no se han reportado que cause enfermedad en la población mexicana.

### **1.7 EPEC y STEC, modelo de patogénesis.**

El efecto patogénico de una cepa particular de *E. coli* depende de variedad de genes de virulencia específicos que puede poseer. Las combinaciones específicas de los genes de virulencia determinan patotipos de *E. coli* y cada patotipo tiene una capacidad para causar una diversidad limitada de cuadros clínicos.

La complejidad de la nomenclatura es producto de la relación entre los patotipos, así como del número de patotipos de *E. coli*, las similitudes de sus nombres, versatilidades en el uso en la literatura, la evolución, la patogénesis y la aparición de nuevos patotipos. La **figura 5** representa las relaciones entre los patotipos de *E. coli*.

Las cepas patógenas de *E. coli* pertenecen a dos grupos: las que causan enfermedades gastrointestinales y las que causan infecciones extraintestinales. Entre las cepas extraintestinales, parece probable que la mayoría, de las cepas pueden producir meningitis neonatal también pueden causar infecciones del tracto urinario. Entre los patotipos gastrointestinales, la situación es aún más compleja, dada la superposición de los atributos de EAEC y STEC (73).



**Figura 5. Diagrama de Venn. Tomada del libro *Escherichia coli* Pathotypes and Principles of Pathogenesis 2013 (74)**

Relaciones entre los diferentes patotipos de *E. coli* causantes de enfermedad en los seres humanos. También hay reportes de cepas de *E. coli* productoras de toxinas Shiga (STEC, verde) que causan infecciones del tracto urinario UTI y otras infecciones extraintestinales (75). STEC se define por la producción de toxinas Shiga, codificadas por bacteriófagos. Entre las STEC, algunas cepas también son capaces de unirse íntimamente a las células epiteliales, eliminando las microvellosidades, y produciendo la formación de pedestales. La capacidad de adherencia que es una propiedad que define a *E. coli* adherente y efectora (AEEC, rayas diagonales). Estas cepas se denominan EPEC típica (a cuadros), mientras que aquellos que no producen toxinas Shiga, ni BFP se conocen como EPEC atípica. Algunas cepas de EPEC atípica presentan adherencia difusa (74).

### **1.8 Antimicrobianos.**

Los antimicrobianos son compuestos obtenidos de un microorganismo o producidos sintéticamente, utilizadas en el tratamiento de infecciones bacterianas. También pueden considerarse como ligandos cuyos receptores son las proteínas de la pared celular de los microorganismos. Las proteínas sobre las que ejerce

acción el antimicrobiano son fundamentales en las reacciones bioquímicas de los microorganismos y la interferencia en sus vías fisiológicas causa efectos que los elimina (76).

Existen diferentes formas de clasificación de los antimicrobianos:

- **Efecto antimicrobiano:** se diferencian entre bactericidas y bacteriostáticos, según se provoque la muerte de las bacterias o inhiban su crecimiento sin provocar su destrucción.
- **Espectro de actividad:** se refiere al número de variedades bacterianas frente a las que sean activos; pueden ser de amplio espectro o de espectro reducido.
- **Estructura química:** se agrupan en familias con propiedades similares, como  $\beta$ -lactámicos, tetraciclinas, quinolonas, etc.
- **Mecanismo de acción:** hay antibióticos que impiden el crecimiento bacteriano, la síntesis proteica, alterando la permeabilidad de la membrana celular y bloquean la síntesis de los ácidos nucleicos.

### ***1.9 Familias de antimicrobianos.***

Su descubrimiento ocurrió en la década de los cuarentas donde surgieron numerosas familias de antimicrobianos y actualmente son el principal grupo terapéutico; entre las cuales se encuentran:  $\beta$ -lactámicos, macrólidos, aminoglucósidos, tetraciclinas, polipéptidos, polienos, sulfonamidas, carbapenos, monobactámicos, entre otras (77).

**$\beta$ -Lactámicos:** son antimicrobianos bactericidas, es decir, actúan bloqueando los procesos de síntesis y reparación de la pared bacteriana. Formando así una pared defectuosa incapaz de mantener el equilibrio osmótico provocando la lisis celular, actúan siempre en la fase de crecimiento celular.

La penicilina es el primer antibiótico del cual se tiene registro; da origen a dos grupos de antibióticos: las **penicilinas** y las **cefalosporinas**. La penicilina se obtuvo por primera vez del hongo *Penicillium* y está formada por un anillo  $\beta$ -lactámico; actúa inhibiendo la síntesis de la pared celular bacteriana. Se clasifica en **1-Activas** frente a Gram positivos, **2- Activas** frente a Gram negativos, **3- Resistente** a penicilinasa, **4-Penicilinas** de amplio espectro, **5-Penicilinas** con inhibidores de  $\beta$ -lactamasas (78).

Las cefalosporinas son un derivado semisintético de un antibiótico obtenido del microorganismo *Cephalosporium acremonium*. Las cefalosporinas poseen un anillo  $\beta$ -lactámico-dihidrotiacina, su mecanismo de acción es idéntico a las penicilinas que actúan al nivel de la pared celular, en la última etapa de su síntesis. Se clasifican en 4 generaciones dependiendo de su espectro de acción (78). Las cefalosporinas de tercera y cuarta generación son las más eficaces contra bacilos Gram negativos, resistentes a las  $\beta$ -lactamasas que producen, la ceftazidima y el cefepime son ejemplos de estos antimicrobianos (79).

Los carbapenos son antimicrobianos bicíclicos afines estructuralmente con los  $\beta$ -lactámicos, poseen la propiedad de no ser inactivados por las  $\beta$ -lactamasas plasmídicas de las enterobacterias. Presentan un mayor espectro de acción frente

a microorganismos anaerobios, el Imipenem pertenece a esta clase de antimicrobianos (80). El aztreonam es el único antimicrobiano monobactámico, tiene su efecto en bacterias Gram negativas nosocomiales, su mecanismo de acción es similar a los  $\beta$ -lactámicos: atraviesan la pared y la membrana celular para interaccionar con las proteínas de unión de penicilinas necesarias en las últimas etapas de la transpeptidación. Su dinamismo difiere de los  $\beta$ -lactámicos y se asemeja a un aminoglucósido; presenta una elevada resistencia a las  $\beta$ -lactamasas [ (77) (81)].

Las tetraciclinas inhiben la síntesis de proteínas ya que se unen a la subunidad ribosómica 30S, lo que impide la elongación de la cadena peptídica. Tienen un amplio espectro de actividad que incluye una gran variedad de bacterias Gram negativas (82). Las sulfamidas (sulfametoxazol) son un grupo de fármacos sintéticos con efecto bacteriostáticos, impiden el crecimiento y desarrollo y multiplicación de las bacterias Gram negativas; en combinación con trimetropim (diaminopiridina) actúa sobre la reacción enzimática de la síntesis del ácido tetrahidrofólico mediante competitividad metabólica (78).

Fluoroquinolonas a menudo llamadas quinolonas, son derivadas del ácido nalidíxico, un antiguo antimicrobiano. Estos agentes se unen a las DNA girasas involucradas en la regulación del superenrollamiento del DNA bacteriano, un proceso primordial para la replicación y la transcripción del DNA interfiriendo en su actividad. Son agentes bactericidas potentes y tienen un amplio espectro de actividad (82). Quinolonas de acuerdo a la generación: 1ª ácido nalidíxico, 2ª norfloxacin, ciprofloxacina, ofloxacina (83).

### **1.10 Resistencia a los antimicrobianos.**

El término resistencia se refiere a los cambios que determinan que la sensibilidad del microorganismo a un antimicrobiano determinado sea inferior a la observada con anterioridad. Cuando la sensibilidad al antimicrobiano se perdió hasta tal grado que el fármaco ya no es eficaz para uso clínico se dice que el microorganismo alcanzó resistencia clínica. El desarrollo de resistencias es extremadamente variable. Existen diversos mecanismos de resistencia que incluyen: destrucción o inactivación del agente antimicrobiano (82).

### **1.11 Mecanismo de resistencia de las bombas de eflujo en los antimicrobianos.**

Las bombas de eflujo son transportadores de membrana, organizadas en superfamilias y distribuidas ubicuamente, están involucrados generalmente en la extrusión de sustancias tóxicas desde el interior de la célula hacia el medio externo. Las bacterianas tienen variados sistemas transportadores de membrana con múltiples funciones vitales como ingreso de nutrientes, excreción de sustancias tóxicas y mantenimiento de la homeostasis [ (84) (85)].

Es importante conocer el mecanismo de resistencia por las bombas de eflujo, ya que este afecta directamente la estructura, la regulación y el efecto en los antimicrobianos. Uno de estos mecanismos involucra la producción de enzimas hidrolíticas capaces de inactivar directamente al antimicrobiano como en el caso de la  $\beta$ -lactamasas (86). Las bombas de eflujo pueden ser específicas para un sustrato, o bien pueden transportar una amplia variedad de compuestos químicamente diferentes, incluyendo antimicrobianos de múltiples clases.

Filogenéticamente las bombas de eflujo pertenecen a cinco superfamilias denominadas: (1) familia de casete de unión al ATP (ABC); (2) superfamilia del facilitador mayor (MFS); (3) familia de extrusión de multifármacos y tóxicos (MATE); (4) familia de resistencia pequeña a multifármacos (SMR); y (5) familia de resistencia a división por nodulación (RND) (87).

Un ejemplo de este sistema es el demostrado por la bomba Tet bombea tetraciclina al espacio periplásmico de *E. coli*. Podría crear altos niveles de resistencia solamente por tener una velocidad de eflujo que supere altamente al retorno de la droga hacia el citoplasma (88).

También la expresión de  $\beta$ -lactamasas clase C confiere resistencia a cefalosporinas de primera y segunda generación. Las bombas de eflujo, generan resistencia a las penicilinas. Para el caso de las fluoroquinolonas, la resistencia resulta de una mutación puntual a nivel de DNA girasa/topoisomerasa IV (89).

### **1.12 Mecanismo de acción de las bombas**

Se han propuesto tres modelos para explicar las posibles rutas de los transportadores:

La hipótesis de la *aspiradora hidrofóbica* asume que los transportadores están embebidos en los fosfolípidos de la bicapa membranosa, el sustrato se mueve libremente en la fase lipídica, desde allí alcanzan el canal central de la bomba proteica ya sea desde el lado interno o externo de la membrana y por último son aspirados (**Figura 6**).

La segunda hipótesis *flipase* es donde el sustrato alcanza la bomba proteica también desde dentro de la membrana y simplemente difunde al exterior pasando desde la porción interna hacia la externa.

La tercera hipótesis *poro acuoso* asume que la traslocación incluye el transporte del sustrato desde el citoplasma hacia el medio externo a través de poros acuosos con sitios flexibles de reconocimiento de sustrato [ (84) (90)].

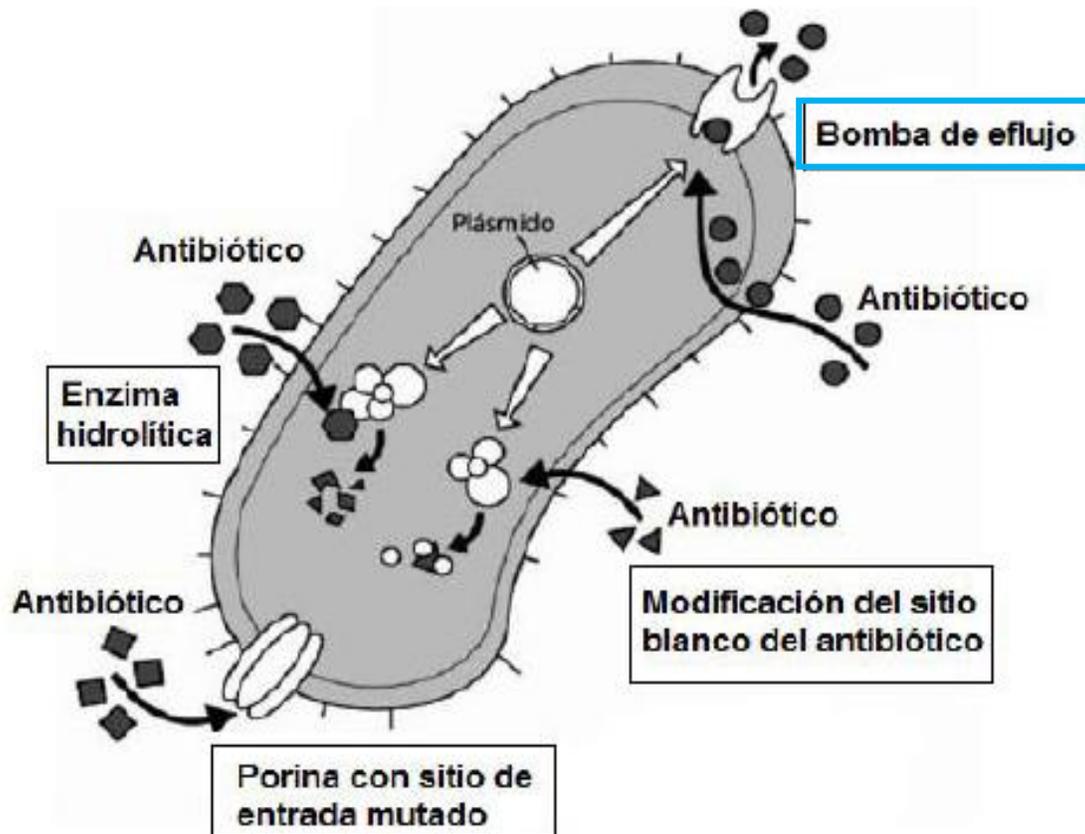


Figura 6. Algunos mecanismos de resistencia a los antibióticos que presentan algunas bacterias. Tomado de tesis José Molina 2011 (91)

### **1.13 Grupos filogenéticos.**

Existe una vasta variabilidad genética interespecie en *E. coli*, la cual nos da como resultado una diversidad en cuanto a patotipos. En estudios recientes se ha investigado la relación entre cepas en todo lo que se refiere a grupos filogenéticos. Estos han llevado a determinar los siguientes subgrupos en términos de acción en el hospedero: a) comensales, b) patotipos intestinales y c) patógenos extraintestinales. En estudios de análisis de isoenzimas (MLEE- *Multilocus Enzyme Electrophoresis*) en la colección de referencia de *E. coli* (ECOR- *E. coli reference collection*) se han categorizado a las cepas de *E. coli* en 4 grupos filogenéticos principales: A, B1, B2, y D. Las cepas comensales están incluidas en los grupos filogenéticos A y B1, las cepas patógenas extra intestinales en el grupo B2 y D, los patotipos intestinales están presentes en cualquiera de los filogrupos (92).

También existe un filogrupo denominado E en el cual el patotipo O157:H7 es representante. Científicos han recocido la existencia de filogrupos conocidos como C y F, las cuales están relacionadas con el filogrupo B1 y los filogrupos B2 y D respectivamente (93). En humanos los filogrupos más comunes son A y B2, los menos comunes B1 y D, mientras que en animales B1 es el más frecuente seguidos de A, B2 y D (94).

Se han desarrollado técnicas para constituir las relaciones filogenéticas de esta bacteria. Existe un protocolo de PCR triple para permitir la clasificación de las cepas de *E. coli* en los cuatro grupos filogenéticos mayores A, B1, B2 o D. Esta técnica se fundamenta en la presencia o ausencia de los genes *chuA* (presente en las cepas de los filogrupos B2 y D, ausente en B1 y A) junto con *yjaA* (presente en

el grupo B2, ausente en grupo D) y el fragmento de ADN TSPE4.C2 (presente en grupo B1, y ausente en grupo A) (95).

Recientemente (2013) la misma técnica de Clermont para ubicar cepas de *E. coli* en los cuatro grupos filogenéticos mayores tuvo una modificación y ahora permite ubicarlos en siete grupos (A, B1, B2, C, D, E, F) pertenecientes a *E. coli sensu stricto* y a un octavo clado críptico llamado I. Este método adiciona un gen aparte de los genes : *chuA*, gen requerido para transporte de hierro en *E. coli* O157:H7 (96); *yjaA*, gen inicialmente identificado en la secuencia completa del genoma de *E. coli* K-12 cuya función es desconocida (95); TspE4.C2, es un fragmento de ADN que posteriormente se caracterizó como un gen esterasa lipasa (97); que es el gen *arpA*, que permite que las cepas pertenecientes al filogrupo F se diferencien de las pertenecientes al grupo D. El gen *arpA* está presente en todas las cepas de *E. coli* con excepción de las pertenecientes al filo grupos B2 y F.

Propio de su investigación, se obtuvo que el 99 % de las cepas que estudiaron, pertenecían a los mismos filogrupos determinados por otras técnicas de referencia como electroforesis de enzimas multilocus (MLEE) o ribotipificación. En consecuencia, construyeron un árbol de decisión dicotómico (**Figura 7**) con los tres marcadores genéticos para determinar el grupo filogenético por medio de una PCR múltiple. Los patrones para otorgar las cepas del estudio dentro de los diferentes grupos filogenéticos son: filogrupo A (*chuA*(-) / TspE4C2(-)); filogrupo B1 (*chuA*(-) / TspE4C2(+)); filogrupo B2 (*chuA*(+) / *yjaA*(+)) y el filogrupo D (*chuA*(+) / *yjaA*(-)).

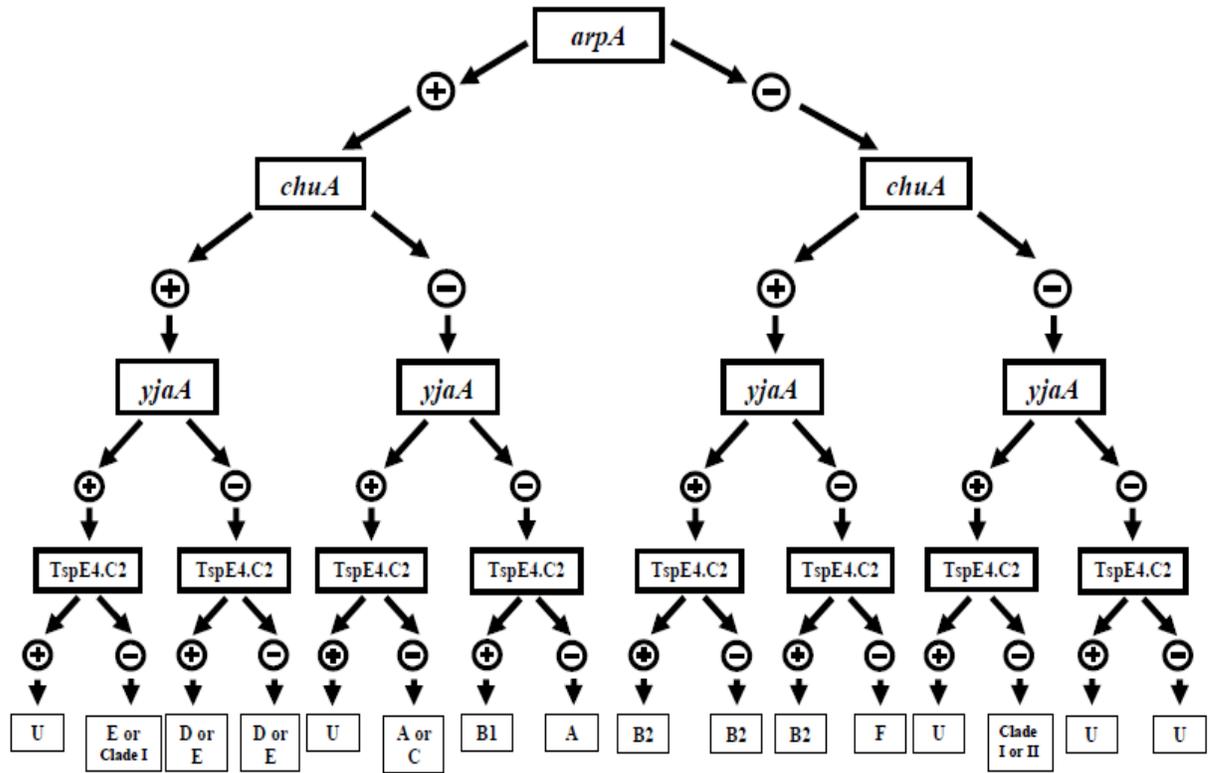


Figura 7. Árbol de decisión dicotómico para la determinación de grupos filogenéticos de *E. coli* Tomado de Clermont 2013 (97).

## **2. JUSTIFICACIÓN**

En México los padecimientos intestinales son un problema importante de salud, sobre todo en infantes y lactantes. En proporción con su incidencia son escasos los estudios epidemiológicos que nos proveen información sobre la distribución tanto de STEC O157 como la no-O157 y de EPEC como causales de sucesos diarreicos en dicha población.

Las enfermedades gastrointestinales son responsables de 1,700 millones de casos de los cuales 760,000 terminan siendo mortales en niños menos de 5 años. *E. coli* patógena se ha posicionado como uno de los patógenos principales causantes de diarrea infecciosa solo después del rotavirus. Además de ser uno de los agentes etiológicos causantes de la denominada diarrea del viajero.

La comprensión de la patogénesis de STEC como de EPEC es primordial para la optimización, desarrollo y prevención de las infecciones por esta bacteria. Es por lo que, en este trabajo se estudia la caracterización fenotípica y genotípica de cepas de *E. coli* aislada en niños menores de cinco años de diferentes zonas geográficas, para identificar primeramente sí dichas cepas son STEC o EPEC, así como su clasificación en subtipos típicas o atípicas y mediante métodos serológicos conocer su identidad antigénica.

### **2.1 Hipótesis**

Conocer si las cepas de *E. coli* aisladas de niños menores de 5 años y ganado lechero presentan genes correspondientes a los patotipos STEC O157 y no-O157 y EPEC y su clasificación en típicas y atípicas. Así como sus patrones de resistencia a los antimicrobianos.

## **2.2 Objetivos**

### **2.2.1 Objetivos generales**

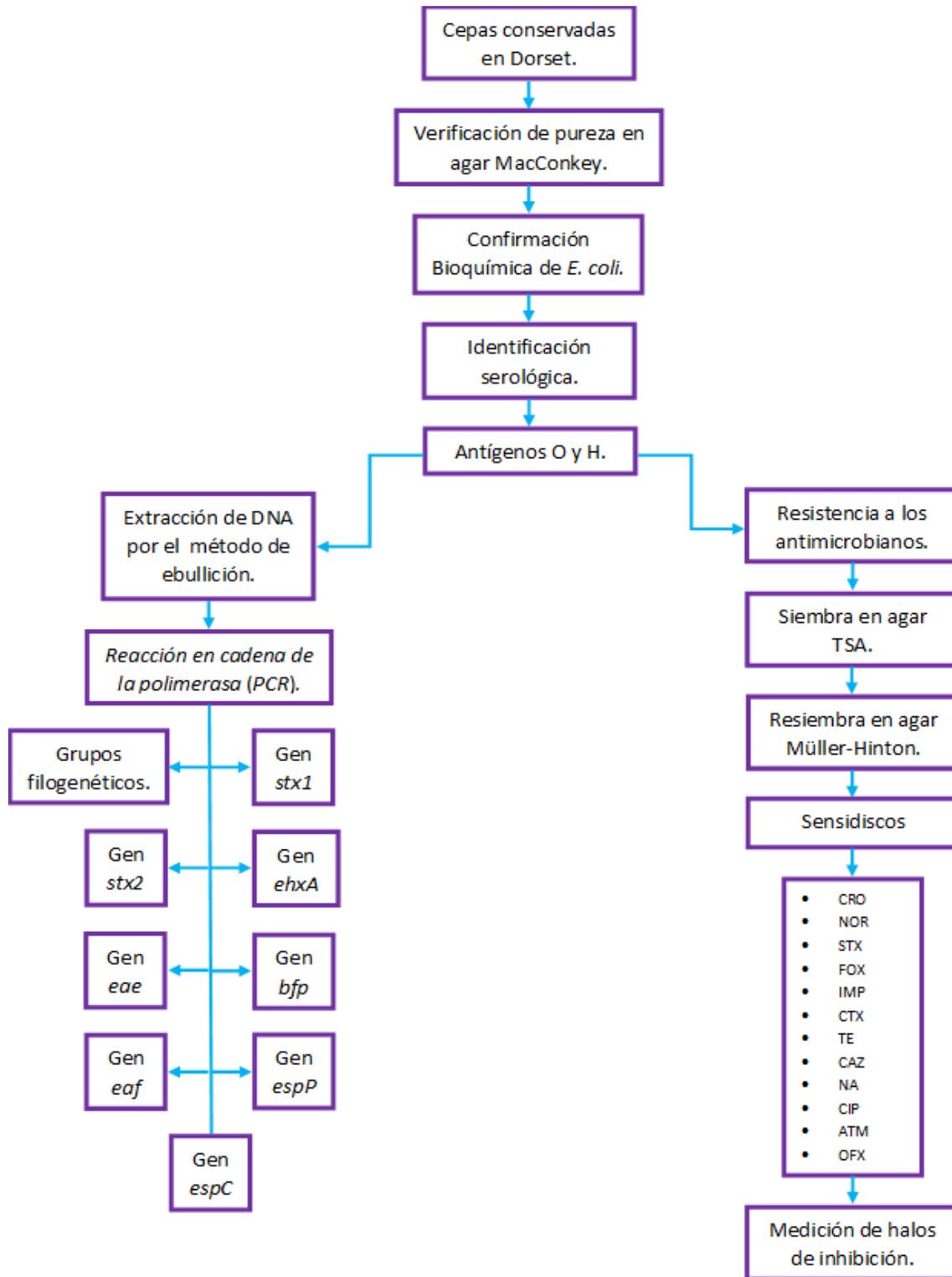
Mediante el uso de las propiedades fenotípicas y genotípicas caracterizar cepas de *E. coli* productora de la toxina de Shiga (STEC) y cepas de *E. coli* enteropatógena (EPEC) típicas y atípicas.

### **2.2.2 Objetivos específicos**

- Por medio de un esquema de sueros contra los antígenos somático y flagelar, determinar los serotipos de las cepas en estudio (O:H)
- Mediante la reacción con la polimerasa (PCR) e iniciadores específicos determinar si las cepas de *E. coli* presentan los genes *stx1*, *stx2*, *eae*, *ehxA*, *bfp*, *eaf*, *espC* y *espP* relacionados con la capacidad de virulencia de las cepas STEC y EPEC.
- Realizar una PCR múltiple con iniciadores específicos para identificar los genes *arpA*, *chuA*, *yjaA* y TspE4C2 para establecer el grupo filogenético al cual pertenecen las cepas.
- Determinación de los patrones de resistencia a los  $\beta$ -lactámicos de amplio espectro y fluroquinolonas, mediante el método de difusión en agar (Kirby-Bauer).

### 3. MATERIAL Y MÉTODOS

#### 3.1 Flujograma de Trabajo



### **3.2 Origen de las cepas bacterianas**

En este estudio se incluyeron cepas de *E. coli* obtenidas de estudios epidemiológicos de diferentes áreas geográficas en los que se incluyeron México, Tailandia, Egipto, Argentina, Perú y como controles de las pruebas se usaron cepas de referencia.

### **3.3 Confirmación bioquímica**

Para confirmar la pureza de las cepas, éstas se inocularon en agar MacConkey, se incubaron a 37°C durante 18-24h. Posteriormente se realizó la identificación bioquímica con pruebas preparadas en el laboratorio que incluyeron agar Kligler, Rojo de metilo-Voges Proskaguer (RM-VP), urea, sulfhídrico-indol-movilidad (SIM), caldo malonato, ácido glucónico y sorbitol (98).

### **3.4 Preparación de antígenos somáticos (O) y flagelares (H)**

La identificación de los antígenos somáticos (O) y flagelares (H) de las cepas de *E. coli* se realizó utilizando el método previamente descrito por Orskov, que incluyó la obtención de antígenos de la bacteria (19).

#### **3.4.1 Preparación de antígeno somático (O)**

Las cepas se resembraron en medio de agar soya tripticaseína (TSA) para utilizarla como copia de trabajo. Para realizar la identificación del antígeno somático las cepas se resembraron en agar TSA, se incubaron a 37 °C durante 18-24h. Una vez que en el agar TSA hubo crecimiento bacteriano se le agrego solución salina al 0.85% (NaCl 0.15 M) hasta cubrir el pico de flauta. El sobrenadante se colocó en otros tubos de ensaye de 16x150 mm y se llevó a la autoclave a 100°C con vapor fluente durante 1h. Posteriormente se le agregó

formalina (solución de NaCl 0.15 M con 0.6 % de formaldehído) y se conservaron a temperatura ambiente hasta su uso.

#### **3.4.2 Identificación de antígeno (O)**

Para este propósito, en tres microplacas serológicas de 96 pozos y fondo en U se distribuyeron 50  $\mu$ L de cada uno de los 187 sueros obtenidos en conejo (SERUNAM) anti-O del esquema antigénico de *E. coli* diluidos 1:100; en el esquema se incluyeron sueros anti-O1 hasta el anti-O187. Adicionalmente se incluyeron 50 sueros, también obtenidos en conejo, contra los antígenos de *Shigella* (15 de *S. dysenteriae*, 13 de *S. flexneri*, 20 de *S. boydii* y 2 de *S. sonnei*). Posteriormente las microplacas con las suspensiones suero/antígeno se incubaron a 50°C durante 18-24 h, al finalizar la incubación se registraron las reacciones de aglutinación.

#### **3.4.3 Preparación de antígeno flagelar (H)**

Las cepas de *E. coli* se inocularon en tubos de Craigie's con medio semisólido y se incubaron a 30 °C de 1 a 14 días. Cuando en el medio semisólido hubo crecimiento bacteriano se procedió a inocular en el caldo biotriptasa y se incubaron a 30 °C durante 18-24h. Posteriormente se le agregó formalina y se dejaron reposar 1h.

#### **3.4.4 Identificación antígeno (H)**

En una microplaca serológicas de 96 pozos con fondo en U se distribuyeron 50  $\mu$ L de cada uno de los 56 sueros obtenidos en conejo (SERUNAM) contra el antígeno H de *E. coli* y se incubaron a 50°C durante 2h. Al final de la incubación se registraron las reacciones de aglutinación.

### **3.5 Obtención de ADN por el método de ebullición**

El DNA de las cepas de *E. coli* se obtuvo por el método de ebullición previamente descrito por Islam *et al.*, (99). Los cultivos de *E. coli* fueron inoculados en 2 mL de caldo Luria-Bertani y se incubaron a 37 °C durante 18-24 h, posteriormente se tomó 1 mL del crecimiento bacteriano y fue colocado en un microtubo el cual se centrifugó a 13000 rpm durante 5 min. Después de la centrifugación, el sobrenadante se decantó, se les quito el exceso de agua con papel secante. Consecutivamente, a los tubos se les adicionó 200 µL de agua ultra pura y por agitación con vortex el pellet se resuspendió. Los tubos se sometieron a ebullición durante 10 min, fueron colocados rápidamente en hielo por 5 min, la suspensión anterior se homogenizó con vortex, se centrifugó a 13000 rpm durante 10 min y por último se tomaron 100 µL del sobrenadante y fueron congelados a -20 °C hasta su uso.

Para observar la integridad del DNA que se obtuvo, se mezclaron 2.5 µL de azul de bromofenol con 8 µL del sobrenadante que contenía el DNA, la suspensión anterior se distribuyó en pozos de un gel de agarosa al 1.0 % dentro de una cámara para electroforesis (BIO•RAD) con buffer de Tris Borato etilendiamino-tetra acético (TBE) 0.5X y se aplicó corriente de 100 V. Finalmente, el gel se tiñó con el colorante Red-Gel (Biotium) y al término del tiempo el DNA fue visualizado con un programa digitalizador de imágenes Biosens SC805 Gel Imagine Systems y se tomó una fotografía.

### **3.6 Determinación de grupos filogenéticos y genes de virulencia**

Mediante el ensayo de la reacción de la polimerasa (PCR) se determinaron los genes de virulencia y grupos filogenéticos. Se utilizaron condiciones e iniciadores previamente reportados por diferentes autores (**Cuadro 3**), en el primer renglón se encuentran los iniciadores delanteros y en el segundo los iniciadores reversos.

En el caso específico de los grupos filogenéticos se utilizó la combinación de genes (*arpA*, *chuA*, *yjaA* y TspE4.C2) para establecer los grupos filogenéticos A, B1, B2, D y F de las cepas de *E. coli* (97).

**Cuadro 3. Secuencia de nucleótidos de los iniciadores.**

<b>Genes</b>	<b>Secuencia de iniciadores 5' a 3'</b>	<b>Peso del amplicón (pb)</b>	<b>Referencia</b>	
<i>chuA</i>	ATGGTACCGGACGAACCAAC	288	Clermont O, 2013 (97).	
	TGCCGCCCAGTACCAAAGACA			
<i>yjaA</i>	CAAACGTGAAGTGTGTCAGGAG	211		
	ATTGCGTTCCTCAACCTGTG			
TspE4.C2	CACTATTCGTAAGGTCATCC	152		
	AGTTTATCGCTGCGGGTTCGC			
<i>arpA</i>	AACGCTATTCGCCAGCTTGC	400		
	TCTCCCCATACCGTACGCTA			
<i>arpA</i>	AGTTTTATGCCAGTGCAGG	219		
	TCTGCGCCGGTACGCCC			
<i>trpA</i>	CGGCGATAAAGACATCTTCAC	489		
	GCAACGCGGCCTGGCGGAAG			
<i>stx1</i>	GTACGGGGATGCAGATAAATCGC	209		Scheutz F, 2012 (100).
	AGCAGTCATTACATAAGAACYCCACT			
<i>stx2</i>	GGCACTGTCTGAACTGCTCCTGT	627		
	ATTAACTGCCACTTCAGCAAATCC			
	CGCTGTCTGAGGCATCTCCGCT			
<i>ehxA</i>	TAACTTCACCTGGGAAAGCC	625		
	CTCATAGGGGCCCGATAAGC			
	TTCTCCTGGGGTAAATGTTGGTGT			
<i>eae</i>	AGTTTTCTGTTGCTGTATGCC	864		
	CCCGAATTCGGCACGAGCATAAGC			
<i>bfp</i>	CCCGGATCCGTCTGCCAGTATTC	326		
	AATGGTGCTTGCCTTGCTGC			
<i>eaf</i>	GCCGCTTTATCCAACCTGGTA	397		
	CAGGGTAAAAGAAAGATGATAA			
<i>espC</i>	TATGGGGACCATGTATTATCA	301		
	TAGTGCAAGTGCAGAAAGCAGTT			
<i>espP</i>	AGTTTTCTGTTGCTGTATGCC	547		
	GTCCATGCAGGGACATGCCA			
	TCACATCAGCACCGTTCTCTAT			

### 3.7 Condiciones de la PCR

Para la identificación de cada uno de los genes, la PCR se llevó a cabo en microtubos de 200  $\mu$ L, en este tubo se preparó una suspensión que consistía de agua ultra pura, buffer, dNTP's, iniciadores, Taq-polimerasa y DNA (**Cuadro 4**). En cada ensayo se utilizó como control positivo una cepa de *E. coli* de referencia, además se colocó un blanco el cual contenía todos los reactivos excepto DNA.

**Cuadro 4. Composición de la mezcla de reactivos utilizados para cada una de la reacción de PCR.**

Reactivo (Invitrogen)	Genes								
	<i>arpA</i> , <i>chuA</i> , <i>yjaA</i> y TspE4.C2	Grupos A o C	<i>stx1</i>	<i>stx2</i>	<i>ehxA</i>	<i>eae</i>	<i>bfp</i>	<i>eaf</i>	<i>espP</i> / <i>espC</i>
	(μL)								
Agua ultra pura	6,00	8,7	10,47	7,92	10,02	10,11	10,41	10,71	9,33
Buffer	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
MgCl <sub>2</sub>	0,45	0,45	0,45	0,9	0,9	0,9	0,9	0,9	0,45
dNTP's	1,5	1,2	0,6	1,5	0,6	0,6	0,3	0,6	0,6
Iniciadores	4,35	2,4	1,2	2,4	1,2	1,2	1,2	0,6	2,4
Taq	0,6	0,15	0,18	0,18	0,18	0,09	0,09	0,09	0,12
DNA muestra	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6
<b>TOTAL</b>	15,00	15,00	15,00	15,00	15,00	15,00	15,00	15,00	15,00

### 3.7.1 Condiciones de la PCR en el termociclador

Una vez preparada la mezcla de reacción, los microtubos se colocaron en un termociclador (Multigene Optimax) y para cada uno de los genes se establecieron las condiciones de los ciclos de extensión, alineamiento y elongación de la reacción de PCR (Cuadro 5).

**Cuadro 5. Condiciones PCR para la amplificación de cada uno de los genes.**

Fase	Grupo filogenético	Grupo A o C	Genes						
			<i>stx1</i>	<i>stx2</i>	<i>ehxA</i>	<i>eae</i>	<i>Bfp</i>	<i>eaf</i>	<i>espC/espP</i>
T(°C) / t(min)									
<b>Desnaturalización inicial</b>	94 / 4	94 / 4	95 / 5	96 / 5	94 / 3	94 / 5	95/5	95/5	95/5
<b>Extensión</b>	94 / 0,08	94 / 0,08	94 / 0,50	95 / 0,50	94 / 0,45	94 / 0,30	72/2	96/0,40	95/1
<b>Alineamiento</b>	58 / 0,20	58 / 0,20	56 / 0,40	57 / 0,40	57 / 0,30	55 / 1	96/0,30	57/1	59/1
<b>Elongación</b>	72 / 0,40	72 / 0,40	72 / 1	73 / 1	72 / 1,5	72 / 2	56/1	72/0,45	72/1,5
<b>Extensión final</b>	72 / 5	72 / 5	72 / 5	73 / 5	72 / 10	72 / 5	72/8	72/10	72/10
<b>% Agarosa</b>	1,8	1,5	1,5	1,6	1,0	1,0	1,5	1,2	1,2

### 3.7.2 Electroforesis en geles de agarosa

Al final de la PCR se tomaron 8 µL de los amplicones obtenidos, se mezclaron con 2.5µL de azul de bromofenol y fueron distribuidos en los pozos de un gel de agarosa al 1.5%. El gel fue colocado en una cámara de electroforesis (BIO•RAD) con solución amortiguadora TBE 0.5X y se aplicó corriente de 100 V, en cada uno de los geles además de los amplicones se colocó un marcador de peso molecular y un blanco, que consistió en colocar todos los reactivos para la reacción de la

PCR con excepción del DNA. El gel se tiñó con colorante Red-Gel y al finalizar se tomó una fotografía con el programa digitalizador de imágenes Biosens SC805 Gel Imagine Systems, visualizando el producto amplificado con un transiluminador de UV.

### ***3.8 Resistencia a los antimicrobianos por el método de difusión en agar (Kirby-Bauer)***

De acuerdo a la recomendación del National Committee for Clinical Laboratory Standards 2010 (104), se utilizó el método de difusión en agar (Kirby-Bauer) utilizando sensidiscos (BD) y se empleó el medio de agar Müeller Hinton (M-H). Cada placa de M-H se preparó con 20 mL del agar fundido y enfriado a 50-55°C, para obtener una capa de 4 mm de espesor. El antibiograma se realizó a partir de colonias bien aisladas. El inóculo se realizó preparando una suspensión de las colonias, hasta obtener una turbidez correspondiente al tubo 0.5 del Nefelómetro de McFarland (Cl<sub>2</sub>Ba 0,5 %).

#### **3.8.1 Día 1**

Los sensidiscos se colocaron a temperatura ambiente antes de usarlos. Se utilizaron los sensidiscos de los siguientes antimicrobianos: 30 µg ceftriaxona (CRO), 10 µg norfloxacin (NOR), 1.25 µg trimetoprim 23.75 µg sulfametoxazol (SXT), 30µg cefoxitina (FOX), 10 µg imipenem (IMP), 30 µg cefotaxima (CTX), 30 µg ceftazidina (CAZ), 30 µg ácido nalidíxico (NA), 5 µg ciprofloxacina (CIP), 30 µg aztreonam (ATM), 5 µg ofloxacina (OFX), 30 µg cefepima (FEP) y 30 µg tetraciclina (TE). Se preparó la suspensión bacteriana que se usó como inóculo en el antibiograma. Con asa bacteriológica se tomó un inóculo del cultivo y se resuspendió en 2 ml de Solución Fisiológica (NaCl 8.5 %) hasta obtener una

turbidez correspondiente tubo 0.5 (Cl<sub>2</sub>Ba 0.5 %) de la escala de McFarland. Con hisopo estéril previamente embebido con el inóculo y escurrido en las paredes del tubo, se estriaron las placas de MH en tres direcciones. Las placas de agar M-H estriadas se dejaron estabilizar a temperatura ambiente, sobre la placa con pinzas se colocaron los sensidiscos con antibiótico. En cada una de las placas se colocaron 6 sensidiscos como máximo y se incubó a 37°C durante 18-24 h.

### **3.8.2 Día 2**

Se efectuó la lectura, para medir el diámetro del halo de inhibición alrededor de cada disco se utilizó un vernier.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Origen de las cepas bacterianas

Se analizaron 72 cepas aisladas de casos de diarrea infantil en niños menores de 5 años de 5 zonas geográficas que fueron Argentina, Egipto, Perú, Tailandia y México (**Cuadro 6**). De 72 casos, 2 (2.8%) fueron de Argentina y del mismo número para Egipto, 3 (4.2%) para Tailandia, 5 (6.9%) de Perú, en el caso de México 56 (77.8%)

**Cuadro 6. *E. coli* aislada de casos de diarrea infantil en 5 áreas geográficas.**

PAÍS	N (%)
ARGENTINA	2 (2.8)
EGIPTO	2 (2.8)
PERÚ	5 (6.9)
TAILANDIA	3 (4.2)
MÉXICO	56 (77.8)
REFERENCIA	4 (5.6)
TOTAL	72 (100)

Asimismo, para comparación entre casos humanos y animales se incluyeron 19 cepas aisladas de bovinos con episodio de diarrea del Estado de México 16 (84.2%) y 3 (15.8) del estado de Jalisco.

### 4.2 Confirmación bioquímica

Con base en los resultados obtenidos de las pruebas bioquímicas se determinó que las cepas del estudio eran *E. coli*. El perfil bioquímico consistió en la fermentación glucosa y lactosa con producción variable de gas. Las pruebas de utilización de Gluconato y Malonato, además en la producción de ureasa fueron negativas. La reacción de Voges-Prokauer y deaminación de la fenilalanina fueron

negativas. Las pruebas de producción de indol y ácido de la fermentación de la glucosa (rojo de metilo) fueron positivas.

#### **4.3 Tipificación serológica**

La tipificación serológica de las cepas de *E. coli* provenientes de niños permitió identificar 20 serotipos. El análisis de los serogrupos de las cepas de las cinco áreas del estudio mostró que estos fueron reportados inicialmente como STEC. Los serotipos más frecuentes de STEC en humanos fueron: O26:H11 (16.6%) con 12 cepas, O111ab: NM (13.9%) con 10 cepas, OR: NM y O157: NM (11.1%) con 8 cepas cada uno, O26: NM (8.3%) con 6 cepas, O103: NM y O103:H7 (5.5%) con 4 cepas cada uno. Los 11 serotipos restantes solo se presentaron 1-3 veces y representaron el 28% (**Cuadro 7**).

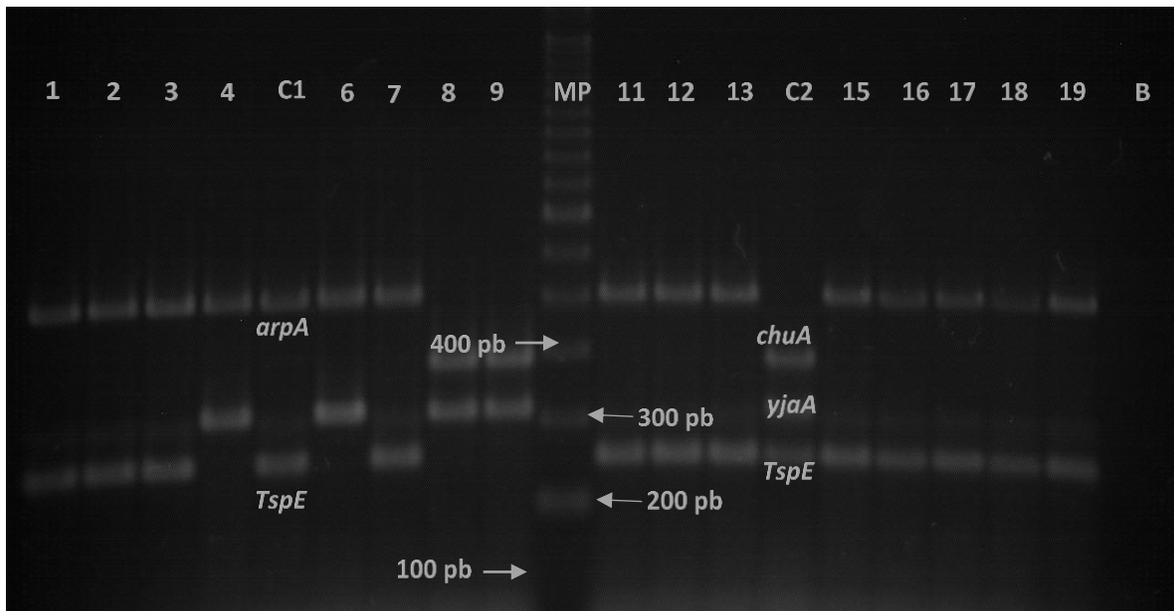
**Cuadro 7. Serotipos de *E. coli* aislada de casos de diarrea infantil en México y otros países.**

Origen	Serotipos	N (%)	Origen	O:H	N (%)
	O:H				
MÉXICO	OR:NM	8 (11.1)	ARGENTINA	O26:NM	1 (1.4)
	OR:H11	1 (1.4)		O26:H11	1 (1.4)
	O26:NM	3 (4.2)	EGIPTO	OR:NM	1 (1.4)
	O26:H11	3 (4.2)		O187:NM	1 (1.4)
	O103:NM	4 (5.5)	PERÚ	O26:NM	2 (2.7)
	O103:H2	1 (1.4)		O26:H11	3 (4.2)
	O103:H7	4 (5.5)	TAILANDIA	O26:H11	2 (2.7)
	O111ab:NM	10 (13.9)		O184:H7	1 (1.4)
	O111ab:H12	1 (1.4)	REFERENCIA	O26:H11	3 (4.2)
	O111:NM	3 (4.2)		OR:NM	1 (1.4)
	O126:H5	2 (2.7)	TOTAL		72 (100)
	O157:NM	8 (11.1)			
	O172:H27	1 (1.4)			
	O174:H2	1 (1.4)			
	O184:NM	2 (2.7)			
	O184:H2	1 (1.4)			
	O184:H7	1 (1.4)			
	O184:H11	1 (1.4)			
O184:H32	1 (1.4)				

#### **4.4 Grupos filogenéticos**

Para establecer los grupos filogenéticos de las cepas de *E. coli* se utilizó el esquema de Clermont [2013] de acuerdo, a la ausencia o presencia de los genes *arpA*, *chuA*, *yjaA* y al fragmento TspE4.C2, mediante una PCR cuádruplex (**Figura**

8). La distribución de los grupos filogenético fue la siguiente, de las cepas de México 31 (55.4%) se ubicaron en el grupo B1, 18 (32.1%) cepas en A, 4 (7.1%) B2 y una (1.8%) para F, respectivamente. Los grupos filogenéticos determinados en las cepas del extranjero 14 (87.5%) fueron del grupo B1 y 2 (12.5%) del grupo B2 (**Cuadro 8**).



**Figura 8. Electroforesis en gel de agarosa al 1.8 % de los amplicones de *arpA* (400 pb), *chuA* (288 pb), *yjaA* (211 pb) y *TspE* (152 pb).** Carriles 1-4, cepas 92433, 3389, 115535, 115615; carriles 7-9, cepas 46156, 89856, 89857; carriles 11-13, cepas 89858, 89859, 95101, 95117; carriles 15-19 cepas 47148, 107728, 107730, 47767, 47993; Carril 5 control positivo para *arpA* y *TspE* (C1) y carril 14, positivo *chuA*, *yjaA* y *TspE* (C2) y finalmente carril 20 blanco.

**Cuadro 8. Distribución de grupos filogenéticos en cepas de *E. coli* aisladas de casos de diarrea en México y otros países.**

Origen	N (%)	Genes				
		Filogrupo	<i>arpA</i>	<i>chuA</i>	<i>yjaA</i>	TspE
<b>MÉXICO</b>	<b>56 (77.8)</b>	A	18		18	
		B1	31			31
		B2		4	4	
		A o C	1		1	
		D o E	1		1	1
		F		1		
<b>ARGENTINA</b>	<b>2 (2.8)</b>	B1	2			2
<b>EGIPTO</b>	<b>2 (2.8)</b>	B1	2			2
<b>PERÚ</b>	<b>5 (6.9)</b>	B1	3			3
		B2		2	2	
<b>TAILANDIA</b>	<b>3 (4.2)</b>	B1	3			3
<b>REFERENCIA</b>	<b>4 (5.6)</b>	B1	4			4
<b>TOTAL N (%)</b>	<b>72 (100)</b>		<b>65 (90.3)</b>	<b>7 (9.7)</b>	<b>26 (36.1)</b>	<b>46 (63.8)</b>

En el **Cuadro 9** tenemos representados los grupos filogenéticos, como se puede observar el grupo B1 es el que tiene mayor representación con un total de 45 cepas que representan el 62.5% seguido del filogrupo A que representa el 25%. Teniendo una minoría en los filogrupos B2, C, D y F teniendo solamente el 12.5% esto es un cuarto de la totalidad de la cepas estudiadas.

**Cuadro 9. Grupos filogenéticos determinados en las cepas de estudios.**

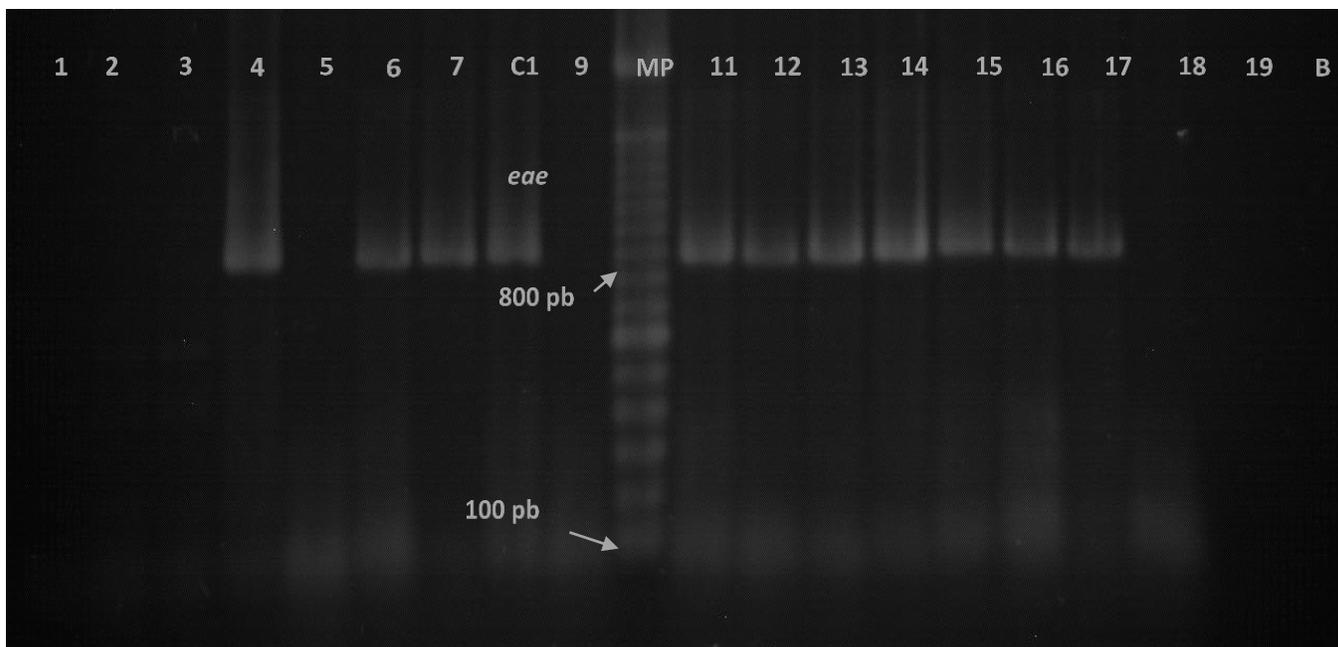
	Grupos filogenéticos					
	A	B1	C	B2	D	F
	18	31	1	4	1	1
		2				
		2				
		3		2		
		3				
		4				
Total	<b>18 (25)</b>	<b>45 (62.5)</b>	<b>1 (1.4)</b>	<b>6 (8.3)</b>	<b>1(1.4)</b>	<b>1(1.4)</b>

#### **4.5 Genes de virulencia**

El análisis de la presencia de genes en las 56 cepas de México mostró lo siguiente: genes *eae*, 27 (48.2%); *ehxA*, 11 (17.8%); *bfp*, 9 (16.1%); *eaf*, 3 (5.4%) y *espP* 3 (5.4%). Haciendo mención que en este grupo de cepas no se detectó la presencia de los genes *stx1*, *stx2*, *espC* (**Cuadro 10**). Por lo que, aunque, los serogrupos determinados pertenecen a cepas del patotipo STEC, los genes identificados indican que pudieran ser del patotipo de *E. coli* enteropatógena (EPEC). En la **Figura 9** se muestra los amplicones de cepas positivas para el gen *eae*.

**Cuadro 10. Caracterización genotípica de *E. coli* aislada de casos de diarrea infantil en México**

Origen	Patotipo	Serotipo	N	Genes				
				<i>ehxA</i>	<i>eae</i>	<i>Bfp</i>	<i>eaf</i>	<i>espP</i>
MÉXICO	EPEC-a	OR:NM	7	2	3			
		OR:H11	1		1			1
		O26:NM	3		1			
		O103:NM	4	1	2			
		O103:H7	4		2			
		O111ab:NM	2		2			
		O111:NM	3	1	2		1	
		O157:NM	8		5			
	EPEC-t	OR:NM	1		1	1	1	1
		O111ab:NM	8	4	8	8	8	
	Sin Patotipo	O26:H11	3	2				
		O111ab:H2	1					
		O103:H2	1					
		O126:H5	2					1
		O172:H27	1					
		O174:H2	1					
		O184:NM	2	1				
		O184:H2	1					
		O184:H7	1					
		O184:H11	1					
O184:H32	1							
TOTAL			56 (100)	11(19,6)	27(48,2)	9(16,1)	10(5,4)	2(1,1)



**Figura 3. Electroforesis en gel de agarosa al 1.0 % de los amplicones del gen *eae* de *E. coli*.** Carril 4, 6 y 7, cepas 110052, 106604/1; carriles 11-17, cepas 42659, 42984, 47787, 68887, 69900, 29358, 48067. Carril 8 control positivo del grupo C1, *eae* (863 pb); carril 10 marcador de peso y carril 20 blanco.

Por lo que respecta a las cepas del extranjero 4 (25%) cepas fueron positivas para *ehxA*, 3(18.7%) cepas *eae* y 2 (12.5%) cepas *espP*, y negativas para los genes *stx1*, *stx2*, *bfp*, *eaf*, *espC* (**Cuadro 11**). Las cepas provenientes de Argentina no mostraron factores de virulencia, las de Egipto y Tailandia fueron *eae* negativas al igual que lo fueron las cepas de Perú.

**Cuadro 11. Caracterización genotípica de *E. coli* aislada de casos de diarrea infantil en otros países.**

Origen	Serotipo (O:H)	N	Genes			Patotipo
			<i>ehxA</i>	<i>eae</i>	<i>espP</i>	
EGIPTO	OR: NM	1			1	
	O187:NM	1	1			
PERÚ	O26:H11	3	1	1		EPEC-a
TAILANDIA	O26:H11	2	1		1	
REFERENCIA	O26:H11	3	1	2		EPEC-a
<b>TOTAL N (%)</b>		<b>10 (62.5)</b>	<b>4 (25)</b>	<b>3 (18.7)</b>	<b>2 (12.5)</b>	

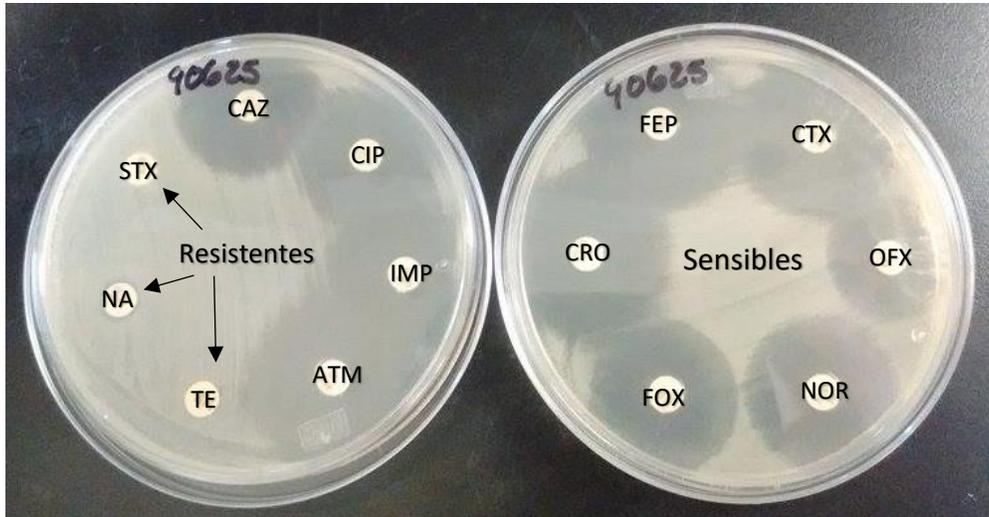
#### **4.6 Determinación del subtipo EPEC**

Para determinar el subtipo EPEC-t de las cepas de México se tomó en cuenta la presencia de los genes *eae*, *eaf* y *bfp*, presentándose solo 1 (1.8%) cepas del serotipo O111ab: NM con filogrupo D o E. Mientras que para el subtipo EPEC-a se consideró la presencia del gen *eae* con ausencia de los genes *eaf* y *bfp*, así como la presencia de otro gen de virulencia, el análisis mostró que 27 (48.2%) cepas EPEC-a, donde el serotipo O111ab:NM fue el más frecuente y perteneciente al filogrupo B1 con 9 (16.1%) cepas, seguida del OR: NM con 4 (7.1%) cepas con filogrupo A.

#### **4.7 Patrones de resistencia**

En 30 (41.7%) de las cepas de *E. coli* se observó resistencia a los siguientes antimicrobianos FOX, TE, NA y SXT (**Figura 10**). Las cepas de México presentaron resistencia a TE 24 (56) los serotipos con mayor frecuencia fueron: 4 (8%) OR: NM, 4 (4%) O103: NM y 5 (8%) O157: NM.

En las cepas provenientes del extranjero, una de dos cepas de Egipto O187:NM presentó resistencia a FOX y TE; de Perú 2 cepas del serotipos O26: NM fueron resistentes a FOX y SXT y las cepas de referencia 3 (4%) del serotipos O26: NM fueron resistentes a FOX (**Cuadro 12**).



**Figura 4. Halos de inhibición y de resistencia a SXT, NA y TE.** Lado derecho se muestran los halos de inhibición del crecimiento bacteriano, esta cepa (90625) fue sensible los 6 antibióticos estudiados, del lado izquierdo se observan 4 halos de inhibición y 3 halos de resistencia a SXT, NA y TE.

**Cuadro 12. Relación entre el serotipo y la resistencia a los antibióticos en cepas de *E. coli* aislada de diarrea infantil en México y en otros países**

ORIGEN	SEROTIPO (O:H)	Número de cepas	TIPO DE ANTIMICOBIANO			
			$\beta$ - LACTAMICO FOX	TETRACICLINA TE	QUINOLONA NA	SULFAMIDA SXT
MÉXICO	OR:NM	8	1	4		1
	OR:H11	1	1	1		
	O26:H11	3	1	1		
	O103:NM	4		4	4	
	O103:H2	1		1	1	1
	O111ab:NM	10		2		
	O111ab:H12	1	1	1		
	O157:NM	8		5		1
	O184:H7	1		1		1
	O184:H11	1		1	1	
O184:H32	1		1		1	
EGIPTO	O187:NM	1	1	1		
PERÚ	O26:NM	2	2			2
	O26:H11	3		1	1	
REFERENCIA	O26:H11	4	3			
TOTAL N (%)		49 (100)	10 (20.4)	24 (48.9)	7 (14.3)	7 (14.3)

#### **4.8 Cepas de *E. coli* aislada de ganado lechero**

Para comparación se incluyeron 19 cepas de *E. coli* aisladas de bovinos del mismo serogrupo que de las cepas aisladas analizadas de los casos de los niños. De las 19 cepas, 16 (84.2%) eran de bovinos con episodio de diarrea del Estado de México y 3 (15.78) del estado de Jalisco (**Cuadro 13**). Los resultados de la tipificación serológica, mostró lo siguiente: en las 16 cepas del Estado de México se identificó el serotipo O111:NM 16 (100%), dichas cepas se clasificaron en el grupo filogenético B1, los genes de virulencia que estuvieron presentes en estas

cepas fueron *stx1* en 11 (68.8%) cepas, *eae* en 16 (100%) cepas y *ehxA* en 14 (87.4%) cepas. Por lo que, 11 (68.8%) de ésta cepas se clasificaron como STEC, y las cinco (31.2%) restantes como EPEC-a. Con respecto a 3 cepas O157:H7 presentaron los genes *stx1*, *eae* y *ehxA*, estos genes correspondieron al patotipo STEC.

**Cuadro 13. Serotipos de grupos filogenéticos, factores de virulencia y patrones de resistencia de cepas de *E. coli* aisladas de bovinos del Estado de México y Jalisco**

BOVINOS			GENES						Patotipo
ORIGEN	Serotipo	Cepas	FILOGRUPO	<i>stx1</i>	<i>stx2</i>	<i>eae</i>	<i>ehxA</i>	<i>EspP</i>	
EDO. DE MEX	O111:NM	16	B1	11		16	14		STEC
JALISCO	O157:H7	3	D		3	3	3	3	STEC
<b>TOTAL N (%)</b>		19		11 (57.9)	3 (15.8)	19 (100)	17 (89.5)	3 (15.8)	

**Resistencia a los antimicrobianos.** Nueve (56.3%) de 16 cepas de *E. coli* O111:NM del Estado de México fueron resistentes a TE.

## 5. DISCUSIÓN

Aunque se han hecho esfuerzos para disminuir la incidencia de las infecciones intestinales, la diarrea en la población menor a cinco años continúa siendo un problema importante de salud pública, anualmente en México se presentan alrededor de 1, 343,681 casos (105). En este estudio se abordó la caracterización fenotípica y genotípica de cepas de *E. coli* aislada en niños menores de cinco años de diferentes zonas geográficas y de diferentes años para establecer si dichas cepas eran STEC o EPEC y su clasificación, conociendo, además, su identidad antigénica mediante métodos serológicos. Desde los inicios en que se relacionó a *E. coli* con las enfermedades diarreicas, la tipificación serológica ha tenido un papel muy importante dentro del diagnóstico clínico relacionando serogrupos y serotipos característicos de grupos patógenos específicos de esta bacteria. Como parte de la identificación y caracterización de las cepas en estudio, se utilizó la serología logrando identificar serogrupos y serotipos característicos de STEC y EPEC. Para las zonas geográficas (México, Tailandia, Argentina, Perú, Egipto) se encontraron cepas de los serogrupos clásicos STEC definidos como no-O157 que incluyeron los serogrupos, O26, O45, O103, O111, O121, O145 (29). Sin embargo, el análisis e identificación de los genes de virulencia mostraron que las cepas de los niños los serotipos fueron clasificados como pertenecientes a los subtipos atípicos y típicos de EPEC.

En las cepas México, el serogrupo que se encontró con más frecuencia fue O157 en 8/40 cepas (20%), seguido por el serogrupo rugoso OR en 6/40 cepas (15 %). En contraste con las cepas de *E. coli* O157:H7, reportadas asociadas a CH y SUH, las cepas O157:NM de nuestro estudio fueron cepas no móviles, utilizaron el

sorbitol como fuentes de carbono, con la presencia del gen *eae*, además de este gen no se detectaron genes de *stx* u otros factores de virulencia. Sin embargo, en varios países europeos, este serotipo se ha reportado asociado CH y SUH, con la propiedad de presentar los genes de virulencia *eae* y *stx* (106). Interesantemente estas cepas O157:NM se clasificaron como EPEC-a, y no estuvieron asociadas CH o SUH.

De manera similar, en las cepas obtenidas de Argentina, Perú, Egipto y Tailandia, se encontraron serogrupos reportados como pertenecientes a serotipos STEC de los cuales el más prevalente fue el O26:H11 en 10/15 (67%). Las cepas de dicho serogrupo, generalmente se les identifica como STEC formando parte las cepas de los grandes seis (29), en contraste con lo mencionado anteriormente, las cepas del estudio se clasificaron como EPEC-a. Otro serogrupo, que cabe destacar es el O111, en un estudio previo en nuestro laboratorio cepas de este serogrupo se encontró que este tipo de cepas fueron clasificadas dentro de los subtipos EPEC-t y EPEC-a, observándose una coexistencia de ambos subtipos (107), lo cual tiene correspondencia con nuestros resultados.

Finalmente, 15 cepas del estudio no se ubicaron, dentro de los patotipos analizados, y estas fueron cepas en las que se identificaron 9 serotipos entre los que se incluyeron O26:H11, O111ab:H2, O126:H6, O172:H27, O174H2 y cuatro serotipos del serogrupo O184, al respecto de los serotipos O26:H11, O103:H2 y los serotipos del serogrupo O184 son clasificados como STEC (108), una posibilidad de no ubicar dichas cepas en los patotipos estudiados pudiera ser que pertenecen a otro patotipo o definitivamente que carecen de los genes de factores

de virulencia de *E. coli* diarreagénica. En México, son escasos los estudios que reportan el aislamiento de cepas STEC no-O157, uno de estos estudios es el realizado por Estrada-García [2005] (109) con el propósito de conocer la prevalencia *E. coli* diarreagénica en niños hospitalizados, en el estudio mencionado, se reportó que en 11 (18%) pacientes de 62 fueron aisladas cepas STEC no-O157, en el mismo estudio, en 13 (21%) pacientes se encontraron cepas del subtipo EPEC-a. Sin embargo, en ambos patotipos en el reporte no se presentaron datos de los serotipos de las cepas, por lo que una ventaja de nuestro estudio es que se determinaron las propiedades antigénicas (serotipos), lo cual permite conocer las variedades antigénicas que infectan a la población.

Por otra parte, la mayoría de las cepas analizadas se ubicaron en los grupos filogenéticos A, B1 y B2, con menor proporción los grupos C, D y F. En particular las cepas O157:NM se ubicaron principalmente en los grupos filogenéticos A y B2, en contraste con las cepas O157:H7 aisladas de los bovinos se ubicaron en el grupo D. En un estudio realizado por Gireardeau [2005] (110) en cepas STEC de diferentes fuentes, reportó que las cepas STEC no-O157:H7 fueron ubicadas en el grupo filogenético B1 y se caracterizaron por presentar el gen *eae*, en las cepas de nuestro estudio este fue el gen más frecuentemente identificado. Por otra parte, las cepas de grupos filogenéticos A y B1, diferentes autores los reportan como cepas comensales, no patógenas pero propias del intestino de los humanos y de otros mamíferos como los cerdos y animales herbívoros, entre ellos las cabras, carneros y bovinos (111). Con relación a los grupos B2 y D, son considerados como patógenos extraintestinales causantes de infecciones intestinales en los

humanos, aunque fueron escasas las cepas que se ubicaron en estos grupos. Al respecto del grupo B2, en este se ubicaron los serotipos O126:H5, O157:NM y O26:NM, los tres serotipos con 2 cepas cada uno. En relación al grupo D, en este se ubicaron las cepas O157:H7 de bovinos. En el caso particular de las cepas O157:H7, estas fueron obtenidas de hisopo rectal de vacas lecheras de un hato del estado de Jalisco.

Cabe destacar que las cepas STEC son clasificadas en los grupos filogenéticos A, B1 y D (110) lo que tiene correlación con nuestros resultados.

Con respecto, al análisis de los patrones de resistencia a los antimicrobianos, las cepas de México, Egipto y Perú mostraron resistencia a una cefalosporina (FOX), TE, NA y SXT; Los antimicrobianos con los que se registró mayor resistencia fue a TE (48.9%) y FOX (20.4%), precediéndole NA y SXT (14.3%), estos resultados tienen coincidencia con un estudio con cepas de *E. coli* aisladas de hisopo rectal de corderos sanos del Estado de México (112), en dicho estudio se reportó la resistencia más frecuente a TE y NA, pero sensibles a cefalosporinas. Así mismo en cepas de *E. coli* aisladas de muestras de aguas de los canales de Xochimilco, se reportó la resistencia más frecuente a TE y NA (113) y con menos frecuencia a gentamicina y ciprofloxacina. Aunque otros estudios con cepas de *E. coli* aisladas de niños menores de cinco años reportaron resistencia a TE y SXT (109). Por lo anterior, la resistencia a los antimicrobianos de las cepas del estudio con respecto a cepas de *E. coli* aislada de diferentes fuentes de otros estudios realizados en México tiene común resistencia a TE, NA y SXT, e inclusive tiene coincidencia con

un estudio realizado en nuestro laboratorio con cepas de serotipos del serogrupo de *E. coli* O111 de diferentes fuentes (107).

Un aspecto importante dentro de la clasificación de microorganismos patógenos es la agrupación en filogrupos mediante el cual se puede obtener información acerca de la procedencia de las cepas, así como información del tipo de cepas a las que pertenecen, comensales o patógenas. En primera instancia, se buscó clasificar las cepas de estudio dentro de los cuatro principales grupos filogenéticos descritos para *E. coli* y los relacionamos con los serotipos encontrados. En la literatura se hace referencia a que las cepas comensales, presentan menos factores de virulencia, de *E. coli* pertenecen en mayor medida a los filogrupos A y B1, en contraste, las cepas patógenas, contienen mayor número de factores de virulencia y se encuentran principalmente en los filogrupos B2 y D (114). Con el análisis de los resultados de la identificación de genes por la PCR se demostró, de una manera importante los resultados de la identificación antigénica de las cepas del estudio y la ubicación de las cepas analizadas en grupos patógenos: En este estudio se encontró que las cepas obtenidas de niños menores de cinco años se ubicaron en los subtipos EPEC-t y EPEC-a con diversidad de serotipos, en contraste las cepas STEC fueron aisladas principalmente de bovinos, hecho que refuerza la observación de que los bovinos son reservorios naturales de cepas STEC.

## 6. CONCLUSIONES

En este trabajo se logró caracterizar fenotípica y genotípicamente cepas aisladas de estudios de epidemiológicos de etiología de la diarrea en niños menores de 5 años, de cinco regiones geográficas distintas. En las cepas aisladas de niños México prevalecieron los subtipos EPEC-t y EPEC-a, en contraste las cepas obtenidas de bovinos fueron STEC. Por lo que, estos animales pudieran ser fuente importante de cepas STEC.

Los grupos filogenéticos determinados en las cepas se ubicaron principalmente en los grupos A y B1 con 52 cepas (88.1%) y B2 con 6 cepas (10.11%), considerados como componentes de la microbiota del intestino de los humanos y de animales. Las toxinas *stx1* y *stx2* como factores de virulencia tienen mucha importancia, en este estudio solo se identificaron en cepas obtenidas de bovinos. Sin embargo, los genes de virulencia *eaf*, *bfp*, *eae* y *ehxA* se obtuvieron en mayor número de cepas aisladas de niños.

La importancia de estudiar los genes de virulencia *eae* y *ehxA* es por su capacidad de adherencia y daño al enterocito. Por medio de la caracterización fenotípica, se logró obtener una representación acerca de la distribución serológica que tienen las cepas STEC, incluyendo a los serotipos clásicos del mismo, y encontrando que gran parte de estas muestras pertenecen también a una gran diversidad de serogrupos y serotipos STEC no-O157.

Este estudio aporta evidencia que ayuda a conocer, de manera más detallada, a uno de los principales agentes etiológicos de la diarrea en la población infantil. Proporciona también, resultados que muestran la distribución antigénica y genética de las cepas que puede ayudar en estudios epidemiológicos posteriores.

## 7. PERSPECTIVAS

- Continuar con los estudios de caracterización fenotípica y genotípica de cepas de *E. coli* aisladas de niños menores de cinco años, lo que nos dará elementos para conocer la prevalencia de las cepas STEC y EPEC que circulan en nuestro país.
- Proponer estudios, que incluyan la vigilancia epidemiológica continua de las infecciones por estos microorganismos en nuestra población.
- Diseñar estudios, para conocer el papel de los alimentos de origen animal, entre los que se incluya los derivados lácteos, las carnes provenientes de los bovinos, corderos, cabras, etc., en la transmisión de estas bacterias hacia la población humana.
- Contribuir al estudio del control de la inocuidad de los alimentos, utilizando metodologías empleadas en este estudio para la detección de cepas STEC.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

1. OMS. Mayo de 2016. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs330/es/>.
2. Kotloff KL, Blackwelder WC, Nasrin D, Nataro JP, Farag TH, Van Eijk A, et al. «The Global Enteric Multicenter Study (GEMS) of Diarrheal Disease in Infants and Young Children in Developing Countries Epidemiologic and Clinical Methods of the Case/Control Studies.» *Clin Infect Dis*, 232-245 (2012).
3. Organization., World Health. «World health statistics.» (2012).
4. Varela C, Aguirre A, Carrillo J,. «*Escherichia coli* Gómez, nueva especie aislada de un caso mortal de diarrea.» *Bol. Med. Hosp. Inf. Mex.*, nº 2:117 (1946).
5. Cravioto, Alejandro. «Enfermedad diarreica causada por *Escherichia coli*.» *Instituto Nacional de Ciencia y Tecnología de la Salud del Niño DIF*.
6. Hernández C. C. y col. et al. «Situación de las enfermedades gastrointestinales en México.» *Enf. Inf. Microbiol.*, nº 31(4) pp 137-15. (2011.).
7. Cordier J.L., «*Enterobacteriaceae*.» En *Emerging foodborne pathogens. Florida*.; de Adams M, editores. En Motarjemi Y. Woodhead Publishing Limiting y CRC Press LLC; p. 450-475., (2006).
8. Brenner, D.J. and Framer J., «Enterobacteriaceae Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bateria.» *Published by Jonh Wiley & Sons. Inc, in association with Bergey's Manual Trust*, nº 1-24 (2015).
9. Escherich T, Bettelheim KS. «The intestinal bacteria of the neonate and breast-fed infant.» *Rev. Infect. Dis.*, nº 10:1220–1225. (1988).
10. Cowan S.T., «A review of names for coliform organisms.» *Int. Bull. Bacteriol. Nomencl. Taxon.*, nº 4:119–124. (1954).
11. Farmer 3rd J.J., Fanning G.R., Davis B.R.,. «*Escherichia fergusonii* and *Enterobacter taylorae*, two new species of Enterobacteriaceae isolated from clinical specimens.» *J. Clin. Microbiol.*, nº 21, 77–81. (1985).
12. Huys G., Cnockaert, M., Janda J.M., Swings J.,. «*Escherichia albertii* sp. nov., a diarrhoeagenic species isolated from stool specimens of Bangladeshi children.» *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, nº 53, 807–810. (2003).
13. Hyma K.E., Lacher D.W., Nelson A.M., et al.,. «Evolutionary genetics of a new pathogenic *Escherichia* species: *Escherichia albertii* and related *Shigella boydii* strains.» *J. Bacteriol.*, nº 187, 619–628. (2005).
14. Percival SL, Williams DW. «*Escherichia coli*.» En *Microbiology of Waterborne Diseases*, de Yates MV, Williams DW, Chalmers RM, Gray NF. En Percival L. Elsevier (2013).

15. Torres AG, Arenas-Hernández MMP, Martínez-Laguna Y. «Overview of *Escherichia coli*.» En *Pathogenic Escherichia coli in Latin America*. En Torres AG, editor. Bentham Science Publishers (2010).
16. Joklik W.K. Smith D.T. «Zinsser microbiology .» *Appleton-Century-Crofts.*, nº 537-544 (1972).
17. Eslava C, Mateo J, Cravioto A. «Cepas de *Escherichia coli* relacionadas con la diarrea: diagnóstico de laboratorio de enfermedades gastrointestinales.» *Secretaria de Salud*, nº 251 (1994).
18. OMS. «Zoonotic non-O157 Shiga toxin producing *Escherichia coli* (STEC).» (1998).
19. Orskov I, Orskov F. «Serotyping of *Escherichia coli*» *Methods in Microbiology*, nº 14 (1984).
20. Stenutz RW, Andrej. «The structures of *Escherichia coli* O-Polysaccharide antigens.» *Federation of European Microbiological Societies*, nº 30:382-403 (2006).
21. Flemming Scheutz, Thomas Cheasty, David Woodward and Henry Smith. «Eight new O groups in Verocytotoxin producing *E. coli*» *APMIS*, nº 112: 568-584 (2004).
22. Nataro JP, Kaper JB. «Diarrheagenic *Escherichia coli*.» *Clin. Microbiol. Rev.*, nº 11:142–201. (1998).
23. Taylor J., «Host specificity and enteropathogenicity of *Escherichia coli*.» *J. Appl. Microbiol.*, nº 24, 316–325. (1961).
24. Bray J., «Isolation of antigenically homogeneous strains of *Bact. coli neapolitanum* from summer diarrhoea of infants.» *J. Pathol. Bacteriol.*, nº 57, 239–247 (1945).
25. Gomes T.A.T., Blake PA, Trabulsi LR. «Prevalence of *Escherichia coli* strains with localized, diffuse and aggregative adherence to HeLa cells in infants with diarrhoea and matched controls.» *J. Clin. Microbiol.*, nº 27:266 (1989).
26. Neter E, Schumway C. «*Escherichia coli* D433: occurrence in intestinal and respiratory tracts. Cultural characteristics, pathogenicity, sensitivity to antibiotics.» *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, nº 75:504 (1950).
27. Campos L.C., Whittam T.S., Gomes T.A.T., Andrade, J.R.C., Trabulsi, L.R. «*Escherichia coli* serogroup O111 includes several clones of diarrheagenic strains with different virulence properties.» *Infect. Immun.*, nº 62, 3282–3288. (1994).
28. Trabulsi L.R., Keller R., Gomes T.A.T. «Typical and atypical enteropathogenic *Escherichia coli*.» *Emerg. Infect. Dis.*, nº 8, 508–513. (2002).

29. Croxen MA, Robyn J, Law, Roland Scolz. «Recent Advances in understanding Enteric Pathogenic *Escherichia coli*.» *Clin. Microbiol. Rev.*, nº 26(4):882-880 (2013).
30. Neter E, Westphal O, Luderitz O, Gino RM, Gorzynski EA. «Demonstration of antibodies against enteropathogenic *Escherichia coli* in sera of children of various ages.» *Pediatrics*, nº 16:801–808. (1955).
31. RM., Robins-Browne. «Traditional enteropathogenic *Escherichia coli* of infantile diarrhea.» *Rev. Infect. Dis.*, nº 9:28–53. (1987).
32. Donnenberg, M.S., Kaper, J.B. «Minireview: Enteropathogenic *Escherichia coli*.» *Infect. Immun.*, nº 60, 3953–3961. (1992).
33. Savarino SJ, McVeigh A, Watson J, Cravioto A, Molina J, Echeverria P, Bhan MK, Levine MM, Fasano A. «Enteraggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin is not restricted to enteraggregative *E. coli*.» *J. Infect. Dis.*, nº 173:1019–1022. (1996).
34. Celli J, Olivier M, Finlay BB. «Enteropathogenic *Escherichia coli* mediates antiphagocytosis through the inhibition of PI 3-kinasedependent pathways.» *EMBO J.*, nº 20:1245–1258. (2001).
35. Dean P, Kenny B. «The effector repertoire of enteropathogenic *E. coli*: ganging up on the host cell.» *Curr. Opin. Microbiol.*, nº 12:101–109. (2009).
36. Vidal JE, Navarro-Garcia F. «Efficient translocation of EspC into epithelial cells depends on enteropathogenic *Escherichia coli* and host cell contact.» *Infect. Immun.*, nº 74:2293–2303. (2006).
37. Shahista N, Karen M, Scalon, Donnenberg MS. «Enteropathogenic *Escherichia coli*.» En *Escherichia coli*, de Donnenberg MS. USA: Second Edition. El Sevier (2013).
38. Kaper JB, Nataro JP, Mobley HLT. «Pathogenic *Escherichia coli*.» *Nat. Rev. Microbiol.*, nº 2(2): p. 123-140. (2004).
39. Rodriguez-Angeles. «Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*.» Inst. Diagnóstico y Referencia Epidemiológica (2002).
40. Cravioto A, Vasquez V. «*Escherichia coli*: pathogenic mechanisms and enterohemorrhagic strains.» *Bol. Med. Hosp. Infant. Mex.*, nº 45(3): 196-197 (1988).
41. Cravioto A, Tello A, Navarro A. «Association of *Escherichia coli* HEp-2 adherence patterns with type and duration of diarrhoea.» *Lancet*, nº 337(8736):262-264 (1991).

42. Cravioto A, Gross RJ, Scotland SM. «An adhesive factor found in *Escherichia coli* belonging to the traditional infantile enteropathogenic serogroups.» *Curr Microbiol*, nº 3: 95-99 (1979).
43. Baldini M.M., Kaper J.B., Levine M.M., Candy D.C., Moon, H.W. «Plasmid-mediated adhesion in enteropathogenic *Escherichia coli*.» *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.*, nº 2, 534–538. (1983).
44. Al-Mamun A, Mily A, Sarker P, Tiash S, Navarro A, Cravioto A, Akter M, Islam MF, «Treatment with phenylbutyrate in a pre-clinical trial reduces diarrhea due to enteropathogenic *Escherichia coli*: link to cathelicidin induction.» *Microbes Infect* S1286-4579, nº (13)00173-1 (2013).
45. Jerse, A.E., Kaper, J.B. «The *eae* gene of enteropathogenic *Escherichia coli* encodes a 94-Kilodalton membrane protein, the expression of which is influenced by the EAF plasmid.» *Infect. Immun.*, nº 59, 4302–4309. (1991).
46. Girón, J.A., Ho, A.S.Y., Schoolnik, G.K. «An inducible bundle-forming pilus of enteropathogenic *Escherichia coli*.» *Science*, nº 254, 710–713. (1991).
47. Donnenberg M.S., Girón J.A., Nataro J.P., Kaper J.B. «A plasmid-encoded type IV fimbrial gene of enteropathogenic *Escherichia coli* associated with localized adherence.» *Mol. Microbiol.*, nº 6, 3427–3437. (1992a).
48. Ramer S.W., Bieber D., Schoolnik G.K. «BfpB, an outer membrane lipoprotein required for the biogenesis of bundle-forming pili in enteropathogenic *Escherichia coli*.» *J. Bacteriol.*, nº 178, 6555–6563. (1996).
49. Abreu A.G., Bueris V., Porangaba T.M., Sircili M.P., Navarro-Garcia F, Elias W.P. «Autotransporter protein-encoding genes of diarrheagenic *Escherichia coli* are found in both typical and atypical enteropathogenic *E. coli* strains.» *Appl. Environ. Microbiol.*, nº 79:411-414 (2013).
50. Elliott S.J., McDaniel T.K., Kaper J.B., 2000. «The locus of enterocyte effacement (LEE)-encoded regulator controls expression of both LEE and non-LEE-encoded virulence factors in enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*.» *Infect. Immun.*, nº 68:6115–6126 (2000).
51. Mellies J.L., Elliott S.J., Sperandio V., Donnenberg M.S., Kaper J.B., «The Per regulon of enteropathogenic *Escherichia coli*: identification of a regulatory cascade and a novel transcriptional activator, the locus of enterocyte effacement (LEE)-encoded regulator (Ler).» *Mol. Microbiol.*, nº 33:296-306 (1999).
52. Kenny B., De Vinney R., Stein M., «Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) transfers its receptor for intimate adherence into mammalian cells.» *Cell*, nº 91:511-520 (1997).

53. Goosney D.L., Gruenheid S., Finlay B.B., «Gut feelings: enteropathogenic *E. coli* (EPEC) interactions with the host.» *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* , nº 16: 173-189 (2000).
54. Nisa, Shahista, Karen M. Scanlon, y Michael S. Donnenberg. «Enteropathogenic *Escherichia coli*.» En *Escherichia coli. Pathotypes and Principles of pathogenesis.*, editado por Michael S. Donnenberg, 75-119. Elsevier (2013).
55. Dautin, Nathalie. «Serine Protease Autotransporters of Enterobacteriaceae (SPATEs): Biogenesis and Function.» *Toxins* 2, nº 6 1179-1206, (2010).
56. Clarke S.C., Haigh R.D., Freestone P.P.E., y Williams P.H., «Virulence of Enteropathogenic *Escherichia coli*, a Global Pathogen.» *Clin Microbiol Rev* 16, nº 3: 365-378, (2003).
57. Cookson, Adrian L., Jenny Bennet, Carolyn Nicol, Fiona Thomson-Carter, y Graeme T. Atwood. «Molecular Subtyping and Distribution of the Serine Protease from Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* among Atypical Enteropathogenic *E. coli* Strains.» *Appl Env Microbiol* 75, nº 7: 2246-2249, (Abril 2009).
58. Navarro-Garcia F, Canizalez-Roman A, Sui BQ, Nataro JP, Azamar Y. «The serine protease motif of EspC from enteropathogenic *Escherichia coli* produces epithelial damage by a mechanism different from that of Pet toxin from enteroaggregative *E. coli*.» *Infect. Immun*, nº 72:3609-3621, (2004).
59. Tarr P.I., «*Escherichia coli* O157:H7 clinical, diagnostic and epidemiological aspects of human infection.» *Clin. Infect. Dis.*, nº 20:1-10. (1995).
60. O’Ryan ML, Nataro JP, Cleary TG. «Microorganisms responsible for neonatal diarrhea. .» En *Infectious Diseases of the Fetus and Newborn Infant*, de Klein JO, Wilson CB, Nizet V, Maldonado YA, En Remington JS. Elsevier, (2011).
61. Jackson M, Neill R, O’Brien AD, Holmes R, Newland J:. «Nucleotide sequence analysis and comparison of the structural genes for Shiga-like toxin I and Shiga-like toxin II encoded by bacteriophages from *E coli* 933. .» *FEMS Microbiol Lett* , nº 44:109-4 (1987).
62. Sandvig K, Van Deurs B,. «Entry of ricin and Shiga toxin into cells: molecular mechanisms and medical perspective.» *EMBO J*, nº 19 (22): 5943-50. (2000).
63. Johnson K.E., Thorpe C.M., Sears C.L., «The emerging clinical importance of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli*.» *Clin. Infect. Dis.*, nº 43:1587–1595. (2006).
64. Rivero M.A., Passucci J.A., Rodriguez E.M., «Role and clinical course of verotoxigenic *Escherichia coli* infections in childhood acute diarrhoea in Argentina.» *J. Med. Microbiol*, nº 59:345-352 (2010).

65. Betancour A.B., Ameal L.A., Calviño M.F., «Risk factors for Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections in preadolescent schoolchildren in Buenos Aires, Argentina.» *J. Infect. Dev. Ctries*, nº 6:378-386 (2012).
66. De Souza, Abreu Carvalhaes JT, Sanae Nishimura. «Hemolytic uremic syndrome in pediatric intensive care units in Sao Paulo, Brazil.» *Open Microbiol. J.*, nº 5:76-82 (2011).
67. Irino K., Vaz T.M.I., Kato M.A.M.F., Naves Z.V.F., Gomes T.A.T., «O157:H7 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains associated with sporadic cases of diarrhea in Sao Paulo, Brazil.» *Emerg. Infect. Dis.*, nº 8:446-447 (2002).
68. Effler E., Isaácson M., Arntzen L., Heenan R., «Factors contributing to the emergence of *Escherichia coli* O157 in Africa.» *Emerg. Infect. Dis.*, nº 7:812-819 (2001).
69. Sehgal R., Kumar Y., Kumar S., «Prevalence and geographical distribution of *Escherichia coli* O157 in India: a 10-year survey.» *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, nº 102:380-283 (2008).
70. Varela-Hernández J. J, Cabrera-Díaz E, Cardona-López M A, Ibarra-Velázquez L M, Rangel-Villalobos H, Castillo A, Torres-Vitela M R, and Ramírez-Alvarez A. «Isolation and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 and non-O157 from beef carcasses at slaughter plant in Mexico.» *Int. J. Food Microbiol*, nº 113: 237-241 (2007).
71. Reyes-Rodríguez N, Soriano-Vargas E, Barba-León J, Navarro A, Talavera-Rojas M, Sanso A, and Bustamante AV. «Genetic characterization of *Escherichia coli* isolated from cattle carcasses and feces in Mexico State. .» *J Food Protect*, nº 78, 796-801. (2015).
72. Callaway T.R., Anderson R.C., Tellez G., Rosario C., Nava G.M., Eslava C., Blanco M. A., Quiroz M.A., Olguin A., Herradora M, Edrington TS, Genovese KJ, Harvey RB, and Nisbet DJ. «Prevalence of *Escherichia coli* O157 in cattle and swine in central Mexico.» *J Food Prot*, nº 67:2274-2276 (2004).
73. Frank, C., Werber, D., Cramer, J.P., Askar, M.,. «Epidemic profile of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* O104:H4 outbreak in Germany.» *N. Eng. J. Med.*, nº 365, 1771-1780 (2011).
74. Michael Donnenberg. *Escherichia coli* Pathotypes and Principles of Pathogenesis. Segunda ed. Baltimore, Maryland, USA: Elsevier, (2013).
75. Tarr P.I., Fouser L.S., Stapleton A.E., «Hemolytic-uremic syndrome in a six-year-old girl after a urinary tract infection with shiga toxin-producing *Escherichia coli* O103:H2.» *N. Eng. J. Med.*, nº 335, 635-638 (1996).

76. Jover BA, García BJ. *Generalidades sobre los grupos terapéuticos* . Primera Edición . Sevilla: MAD, (2006).
77. Vargas C, Ugarte CA, Montiel M. «Uso adecuado y racional de los antibióticos.» *Acta Med. Per.* , nº 23(1): 15-20 (2006).
78. Negroni M. *Microbiología Estomatológica y guía practica*. Segunda. Médica Panamericana, (2009).
79. Bravo, Álvarez. «Mapa Bacteriológico de bacilos gram negativos.» Tesis Doctoral, Facultad de Medicina Panamericana (1991).
80. Gómez ML, Calvo A, Prieto J. *Antibióticos y quimioterapéuticos: Generalidades*. Editado por In Velázquez. Médica Panamericana, (2008).
81. Goodman&Gilma, Bruton L. *Las bases farmacológicas de la terapéutica*. 12va. México: Mc Graw Hill, (2011).
82. Scott, Bailey &. *Diagnóstico Microbiológico*. 12va. Madrid: Medica Panamericana, (2007).
83. Andriole V., «The quinolones: past, present and future.» *Clin. Infect. Dis*, nº 41:113-119 (2005).
84. Scatamburlo Moreira M, Chartone de Souza E, Alencar de Morais C. «Multidrug efflux systems in gram negative bacteria. .» *Braz J Med Biol Res* , nº 35:19-28 (2004).
85. Thanassi D, Cheng L, Nikaido H. «Active efflux of bile salts by Escherichia coli.» *J Bacteriol* , nº 179:2512-18 (1997).
86. D., Livermore. «Beta-lactamases in laboratory and clinical resistance.» *Clin Microbiol Rev*, nº 8:557-84 (1995).
87. Webber M, Piddock L. «The importance of efflux pumps in bacterial antibiotic resistance.» *J Antimicrob Chemoter* , nº 51: 9-11 (2003).
88. H., Nikaido. «Multidrog efflux pumps of gramnegative bacteria.» *J Bacteriol*, nº 178:5853-59 (1996).
89. Marchetti ML, Errecalde J, Mestorino N. «Resistencia bacteriana a los antimicrobianos ocasionado por las bombas de eflujo. Impacto en la resistencia.» *ANALECTA Vet*, nº 31(2):40-53 (2011).
90. Van Bambeke F, Balzi E, Tulkenes P. «Antimicrobial efflux pump.» *Biochem Pharmacol*, nº 60: 457-70 (2000).

91. Molina, José. «Papel de plásmidos e integrones en la multirresistencia a antimicrobianos en cepas de UPEC y su posible asociación con adherencia e invasividad en células cultivadas.» *Tesis de Doctorado IPN*, (2011).
92. Roy R. Chaudhuri, IH. «The evolution of the *Escherichia coli* phylogeny. .» *Infection, Genetics and Evolution*, nº (12):214-226. (2012).
93. Gordon DM., «*Escherichia coli* Pathotypes and Principles of pathogenesis.» (2013).
94. Olivier Tenaillon DS, Bertrand Picard, Erick Denamur., «The population Genetics of commensal *Escherichia coli*.» *Nature Microbiology Reviews* , nº 8:2017-2217. (2010).
95. Clermont Oliver, S Bonacorsi, y E Bingen. «Rapid and Simple Dermination of the *Escherichia coli* Phylogenetic Group.» *Appl. Environ. Microbiol.* 66, nº 10 (2000).
96. Alfredo G. Torres S.M.P., «Haem iron-transport system in enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 .» *Molecular Microbiology* , nº 23(4):825-833. (1997).
97. Clermont O., Denamur E., David M., Gordon. « The Clermont *Escherichia coli* Phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylo-groups. .» *Environmental Microbiology reports* , nº 5(1):58-65. (2013).
98. MacFaddin, J. F., et al. *Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica*, . Editorial Médica Panamericana, (2000).
99. Islam M.A., Heuvelink A.E., Talukder K.A., Zwietering M.H., De Bor E., «Evaluation of Immunomagnetic Separation and PCR for the Detection of *Escherichia coli* O157 in Animal Feces and Meats. J Food Protect.» nº 69: p. 2865-2869. (2006).
100. Scheutz F., et al. «Multicenter Evaluation of a Sequence-Based Protocol for Subtyping Shiga Toxins and Standarizing stx Nomenclature.» *JCM* , nº 50 (9), 29151-2963 (2012).
101. Schmidt H, Plaschke B, Franke S, Russmann H, Schwarzkopf A, Heesemann J., «Differentiation in virulence patterns of *Escherichia coli* possessing *eae* genes.» *Med Microbiol Immunol.*, nº 183(1): p. 23-31. (Febrero 1994).
102. Gunzburg S.T., Tornieporth N.G., Riley L.W., «Identification of enteropathogenic *Escherichia coli* by PCR-based detection of the bundle-forming pilus gene. .» *J Clin Microbiol.* , nº 33(5): p. 1375-1377. (Mayo 1995 ).
103. Franke J., Franke S., Schmidt H., Schwarzkopf A., Wieler L.H., Baljer G., «Nucleotide sequence analysis of enteropathogenic *Escherichia coli* adherence

- factor probe and development of PCR for rapid detection of EPEC harboring virulence plasmids. .» *J Clin Microbiol*, nº 32(10): p.2460-2463 (Octubre 1994).
104. Epidemiología., Dirección General de. «Anuarios de morbilidad; .» *Disponible en: <http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/anuario/html/anuarios.html>*, (2015).
105. Karch H., «The role of virulence factors in enterohemorrhagic *Escherichia coli* - associated hemolytic - uremic syndrome.» *Sem Thromb. Hemost*, nº 27: 207-213 (2001).
106. Otero A. «Coexistencia de subtipos de *Escherichia coli* O111 enteropatógena (EPEC) aislada de diarrea infantil de diferentes zonas geográficas.» Tesis de Licenciatura, Salud Pública, UNAM, CDMX, (2015).
107. Scheutz, F. and Strockbine, N. A. «*Escherichia*. Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria. 1–49. .» *Published by John Wiley & Sons, Inc., in association with Bergey's Manual Trust.*, (2015).
108. Estrada-García T., Cerna J. F., Paheco-Gil L., Velázquez, R. F., Ochoa, T. J., Torres, J., & DuPont, H. L. «Drug-resistant diarrheogenic *Escherichia coli*, Mexico. .» *Emerging infectious diseases*, , nº 11(8), 1306. (2005).
109. Gireardeau J.P, Dalmasso A, Bertin Y, Ducrot C, Bord S, Livrelli V. «Association of virulence genotype with phylogenetic background .» *Clin. Microbiol.*, nº 43 (12):6098-6107. (2005).
110. Carlos C., Pires M.M., Stoppe N.C., Hachich E.M., Sato M.I., Gomes T. A., & Ottoboni, L. M. «*Escherichia coli* phylogenetic group determination and its application in the identification of the major animal source of fecal contamination.» *BMC Microbiology*, nº 10 (1), 161 (2010).
111. Enriquez-Gomez E, Talavera-Rojas M, Soriano-Vargas E, Navarro-Ocaña A, Vega-Sanchez V, Aguilar-M, S. «Serotypes and antimicrobial resistance patterns in Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* isolates from healthy lambs in Mexico. .» *Small Ruminant Research*, nº 153, 41-47 (2017).
112. Rosas I. Salinas E, Martínez L, Cruz-Cordova A, González-Pedrajo B, Espinosa M, Amábile-Cuevas C F. «Characterization of *Escherichia coli* isolated from an urban lake receiving water from wastewater treatment plant in Mexico City: Fecal pollution and antibiotic resistance.» *Curr Microbiol*, (2015).
113. Chaudhuri RR, Henderson IR. «The evolution of the *Escherichia coli* phylogeny. .» *Infect Genet Evol.* , nº 12(2): p. 214-226. (enero 2012).