



Universidad Autónoma de Sinaloa
Facultad de Ciencias Químico Biológicas
Programa de Posgrado en Biotecnología
Maestría en Ciencias con Orientación en Biotecnología

Caracterización Fenotípica y Genotípica de
***Escherichia coli* Productora de Toxinas Shiga**
Aisladas de Agua de Río y Heces de Animales de
Corral en Culiacán, Sinaloa

T E S I S

Que presenta:

QFB Edgar Fausto Bon Haro

Para obtener el grado de
Maestro en Ciencias con Orientación en
Biotecnología de la Salud

Director de Tesis
Dr Bianca Anabel Amézquita López
Dr Johana Marcela Soto Beltrán

Culiacán, SIN, MEX

Junio, 2017

La presente investigación, titulada “Caracterización fenotípica y genotípica de *Escherichia coli* productora de toxinas Shiga aisladas de agua de río y de animales de corral en Culiacán, Sinaloa,” se llevó a cabo en los laboratorios del Programa Regional de Posgrado en Biotecnología, Facultad de Ciencias Químico Biológicas, Universidad Autónoma de Sinaloa. Como Asesores Académicos participaron: Dra. Yadira Lugo Melchor, Dra. Beatriz Quiñones, Dr. Ignacio Contreras Andrade Dra. Bianca Anabel Amézquita López (Director de tesis), Dra. Johana Marcela Soto Beltrán (Director de tesis). Este proyecto de investigación fue financiado con recursos aportados por el Programa de Fomento y Apoyo a Proyectos de Investigación (PROFAPI), convocatoria 2014 con número de proyecto PROFAPI2014-013 y PROFAPI2014-208 y PROFAPI2015-014, el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) apoyó al QFB Edgar Fausto Bon Haro, por medio la de Beca Tesis para Estudios de Maestría 2015-2017. La investigación tuvo carácter interinstitucional, participando: El Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C. (CIATEJ), planta Guadalajara. El cual es un Centro Público de Investigación perteneciente a la red de centros de desarrollo e innovación tecnológica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT).

AGRADECIMIENTOS

AL programa de posgrado de maestría en biotecnología por haberme dado la oportunidad de realizar un posgrado

A CONACyT por el apoyo económico brindado para realizar la maestría.

A la Dra. Bianca Anabel Amézquita López por haberme aceptado primeramente como su estudiante y darme la oportunidad para desarrollar este proyecto, por siempre preocuparse por mi desarrollo como investigador y como persona, además de estar siempre atenta y disponible para brindarme su apoyo y asesoría. Por compartirme su valioso conocimiento y amistad.

A la Dra. Johana Marcela Soto Beltrán por su apoyo y asesoría para la realización del proyecto.

A la Dra. Yadira Lugo Melchor, por permitirme realizar parte del proyecto en CIATEJ, pero principalmente por brindarme su asesoría, apoyo y su valiosa amistad. No tengo palabras para expresarle lo mucho que le agradezco.

A la Dra. Beatriz Quiñones por su apoyo para la realización de este proyecto.

Al Dr. Ignacio Contreras Andrade, por apoyarnos y permitirnos trabajar en su laboratorio y lograr sacar adelante este proyecto.

A mis maestros del programa de posgrado en biotecnología, por ayudarme y ser parte de mi formación académica.

A la QFB Martha Rentería, por brindarme su apoyo técnico, consejos, por su enseñanza pero principalmente por su gran amistad y su forma de ser como persona.

A la QFB Ana Esthela Barrios, por su apoyo técnico tanto en la realización de los muestreos, como en el trabajo de laboratorio, por su gran dedicación al trabajo y su valiosa amistad.

A mi compañero y amigo de maestría, IBT Héctor Manuel Fonseca Peralta, por su ayuda durante toda la maestría, por sus enseñanzas y sobre todo por su gran amistad.

A Juan Carlos Ayala, por su apoyo técnico para realizar el trabajo en el

laboratorio y por su gran amistad.

A Osiris Díaz Torres, por su gran apoyo técnico, por compartirme sus conocimientos y enseñanzas en el laboratorio, durante mi estancia en CIATEJ

A Jenny Juárez, por su apoyo técnico en el laboratorio de CIATEJ, por su amistad y por estar siempre disponible para ayudar.

A todos los compañeros de CIATEJ, Kathy, Denisse, Fanny y Ángel, a todos por su gran apoyo y amistad durante mi estancia y la forma de demostrar lo valioso que es trabajar en armonía y haciendo un gran equipo.

A mis compañeros del laboratorio 22 Kathia, Jocelyn, Grecia, Hilary, Ángel y Sara, por su gran apoyo y compartirme su amistad.

A el QFB Eduardo Acosta Rosales, por su amistad y formar parte de esta decisión de lograr estudiar un posgrado.

A mi familia, a mis padres, a mi esposa e hijos por ser un motivo para tratar de prepararme y ser mejor persona.

Gracias a todos mis amigos que de una manera u otra han formado parte de este periodo y me han ayudado a salir adelante.

ÍNDICE GENERAL

	Pág
ÍNDICE DE FIGURAS	iii
ÍNDICE DE CUADROS	iv
I RESUMEN	1
II INTRODUCCIÓN	2
III REVISIÓN DE LITERATURA	6
A Enfermedades transmitidas por alimentos (ETA)	6
B <i>E. coli</i> productora de toxina Shiga	7
C Clasificación de STEC	11
D Patogénesis y manifestaciones clínicas por STEC	12
E Reservorio y vías de transmisión de STEC	16
F Caracterización de STEC	18
1 Marcadores fenotípicos	19
a Biotipado bioquímico	19
b Serotipado	19
c Resistencia a antimicrobianos	20
d Ensayos en cultivos celulares para observar la actividad de las toxinas	21
2 Marcadores genotípicos	22
A Genotipado	22
B Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	23
C Electroforesis en gel de campos pulsados (PFGE)	24
IV HIPÓTESIS	25

V	JUSTIFICACIÓN	26
VI	OBJETIVO GENERAL	27
A	Objetivo General	27
B	Objetivos Específicos	27
VII	MATERIALES Y MÉTODOS	28
A	Recolección de las muestras	30
B	Aislamiento de cepas de <i>Escherichia coli</i> productora de toxinas Shiga (STEC) de agua de río y heces de vacas, pollos y ovejas	33
C	Confirmación de cepas STEC y caracterización de los principales factores de virulencia	36
D	Serotipificación para STEC O157:H7	39
E	Perfil de resistencia a antimicrobianos	39
VIII	RESULTADOS Y DISCUSIONES	42
A	Recolección y aislamiento de cepas de <i>Escherichia coli</i> productora de toxinas Shiga (STEC) en agua de río y heces de vacas, pollos y ovejas	42
B	Confirmación de cepas STEC y caracterización de los principales factores de virulencia	42
C	Serotipificación para STEC O157:H7	49
D	Perfil de resistencia a antimicrobianos	54
IX	CONCLUSIONES	59
X	BIBLIOGRAFÍA	60
	ABREVIATURAS	71

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Pág
1	Estrategia experimental de la metodología empleada	29
2	Distribución de los puntos de muestreo	31
3	Dispositivo de Moore	32
4	Morfología de las colonias seleccionadas	35
5	Análisis de frecuencia del perfil de resistencia	57

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Pág
1	Características de <i>Escherichia coli</i> enteropatógenas	9
2	Secuencias de los oligonucleótidos utilizados para la PCRm	38
3	Descripción de los antibióticos utilizados en el análisis de perfil de resistencia	41
4	Confirmación de cepas STEC por PCR múltiple	44
5	Frecuencia de muestras positivas para bacterias STEC, aisladas de agua de río y animales de corral	46
6	Cepas <i>E. coli</i> O157:H7	50
7	Cepas STEC no O157	51
8	Resultado de análisis de perfil de resistencia	56
9	Perfil de resistencia	58

I RESUMEN

Escherichia coli productora de toxina Shiga (STEC) es un patógeno de transmisión alimentaria de carácter zoonótico, que representa un grave problema para la Salud Pública. El serotipo de bacterias STEC que mayormente se asocia a enfermedades humanas es el O157:H7. Además, se encuentran el grupo no O157 que pueden ser igual de virulentas que O157:H7. El objetivo de este trabajo es caracterizar fenotípica y genotípicamente las cepas de *Escherichia coli* productoras de toxinas Shiga aisladas de agua de río y de animales de corral en Culiacán. Para llevar a cabo esta investigación se aislaron las cepas STEC utilizando un método de separación inmunomagnética (IMS, por sus siglas en inglés), técnicas moleculares como reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para identificar sus principales factores de virulencia, PCR en tiempo real para agrupar en O157 y no O157, un antibiograma mediante el método de Kirby-Bauer para determinar el perfil de resistencia a los antimicrobianos de las cepas STEC aisladas. Se recolectaron 54 muestras durante el periodo de octubre 2016 a enero 2017. Dando como resultado 12 muestras positivas para STEC. Se aislaron 19 cepas STEC en muestras de agua de río y heces de vaca. De las 19 cepas se detectaron dos cepas O157:H7 y el resto se clasificaron como no O157. El 31.58% (6/19) presento resistencia a uno o dos antibióticos, el 94% es susceptible a cloranfenicol, antibiótico que disminuye la producción de toxina Shiga por lo que pudiera utilizarse como tratamiento. Estos resultados permiten conocer la incidencia de O157:H7 y no O157 en agua de río y heces de vaca, así como los factores de virulencia y el perfil de antimicrobianos de las cepas aisladas en Culiacán, Sinaloa.

Palabras claves: *STEC O157, STEC no O157, agua de río, perfil de virulencia, perfil antimicrobiano*

II INTRODUCCIÓN

Las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) son de los principales problemas de salud pública a nivel mundial. Son ocasionadas por el consumo de agua y alimentos contaminados con microorganismos patógenos o por sus metabolitos, sus principales síntomas son diarrea y vómito (Rosas y Acosta, 2001; Flores y Herrera, 2005). Es difícil conocer la incidencia real a nivel mundial debido a que no se reportan todos los casos cuando se presentan estas enfermedades (Arroyo y Martell, 2001). Entre las enfermedades zoonóticas asociadas a las ETA, se reportan con mayor frecuencia campilobacteriosis, salmonelosis, yersiniosis y las infecciones por *Escherichia coli*, siendo el patotipo de bacterias STEC uno de los más importantes (Norrung y Buncic, 2008; EFSA, 2015). A nivel mundial *E. coli* es responsable del 25% de los casos de diarrea, y se transmite de persona a persona, animal a persona o través del consumo de agua y alimentos contaminados (OPS, 2008). Las bacterias STEC, presentan una frecuencia menor, sin embargo, su importancia en la salud pública es relevante debido a que se asocia con enfermedades severas en humanos, tales como colitis hemorrágica (CH) y SUH (Roldgaard y col., 2004). Las bacterias STEC se reconocieron por primera vez como patógeno humano en 1982, cuando se presentaron dos brotes de CH ocurridos en Oregon y Michigan, EE.UU., los cuales se relacionaron al consumo de hamburguesas en restaurantes de una cadena de comidas rápidas (Riley y col., 1983). La patogenicidad de las bacterias STEC en humanos se cree que es multifactorial, ya que para que se desarrolle

una enfermedad es necesario que se combinen diferentes factores como lo es la edad y el sistema inmune del hospedero, dosis infectiva, así como los factores de virulencia que presente el agente infeccioso STEC (siendo su principal factor de virulencia la producción de toxinas Shiga). Las toxina Shiga se divide en dos grandes grupos: toxina Shiga 1 (Stx1) y toxina Shiga 2 (Stx2), la bacteria puede producir solo una o las dos toxinas siendo la de mayor virulencia la Stx2 (Bolton y col., 2008). Estas toxinas tienen la capacidad de inhibir la síntesis de proteína por la inactivación del ribosoma (Bergan y col., 2012; Gyles, 2007). Además de este factor de virulencia las STEC pueden poseer otros factores de virulencia que le ayudan a desarrollar la enfermedad como lo es proteína intimina que le ayuda a la adherencia, y la enterohemolisina que le permite destruir el eritrocito para liberar la hemoglobina y obtener el hierro presente en este, el cual sirve de alimento para la bacteria (Bolton, 2011).

El desarrollo de la infección se puede dar de diferentes formas ya que puede presentarse de manera asintomática, pero en más de un 90% se manifiesta con diarrea acuosa, el 30% puede evolucionar a diarrea sanguinolenta y CH, y el 10% se puede complicar hasta llegar a presentar SUH, y con un 3-5% que pueden llegar a fallecer (Rivas y col. 2011). El principal reservorio de STEC son los rumiantes principalmente el ganado bovino, pero también se ha encontrado en pollos, ovejas y cabras, animales domésticos como perros, gatos, cerdos y en animales salvajes como ciervos, coyotes, aves y cerdos salvajes (Betancur y col., 2007; Amézquita-López y col. 2012; Cooley y col. 2013). El

serotipo que se considera más relevante de las STEC es el O157:H7, debido a que los brotes que se han presentado se encuentran relacionados mayormente con este serotipo, y es el principal responsable del desarrollo de SUH a nivel mundial (Gordani y col., 1997; Betancur, 2016), afectando principalmente los riñones, la pared del colon, pulmones, el corazón y el sistema nervioso central (Eisenhauer y col., 2001; Proulix y col., 2001; Pelicano y col., 2014). Dentro de las bacterias STEC también se encuentran otros serotipos que pueden llegar a tener la misma capacidad de desarrollar enfermedad en el humano, es por eso que se les ha clasificado en dos grandes grupos: como STEC O157 y STEC no O157. A nivel mundial se han presentado diversos brotes, pero en los últimos años el de mayor relevancia es el sucedido en Alemania en el 2011, el cual se relacionó con el consumo de germinados crudos contaminados con STEC O104:H4. Este brote se diseminó por varios países de Europa y causó más de 3,800 casos, alrededor de 345 personas desarrollaron SUH de las cuales fallecieron 54 (ECDC, 2011). En México, a pesar de que existe poca información sobre esta problemática ya se han reportado algunos casos como lo es el brote sucedido en Chalco, México, donde estuvieron relacionadas diferentes patotipos de E. coli, entre ellas se encontraron cepas STEC no O157, este brote fue ocasionado por el desbordamiento de aguas negras del cual se reportaron 1550 enfermos (Cortez-Ruiz y col. 2002); así como también en otras publicaciones muestran la presencia de STEC en sus principales reservorios y también en el humano (Cortez-Ruiz y col., 2002; Estrada-García y col., 2005; Gallegos y col.,

2009; Amézquita-López y col., 2012; Canizalez-Román y col., 2016). En Sinaloa se han desarrollado algunos estudios que indican la presencia de STEC en animales que son sus principales reservorios como son el ganado bovino, ovejas y pollos, así como en alimentos listos para consumo (Amézquita-López y col., 2012 y 2014, Canizalez- Román y col., 2013), también hay un estudio donde identificaron en heces de humanos la presencia STEC, los cuales reportan un 0.3% (Canizalez-Román y col. 2016).

La principal fuente de STEC son las heces de sus reservorios, así como el agua que funciona como vehículo para que lleguen al ser humano de manera directa o indirecta, ya que los diferentes cuerpos de agua se utilizan como áreas recreacionales y para irrigación de los campos agrícolas, y de esta manera contaminan los cultivos y posteriormente ser ingeridos por el ser humano (Tanaro y col. 2016), y tomando en cuenta que las bacterias STEC pueden representar un riesgo muy importante en la salud y en la economía para nuestra población, debido a que Sinaloa unas de sus principales actividades económicas son la agricultura y la ganadería, además de contar con una gran cantidad de cuerpos de agua, se considera de mucha importancia el estudio de STEC tanto en animales de corral y en el agua de río de nuestra región, así como realizar estudios para conocer sus características fenotípicas y genotípicas que permitan saber que tan virulentas podrían ser las bacterias STEC de la región.

III REVISIÓN DE LITERATURA

A Enfermedades transmitidas por alimentos (ETA)

Las ETA son aquellas enfermedades ocasionadas por el consumo de alimentos contaminados con microorganismos patógenos o de los productos de su metabolismo, y que sean tóxicos para el ser humano; produciendo una serie de síntomas que afectan la salud de quien los consume (Flores y Herrera, 2005; Rosas y Acosta, 2001).

Las ETA son una gran problemática a nivel mundial y se han ido expandiendo poco a poco tanto en países desarrollados como en vías de desarrollo (Díaz, 2003; Flores y Herrera, 2005). Las ETA tienen un efecto en la morbilidad y mortalidad en todo el mundo, afectando principalmente a niños menores de 5 años de edad, además del gran impacto a nivel económico, ya sea por gastos en el tratamiento por la enfermedad generada, o las actividades relacionadas con la producción o venta de alimentos y el ausentismo laboral (Pires y col., 2009; Busby y col., 2009). Se estima que a nivel mundial, cada año se enferman hasta 600 millones de personas por ETA y que de estas personas, mueren 420,000 en los que se incluyen 125,000 niños menores de 5 años de edad (OMS, 2015). En el continente americano se reportan 77 millones de casos de personas que se enferman anualmente por el consumo de alimentos contaminados, y de esas personas mueren alrededor de 9,000 al año. De los casos reportados como enfermos 31 millones son menores de 5 años y de ellos mueren más de 2,000 al año (OMS, 2015).

En México, durante el periodo de 1980 a 1989, el Laboratorio Nacional de Salud Pública, confirmó 58 brotes de intoxicaciones alimentarias de origen microbiano y parasitario a nivel nacional (Parrilla y col., 1993). En el año 2002, el Sistema Nacional de Información en Salud reportó 3612 casos de intoxicaciones alimentarias de origen bacteriano, de los cuales 173 se presentaron en el estado de Sinaloa (Díaz, 2003). En el 2016, se reportaron 29,925 casos de intoxicación alimentaria bacteriana a nivel nacional de los cuales 858 correspondieron a Sinaloa (Secretaria de Salud, 2017). Estos datos son alarmantes, ya que se siguen presentando una gran cantidad de casos de intoxicaciones por bacterias. La Secretaria de Salud en su informe publicado en 2015 reportó que en el 2011 las Enfermedades Infecciosas Intestinales fueron las principales causa de muerte en niños menores de 5 años, ocupando el quinto lugar, con una tasa de 3.9 y Sinaloa con una tasa de 0.76 por cada 100,000 habitantes de 1 a 4 años (Secretaria de Salud, 2015).

Las enfermedades diarreicas son causa de más de la mitad de los casos reportados como ETA a nivel mundial, los cuales en su mayoría son por la ingesta de carne y huevos crudos o mal cocidos, verduras y frutas mal lavadas, y productos lácteos, contaminados con microorganismos, tales como Norovirus, *Campylobacter*, *Salmonella* no tifoídica y *Escherichia coli* patógena dentro de la que se encuentran las bacterias STEC (OMS, 2015).

Las enfermedades Zoonóticas transmitidas a través de los alimentos que se reportan con mayor frecuencia son las salmonelosis y campilobacteriosis

(Norrung y Buncic, 2008) y en menor frecuencia se reportan las infecciones por los diferentes patotipos de *E. coli*. Aunque se presenten en menor cantidad son muy relevantes, ya que estos presentan un gran impacto en la salud pública, debido a que se asocian con enfermedades que ponen en riesgo la vida del ser humano, como son los casos que se ocasionan por *E. coli* productora de toxina Shiga (STEC). Las complicaciones clínicas más comunes que se pueden presentar, son diarrea acuosa o sanguinolenta, CH y SUH (Roldgaard y col., 2004).

B *E. coli* productora de toxina Shiga

E. coli se considera como parte de la flora normal del intestino del humano y de otros animales, sin embargo, a través del tiempo ha adquirido elementos móviles como plásmidos, transposones, fagos, que le han conferido la capacidad de desarrollar enfermedad en los humanos (Kaper y col., 2004; Williams y col., 2010).

E. coli es la causa del 25% de los casos de diarrea en los países en desarrollo, la transmisión suele ser por el agua y los alimentos contaminados (OPS, 2008). Desde su primera descripción por Theodor Von Escherich (1885), se ha convertido en uno de los microorganismos modelos de muchas investigaciones científicas, para estudiar y conocer sus características. *E. coli* pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*, es un bacilo Gram negativo, corto, anaerobio facultativo y puede ser móvil por la presencia de flagelos peritricos

(Eriksson, 2010). Es una bacteria mesófila, es decir que se desarrolla a temperatura de 20 a 45°C, con una temperatura óptima de 37°C, y se desarrolla a un pH de 6-8 (Koneman 1999, Sánchez-Veja, 2003). Presenta tres antígenos celulares que se utilizan para realizar la clasificación serológica; el antígeno somático designado como antígeno "O", que forma parte de la estructura del lipopolisacárido; el antígeno flagelar, designado como antígeno "H", que forma parte del flagelo bacteriano de las cepas móviles; y el antígeno "K", presente en aquellas bacterias que poseen cápsula (Lior y col. 1996, Karmali y Beutin, 1998, sheutz y col., 2004).

Dentro de la clasificación de *E. coli* patógenas están las que causan infecciones urinarias, así como las que causan gastroenteritis, de este último grupo, hasta la fecha se conocen 6 patotipos relacionados con gran variedad de síndromes (Cuadro 1). Estos se clasifican de acuerdo a su mecanismo de acción en el huésped: *E. coli* enteropatógena (EPEC), *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* de adherencia difusa (DAEC), *E. coli* productora de toxinas Shiga (STEC) (Williams y col., 2010). En el intestino humano, ETEC, EPEC y EAEC colonizan el intestino delgado, mientras que EIEC y STEC colonizan el intestino grueso, sin embargo, la localización exacta de DAEC para la colonización intestinal no está definida (Williams y col., 2010).

Cuadro 1. Características de *Escherichia coli* enteropatógenas

Patotipo	Algunos serotipos	Mecanismo patogénico	Síntomas	Grupo de edades
EHEC ^a o STEC ^g	O157:H7, O103:H2, O113:H21, O119,O128, O145	STX E/A Intimina pO157	SUH, CH, PTT, diarrea sin sangre, dolor abdominal, fiebre y vómito	Niños y adultos
EPEC ^b o STEC ^g	O55, O86, O142, O111:H-, O127, O26	E/A STX Plasmido EAF de 50-70MDa	Diarrea aguda, dolor abdominal, vómito, fiebre baja	niños menores de 6 meses hasta 2 años
EIEC ^c	O28:H, O112:H-, O152:H-, O164:H- O167:H-	Invasividad, plásmido 140MDa	Diarrea con moco y sangre o diarrea acuosa, cuadro disenterico	Niños menores de seis meses
ETEC ^d	O8:H9, ST Y LT O15:H11, O20:H- O25:H-, O27:H7	Toxina termoestable y toxina termolabil, CFA	Diarrea aguda acuosa	niños menores de 2 años
EAEC ^e	O44:H18	Fimbria AAFI y II, EASTI, proteínas Pet y Pic, OMP, plásmido de 60MDa, citotoxina	Diarrea líquida, verde, con moco, sin sangre, diarrea persistente hasta 20 días	Recién nacidos y niños menores de 2 años
ECAD ^f	O126:H27	Fimbria F1845. OMP	Diarrea acuosa sin sangre	Niños de 1 a 5 años

a) *E. coli* enterohemorrágica, b) *E. coli* enteropatógena, c) *E. coli* enteroinvasiva, d) *E. coli* enterotoxigénica, e) *E. coli* enteroagregativa, f) *E. coli* de adherencia difusa, g) *E. coli* productora de toxina Shiga; CFA, factor de colonización antigénico, EAF, factor de adherencia de EPEC, OMP, proteína de membrana externa, STX, toxina shiga, EAST, toxina ST de cepas enteroagregativa.

Entre los tipos de bacterias más peligrosas de *E. coli* se encuentran las productoras de toxina Shiga (STEC) (OMS, 2005). Estas toxinas fueron denominadas en un primer momento como Verotoxinas (VT) por su efecto citotóxico en células Vero (Knowalchuk y col., 1977). Pocos años después, se observó que también producían un efecto citotóxico en células HeLa, el cual podía ser neutralizado por anticuerpos antitoxina Shiga de *Shigella dysenteriae* tipo 1 (O'Brien y col., 1982), y se les denominó toxinas Shiga (Stx). Por lo tanto, la denominación de VTEC y STEC son equivalentes y definen a todas las cepas de *E. coli* que producen una o más toxinas de la familia Stx (VT).

La capacidad de las bacterias STEC para causar enfermedad, radica en la habilidad que presenten para secretar Stx1 y Stx2, las cuales son responsables del daño al endotelio vascular. Además, la cepa puede producir solo una o ambas toxinas, siendo la más tóxica la Stx2 (Gyles, 2007; Bergan y col., 2012; Farrokh y col., 2013). Stx1 presenta tres variantes: Stx1a, Stx1c y Stx1d; mientras que la Stx2 presenta siete variantes: Stx2a, Stx2b, Stx2c, Stx2d, Stx2e, Stx2f y Stx2g (Kuczius y col., Sheutz y Strockbine, 2005, Karmali y col. 2003). Además de expresar las Stx, este grupo bacteriano posee factores de virulencia adicionales, como la isla de patogenicidad LEE (por sus siglas en inglés Locus for Enterocyte Effacement), que codifica para un sistema de secreción tipo III, y proteínas efectoras homólogas a aquellas producidas por EPEC (Kaper y col., 2004) La mayoría de las cepas STEC O157:H7 tienen el Plásmido pO157 de 90 Kb, en el cual se encuentran diversos genes que codifican para los siguientes factores de

virulencia: *espP* (serina proteasa extracelular), *katP* (catalasa-peroxidasa), *ehxA* (enterohemolisina), *etp* (sistema de secreción tipo II) y para una fimbria que podría estar involucrada en la colonización inicial de los enterocitos (Schmidt y col., 2000). La presencia del gen *eae* que codifica para la proteína intimina está comúnmente asociada en aislados procedentes de animales, presentando serogrupos asociados a enfermedad en humanos como O157, O26, O111 (Paton y col., 1998; Oswald y col., 2000). Se han descrito al menos 17 tipos de intimina ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\beta 1$, $\beta 2$, $\gamma 1$, $\gamma 2/\theta$, δ/κ , ϵ , ζ , η , $\eta 2$, λ , μ , entre otros) en función de la heterogeneidad de la parte C-terminal de la molécula. La intimina $\gamma 1$ se asocia con serotipos de STEC muy patógenos como O157:H7 y O145: NM (Gyles, 2007). El gen *ehxA* codifica para enterohemolisina, está relacionado con enfermedades severas, debido a que tiene la capacidad de liberar la hemoglobina de los glóbulos rojos durante la infección (Wang y col., 2002, Cookson y col.; 2007).

C Clasificación de STEC

El patotipo STEC fue identificado por primera vez en 1982, cuando el serotipo O157:H7 se asoció a dos brotes de CH en los estados de Michigan y Oregón (USA), causados por el consumo de hamburguesas (Riley y col., 1983). A partir de entonces, la importancia en la salud pública a nivel mundial aumentó, ya que se estima que sólo en Estados Unidos más de 265,000 personas por año sufren una infección originada por STEC, con más de 3600 hospitalizaciones y

producen aproximadamente 30 muertes por año (CDC, 2011). La excreción de STEC por materia fecal se da de manera intermitente, y puede presentarse por varios meses después de que el proceso infeccioso haya terminado, esto especialmente en niños pequeños (HPSC, 2013).

Knowalchuk en 1977, informó que cepas de *E. coli* de los serogrupos O18, O26, O111 y O128 aisladas de niños y cerdos con diarrea, producían una toxina extracelular con propiedades citotóxicas sobre células Vero (Knowalchuk y col., 1977). El serotipo O157 es el que se relaciona con mayor frecuencia en los casos reportados, sin embargo, existen otros serotipos de STEC, tales como O26, O103, O111, O145, O45, y O121, entre otros, los cuales pueden tener la misma virulencia que O157:H7 y están asociados a enfermedades severas (Karmali y col., 2003 y CDC, 2011). En un estudio reportado en la Base de Datos del Laboratorio Nacional de Referencia para la Vigilancia del SUH en Argentina, informan que las cepas aisladas de casos de SUH producidos entre 2004 y 2013 pertenecieron aproximadamente en un 74.5% a STEC O157:H7 y el 25,4% a los serotipos O26:[H2], O103:[H2, H-], O111:[H-, HNT, HNT], O121: [H19, H11, HNT], O145:[H27, H-, HNT] y O174:[H8, H21, H28, H-]. Debido al gran impacto que han ocasionado los diversos serotipos de las cepas STEC, se han clasificado en dos grandes grupos, las STEC O157 y las STEC no O157. Son responsable de causar enfermedad en humanos y se puede desarrollar de diferentes maneras esto dependiendo de la capacidad de virulencia que presente la cepa (Kaper, 2004).

D Patogénesis y manifestaciones clínicas por STEC

La infección por STEC se puede dar solo con la portación asintomática del microorganismo, o presentar brotes de diarrea que se pueden complicar hasta presentar CH o SUH. SUH es un síndrome que causa una complicación sistémica severa caracterizada por insuficiencia renal aguda, anemia hemolítica microangiopática y trombocitopenia (Kaper y col., 2004). Los riñones constituyen el principal órgano afectado, pero también otros órganos como el páncreas, los pulmones, el corazón y el sistema nervioso central (Giantonio y col., 1973; Eisenhauer y col., 2001; Proulx y col., 2001). La infección y desarrollo de la enfermedad puede ocurrir luego de la ingesta de una pequeña dosis bacteriana de 50 unidades formadoras de colonias (UFC) (Prado y Cavagnaro, 2008).

El periodo de incubación promedio de la infección por STEC es de 3 días (con un rango de 1-8 días). Luego de ese periodo, un alto porcentaje de pacientes presenta diarrea acuosa y aproximadamente el 30% evoluciona a diarrea sanguinolenta o colitis hemorrágica en los días 5-6, presentando evidencia de edema de la mucosa colónica, dolores abdominales severos (frecuente en niños menores de 6 años), en algunos casos pueden presentarse vómitos e irritabilidad, pero no es frecuente la aparición de fiebre (Rivas y col., 2011). Aunque en la mayoría de los casos la diarrea por STEC es autolimitada se recomienda un manejo adecuado de la diarrea con soluciones rehidratantes, aproximadamente del 5 al 10% de los niños infectados evolucionan a SUH, para el cual no existe

un tratamiento específico. Se da un tratamiento de soporte (transfusión de paquetes globulares, diálisis, etc.), pero no existe a la fecha una cura. No se recomienda dar tratamiento con antidiarreicos, ni antibióticos como sulfamidas, quinolonas y fluoroquinolonas, ya que estas inducen la producción de la toxina Shiga y pueden empeorar el cuadro clínico y aumentar el riesgo de desarrollar SUH (McGannon y col., 2011; Bielaszewska y col., 2012). Se recomienda dar tratamiento con antibióticos como ceftriaxona que es una cefalosporina de tercera generación, la cual no promueve la producción de la toxina Shiga (Bielaszewska y col., 2012). En un estudio realizado en nuestra región (Sinaloa), se observó que la cepas STEC eran susceptibles a este medicamento por lo que podría utilizarse como un tratamiento eficaz en una infección por este tipo de microorganismos (Amézquita-López y col., 2016). Aproximadamente, la mitad de los pacientes con SUH requiere diálisis y el 75% requiere transfusión sanguínea (Rivas y col., 2011, Prado y Cavagnaro 2008). Para los casos que evolucionaron a SUH se está desarrollando tratamientos, en Colombia desde el 2011, se encuentra el único medicamento autorizado como tratamiento para SUH, el cual es un anticuerpo monoclonal recombinante híbrido Ig2/Ig4. Este medicamento está totalmente humanizado, es decir que está conformado por la fusión de un antígeno murino con un anticuerpo humano, esto sirve para hacer más efectivo el tratamiento y menos probabilidad de que sea rechazado por el organismo; va dirigido contra el componente C5 del complemento humano, lleva por nombre Eculizumab el cual ha demostrado mejorar de manera significativa, la evolución de la enfermedad, y

es considerado como la primera opción de terapia (Ramos y col., 2003; Córdoba y col.; 2015; Nieto-Ríos y col., 2016).

Cuando se presenta un cuadro diarreico por una infección por STEC puede evolucionar de diferentes maneras. Algunas pueden ser muy severas como los son: CH, purpura trombótica trombocitopénica y SUH, los cuales se describen en los siguientes párrafos.

La CH tiene un periodo de incubación de 2 a 10 horas. Al inicio de la enfermedad se presentan signos característicos como fuertes espasmos abdominales seguidos de una diarrea acuosa sin sangre. Luego de 1 ó 2 días, en el 90% de los casos, evoluciona a diarrea sanguinolenta. En la mayoría de los casos la evolución es favorable, pero entre 5-10% de los pacientes sufren otras complicaciones como SUH y púrpura trombótica trombocitopénica (Rivas y col., 2011).

La púrpura trombótica trombocitopénica es una enfermedad que se manifiesta en adultos, principalmente en ancianos. Se caracteriza por una anemia hemolítica microangiopática, trombocitopenia y fiebre, pudiendo llegar a producir trastornos neurológicos e insuficiencia renal aguda. La enfermedad puede presentarse solo unas horas hasta algunas semanas, esto dependiendo del estado del paciente. Si la enfermedad progresa al sistema nervioso central y a los riñones, se observan algunos signos neurológicos como modificación en el comportamiento, confusión y delirio que pueden asociarse con crisis de epilepsia, y anomalías en el campo visual, pudiendo terminar en estado de coma y muerte

(Doyle y col., 1997; De la Rubia, 2011).

El SUH se caracteriza por anemia hemolítica, trombocitopenia y falla renal causada por trombos plaquetarios en la microcirculación renal y de otros órganos. Más de 90% de los enfermos con SUH sobrevive a la fase aguda con un adecuado tratamiento, recuperándose en la mayoría de los casos la función renal y 10% restante evoluciona hacia insuficiencia renal crónica (Noris, 2005). Existen diversas etapas entre la ingestión del alimento contaminado y el desarrollo del SUH. La primera involucra la colonización del intestino por la bacteria, la cual comienza a producir la Stx causando diarrea; debido a que las STEC no son invasivas, el pasaje de la toxina a la circulación se realiza a través del epitelio intestinal (Acheson y col., 1996; Hurley y col., 1999). Las toxinas Shiga (Stx) poseen una estructura del tipo AB₅ en la que B identifica y se une específicamente a las células blanco; A es la parte catalítica que inactiva irreversiblemente a los ribosomas, con lo cual se bloquea la biosíntesis de proteínas (Jiménez y col.; 2012), esto se lleva a cabo con la participación de una proteasa denominada furina (Gordon y col.; 1994). Las 5 subunidades B se unen a moléculas de globotriaosilceramida (Gb₃) que se encuentran presentes en la superficie de las células blanco, la stx₂ también puede unirse a receptores Gb₄ (Sandvig y col.; 2010). La microangiopatía trombótica es la lesión característica del síndrome, que consiste en el engrosamiento de los capilares y las arteriolas, el hinchamiento, el desprendimiento de las células endoteliales de la membrana basal y la formación de trombos de plaquetas obstruyen la microcirculación de

diversos órganos, estas lesiones afectan principalmente los riñones (Jiménez y col.; 2012).

El blanco primario de las toxinas Stx son las células del endotelio glomerular, las toxinas Stx1 y Stx2 una vez unidas a su receptor Gb3 desencadenan una serie de señales como movilización de los leucocitos, formación de trombos de plaquetas y deposición de fibrina los cuales favorecen al desarrollo de la disfunción vascular (Obrig y col.; 1993; Jiménez y col.; 2012). La unión Stx-célula endotelial estimula la producción de NFkB que a su vez promueve la producción de MCP-1, IL-8 y FKN (fractalina) que en sinergia con moléculas de adhesión favorecen la acumulación de los leucocitos y su fijación a las células endoteliales (Zoja y col.; 2013).

Las toxinas Stx dañan a las células endoteliales en los primeros días de la infección, aún antes de que ocurra la diarrea hemorrágica. Este daño genera trombina que provoca el depósito de fibrina en la microvasculatura lo que puede aumentar el daño trombótico (Chandler y col.; 2002). La formación de trombos esta mediada por la participación de la molécula de PECAM-1, la integrina $\alpha\beta_3$ y la selectina P, y que con la participación del factor de Von Willebrand (VWF) promueven la formación de trombos los cuales pueden ser o no oclusivos. Después de la fijación de la toxina se produce la invaginación de la membrana plasmática formando las conocidas hendiduras recubiertas de clatrina denominadas también coated pits (Torgersen y col.; 2005). La toxina Stx regula su entrada en las células a través de la membrana plasmática, así como su

transporte retrógrado al retículo endoplásmico rugoso (Romer W y col.; 2007, Walchli y col.; 2008). Las toxinas Shiga, se transfieren al aparato de Golgi desde los denominados “endosomas tempranos”, una ruta que es independiente de Rab-9 (Sandvig y col.; 2002). Estos endosomas transportan la toxina al aparato de Golgi en donde se libera la toxina en su parte “trans”. Este transporte parece ser dependiente de las proteínas fijadoras de GTP, Rab11 y Rab6 (Mallard y col.; 2002). Posteriormente, la toxina es transferida al retículo endoplásmico rugoso y, desde allí, la cadena A es translocada al citosol, en donde ejerce su acción sobre los ribosomas citoplasmáticos 80S (Sandvig y col.; 2002). Este proceso es muy importante, porque determina la posibilidad de contacto directo entre las cadenas A1 y los ribosomas, si no se produce la translocación de una manera eficiente no se ataca a los ribosomas, y por consecuencia no hay toxicidad ni estrés ribotóxico (Jiménez y col.; 2012).

E Reservorio y vías de transmisión de STEC

Las bacterias STEC son consideradas uno de los principales patógenos emergentes que presentan gran impacto en los brotes transmitido por alimentos y agua contaminada, y representa un grave problema de salud pública, siendo su principal reservorio el ganado bovino (Parma y col., 2000; Cobbold, y col., 2001; Meichtri y col., 2004). Sin embargo, en diferentes trabajos de investigación, han encontrado que se pueden presentar cepas STEC en el tracto gastrointestinal de animales domésticos como ovejas, cabras, búfalos, cerdos, perros y gatos

(Beutin y col., 1993; Caprioli y col., 2005; Bentancor y col., 2007; Oliveira y col., 2007). También pueden encontrarse cepas STEC en animales de vida silvestre (Leotta y col., 2006); sin embargo, la fuente más importante de infecciones humanas es el ganado vacuno, ya que las heces pueden contaminar la carne, productos lácteos, vegetales y agua (Rovira y col., 2012).

En estudios realizados en Argentina, se demostró que los serotipos frecuentes en el ganado son O2:H25, O8:H16, O8:H19, O11:H14, O26:H11, y O113:H21, entre otros; mientras que en el ganado brasileño los serotipos más prevalentes fueron O4:H4, O82:H8 y O113:H21 (Guth y col., 2003). En Argentina se ha reportado la presencia de STEC O157 en hamburguesas de pollo, pollo poco cocinado o crudo y en canales de pollo y mediante fagotipificación, genotipificación y PFGE encontraron cepas idénticas (Chinen y col., 2009). En un estudio realizado en Irán se reportó la presencia de STEC en carnes, la mayor frecuencia se observó en carne picada de res con un 23.5%, seguido de un 23% en pollo (Panahee y Pourtaghi, 2016).

Los alimentos contaminados con heces son la principal vía de transmisión de STEC O157 y no-O157, como por ejemplo, carne molida, productos cárnicos crudos o insuficientemente cocidos, hamburguesas, embutidos fermentados, leche no pasteurizada ni hervida, yogurt, quesos, mayonesa, papas, lechuga, brotes de soja y alfalfa, jugos de manzana no pasteurizados, y agua, entre otros (OMS, 1997; Rivas y col., 2003; Caprioli y col., 2005; Oteiza y col., 2006). En la Argentina, se detectó un 8.4% de STEC no-O157 en hamburguesas congeladas

(Gómez y col., 2002) y un 3.9% de STEC O157 en productos cárnicos (Chinen y col., 2001).

En Estados Unidos se reportan varios brotes donde se involucra a O157:H7, y se relacionan directamente con el ganado bovino. En 2015, el brote se relacionó con personas que visitaron el festival de la leche, realizado en la ciudad de Lynden, en el condado de Whatcom, Washington, se reportaron 20 casos de los cuales, 9 fueron hospitalizados y 4 desarrollaron SUH; otro caso se dio en el condado de Oxford-Maine en octubre del 2015, cuando niños asistieron a un zoológico, en este brote se reportó una muerte de un niño de 20 meses; en 2016, se informó de 10 casos por el consumo de leche de cruda y otros que visitaron una granja de productos lácteos, tres personas desarrollaron SUH, siendo el serogrupo O157 el que estuvo involucrado en ocasionar las enfermedades (ISID, 2016).

En México también se han realizado algunos estudios como lo es el que se efectuó en un rastro de Guadalajara, Jalisco en el cual se analizó carne de res y se identificó O157:H7 en un 2.7% (Varela-Hernández y col., 2007). Estudios realizados en Sinaloa, mostraron la presencia de diferentes serotipos en ganado de corral (vacas, ovejas y pollo), donde encontraron O157:H7, O8:H19, O75:H8, O111:H8, O146:H8, O146H2, en las vacas se presentó STEC en una frecuencia del 5%, en ovejas un 25% y en pollos 4.2% (Amézquita-López y col., 2012).

El desarrollo de enfermedades o brotes presentados por STEC están relacionados principalmente con el contacto directo o indirecto con las heces del

ganado bovino, las cuales pueden contaminar de diferentes formas los productos agrícolas. Esto puede ser ocasionado por la fertilización de los cultivos con abono (materia fecal), o por contaminación durante la cosecha o procesamiento de los mismos, o quizás por contaminación cruzada durante la preparación de los alimentos, así como el contacto directo del hombre con los animales, y persona a persona por la ruta fecal-oral (Rivas y col., 2008). El grupo de bacterias STEC se diferencia de otras *E. coli* principalmente por sus características fenotípicas y genotípicas por lo que es necesario conocer éstas características, para lo que se han desarrollado diferentes técnicas de detección molecular.

F Caracterización de STEC

Las cepas patógenas de *E. coli* se diferencian del resto de las cepas no patógenas, por lo que es necesario su caracterización para poderlas diferenciar correctamente. Para lo cual, se han desarrollado diferentes clasificaciones tomando en cuenta las características fenotípicas y genotípicas de *E. coli*. Los siguientes métodos son utilizados para su clasificación (Tenover y col., 1999; Swaminathan y Matar, 2001).

1 Marcadores fenotípicos

Sirven para detectar características expresadas por los microorganismos, los métodos a utilizar son biotipado, serotipado, fagotipificación, antibiograma y ensayos de adherencia en cultivos celulares (Romeu, 2012).

a Biotipado bioquímico

El biotipado bioquímico sirve para identificar las cepas por la capacidad de poder degradar determinados aminoácidos como la lisina, la ornitina o la arginina, o por la capacidad de poder fermentar carbohidratos como el manitol, trealosa, lactosa, ramnosa o sorbitol esto para poder indicar la presencia o ausencia de determinadas enzimas como la β -D-glucuronidasa (Romeu, 2012).

b Serotipado

Este método se utiliza para identificar los antígenos de las bacterias, el que se utiliza con mayor frecuencia en la clasificación de *E. coli* es el sistema basado en el método descrito por Kauffmann (1947). Este se basa en la detección de sus tres antígenos celulares. La serotipificación es una herramienta muy valiosa que en combinación con otros métodos puede ayudar a la identificación de cepas patógenas de esta especie (Kaper, 2005; Gyles, 2007).

La descripción de los 3 antígenos, O, H y K, otorga información muy completa sobre el serotipo, sin embargo el antígeno K por su dificultad no suele determinarse en muchos laboratorios. Describiendo solo los antígenos O y H permite determinar alrededor de 9500 serotipos diferentes (Bettelheim y col., 2003).

c Resistencia a antimicrobianos

El método de difusión en disco de Kirby-Bauer, se utiliza para conocer la

susceptibilidad de las bacterias a ciertos antibióticos y consiste en depositar en la superficie de agar de una caja Petri previamente inoculada con la suspensión bacteriana, los discos se encuentran impregnados con antibiótico, el filtro absorbe agua y el antibiótico se difunde al agar, formándose un gradiente de concentración. Se incuba durante 18 horas a 37° C, los discos aparecen rodeados por una zona de inhibición. Dependiendo del tamaño del halo de inhibición las cepas se clasifican como sensibles, intermedio o resistentes de acuerdo con los criterios de interpretación de CLSI (2008)

En estudios realizados en los últimos años se observa un incremento muy relevante de la resistencia a los antibióticos para STEC O157:H7 y no O157:H7 (Colello y col., 2015). Esto se debe al uso inapropiado de antibióticos en animales, humanos y en vegetales ya sea para curar enfermedades o para ayudar al crecimiento (Murillo y col., 2011). En las enfermedades ocasionadas por STEC existe una relación con el uso inadecuado de antimicrobianos, y el aumento del riesgo de padecer el SUH (Bielaszewska y col., 2012). Esto debido a que cuando se utiliza un antibiótico inadecuado, aumenta la producción Stx y al ocurrir la lisis de la bacteria se libera la toxina por lo que aumenta la concentración de Stx libre y aumenta la probabilidad de desarrollar el SUH; este efecto se puede observar con el uso de antibióticos de los grupos de sulfonamidas, quinolonas y fluoroquinolonas; como son: trimetoprima con sulfametoxazol y ciprofloxacino (McGannon y col., 2010; Bielaszewska y col., 2012). Para evitar que ocurra lo anterior se recomienda dar tratamiento con

antibióticos que no promueven la producción de la toxina Shiga, como lo es el caso de la ceftriaxona, cloranfenicol, azitromicina, meropenem y rifamiximina (McGannon y col., 2010; Bielaszewska y col., 2012). Amézquita-López y col. en 2014 determinaron que las cepas aisladas de STEC presentaron susceptibilidad a ceftriaxona, por lo que este se podría utilizar como un tratamiento eficaz para infecciones por STEC.

d Ensayos en cultivos celulares para observar la actividad de las toxinas

Con la finalidad de mejorar la seguridad alimentaria se ha tenido la necesidad de desarrollar nuevas metodologías para detectar y /o inactivar las toxinas que producen las bacterias, es por eso que se han desarrollado diferentes ensayos en cultivos celulares donde se observa la actividad de las toxinas (Quiñonez y col., 2009).

Debido a la necesidad de conocer la actividad de las toxinas se han desarrollado diferentes estudios, donde se analiza la actividad de Stx, se mide como una función de la viabilidad celular. Estos estudios presentan la desventaja de ser muy tardados ya que requiere varios días de incubación y por lo general produce datos cuantitativos muy bajos (Paton y col.; 1998; Bettelheim y Beutin, 2003). Se desarrollaron otros ensayos que son más sensibles y dan una mejor cuantificación, en estos estudios realizaron la incorporación de aminoácidos radiactivos en las proteínas recién sintetizadas (Hovde y col., 1988; Obrig y col.,

1993). Sin embargo, son muy laboriosos, requieren el uso de radioisótopos y permiten un número muy bajo de ensayos (Song y col., 2005). En estudios posteriores se hicieron ensayos que eran libres de células radioactivas, pero estos requieren altas concentraciones de toxina, y kits comerciales para observar si se inhibe la síntesis de proteínas (Pastrana y FitzGerald 2006). En el 2008 Zhang y col., desarrollaron un método libre de células, ensayo que se utiliza para detectar la toxina Shiga, y ofrece muy buena sensibilidad, el cual es un ensayo de inmuno-PCR.

Otro ensayo desarrollado para observar la intoxicación por la toxina Shiga es en el que se evalúa la pérdida de la expresión de luminosidad de una luciferasa, esto inducido por una toxina (Zhao y Haslam, 2005). Posteriormente, se realizó un estudio similar donde se observó la pérdida de la luminosidad pero no utilizando el sistema de luciferasas, ya que requiere mayor tiempo para su estudio. Quiñonez y colaboradores (2009) desarrollaron un sistema cuantitativo que logra validar, y proporciona resultados reproducibles en pasos simples con alto grado de sensibilidad, utilizaron una línea celular Vero con una variación de la proteína verde fluorescente (vida media de 2 h). Lo utilizaron en la detección de Stx2, y sus posibles inhibidores en la actividad de la toxina. Este proceso es más sencillo de realizar, y se puede hacer en una gran cantidad de muestras al mismo tiempo, solo se requiere el uso de un lector de placas de fluorescencia y negro, y microplacas de 96 pocillos con fondos transparentes. Este sistema también puede servir para otras toxinas, ya que no es específica, y también es

de gran utilidad para realizar estudios sobre posibles inhibidores de una toxina.

2 Marcadores genotípicos

Se utilizan para conocer las características no expresadas y se basan en identificar directamente las características del ADN cromosomal y extracromosomal, para esto se utilizan diferentes técnicas como son reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés), electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE, por sus siglas en inglés), análisis plasmídicos, análisis de enzimas de restricción (REA, por sus siglas en inglés), restricción de fragmentos de amplio polimorfismo (RFLP, por sus siglas en inglés) (Romeu, 2012).

a Genotipado

El genotipado se utiliza para complementar los métodos tradicionales de tipificación, para lo que se han desarrollado una serie de técnicas moleculares basadas en la caracterización del genotipo microbiano mediante los análisis del ADN plasmídico y cromosómico. El análisis del ADN plasmídico permite identificar el plásmido que contiene los genes que le confieren la virulencia a la bacteria (Kariuki y col., 1999; Garaizar y col., 2000; Liébana y col., 2001; Rascón y Mora; 2015).

En los métodos de análisis cromosómico se han desarrollado diferentes técnicas moleculares que se utilizan para conocer el cromosoma bacteriano como lo realizado por Old y Threlfall en 1998, que utilizaba la comparación de

rRNA para conocer la relación filogenética de las bacterias.

Dentro de los métodos basados en el análisis del ADN cromosómico para *E. coli* se encuentran:

b Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La PCR se utilizó por primera vez a mediados de 1980, su metodología fue descrita por el químico Kary Mullis, con el objetivo de replicar el ADN (Mullis y col., 1986). Se utilizó para diagnosticar anemia y en la medicina forense. Es un método muy sensible y selectivo, que tiene la capacidad de amplificar regiones específicas de un gen. Se lleva a cabo en varios ciclos que duplican el ADN, constan de 3 etapas: la primera etapa es la desnaturalización, es donde se separa la cadena doble del ADN en dos cadenas simples, esto por efecto de las altas temperaturas, el rango de las temperaturas utilizadas pueden estar entre 90°C-95°C. La segunda etapa es conocida como etapa de alineamiento o hibridación, la temperatura disminuye a 55°C aproximadamente causando que el oligonucleótido se una al ADN. La tercera etapa se conoce como extensión, la temperatura se incrementa hasta 72°C, es la temperatura ideal para que la enzima ADN polimerasa actúe extendiendo los oligonucleótidos. Una reacción se lleva a cabo entre 20 y 40 ciclos, lo cual da como resultado cerca de un millón de copias de un segmento de doble cadena de ADN. El producto de amplificación de PCR se visualiza por electroforesis en un gel de agarosa. La principal ventaja de PCR es que puede utilizar cantidades muy pequeñas de ADN, sin embargo,

una de sus desventajas que se encuentran que se aplica solo cuando se buscan fragmentos cortos de ADN, por lo general de menos de 5kb. Para el estudio de las bacterias STEC se han utilizado variantes de la PCR como PCR múltiple y PCR tiempo real (Paton y col., 1998; Estrada-García y col., 2005 y 2009; Amézquita-López y col., 2012; Guzmán-Hernández y col. 2016).

La PCR ha permitido detectar genes de virulencia específicos de *E. coli* y conocer el grado de patogenicidad, determinar los serotipos, plásmidos de virulencia, plásmidos de resistencia y genes que codifican para la producción de toxinas (Ahmed y col., 2008; Delicato y col., 2003; Ewers y col., 2003; Loukiadis y col., 2006, Literak y col., 2010 Quiñones y col., 2012, Amézquita-López y col., 2012 y 2014).

c Electroforesis en gel de campos pulsados (PFGE)

La electroforesis en gel de campos pulsados es una técnica que se describió por primera vez en 1984 como una herramienta para el estudio del ADN cromosómico de los organismos eucariotas (Schwartz y Cantor, 1984). Es una técnica con alta discriminación, estable y reproducible, muy útil para conocer una posible relación filogenética en casos aislados o brotes. Es considerado como el principal método de elección para estudios de epidemiología molecular en bacterias patógenas como *Pseudomonas* spp., *Mycobacterium* spp., *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp., y *Escherichia coli*, incluyendo a las bacterias STEC (Tenover y col., 1995; Singh y col., 2001; Jay y col., 2007; Acedo-

Félix y col., 2009; Amézquita-López y col.; 2012). Para esta técnica se utilizan enzimas de restricción las cuales fragmentan el ADN, este producto es cargado en un gel de agarosa, el cual es sometido a un campo eléctrico y los fragmentos son separados de acuerdo a su tamaño y generan su huella genética, estos datos son analizados por un software como BioNumerics e indica la relación que puede existir entre las cepas analizadas (CDC, 2016).

IV HIPÓTESIS

Existen cepas de E. coli productoras de toxinas Shiga en las heces de animales de corral y agua de río de Culiacán, Sinaloa, y las cuales presentan al menos 1 de los principales factores de virulencia, así como diferentes perfiles de resistencia antimicrobiana.

V JUSTIFICACIÓN

Los principales problemas de salud pública a nivel mundial son las enfermedades bacterianas, las cuales pueden afectar a toda la población y principalmente a niños menores de 5 años. En la actualidad, el detectar la frecuencia de los agentes causales ha sido subestimado, debido a que en algunos países como México, no se lleva a cabo la identificación rutinaria de dichos agentes, tales como las bacterias STEC. A pesar de los grandes esfuerzos de la Secretaría de Salud en México, todavía se consideran un gran número de casos agrupados como “infecciones intestinales por otros organismos y las mal definidas”, así como casos por “intoxicación alimentaria bacteriana”; tan solo en Sinaloa, en la semana 52 del 2016 (25-31 de dic), se reportó un acumulado de 113,336 casos y 858 casos respectivamente. Debido a que se desconoce el agente causal de estos reportes, se puede estimar que un gran porcentaje de estos casos pueden ser ocasionados por bacterias STEC, ya que este agente es considerado como uno de los principales agentes causante de enfermedades gastrointestinales reportadas a nivel mundial y se ha demostrado su presencia en Sinaloa. Tomando en cuenta que en nuestra región ya se han reportados estudios donde se han aislado bacterias STEC en las heces de los principales reservorios y en alimentos listos para comer, lo cual sugiere que representan un riesgo para la población. Esto aunado a que los animales portadores de las bacterias STEC se encuentran a orillas de los ríos de la región, estos cuerpos de agua pueden contaminarse y a su vez contaminar los campos agrícolas,

generando que se contaminen frutas y hortalizas con bacterias STEC, y pudieran servir como vehículo para transmitir las bacterias a la población. Por lo que es de suma importancia analizar el agua de los ríos y heces de animales de corral de nuestra región, y así poder conocer la incidencia y las características fenotípicas y genotípicas de las cepas STEC presentes, lo cual permitirá conocer el perfil de virulencia y de resistencia, así como el riesgo que pudieran representar estas cepas para nuestra comunidad.

VI OBJETIVO GENERAL

A Objetivo General

Caracterizar fenotípica y genotípicamente las poblaciones *Escherichia coli* productoras de toxinas Shiga (STEC) aisladas de aguas de río y heces de animales de corral en Culiacán, Sinaloa

B Objetivos Específicos

1. Aislar cepas de *Escherichia coli* productoras de toxinas Shiga (STEC) de muestras de heces de animales de corral (pollos, vacas y ovejas) y agua de río.
2. Identificar los principales factores de virulencia de STEC.
3. Clasificar las cepas obtenidas en los grupos de bacterias STEC O157 y no O157.
4. Evaluar el perfil de resistencia de las cepas STEC aisladas.

VII MATERIALES Y MÉTODOS

La estrategia experimental consistió en la toma de muestras de agua de río y heces de vacas, pollos y ovejas. De las muestras de agua se midió la temperatura, pH, turbidez y conductividad. El aislamiento de las cepas presuntivas STEC se llevó a cabo en el laboratorio 22 de biocombustibles y catálisis heterogénea, ubicado en la Facultad de Ciencias Químico Biológicas. La confirmación de cepas STEC, la caracterización de sus factores de virulencia, clasificación en grupos O157:H7 y no O157 y perfil de resistencia, se realizó en el laboratorio de la unidad de metrología ubicado en el centro de investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco A.C., Unidad Guadalajara, Jalisco.

A Recolección de las muestras

La toma de muestras de agua de río y heces de animales de corral se llevó a cabo en el periodo de Octubre 2016 a Enero 2017, en la zona Noroeste de México. Los puntos de muestreo son Jotagua (24.862816 N,-107.270656 W), Agua caliente (24.929058 N,-107.387967 W) y San Pedro (24.777599 N,-107.571019 W), Sinaloa (Figura 1). Para el muestreo de agua se utilizó el dispositivo de Moore, siguiendo la metodología propuesta por Cooley y col. (2013). Este dispositivo se colocó dentro del agua a unos 30 cm de profundidad (Figura 2), se retiró a las 72 horas. El día de la colocación y retiro de dispositivo Moore se midió la temperatura del agua y del ambiente, además se tomaron muestra para la medición de pH, turbidez y conductividad. Para las muestras de

heces de animales de corral (res, pollo y oveja), se recolectaron aproximadamente 50 g de cada muestra, ya que se recolectaron las muestras se transportaron a 4°C hasta llegar al laboratorio número 22 de biocombustibles y catálisis heterogénea, ubicado en la Facultad de Ciencias Químico Biológicas. A las muestras se le designó un código de identificación: "Xx0n" donde X: representa el punto de muestreo, y puede ser A=Jotagua, B=Agua caliente y C= San Pedro; x: fuente de muestreo siendo a=agua, v=vaca, p=pollo y o=oveja; 0n: número de muestreo donde n puede ser 1, 2, 3, 4, 5, 6).

Estrategia experimental

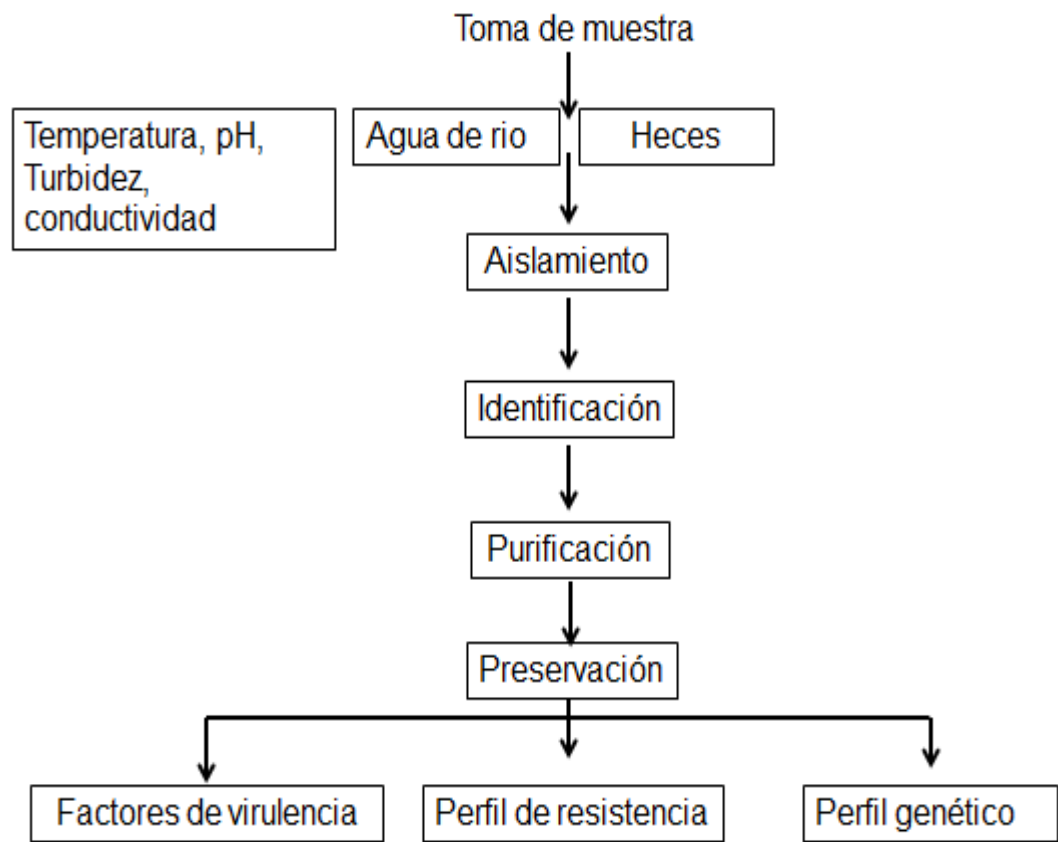


Figura 1. Estrategia experimental de la metodología empleada

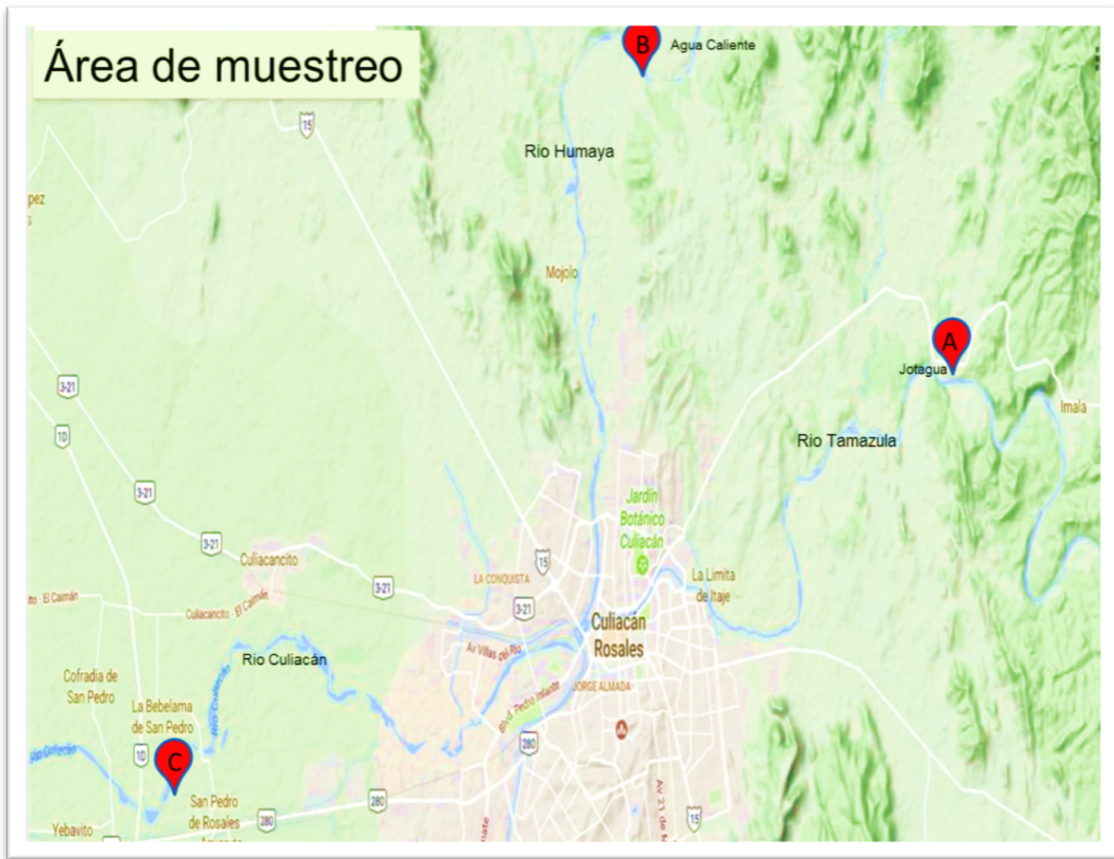


Figura 2. Distribución de los puntos de muestreo en Culiacán, Sinaloa
A: Jotagua, B: Agua Caliente, C: San Pedro

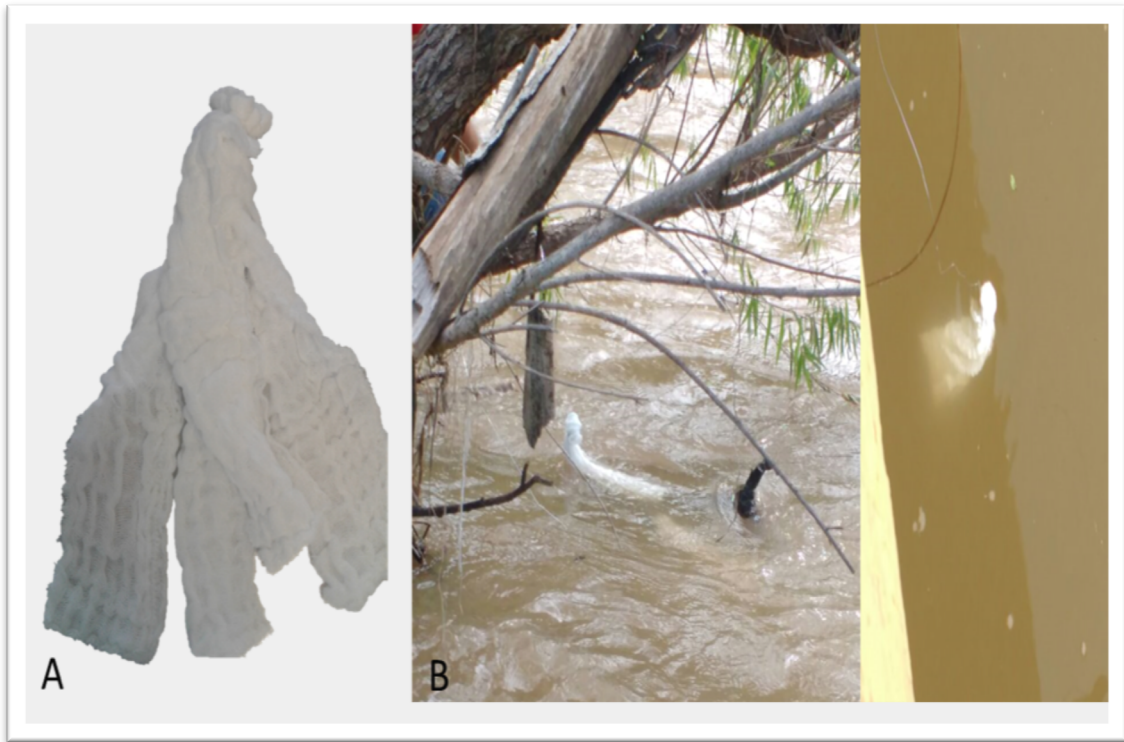


Figura 3. Dispositivo de Moore

A: Dispositivo de Moore, B: Colocación del dispositivo.

B Aislamiento de cepas de *Escherichia coli* productora de toxinas Shiga (STEC) de agua de río y heces de vacas, pollos y ovejas

A las cepas seleccionadas en el aislamiento se les designó el mismo código de identificación acorde al de la muestra, y se añadió un número al final para identificar la cepa. e.g. "Xx0n-i" (X: punto de muestreo, x: fuente de muestreo, n: número de muestreo y -i: número de cepa).

El aislamiento de las cepas STEC se llevó a cabo mediante el método desarrollado por Amézquita-López y col. (2012), con algunas modificaciones: en un recipiente estéril se pusieron 90 mL de TSB 1X y se añadieron 10 g de muestra de heces. Para las muestras de agua, el dispositivo de Moore se colocó en un recipiente estéril, se le añadieron 225 mL de agua estéril y posteriormente 25 mL de TSB 10X. Se pusieron a incubar durante 2 h a 25°C con agitación a 90 rpm, concluido este tiempo se continuó la incubación a 42°C durante 8 horas manteniendo la agitación. Transcurrido el tiempo de la incubación, se procedió a realizar la separación inmunomagnética (IMS, por sus siglas en inglés) de la siguiente manera; se tomó 1 mL del cultivo obtenido de la incubación, y se colocó en un tubo eppendorf, se le añadieron 20 µL de perlas magnéticas de anticuerpos anti-O157 (Invitrogen/Dynal), posteriormente a las perlas se les realizó cuatro lavados con Buffer fosfato salino (PBS, por sus siglas en inglés); y se resuspendieron en 100 µL de PBS, de esta mezcla se tomaron 50 µL para sembrarlos por extensión en placas que contienen CHROMagar O157, el cual es selectivo para *E. coli* O157. Las placas se incubaron a 37°C durante 24 horas.

Las cepas presuntivas que se aislaron en CHROMagar O157 se apreciaron las diferente morfología, que van desde un color lila, rosa, turquesa o azul (Figura 3). Las colonias seleccionadas como presuntivas para bacterias STEC se resembraron hasta lograr la purificación de las cepas, no obstante, estos resultados se obtuvieron tras realizar una modificación en la metodología, la cual se aplicó a partir del segundo muestreo, debido a que durante el primer muestreo se observó que en las placas de CHROMagar O157, había demasiado crecimiento de la flora bacteriana y una gran cantidad de cepas presuntivas de STEC, lo cual era un impedimento en la recuperación de las cepas. Por lo tanto, el procedimiento se modificó en la etapa de lavado. Aumentando de dos a cuatro lavados para disminuir el crecimiento de la flora microbiana. Consecuentemente, al analizar las muestras con esta modificación se observó una disminución del crecimiento bacteriano en la placa y un mejor resultado en la recuperación de cepas STEC. Posteriormente, se procedió a realizar la confirmación por medio de Reacción en Cadena de la polimerasa múltiple (PCRm, por sus siglas en inglés). Las cepas que se confirmaron como STEC se almacenaron para realizar los estudios posteriores.

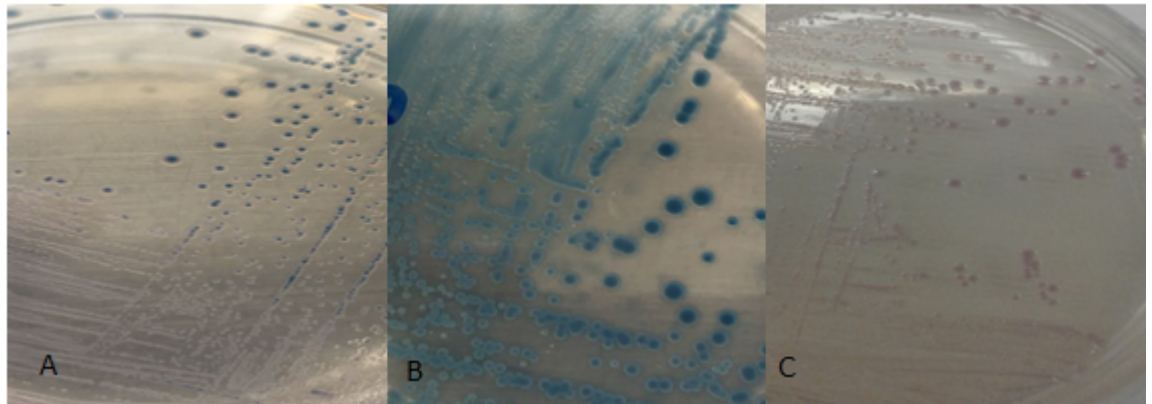


Figura 4. Morfología de las colonias seleccionadas

A: Azul con perímetro rosa, B: Azul con perímetro Blanco, C: Rosa

C Confirmación de cepas STEC y caracterización de los principales factores de virulencia

Para realizar la confirmación de las cepas STEC e identificar los principales factores de virulencia, se utilizó la metodología propuesta por Quiñones y col. (2012) y Amézquita-López y col. (2012), con algunas modificaciones. Las cepas purificadas se colocaron en un caldo de enriquecimiento (TSB) y se incubaron durante 24 horas a 37°C. Seguido de este paso, se hizo la extracción de ADN por lisis celular por temperatura, utilizando 1000 µL de la suspensión obtenida en el paso anterior, se centrifugó a 4,000 x rpm durante 10 min. Con mucho cuidado se decantó el sobrenadante, la pastilla obtenida se resuspendió de nuevo en 500 µL de agua inyectable y se agitó con ayuda de un Vortex. Se tomaron 100 µL, se procedió a realizar la lisis en el termociclador, programando una temperatura inicial de 95°C durante 30 segundos, seguido de 20 min a 100°C, terminando a 4°C, se centrifugó nuevamente a 7,000 x rpm durante 4 min. La suspensión que se obtuvo se utilizó como ADN molde para la realización de la PCR múltiple. Los oligonucleótidos utilizados son los descritos previamente por Quiñones y col. (2012). Las secuencias y el tamaño del amplicón se muestran en el Cuadro 2.

Para realizar la PCRm se utilizaron 5 µL de la suspensión obtenida de la lisis, 5 µL de buffer, 2 µL de MgCl₂, 1 µL dNTP's, 0.63 µL de primers para *stx1* y *ee*, 1 µL de primers para *stx2*, 1.25 µL de primers para *ehxA* y 0.25 µL GoTaq polimerasa, y 14.19 µL de agua grado inyectable con un volumen total de la

mezcla maestra de 25 μ L. El termociclador se programó con las siguientes condiciones: desnaturalización inicial de 95°C durante 10 min, desnaturalización a 95°C por 1 min, temperatura de alineamiento a 52°C por 2 min y elongación a 72°C por 1.5 min, este ciclo se repite en 10 ocasiones, desnaturalización a 95°C por 1 min, temperatura de alineamiento a 55°C por 2 min y elongación a 72°C por 1.5 min, este ciclo se repite en 20 ocasiones. Desnaturalización a 95°C por 1 min, temperatura de alineamiento a 60°C por 2 min y elongación a 72°C por 1.5 min, este ciclo se repite en 5 ocasiones y por último, una elongación final a 72°C por 10 min. Terminado este proceso, se tomó 10 μ L de muestra del producto de PCR y se sometió a electroforesis en un gel de agarosa al 2 % teñido con 0.04 μ L/mL de GelRed Nucleic Acid Stain (Phenix Research, Candler, NC, USA). Terminado este proceso el gel se observó en un fotodocumentador para observar si se presentó amplificación.

Cuadro 2. Secuencias de los oligonucleótidos utilizados para la PCRm

Gen	Secuencia	Tamaño de amplicón	Referencia
<i>stx1</i> (Todas las variantes)	F-5' - GGATGCAGATAAATCGCCAT-3'	274 pb	Quiñones y col. 2012
	R-5' - GAGTCTTGTCCATGATAGTC-3'		
<i>stx2</i> (Todas las variantes)	F-5' - GATTTYDCACATATWTCAGTCC-3'	155 pb	Quiñones y col. 2012
	R-5' - AACTCCATTAAMKCCAGATATGA-3'		
<i>eae</i>	F-5' - CGTTACATTGACTCCCGCTT-3'	188 pb	Quiñones y col. 2012
	R-5' - CTCATGCGGAAATAGCCGTT-3'		
<i>ehxA</i>	F-5' - GAGTTCTGTATCTGCGGGAG-3'	339 pb	Quiñones y col. 2012
	R-5' - GCAAGTTCACCGATCTTCTC-3'		

D Serotipificación para STEC O157:H7

La serotipificación se hizo mediante PCR en tiempo real para la identificación del serotipo de *E. coli* O157:H7, de esta manera se agruparon las cepas en STEC O157 y no-O157. Para llevar a cabo la detección de *E. coli* O157:H7 se utilizó el método estandarizado en el Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco A.C.

Para realizar la PCR tiempo real se utilizó el kit iQ-Check™ *E. coli* O157:H7 Kit Cat #: 357-8114 de BIORAD. Primeramente se puso a crecer la bacteria en buffer de agua peptonada y se incubó durante 24 horas. Una vez que se tiene el crecimiento bacteriano, se agitaron los reactivos de lisis y se hizo una mezcla de 100 µL y se colocaron en tubos de 2 ml, se les agregó 100 µL del crecimiento bacteriano, se incubó en un baño seco durante 15 minutos a 95-100°C, se dejó enfriar y se agitó con el vortex. Posteriormente, se centrifugaron las muestras 12,000 rpm durante 2 minutos. Para preparar el mix de PCR se siguió la guía del kit, que indica las cantidades a tomar dependiendo de la cantidad de muestras. Se tomaron 45 µl del mix y se colocaron en los pocillos de la microplaca, se le añaden 5 µL de la lisis, iniciando con los blancos de PCR, lisis y medio, luego el control negativo, las muestras y por último el control positivo, este orden se sigue para disminuir la probabilidad de una contaminación. Se colocó en la placa el papel sellador, se centrifuga a 12,000 rpm /2 min, se pone la placa en el termociclador y se inició la PCR con el programa para *E. coli* O157:H7.

E Perfil de resistencia a antimicrobianos

El perfil de resistencia a antimicrobianos se llevó a cabo a través del método de difusión Kirby-Bauer, de acuerdo al Instituto de Estándares Clínicos (CLSI, 2005). Para llevar a cabo esta técnica primero se pusieron a crecer las cepas preservadas en TSA y se incubaron a 37°C por 24 h.

Se preparó una suspensión bacteriana en 7 mL de solución salina estéril a 0.87%. Se ajustó la suspensión hasta alcanzar una turbidez equivalente al 0.5 de la escala de MacFarland (concentración de 1 a 2 X10⁸ UFC/mL). De cada suspensión bacteriana se tomó una muestra con un hisopo estéril y se extendió en las placas de agar Müeller Hinton hasta obtener una adecuada distribución en toda la placa. Esto se llevará a cabo por duplicado. Finalmente, se colocaron los discos de antibióticos en las placas y se incubó a 37°C por 18 horas. La lista de antibióticos utilizados se observa en el Cuadro 3.

Transcurrido el tiempo de incubación, con la ayuda de un vernier se midió el diámetro del halo de inhibición de crecimiento bacteriano, para cada disco generado obteniendo la medida en mm. Los resultados se reportaron como Resistente, Intermedio o Susceptible, basados en las tablas para enterobacterias del Instituto de Estándares Clínicos. Se consideraran multiresistentes a las cepas con resistencia a dos o más antibióticos de diferentes clases.

Cuadro 3. Descripción de los antibióticos utilizados en el análisis de perfil de resistencia

Grupo	Antimicrobiano	Código	Concentración µg	R (mm)	I (mm)	S (mm)	Referencia
Aminoglucósidos	Amicacina	AN	30	≤14	15 – 16	≥17	CLSI, 2008
	Estreptomina	S	10	≤11	12 – 14	≥15	CLSI, 2008
	Kanamicina	K	30	≤13	14 – 17	≥18	CLSI, 2008
	Gentamicina	GM	10	≤12	13 – 14	≥15	CLSI, 2008
Penicilinas	Ampicilina	AM	10	≤13	14 – 16	≥17	CLSI, 2008
	β-Lactámicos	Amoxicilina/Ácido Clavulánico	AMC	20/10	≤13	14 – 17	≥18
Carbapenem	Imipenem	IPM	10	≤13	14 – 15	≥16	CLSI, 2008
Cefalosporinas	Cefalotina	CF	30	≤14	15 – 17	≥18	CLSI, 2008
	Ceftazidime/ Ácido Clavulánico	CAZ/CLA	30/10	≤17	18 – 20	≥21	CLSI, 2008
Sulfamidas	Trimetoprima/ Sulfametoxazol	SXT	1.25/23.75	≤10	11 – 15	≥16	CLSI, 2008
	Trimetoprima	TMP	5	≤10	11 – 15	≥16	CLSI, 2008
Quinolonas	Ácido Nalidíxico	NA	30	≤13	14 – 18	≥19	CLSI, 2008
Fluorquinolonas	Ciprofloxacino	CIP	5	≤15	16 – 20	≥21	CLSI, 2008
Polipéptidos	Colistin	CL	10	≤8	9 – 10	≥11	Andrews, 2008
Fenicoles	Cloranfenicol	C	30	≤12	13 – 17	≥18	CLSI, 2008
Tetraciclinas	Tetraciclina	TE	30	≤14	15 – 18	≥19	Andrews, 2008

R: Resistente, I: Intermedio, S: Susceptible; µg: microgramo, mm: milímetro

VIII RESULTADOS Y DISCUSIONES

A Recolección y aislamiento de cepas de *Escherichia coli* productora de toxinas Shiga (STEC) en agua de río y heces de vacas, pollos y ovejas

El presente estudio es el primero en analizar la presencia de STEC en agua de río en México, específicamente en Culiacán, Sinaloa. Considerando como puntos de muestreo las comunidades de Jotagua adyacente al Río Tamazula, Agua Caliente adyacente al Río Humaya, y San Pedro aledaño al Río Culiacán. Se obtuvieron un total de 18 muestras de agua de río durante el periodo de octubre 2016 a enero 2017. Posteriormente se llevó a cabo la recuperación de cepas presuntivas STEC.

El aislamiento de cepas STEC en heces de vaca se realizó de igual manera en los tres puntos considerados para los muestreos de agua de río. Se obtuvieron un total de 18 muestras. Debido a la disponibilidad del tipo de muestra recolectada, para el aislamiento de cepas STEC en heces de pollo solo se consideraron los puntos de Agua Caliente y San Pedro, de donde se recolectaron 12 muestras en total. De la misma manera, debido a disponibilidad de las muestras el aislamiento de cepas STEC en heces de oveja solo se consideró el punto de la comunidad de San Pedro, obteniendo un total de 6 muestras.

B Confirmación de cepas STEC y caracterización de los principales factores de virulencia

Las 54 muestras (18 de agua de río, 18 heces de vaca, 12 heces de pollo, 6

heces de oveja), se analizaron mediante PCR múltiple para identificar los factores de virulencia mediante la presencia de los genes *stx1*, *stx2*, *eae*, *ehxA*. No obstante, la presencia de uno o ambos genes de *stx1* y *stx2* en la bacteria, infiere la capacidad de esta para producir toxina Shiga y por lo tanto ser clasificada como STEC. En el Cuadro 4, se muestran los resultados obtenidos de las 54 muestras analizadas mediante PCR múltiple, del total de las muestras analizadas el 22% (12/54) resultó ser positivo para uno o dos genes *stx*. La fuente de donde provienen las muestras positivas para STEC, son de agua de río y heces de vaca. Las muestras provenientes de la comunidad de Jotagua presentan una alta incidencia de STEC en agua de río donde de las 6 muestras analizadas el 50% (3/6) fueron positivas para STEC y en heces de vaca 33.33% (2/6) (Cuadro 5). El muestreo de agua de río realizado en la comunidad de Agua caliente presentó una incidencia del 16% (1/6) positivo para STEC. La mayor incidencia de STEC resultó del 66.66% (4/6), en las muestras tomadas de heces de vaca en la zona de Agua Caliente. Las muestras de agua de río tomadas en el área correspondiente a San Pedro reflejaron resultados negativos para STEC. Mientras que las muestras de heces de vaca tomadas este último punto mostraron incidencia en un 33.33% (2/6).

La incidencia de STEC en agua de río en los sitios de muestreo de Jotagua y Agua Caliente puede ser comparada con lo realizado en la India por Ram y col. (2007) y, Duris y col. (2009) en Estados Unidos, detectaron una incidencia de STEC en agua de río de 22.66% y 25% respectivamente, en

Argentina Tanaro y col. (2013) reportan incidencia de STEC de 39.6% en heces de vaca y en agua de río un 27.8%, detectaron mediante PFGE a dos cepas STEC no O157 idénticas, que provenían de agua y otra de heces de vaca. Aunado a esto observaron patrones Xbal idénticos a los perfiles de cepas aisladas de humanos, alimentos y fuentes de origen animal incluidas en la Base de Datos de PulseNet Argentina. Los sitios de estudio sujetos a este trabajo y lo reportado, presentan semejanzas en ser zonas agrícolas y ganaderas adyacentes a ríos, lo que sugiere que es muy probable que la incidencia de STEC en agua de río de ambos casos pueda deberse por contaminación directa de las heces del ganado.

Cuadro 4. Confirmación de muestras STEC por PCR múltiple

Muestra	Fuente	Lugar de muestreo	STEC
Aa01	Agua de río	Jotagua	-
Av01	Heces de vaca	Jotagua	-
Ba01	Agua de río	Agua Caliente	-
Bv01	Heces de vaca	Agua Caliente	-
Bp01	Heces de pollo	Agua Caliente	-
Ca01	Agua de río	San Pedro	-
Cv01	Heces de vaca	San Pedro	-
Cp01	Heces de pollo	San Pedro	-
Co01	Heces de oveja	San Pedro	-
Aa02	Agua de río	Jotagua	-
Av02	Heces de vaca	Jotagua	+
Ba02	Agua de río	Agua Caliente	-
Bv02	Heces de vaca	Agua Caliente	+
Bp02	Heces de pollo	Agua Caliente	-
Ca02	Agua de río	San Pedro	-
Cv02	Heces de vaca	San Pedro	+
Cp02	Heces de pollo	San Pedro	-
Co02	Heces de oveja	San Pedro	-
Aa03	Agua de río	Jotagua	-
Av03	Heces de vaca	Jotagua	+
Ba03	Agua de río	Agua Caliente	-
Bv03	Heces de vaca	Agua Caliente	-
Bp03	Heces de pollo	Agua Caliente	-
Ca03	Agua de río	San Pedro	-
Cv03	Heces de vaca	San Pedro	+
Cp03	Heces de pollo	San Pedro	-
Co03	Heces de oveja	San Pedro	-
Aa04	Agua de río	Jotagua	-
Av04	Heces de vaca	Jotagua	+
Ba04	Agua de río	Agua Caliente	+
Bv04	Heces de vaca	Agua Caliente	+
Bp04	Heces de pollo	Agua Caliente	-

Ca04	Agua de río	San Pedro	-
Cv04	Heces de vaca	San Pedro	-
Cp04	Heces de pollo	San Pedro	-
Co04	Heces de oveja	San Pedro	-
Aa05	Agua de río	Jotagua	+
Av05	Heces de vaca	Jotagua	-
Ba05	Agua de río	Agua Caliente	-
Bv05	Heces de vaca	Agua Caliente	+
Bp05	Heces de pollo	Agua Caliente	-
Ca05	Agua de río	San Pedro	-
Cv05	Heces de vaca	San Pedro	-
Cp05	Heces de pollo	San Pedro	-
Co05	Heces de oveja	San Pedro	-
Aa06	Agua de río	Jotagua	+
Av06	Heces de vaca	Jotagua	-
Ba06	Agua de río	Agua Caliente	-
Bv06	Heces de vaca	Agua Caliente	+
Bp06	Heces de pollo	Agua Caliente	-
Ca06	Agua de río	San Pedro	-
Cv06	Heces de vaca	San Pedro	-
Cp06	Heces de pollo	San Pedro	-
Co06	Heces de oveja	San Pedro	-

(+/-) Indica la presencia/ausencia del gen *stx*

Cuadro 5. Frecuencia de muestras positivas para bacterias STEC, aisladas de agua de río y heces de animales de corral

Lugar de muestreo	Fuente	Muestras STEC Positiva/número total de muestras	Porcentaje (%)
Jotagua ¹	Heces de vaca	3/6	50
	Agua de río	2/6	33.33
Agua Caliente ²	Heces de vaca	4/6	66.66
	Heces de pollo	0/6	0.00
	Agua de río	1/6	16.66
San Pedro ³	Heces de vaca	2/6	33.33
	Heces de pollo	0/6	0.00
	Heces de oveja	0/7	0.00
	Agua de río	0/8	0.00%

Coordenadas: **1** (24.862816 N,-107.270656 W), **2** (24.929058 N,-107.387967 W) y **3** (24.777599 N,-107.571019 W)

Las muestras obtenidas de heces de pollo no resultaron positivas para STEC, en ningún punto de muestreo (Cuadro 4). En Argentina, Otero y col. (2010), mostraron resultados negativos en heces de pollo para STEC siguiendo una metodología similar con el uso de la separación inmunomagnética para O157:H7. Por lo que nuestros resultados confirman que los pollos no son de los principales reservorios y que presentan muy baja incidencia de STEC. Lo cual podemos observar en lo publicado por, Amézquita-López y col. (2012), donde reportaron un 4.2% de STEC, en heces de pollo del valle de Culiacán. No obstante, el periodo y tamaño de muestreo de ese estudio fue mayor a lo realizado en este trabajo. De igual manera en Irán, Tabatabaei y col. (2011) reportaron el 4% de las muestras obtenidas como resultados positivos para STEC en heces de pollo. Sin embargo, el tamaño de muestra empleado fue 350 comparado con las doce realizadas en este estudio. Por lo tanto se puede asumir que existen otros factores que influyen en la diferencia de los resultados obtenidos con lo reportado en la literatura, como es el tamaño de muestra, la región, el periodo del muestreo y el clima.

Aunque las ovejas se consideran de los principales reservorios de STEC, en este estudio no se encontró presencia de STEC en las muestras obtenidas de las heces de oveja, existe diferencia comparado con Amézquita-López y col. (2012), estudio realizado en el valle de Culiacán, donde se reporta el 18.05% de incidencia de STEC en heces de oveja. Uno de los factores que influye en el contraste de resultados es el periodo de muestreo, durante los meses de Enero

a Junio se presentan temperaturas más elevadas (28-42°C) comparado con los meses de octubre a enero (20-37°C), las temperaturas elevadas favorecen el crecimiento de bacterias patógenas como *E. coli* y su temperatura óptima de crecimiento es de 37°C. Además, el tiempo de muestreo en lo reportado fue de 12 meses, mientras que en este estudio fue de 3 meses, lo cual influye directamente con el número de muestras, dado que ellos recolectaron 72 muestras, comparado con 6 obtenidas en este trabajo. Por lo tanto, se puede asumir que la probabilidad de encontrar STEC en heces de oveja está vinculada con el número de muestras recolectadas, el periodo de recolección y la temperatura ambiental.

La presencia de STEC en el agua de río y heces de bovino puede afectar drásticamente la agricultura y la economía de nuestro estado y país, ya que Sinaloa es considerado uno de los principales exportadores de productos agrícolas, y si estos se contaminan por STEC puede detenerse la exportación de estos productos, ya que no cumplirían con las reglamentos estipulados para la exportación de productos agrícolas como lo establece la Guía para Reducir al Mínimo el Riesgo Microbiano en los Alimentos, para Frutas y Hortalizas Frescas y en el Plan de Protección Alimenticia, donde establecen que los productos deben estar libres de STEC (FDA, 1998; FDA, 2007).

C Serotipificación para STEC O157:H7

En el Cuadro 5, se reportaron 12 muestras positivas para STEC, de las

cuales se analizaron 35 cepas presuntivas elegidas de acuerdo a su morfología observada en CHROMagar O157 (Cooley y col. 2013). De las cepas presuntivas el 54.28% (19/35) fueron positivas para STEC. Las cepas se analizaron mediante PCR múltiple para conocer sus principales factores de virulencia, se buscó la presencia de los genes *stx1*, *stx2*, *eae* y *ehxA*. De estas 19 cepas el 89.5% (17/19) es positivo para *stx1*, *stx2* y *ehxA* y para *eae* el 15.8% (3/19).

Para llevar a cabo la clasificación de las cepas en los grupos O157:H7 y no O157, se realizó PCR en tiempo real a las 19 cepas STEC obtenidas en el muestreo, dando como resultado 2 cepas positivas para O157:H7 (Cuadro 6), por lo que las 17 cepas restantes que dieron negativo para O157:H7 se clasificaron como no O157 (Cuadro 7). Las dos cepas STEC O157:H7, fueron recuperadas de la misma zona de muestro en agua de río (Jotagua, Río Tamazula), pero de distinto muestreo siendo la primera aislada del quinto muestreo (Diciembre 2016) y la segunda aislada del sexto muestreo (Enero, 2017), por lo tanto la incidencia de O157:H7 evidenciada en este estudio para Jotagua es del 33.33% (2/6). Este valor representa un porcentaje de incidencia muy alto comparado como los trabajos realizados en Canadá por Walters y col. (2007), reportando una incidencia de 13.6%, en Nigeria Chigor y col., (2010), reportan el 2.1%. Ambos trabajos concuerdan que estos porcentajes son alarmantes y suponen un riesgo para la salud. Por lo anterior se puede deducir que el porcentaje expresado para Jotagua también supone un riesgo para el sector salud y agropecuario en el estado de Sinaloa. Esto debido a que a nivel mundial O157:H7 se relaciona

mayormente con las enfermedades ocasionadas por STEC, además de causar el 74% de los casos de SUH reportados (Bentancor, 2016).

Las 2 cepas O157:H7 obtenidas en este estudio presentaron el mismo perfil de virulencia, el 100% es negativo para *stx1* y positivo para los genes *stx2*, *eae* y *ehx1A*, lo cual coincide con las cepas O157:H7, reportadas en esta zona, por Amézquita-López y col. (2012), pero obtenidas en heces de pollo, oveja y bovinos. Los factores de virulencia encontrados en estas cepas son los que mayormente se relacionan con brotes y enfermedades reportadas a nivel mundial, por lo que esto indica que pudiera existir un alto riesgo para la población de Culiacán de desarrollar una enfermedad que puede poner en riesgo la vida del ser humano, además de un gran costo para el Sector Salud para combatir esta enfermedad.

El que se halla llevado a cabo la detección de STEC en el medio ambiente de nuestra región, tanto en las heces de vaca como en el agua de río es de alto impacto, ya que de manera directa e indirecta puede llegar al ser humano y los alimentos que ingiere, y consecuentemente podría desarrollar una infección. Este tipo de bacterias tienen una gran afectación en la salud y en la economía; y en los últimos años la CDC ha reportado diversos brotes relacionados al consumo de vegetales contaminados por STEC, estos

Cuadro 6. Cepas *E. coli* O157:H7

Cepa	Fuente	Punto de muestreo	Genes identificados			
			<i>stx1</i>	<i>stx2</i>	<i>eae</i>	<i>ehxA</i>
Aa05-2	Agua de río	Jotagua	-	+	+	+
Aa06-1	Agua de río	Jotagua	-	+	+	+

(+/-) Indica la presencia/ausencia del gen

Cuadro 7. Cepas STEC no O157

Cepa	Fuente	Punto de muestreo	Genes identificados			
			<i>stx1</i>	<i>stx2</i>	<i>eae</i>	<i>ehxA</i>
Av02-2	Heces de vaca	Jotagua	+	+	-	+
Av02-3	Heces de vaca	Jotagua	+	+	-	+
Bv02-1	Heces de vaca	Agua Caliente	+	+	-	+
Cv02-2	Heces de vaca	San Pedro	+	+	-	+
Cv02-7	Heces de vaca	San Pedro	+	+	-	+
Av03-2	Heces de vaca	Jotagua	+	+	-	+
Av03-5	Heces de vaca	Jotagua	+	+	-	+
Cv03-4	Heces de vaca	San Pedro	+	+	-	+
Av04-3	Heces de vaca	Jotagua	+	+	-	+
Av04-5	Heces de vaca	Jotagua	+	+	-	+
Ba04-2	Agua de río	Agua Caliente	+	-	+	-
Bv04-1	Heces de vaca	Agua Caliente	+	+	-	+
Bv04-7	Heces de vaca	Agua Caliente	+	+	-	+
Aa05-7	Agua de río	Jotagua	+	+	-	+
Bv05-4	Heces de vaca	Agua Caliente	+	+	-	+
Aa06-4	Agua de río	Jotagua	+	-	-	-
Bv06-2	Heces de vaca	Agua Caliente	+	+	-	+

(+/-) Indica la presencia/ausencia del gen

productos se contaminan mediante el contacto directo con las heces de bovino o de manera indirecta a través de irrigación con agua contaminada (Tanaro y col. 2016).

Las cepas no O157 presentaron tres perfiles de virulencia diferentes, en el 5.88% (1/17) solo presentó el gen *stx1*, en un 88.23% (15/17) se presentó el perfil de virulencia que contiene los genes *stx1*, *stx2* y *ehxA* y otro perfil donde presentó el 5.88% (1/17) presentó el gen *eae* y *stx1*, del total de las cepas no O157, el 5.88% presentó el gen *eae*. Este último resultado es menor a lo reportado por Amézquita-López y col. (2012), donde su grupo de trabajo reporta un 10.8% de muestras positivas para el gen *eae*. Aunque su función primordial es la adhesión de la bacteria, este no es esencial para que la bacteria sea patógena, ya que bacterias con la falta de este gen se han relacionado con diversos casos de enfermedad severa y algunos brotes (Bielaszewska y col. 2011), por lo que la adherencia se puede deber a otros factores de virulencia tales como *efa 1*, *iha* y *saa*, que están involucrados durante el proceso infección (Galli y col., 2010).

Este es el primer estudio realizado en México, donde se reporta O157:H7 y no O157 aislada de agua de río. Esto es muy importante debido a que Jotagua y Agua Caliente son áreas recreacionales, y la infección se puede dar al nadar en el río, esto debido a que se ingiere de 20-50 mL por hora (OMS, 2003). Asimismo, el agua del río se utiliza para el riego de los campos agrícolas y así contaminar los productos para consumo.

C Perfil de resistencia a antimicrobianos

El análisis de perfil de resistencia se llevó a cabo siguiendo el método de Kirby-Bauer, utilizando sensidiscos con los siguientes antimicrobianos: Amikacina (AN), Amoxicilina/Ácido Clavulánico (AMC), Ampicilina (AM), Ceftazidima/ Ácido Clavulánico (CAZ/CLA), Cefalotina (CF), Cloranfenicol (C), Ciprofloxacino (CIP, Colistin (CL), Gentamicina (GM), Imipenem (IMP), Kanamicina (K), Ácido Nalidíxico (NA), Estreptomina (S), Trimetoprima/ Sulfametoxazol (SXT), Trimetoprima (TMP) y Tetraciclina (TE), se realizó la medición del halo de inhibición, de acuerdo al diámetro obtenido para cada antibiótico se clasificaron como sensible (S), intermedio (I) y resistente (R); la descripción de los antibióticos utilizados se pueden observar en el Cuadro 8. Los resultados de este estudio indican que un alto porcentaje de las cepas recuperadas son susceptibles al total de los antibióticos utilizados. El 68.42% (13/19) presentaron sensibilidad a los antibióticos utilizados. Se observó que el 31.58% (6/19) no fueron susceptibles para uno o dos antimicrobianos (Cuadro 9), lo cual difiere con lo publicado por Amézquita-López y col. (2016), donde ellos reportan susceptibilidad a 3 o más antibióticos de las cepas STEC recuperadas de esta misma región. Lo que sugiere diversas especulaciones respecto a las cepas aisladas en el 2008 y en este presente estudio. La primera se basa en que pueden ser cepas diferentes a pesar de ser aisladas en la misma región, ya que fueron diferentes animales los que se usaron como fuente de estudio y uno de los factores que pudiera influir es el fenómeno de globalización que permite el transporte indirecto de microorganismos dentro y fuera de la región. Sea por

comercialización de ganado u otras actividades económicas de la zona.

De las 19 cepas estudiadas el 15.79% (3/19) no presentaron sensibilidad para tetraciclina, el 10.52% (2/19) no fueron sensibles para ampicilina; el 10.53% (2/19) de las cepas analizadas no presentaron sensibilidad a dos antibióticos, una a trimetoprima/sulfametoxazol y a trimetoprima, y la otra fue sensible a cloranfenicol y tetraciclina (Cuadro 9).

En este estudio se puede observar que las cepas recuperadas son sensibles a la gran mayoría de los antibióticos utilizados para analizar el perfil de resistencia de las cepas STEC. Sin embargo, se debe tener suma precaución con el tratamiento indicado, debido a que el uso de antibióticos en las infecciones con STEC es muy controvertido. Al no utilizar el tratamiento adecuado puede favorecer que las bacterias produzcan una mayor cantidad de toxina Shiga, y consecuentemente genere una complicación en la enfermedad. Además, pudiera llegar a causar daño neurológico, SUH y poner en riesgo la vida del ser humano. En la Figura 4 se observa que el 100% de las cepas estudiadas son sensibles a Ciprofloxacino y el 94% a trimetoprima con sulfametoxazol. Estos antibióticos son recetados comúnmente por el sector salud para el tratamiento de las infecciones gastrointestinales en México (Zavala-González y col. 2014). Sin embargo, no se recomienda utilizar estos antibióticos como tratamiento, ya que aumentan drásticamente la producción de la toxina Shiga y aumentarían la gravedad de la enfermedad (McGannon y col. 2010; Bielaszewska y col. 2012). Se recomienda emplear antibióticos que no generan la producción de la toxina, como lo es el

caso del cloranfenicol el cual en un estudio publicado por Bielaszewska y col. (2012), reportan que el uso de este antibiótico disminuye la producción de la toxina Shiga. Las cepas evaluadas en este estudio presentan en un 94% susceptibilidad a este antibiótico por lo que se podría utilizar como un tratamiento para infecciones causadas por STEC. No obstante la OMS no recomienda el uso prolongado de cloranfenicol, debido a que el uso continuo puede causar daño hematológico, daño renal y hepático (OMS, 2004).

Cuadro 8. Resultado de análisis de perfil de resistencia

	Capa																																							
	Antibiótico																																							
	AV02-2	AV02-3	BV02-1	CV02-2	CV02-7	AV03-2	AV03-5	CV03-4	AV04-3	AV04-5	BB04-2	BV04-1	BV04-7	AA05-2	AA05-7	BV05-4	AA06-1	AA06-4	BV06-2																					
AN	18	\$	24	\$	19	\$	17	\$	15	I	17	\$	18	\$	17	\$	20	\$	24	\$	22	\$	20	\$	19	\$	18	\$	17	\$	25	\$	22	\$	20	\$	20	\$		
AMC	24	\$	25	\$	25	\$	21	\$	20	\$	25	\$	26	\$	23	\$	26	\$	24	\$	29	\$	27	\$	26	\$	23	\$	24	\$	23	\$	25	\$	20	\$	20	\$		
AM	23	\$	21	\$	24	\$	23	\$	22	\$	25	\$	24	\$	22	\$	25	\$	7	R	7	R	23	\$	23	\$	21	\$	24	\$	22	\$	15	I	20	\$	24	\$		
CAZ/CIA	25	\$	30	\$	27	\$	29	\$	22	\$	26	\$	28	\$	28	\$	30	\$	29	\$	28	\$	28	\$	23	\$	24	\$	28	\$	28	\$	32	\$	30	\$	26	\$		
CF	18	\$	17	I	17	I	19	\$	16	I	19	\$	19	\$	17	I	20	\$	23	\$	21	\$	21	\$	19	\$	16	I	18	\$	18	\$	20	\$	17	I	17	I		
C	30	\$	27	\$	30	\$	26	\$	28	\$	26	\$	21	\$	24	\$	28	\$	26	\$	23	\$	26	\$	25	\$	24	\$	25	\$	23	\$	23	\$	32	\$	8	R		
CIP	30	\$	32	\$	40	\$	27	\$	30	\$	33	\$	32	\$	34	\$	35	\$	28	\$	28	\$	42	\$	36	\$	28	\$	33	\$	33	\$	32	\$	41	\$	28	\$		
CL	13	\$	13	\$	14	\$	13	\$	12	\$	14	\$	14	\$	13	\$	14	\$	15	\$	15	\$	15	\$	13	\$	14	\$	13	\$	13	\$	14	\$	14	\$	14	\$		
GM	18	\$	24	\$	24	\$	18	\$	20	\$	19	\$	19	\$	17	\$	21	\$	21	\$	21	\$	19	\$	19	\$	18	\$	18	\$	26	\$	23	\$	21	\$	19	\$		
IPM	32	\$	22	\$	32	\$	23	\$	22	\$	30	\$	30	\$	32	I	32	\$	28	\$	26	\$	33	\$	30	\$	25	\$	26	\$	29	\$	29	\$	28	\$	28	\$		
K	17	\$	20	\$	17	I	16	I	16	I	19	\$	17	I	16	\$	18	\$	20	\$	22	\$	20	\$	18	\$	18	\$	18	\$	24	\$	21	\$	19	\$	17	I		
NA	24	\$	25	\$	24	\$	21	\$	25	\$	26	\$	26	\$	24	\$	30	\$	24	\$	22	\$	28	\$	26	\$	25	\$	25	\$	25	\$	27	\$	26	\$	26	\$		
S	13	I	14	I	13	I	12	I	12	I	13	I	12	I	12	I	14	I	17	\$	16	\$	16	\$	14	I	14	I	14	I	13	I	17	\$	15	\$	14	I		
SXT	27	\$	27	\$	25	\$	28	\$	20	\$	27	\$	27	\$	20	\$	29	\$	23	\$	24	\$	30	\$	29	\$	28	\$	26	\$	26	\$	26	\$	0	R	30	\$	25	\$
TMP	24	\$	28	\$	24	\$	30	\$	26	\$	22	\$	26	\$	22	\$	30	\$	25	\$	25	\$	32	\$	30	\$	30	\$	26	\$	28	\$	0	R	28	\$	26	\$		
TE	26	\$	27	\$	25	\$	24	\$	9	R	26	\$	23	\$	7	R	28	\$	21	\$	26	\$	28	\$	24	\$	25	\$	25	\$	21	\$	21	\$	21	\$	28	\$	8	R

a: medición de diámetro en milímetros, b: resultados; S: Sensible, I: Intermedio, R: Resistente

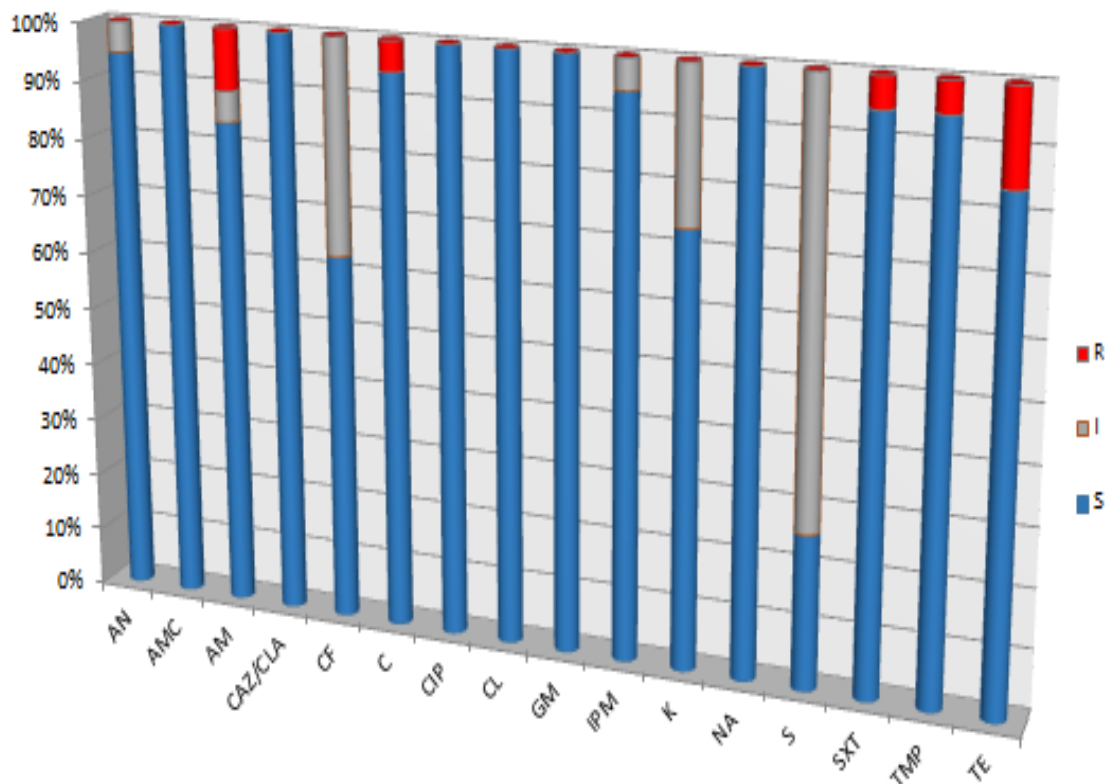


Figura 5. Análisis de frecuencia del perfil de resistencia

R: Resistente, I: Intermedio S: Sensible

AN: Amikacina, AMC: Amoxicilina/Ácido Clavulánico, AM: Ampicilina, CAZ/CLA: Ceftazidima/ Ácido Clavulánico, CF: Cefalotina, C: Cloranfenicol, CIP: Ciprofloxacino, CL: Colistin, GM: Gentamicina, IPM: Imipenem, K: Kanamicina, NA: Ácido Nalidíxico, S: Estreptomina, SXT: Trimetoprima/Sulfametoxazol, TMP: Trimetoprima, TE: Tetraciclina

Cuadro 9. Perfil de resistencia

Cepa	Fuente	Perfil de resistencia
No O157 (2)	Heces de vaca	TE
No O157 (2)	Heces de vaca	AM
O157:H7 (1)	Agua de río	SXT, TMP
No O157 (1)	Heces de vaca	C, TE

TE: Tetraciclina, AM: Ampicilina, SXT: trimetoprima/sulfametoxazol, TMP: trimetoprima, C: Cloranfenicol

IX CONCLUSIONES

1. Se aislaron cepas STEC en heces de vaca, lo cual representa una fuente de contaminación para la población de Culiacán.

2. Se confirma por primera vez la presencia de STEC O157:H7 y no O157 en agua de río, esto representa un gran problema para la salud pública, la agricultura y la economía de nuestra región.

3. Las cepas aisladas se consideran potencialmente patógenas, esto debido a que presentan los genes de virulencia *stx2*, *eae* y *ehxA*.

4. Las cepas aisladas de STEC O157:H7 y no O157, presentaron diferentes perfiles de resistencia (4), sin embargo el 94% presentó sensibilidad a Cloranfenicol, un antibiótico que disminuye la producción de toxina Shiga, por lo que se puede utilizar como una alternativa en el tratamiento de infecciones causadas por este tipo de bacterias, con los respectivos cuidados.

X BIBLIOGRAFÍA

- Acedo-Félix, E., Núñez-Hernández, Y., Pérez-Morales, R., Iñiguez-Palomares, C. M., y Castellón-Campaña, L. (2009). Caracterización polifásica de *salmonella* spp: Aislada de campos agrícolas de melón (*cucumis melo*) y cilantro (*coriandrum sativum*). *Interciencia*, 34(6), 419-423.
- Ahmed, W., Huygens, F., Goonetilleke, A., y Gardner, T. (2008). Real-time PCR detection of pathogenic microorganisms in roof-harvested rainwater in Southeast Queensland, Australia. *Applied and environmental microbiology*, 74(17), 5490-5496.
- Amézquita-López, B. A., Quiñones, B., Cooley, M. B., León-Félix, J., Castro-del Campo, N., Mandrell, R. E., Jiménez, M., y Chaidez, C. (2012). Genotypic analyses of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 and non-O157 recovered from feces of domestic animals on rural farms in Mexico. *PLoS One*. doi: 10.1371/journal.pone.0051565.
- Amézquita-López, B. A., Quiñones, B., Lee, B. G., y Chaidez, C. (2014). Virulence profiling of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* recovered from domestic farm animals in Northwestern Mexico. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 4, 7. doi: 10.3389/fcimb.2014.00007.
- Amézquita-López, B. A., Quiñones, B., Soto-Beltrán, M., Lee, B. G., Yambao, J. C., Lugo-Melchor, O. Y., y Chaidez, C. (2016). Antimicrobial resistance profiles of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 and Non-O157 recovered from domestic farm animals in rural communities in Northwestern Mexico. *Antimicrobial resistance and infection control*, 5(1), 1. doi: 10.1186/s13756-015-0100-5.
- EFSA (2015). European Food Safety Authority (EFSA) The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2013. *Journal*, 13(1).
- Beatriz Romeu Álvarez, N. R. H., Carlos A. Eslava Campos. (2012).

Caracterización de cepas de *Escherichia coli* de importancia clínica humana aisladas de ecosistemas dulceacuícolas de La Habana. (doctorado), UNIVERSIDAD DE LA HABANA.
<https://www.mysciencework.com/publication/show/6cc0273de894c7bb97a609e1a134432e>.

- Barrantes, C. G., Oneeglio, A. G., y León, R. R. (2013). Vigilancia de *Escherichia coli* O157: H7 en alimentos y aguas. *Cátedra Villarreal*, 1(1).
- Bentancor, A. (2016). Síndrome urémico hemolítico en áreas urbanas. *Revista argentina de microbiología*, 48(1), 1-4.
- Bergan, J., Dyve, L. A., Simm, R., Skotland, T., y Sandvig, K. (2012). Shiga toxins. *Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology*, 60(6), 1085-1107.
- Bergan, J., Lingelem, A. B. D., Simm, R., Skotland, T., y Sandvig, K. (2012). Shiga toxins. *Toxicon*, 60(6), 1085-1107.
- Bentancor, A. (2016). Síndrome urémico hemolítico en áreas urbanas. *Revista argentina de microbiología*, 48(1), 1-4.
- Betancur, H., Gogorza, L. M., y Martínez, F. (2007). Seroepidemiología de la diarrea viral bovina en Montería (Córdoba, Colombia). *Analecta Veterinaria*, 27.
- Bielaszewska, M., Idelevich, E. A., Zhang, W., Bauwens, A., Schaumburg, F., Mellmann, A., Peters, G., y Karch, H. (2012). Effects of antibiotics on Shiga toxin 2 production and bacteriophage induction by epidemic *Escherichia coli* O104: H4 strain. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 56(6), 3277-3282.
- Bolton, D., Duffy, G., Baylis, C., Tozzoli, R., Morabito, S., Wasteson, Y., y Lofdahl, S. (2008). Pathogenicity, Virulence and Emerging Pathogenic *Escherichia coli*. ISBN, 1(84170), 517.
- Bolton, D. J. (2011). Verocytotoxigenic (Shiga toxin-producing) *Escherichia coli*: virulence factors and pathogenicity in the farm to fork paradigm. *Foodborne pathogens and disease*, 8(3), 357-365.

- Canizalez-Román, A., Flores-Villaseñor, H. M., González-Nuñez, E., Velázquez-Román, J., Vidal, J. E., Muro-Amador, S., Alapizco-Castro, G., Díaz-Quiñonez, J. A., y León-Sicairos, N. (2016). Surveillance of Diarrheagenic *Escherichia coli* strains isolated from diarrhea cases from children, adults and elderly at northwest of Mexico. *Frontiers in Microbiology*, 7.
- Canizalez-Román, A., González-Nuñez, E., Vidal, J. E., Flores-Villaseñor, H., y León-Sicairos, N. (2013). Prevalence and antibiotic resistance profiles of diarrheagenic *Escherichia coli* strains isolated from food items in northwestern Mexico. *International journal of food microbiology*, 164(1), 36-45.
- Chigor, V., Umoh, V., y Smith, S. (2010). Occurrence of *Escherichia coli* O157 in a river used for fresh produce irrigation in Nigeria. *African Journal of Biotechnology*, 9(2).
- Colello, R., Etcheverría, A. I., Conza, J. A. D., Gutkind, G. O., y Padola, N. L. (2015). Antibiotic resistance and integrons in Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC). *Brazilian Journal of Microbiology*, 46(1), 1-5.
- Cookson, A. L., Bennett, J., Thomson-Carter, F., y Attwood, G. T. (2007). Molecular subtyping and genetic analysis of the enterohemolysin gene (ehxA) from Shiga toxin-producing *Escherichia coli* and atypical enteropathogenic *E. coli*. *Applied and environmental microbiology*, 73(20), 6360-6369.
- Cooley, M. B., Jay-Russell, M., Atwill, E. R., Carychao, D., Nguyen, K., Quiñones, B., Patel, R., Walker, S., Swimley, M., y Pierre-Jerome, E. (2013). Development of a robust method for isolation of Shiga toxin-positive *Escherichia coli* (STEC) from fecal, plant, soil and water samples from a leafy greens production region in California. *PLoS One*, 8(6), e65716.
- Córdoba, J. P., Contreras, K. M., Larrarte, C., Espitaleta, Z., González, L. E., Ibarra, M., Echeverri, J. E., Carrascal, M., Valderrama, L. A., y Prada, M. (2015). Síndrome hemolítico urémico atípico, revisión de la literatura y

- documento de consenso. Enfoque diagnóstico y tratamiento. Revista Colombiana de Nefrología, 2(1), 19-40.
- Cortés-Ortiz, I. A., Rodríguez-Ángeles, G., Moreno-Escobar, E. A., Tenorio-Lara, J. M., Torres-Mazadiego, B. P., y Montiel-Vázquez, E. (2002). Brote causado por *Escherichia coli* en Chalco, México. Salud Pública de México, 44(4), 297-302.
- De la Rubia, J., Contreras, E., y del Río-Garma, J. (2011). Púrpura trombótica trombocitopénica. Medicina Clínica, 136(12), 534-540. doi: 10.1016/j.medcli.2010.02.011
- Delicato, E. R., de Brito, B. G., Gaziri, L. C. J., y Vidotto, M. C. (2003). Virulence-associated genes in *Escherichia coli* isolates from poultry with colibacillosis. Veterinary microbiology, 94(2), 97-103.
- Díaz, C. (2003). Riesgo de enfermedades transmitidas por el agua en zonas rurales. Estado de México. <http://tierra.rediris.es/hidrored/ebooks/ripda/contenido/capitulo13.html>.
- ECDC (2011). European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC): Update on outbreak in the EU, 8 July 2011. Epidemiological updates. http://ecdc.europa.eu/en/activities/sciadvice/Pages/Epidemiological_Update.aspx.
- Duris, J. W., Haack, S. K., y Fogarty, L. R. (2009). Gene and Antigen Markers of Shiga-toxin Producing from Michigan and Indiana River Water: Occurrence and Relation to Recreational Water Quality Criteria. Journal of environmental quality, 38(5), 1878-1886.
- Eriksson, E. (2010). Verotoxinogenic *Escherichia coli* O157: H7 in Swedish cattle and pigs (Vol. 2010).
- Estrada-García, T., Cerna, J. F., Paheco-Gil, L., Velázquez, R. F., Ochoa, T. J., Torres, J., y DuPont, H. L. (2005). Drug-resistant diarrheogenic *Escherichia coli*, Mexico. Emerging infectious diseases, 11(8), 1306.

- Estrada-García, T., López-Saucedo, C., Thompson-Bonilla, R., Abonce, M., López-Hernández, D., Santos, J. I., Rosado, J. L., DuPont, H. L., y Long, K. Z. (2009). Association of diarrheagenic *Escherichia coli* pathotypes with infection and diarrhea among Mexican children and association of atypical enteropathogenic *E. coli* with acute diarrhea. *Journal of clinical microbiology*, 47(1), 93-98.
- Farrokh, C., Jordan, K., Auvray, F., Glass, K., Oppegard, H., Raynaud, S., Thevenot, D., Condrón, R., De Reu, K., y Govaris, A. (2013). Review of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and their significance in dairy production. *International Journal of Food Microbiology*, 162(2), 190-212.
- FDA. (1998). U.S. Food and Drug Administration (FDA) Guía para Reducir al Mínimo el Riesgo Microbiano en los Alimentos, para Frutas y Hortalizas Frescas. Revisado 29-Mayo-2017 <https://www.fda.gov/downloads/Food/GuidanceRegulation/UCM186594.pdf>
- FDA (2007). U.S. Food and Drug Administration (FDA) Departamento de Salud y Servicios Humanos Administración de Alimentos y Fármacos (Plan de Protección Alimenticia, Una estrategia integrada para proteger el suministro de alimentos del país. Revisado 29-Mayo-2017 <http://apps.who.int/medicinedocs/es/d/Js5422s/10.2.2.html>.
- Flores, T. G., y Herrera, R. A. R. (2005). Enfermedades transmitidas por alimentos y PCR: prevención y diagnóstico. *Salud Pública de México*, 47(5), 388-390.
- Gallegos, M., Morales, A., Álvarez, G., Vásquez, J., Morales, L., Martínez, I., y Maldonado, J. (2009). Caracterización de aislados de *Escherichia coli* O157: H7 en canales de bovinos y porcinos mediante PCR. *Revista Científica*, 19(2), 139-146.
- Galli, L., Miliwebsky, E., Irino, K., Leotta, G., & Rivas, M. (2010). Virulence profile comparison between LEE-negative Shiga toxin-producing *Escherichia coli*

(STEC) strains isolated from cattle and humans. *Veterinary microbiology*, 143(2), 307-313.

- Guerrero, J. I. R., y Montes, H. M. M. (2015). Análisis funcional de genes que participan en la elaboración de glicoproteínas en *Sporothrix schenckii*. *Jóvenes en la ciencia*, 1(2), 281-286.
- Guzmán-Hernández, R., Contreras-Rodríguez, A., Hernández-Velez, R., Pérez-Martínez, I., López-Merino, A., Zaidi, M. B., y Estrada-García, T. (2016). Mexican unpasteurised fresh cheeses are contaminated with *Salmonella* spp., non-O157 Shiga toxin producing *Escherichia coli* and potential uropathogenic *E. coli* strains: A public health risk. *International Journal of Food Microbiology*, 237, 10-16.
- Gyles, C. (2007). Shiga toxin-producing An overview. *Journal of animal science*, 85(13_suppl), E45-E62.
- Hovde, C. J., Calderwood, S. B., Mekalanos, J. J., y Collier, R. J. (1988). Evidence that glutamic acid 167 is an active-site residue of Shiga-like toxin I. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 85(8), 2568-2572.
- ISID (2016). International Society for Infectious Diseases. Subject: PRO/AH/EDR> *E. coli* EHEC - USA (13): (CT) O157, goat farm exposure, RFI. Archive Number: 20160408.4146994. <http://www.promedmail.org>
<http://www.isid.org>.
- Jay, M. T., Cooley, M., Carychao, D., Wiscomb, G. W., Sweitzer, R. A., Crawford-Miksza, L., Farrar, J. A., Lau, D. K., O'Connell, J., y Millington, A. (2007). *Escherichia coli* O157: H7 in feral swine near spinach fields and cattle, central California coast. *Emerg Infect Dis*, 13(12), 1908-1911.
- Kaper, J. B., Nataro, J. P., y Mobley, H. L. (2004). Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology*, 2(2), 123-140.
- Kariuki, S., Gilks, C., Kimari, J., Obanda, A., Muyodi, J., Waiyaki, P., y Hart, C. (1999). Genotype Analysis of *Escherichia coli* Strains isolated from children

- and chickens living in close contact. *Applied and environmental microbiology*, 65(2), 472-476.
- Literak, I., Dolejska, M., Janoszowska, D., Hrusakova, J., Meissner, W., Rzycka, H., Bzoma, S., y Cizek, A. (2010). Antibiotic-resistant *Escherichia coli* bacteria, including strains with genes encoding the extended-spectrum beta-lactamase and QnrS, in waterbirds on the Baltic Sea Coast of Poland. *Applied and environmental microbiology*, 76(24), 8126-8134.
- López, A., Ruiz, A., Cabrera, C., León, G., y Tejeda, F. (2014). Prevalencia de cepas multirresistentes de *Salmonella* spp y *Escherichia coli* 0157: H7 en alimentos crudos en la Ciudad de Puebla.
- Loukiadis, E., Kérourédan, M., Beutin, L., Oswald, E., y Brugère, H. (2006). Characterization of Shiga toxin gene (stx)-positive and intimin gene (eae)-positive *Escherichia coli* isolates from wastewater of slaughterhouses in France. *Applied and environmental microbiology*, 72(5), 3245-3251.
- Llanes, j. M., Varon, J., Velarde, J. S. f., y González-Ibarra, F. P. (2011). Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* in Mexico: How serious is the problem? *The Journal of Infection in Developing Countries*, 6(02), 126-131.
- McGannon, C. M., Fuller, C. A., y Weiss, A. A. (2010). Different classes of antibiotics differentially influence Shiga toxin production. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 54(9), 3790-3798.
- Méndez-Durán, A., Méndez-Bueno, J. F., Tapia-Yáñez, T., Muñoz Montes, A., y Aguilar-Sánchez, L. (2009). Epidemiología de la insuficiencia renal crónica en México. *Diálisis y Trasplante*, 36(02), 7-11.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., y Erlich, H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. Paper presented at the Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. (2005) Performance Standards for antimicrobial susceptibility testing: fifteenth informational

- supplement. Wayne, PA.
- Norrung, B., y Buncic, S. (2008). Microbial safety of meat in the European Union. *Meat Science*, 78(1), 14-24.
- Obrig, T. G., Louise, C., Lingwood, C., Boyd, B., Barley-Maloney, L., y Daniel, T. (1993). Endothelial heterogeneity in Shiga toxin receptors and responses. *Journal of Biological Chemistry*, 268(21), 15484-15488.
- Old, D., y Threlfall, E. (1998). Topley and Wilson's Microbiology and Microbial Infections.
- OMS (2003), Organización Mundial de la Salud 2003 Guidelines for Safe Recreational Water Environments. Volume 1, Coastal and Fresh Waters. WHO, Geneva, Switzerland.
- OMS. (2004). Formulario modelo de la OMS 2004. Organización Mundial de la Salud. Revisado en línea 29-Mayo-2017 <http://apps.who.int/medicinedocs/es/d/Js5422s/>.
- OMS. (2015). Organización Mundial de la salud (OMS) Informe de la OMS señala que los niños menores de 5 años representan casi un tercio de las muertes por enfermedades de transmisión alimentaria. (1). Revisado Marzo, 2016, de OMS <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2015/foodborne-disease-estimates/es/>.
- Oporto, B., Esteban, J., Aduriz, G., Juste, R., y Hurtado, A. (2008). *Escherichia coli* O157: H7 and Non-O157 Shiga Toxin-producing *E. coli* in Healthy Cattle, Sheep and Swine Herds in Northern Spain. *Zoonoses and Public Health*, 55(2), 73-81.
- OPS. (2008). Organización Panamericana de la salud (OPS). Tratamiento de la diarrea. Manual Clínico para los Servicios de Salud. (ISBN 978-92-75-32927-6).
- Otero, J., Mendosa, A., Barberis, A., Lunghi, M., y Roldán, L. (2010). Investigación de *Escherichia Coli* O157: H7 en Planta de Faena de Pollos. *FAVE Sección Ciencias Veterinarias*, 9(2), 17-23.

- P. Jimenez, F., M ARACIL, y JUAN, T. G. (2012). Las toxinas Shiga de *Escherichia coli* y su convergencia enzimática con ricina, ebulina y nigrina (I) The Shiga toxins of *Escherichia coli* and their enzymatic convergence.
- Parrilla, M. C., Vázquez, J. L., Saldate, E. O., y Nava, L. M. (1993). Brotes de toxiinfecciones alimentarias de origen microbiano y parasitario. Salud Pública de México, 35(5), 456-463.
- Pastrana, D. V., y FitzGerald, D. J. (2006). A nonradioactive, cell-free method for measuring protein synthesis inhibition by *Pseudomonas* exotoxin. Analytical biochemistry, 353(2), 266-271.
- Paton, J. C., y Paton, A. W. (1998). Pathogenesis and diagnosis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. Clinical microbiology reviews, 11(3), 450-479.
- Pelicano, M. B., de Córdoba, S. R., y Plana, J. M. C. (2015). Síndrome hemolítico urémico atípico. Medicina Clínica, 145(10), 438-445.
- Prado, V., y Cavagnaro, F. (2008). Síndrome hemolítico urémico asociado a infección intestinal por *Escherichia coli* productora de shigatoxina (STEC) en pacientes chilenos: aspectos clínicos y epidemiológicos. Revista chilena de infectología, 25, 435-444.
- Quiñones, B., Massey, S., Friedman, M., Swimley, M. S., y Teter, K. (2009). Novel cell-based method to detect Shiga toxin 2 from *Escherichia coli* O157: H7 and inhibitors of toxin activity. Applied and environmental microbiology, 75(5), 1410-1416.
- Quiñones, B., Swimley, M. S., Narm, K.-E., Patel, R. N., Cooley, M. B., y Mandrell, R. E. (2012). O-antigen and virulence profiling of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* by a rapid and cost-effective DNA microarray colorimetric method. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 2, 61.
- Ram, S., Vajpayee, P., y Shanker, R. (2007). Prevalence of multi-antimicrobial-agent resistant, shiga toxin and enterotoxin producing *Escherichia coli* in surface waters of river Ganga. Environmental science y technology, 41(21),

7383-7388.

- Rivas, M., Chinen, I., Miliwebsky, E., Galli, L., Repetto, H. A., Masana, M., Walk, S., y Feng, P. (2011). Epidemiology of Argentinean Shiga toxin producing *Escherichia coli*. *Population Genetics of Bacteria: A Tribute to Thomas S. Whittam*, 109-132.
- Roldgaard, B. B., Scheutz, F., Boel, J., Aabo, S., Schultz, A. C., Cheasty, T., Nielsen, E. M., Olsen, K. E., y Christensen, B. B. (2004). VTEC O157 subtypes associated with the most severe clinical symptoms in humans constitute a minor part of VTEC O157 isolates from Danish cattle. *International journal of medical microbiology*, 294(4), 255-259.
- Rosas, G., y Acosta, V. (2001). *Manual de manejo higiénico de los alimentos*. Mexico, DF: Secretaría de Salud.
- Schwartz, D. C., y Cantor, C. R. (1984). Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. *Cell*, 37(1), 67-75.
- Singh, D., Matte, M. H., Matte, G., Jiang, S., Sabeena, F., Shukla, B., Sanyal, S., Huq, A., y Colwell, R. (2001). Molecular analysis of *Vibrio cholerae* O1, O139, non-O1, and non-O139 Strains: Clonal relationships between clinical and environmental isolates. *Applied and environmental microbiology*, 67(2), 910-921.
- Song, S., Xue, J., Fan, K., Kou, G., Zhou, Q., Wang, H., y Guo, Y. (2005). Preparation and characterization of fusion protein truncated *Pseudomonas* Exotoxin A (PE38KDEL) in *Escherichia coli*. *Protein expression and purification*, 44(1), 52-57.
- Tabatabaei, M., Mokarizadeh, A., y Foad-Marashi, N. (2011). Detection and molecular characterization of sorbitol negative shiga toxigenic *Escherichia coli* in chicken from northwest of Iran. Paper presented at the Veterinary Research Forum.
- Tanaro, J., Piaggio, M., Gasparovic, A., Badaracco, V., Tesouro, R., Kesselman, D., Indart, N., De Gracia, L., Procura, F., y Vitón, M. (2016). *Escherichia coli*

- O157: H7 Productor de toxina Shiga aisladas de muestras de agua relacionadas a Establecimientos pecuarios de engorde a corral. Ciencia, Docencia y Tecnología Suplemento, 6(6).
- Tenover, F. C., Arbeit, R. D., Goering, R. V., Mickelsen, P. A., Murray, B. E., Persing, D. H., y Swaminathan, B. (1995). Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *Journal of clinical microbiology*, 33(9), 2233.
- Vásquez-Arroyo, J., y Cabral-Martell, A. (2001). La inocuidad alimentaria, realidad y reto mundial. *Revista de alimentos nutrición y agricultura*. FAO, 28, 4-13. URL: <http://www.fao.org/docrep/003/y0600m/y0600m00.htm>.
- Walters, S. P., Gannon, V. P., y Field, K. G. (2007). Detection of Bacteroidales fecal indicators and the zoonotic pathogens *E. coli* O157: H7, *Salmonella*, and *Campylobacter* in river water. *Environmental science y technology*, 41(6), 1856-1862.
- Williams, N. D., Torres, A. G., y Lloyd, S. J. (2010). Evolution and epidemiology of diarrheagenic *Escherichia coli*. *Pathogenic Escherichia Coli in Latin America*, 8.
- Zavala-González, M. A., y Sánchez-Santana, R. (2014). Calidad de prescripción de antibióticos en el servicio de pediatría de un Hospital General de Cárdenas, Tabasco, México, 2010. *Revista mexicana de ciencias farmacéuticas*, 45(2), 37-42.
- Zhang, W., Bielaszewska, M., Pulz, M., Becker, K., Friedrich, A. W., Karch, H., y Kuczius, T. (2008). New immuno-PCR assay for detection of low concentrations of Shiga toxin 2 and its variants. *Journal of clinical microbiology*, 46(4), 1292-1297.
- Zhao, L., y Haslam, D. B. (2005). A quantitative and highly sensitive luciferase-based assay for bacterial toxins that inhibit protein synthesis. *Journal of medical microbiology*, 54(11), 1023-1030.

ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado
A.C.	Asociación civil
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AM	Ampicilina
AMC	Amoxicilina/Ácido Clavulánico
AN	Amicacina
C	Cloranfenicol
CAZ/CLA	Ceftazidime/ Ácido Clavulánico
CF	Cefalotina
CH	Colitis hemorrágica
CIATEJ	Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C.
CIP	Ciprofloxacino
CL	Colistin
CONACyT	Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología
DAEC	<i>E. coli</i> de adherencia difusa
<i>eae</i>	Intimina
EAEC	<i>E. coli</i> enteroagregativa
ECDC	Centro Europeo para el control y prevención de enfermedades
EFSA	European Food Safety Authority
<i>ehxA</i>	Enterohemolisina
EIEC	<i>E. coli</i> enteroinvasiva
EPEC	<i>E. coli</i> enteropatógena
ETA	Enfermedades transmitidas por alimentos
ETEC	<i>E. coli</i> enterotoxigénica
GM	Gentamicina
IMS	Separación inmunomagnética

IPM	Imipenem
ISID	International Society for Infectious Diseases
K	Kanamicina
LEE	Locus for Enterocyte Effacement
NA	Ácido Nalidíxico
OMS	Organización Mundial de la Salud
OPS	Organización Panamericana de la Salud
Pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PFGE	Electroforesis en gel de campos pulsados
PROFAPI	Programa de Fomento y Apoyo a Proyectos de Investigación
REA	Análisis de enzimas de restricción
RFLP	Restricción de fragmentos de amplio polimorfismo
S	Estreptomicina
STEC	<i>Escherichia coli</i> productora de toxina Shiga
Stx1	Toxina Shiga 1
Stx2	Toxina Shiga 2
SUH	Síndrome urémico hemolítico
SXT	Trimetoprima/ Sulfametoxazol
TE	Tetraciclina
TMP	Trimetoprima
TSA	Agar de tripticaseína de soya
UFC	Unidades formadoras de colonias
VT	Verotoxina
VWF	Factor de Von Willebrand