



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

**Caracterización Molecular de la Resistencia
Antimicrobiana y Factores de Virulencia en
E. coli patógenas aisladas de Pacientes
y de Alimentos.**

T E S I S

que presenta

Q.F.B. Jorge Eduardo Valdés Flores

como requisito para obtener
el grado de

**Maestro en Ciencias en
Biotecnología de Salud**

Directores de Tesis

Dr. Vicente Adrián Canizalez Román

Dr. Héctor Manuel Flores Villaseñor

Culiacán, Rosales, Sinaloa

Junio 2016

La presente investigación, titulada Caracterización molecular de la resistencia antimicrobiana y factores de virulencia en *E. coli* patógenas aisladas de pacientes y de alimentos, se llevó a cabo en el laboratorio de Biología Molecular y celular, Facultad de Medicina de la *Universidad Autónoma de Sinaloa* bajo la dirección del Dr. Vicente Adrián Canizalez Román, así como también del Dr. Héctor Flores Villaseñor. Este trabajo de investigación forma parte del proyecto *Sobre Relación y Frecuencia de la presencia de Escherichia coli* diarreogénicas en personas adultas, niños y en alimentos en Sinaloa. Para la conclusión del proyecto se recibió financiamiento por la Universidad Autónoma de Sinaloa (Programa de Fomento y Apoyo a Proyectos de Investigación, PROFAPI, 2014/038. Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) a través de *Beca Tesis para Estudios de Maestría No. 593431 durante el periodo 2014-2016.*

DIRECTORES

DR. VICENTE ADRIÁN CANIZALEZ ROMÁN

Investigador Titular de la Unidad de Investigación

de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Sinaloa

Miembro del Sistema Nacional de Investigadores Nivel I

DR. HÉCTOR MANUEL FLORES VILLASEÑOR

Investigador Titular de la Unidad de Investigación

de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Sinaloa

Miembro del Sistema Nacional de Investigadores Nivel I

AGRADECIMIENTOS

Primeramente quiero expresar mi agradecimiento a Dios, por haberme permitido culminar una más de mis metas, por brindarme una vida de felicidad y abundancia, pero sobre todo por ser mi fortaleza en mis momentos de debilidad.

Posteriormente quiero agradecer al Programa Regional en Biotecnología para la Maestría en Biotecnología en la Salud, de la Facultad de Ciencias Químico Biológicas por permitirme ser parte de su programa de estudios.

También quiero agradecer al Dr. Vicente Adrián Canizalez Román, por brindarme la oportunidad de formar parte de su equipo de trabajo, orientarme y brindarme parte de sus conocimientos para la culminación de este importante proyecto, así como brindarme su amistad que considero muy importante, también para el Dr. Héctor Manuel Flores Villaseñor por todo su apoyo durante esta travesía, consejos y enseñanzas, así como también a todos mis compañeros que forman parte del laboratorio de investigación, por todo el apoyo y consejos brindados, que me fue de gran utilidad para la culminación de este proyecto de investigación.

Agradezco de manera muy especial a mi esposa Mariela Yamileht Graciano Bojórquez, por haber aguantado mi carácter y mi falta de tiempo para con mi familia, a mis hijos, y mis padres que siempre están al pendiente de mis retos y metas de la vida.

ÍNDICE GENERAL

	PÁG
ÍNDICE DE CUADROS	viii
ÍNDICE DE FIGURAS	Ix
I. RESUMEN	1
II. INTRODUCCIÓN	4
III. REVISIÓN DE LITERATURA	7
A. Antecedentes	7
1. Identificación de <i>E. coli</i> diarreogénicas	8
2. Participación de <i>E. coli</i> como parte de la flora intestinal	9
3. Patotipos de <i>E. coli</i>	10
4. Características de patogénesis de las DEC´s	13
a) <i>E. coli</i> Enterotoxigénica	13
b) <i>E. coli</i> enterohemorrágica	14
c) <i>E. coli</i> Enteroinvasiva	15
d) <i>E. coli</i> Enteropatógena	16
e) <i>E. coli</i> Enteroagregativa	17
f) <i>E. coli</i> Adherencia Difusa	18
5. Brotes epidemiológicos	20
6. Importancia de la resistencia antimicrobiana	21
7. Mecanismos de resistencia a los antibióticos	22
a) Modificación enzimática del antibiótico	23

b) Bombas de expulsión	23
c) Cambios en la permeabilidad de la membrana	24
d) Alteraciones del sitio de acción externo	24
8. Contribución de elementos genéticos móviles en <i>E. coli</i> patógenas	27
9. Proteínas autotransportadoras y mecanismos de Secreción.	30
a) Sistema de secreción tipo I (SSTI)	31
b) Sistema de secreción tipo II (SSTII)	31
c) Sistema de secreción tipo III (SSTIII)	32
d) Sistema de secreción tipo IV	32
e) Autotransportadores	33
IV. JUSTIFICACIÓN	36
V. HIPOTESIS	37
VI. OBJETIVOS	38
A. OBJETIVO GENERAL	38
B. OBJETIVOS ESPECIFICOS	38
VII. MATERIALES Y MÉTODOS	39
A. Población de estudio	39
B. Susceptibilidad a los antibióticos	39
C. Extracción e identificación de ADN plasmídico	40
D. Extracción de ADN genómico	41
E. Identificación de genes relacionados a resistencia mediante PCR punto final	42

F. Identificación de genes que codifica para proteínas autotransportadoras mediante PCR punto final	45
G. Estadístico de prueba	45
VIII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	47
IX. CONCLUSIONES	66
X. BIBLIOGRAFÍA	68
A. Abreviaturas	73

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	DESCRIPCIÓN	Pág.
1	Características generales de las categorías de <i>E. coli</i> causantes de diarrea.	13
2	Mecanismos de acción de las principales familias de antibióticos.	27
3	Principales factores de virulencia de las diferentes proteínas autotransportadoras para <i>E. coli</i> .	35
4	Oligonucleótidos que se utilizaron en la PCR, para la amplificación de los diferentes genes relacionados con los mecanismos de resistencia a antibióticos.	44
5	Secuencias de oligonucleótidos de proteínas autotransportadoras que se utilizaron en la amplificación por PCR y su mecanismo de acción.	46
6	Resistencia fenotípica a los diferentes fármacos evaluados en las cepas de <i>E. coli</i> diarreogénicas por fuentes de aislamiento.	48
7	Resistencia fenotípica a los diferentes fármacos evaluados en las cepas de <i>E. coli</i> diarreogénicas por patotipos,	49
8	Multi-Fármaco Resistencia a antibióticos en las cepas DEC's y presencia de plásmidos.	61
9	Presencia de genes que codifican para proteínas autotransportadoras por patotipo y fuente de aislamiento	64

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig.	DESCRIPCIÓN	Pág.
1	Patogénesis de <i>Escherichia coli</i> diarreogénicas	19
2	Principales mecanismos de resistencia a antibióticos	26
3	Factores de virulencia que pueden codificar para diferentes patogénesis	29
4	Mecanismos de secreción de un autotransportador	34
5	Gel de agarosa para visualizar el ADN plasmídico	41
6	Presencia de genes que confieren resistencia a los principales antibióticos encontrados en las DEC's aisladas de muestras clínicas, alimentos y aguas en este estudio	53
7	Presencia de genes que confieren resistencia a los principales antibióticos encontrados que presentaron baja resistencia o susceptibilidad en las DEC's aisladas de muestras clínicas, alimentos y aguas.	57
8	Presencia de plásmidos en cepas DEC's, por fuente de aislamiento	58
9	Presencia de plásmidos identificada en los diferentes patotipos aislados de clínicas, alimentos y aguas en cepas resistentes a los principales antibióticos.	59

I. RESUMEN

Actualmente la incidencia de las infecciones intestinales mal definidas se ha incrementado en muchas partes del mundo. En México en el año 2012 se registraron más de 5.3 millones casos de diarreas mal definidas y en el Estado de Sinaloa, las enfermedades diarreicas son responsables de más del 40% de la morbilidad por causas infecciosas. Estas categorías de DEC's han sido clasificadas en base a su mecanismo de acción, en enteropatogénica, enterohemorrágica, enterotoxigénica, enteroinvasiva, enteroagregativa y de adherencia difusa, mismas que se han vuelto más virulentas y resistentes, esto debido a que las bacterias han sufrido cambios genéticos, que a su vez le confieren propiedades de resistencia y la aparición de nuevos factores de virulencia como las proteínas autotransportadoras, esto debido a los factores ambientales, intercambio genético, el uso indiscriminado de antibióticos, entre otros. Por lo que el objetivo principal de este trabajo fue la caracterización molecular de los factores de virulencia y acción antimicrobiana de los antibióticos y los genes que codifican para dicha resistencia en *E. coli* diarreogénicas aisladas de pacientes, aguas y alimentos en el estado de Sinaloa. Esto debido al incremento en el número de casos de gastroenteritis provocados por las DEC's en la entidad y además que en los últimos años se ha complicado el tratamiento de dichas infecciones debido a la aparición de cepas resistentes a los principales antibióticos utilizados. El estudio se llevó a cabo en la unidad de investigación del laboratorio de Biología Molecular y Celular de la Facultad de Medicina, de donde se utilizaron 306 cepas de *E. coli* diarreogénicas aisladas de pacientes, alimentos y aguas de un total de 6,545 muestras. De la cuales se analizaron 235 cepas provenientes de 1,037 (23.3%) Pacientes, 42 cepas provenientes de 5,036 (1.11%) Alimentos y 29 cepas provenientes de 472 (6.1 %) muestras de aguas de canales de riego y ríos en el estado de Sinaloa. Para la realización de esta investigación se evaluó la

resistencia fenotípica de las cepas DEC's mediante el método de Kirby-Bauer, el ADN plasmídico se purificó mediante un kit de extracción y se identificó mediante una electroforesis en gel de agarosa. Posteriormente se identificaron los genes asociados a resistencia y los genes que codifican para proteínas autotransportadoras mediante PCR punto final. Encontramos que las cepas de DEC's aisladas de muestras de pacientes con diarrea fueron más resistentes a tetraciclina, ampicilina y trimetropim-sulfametoxazol que las cepas aisladas de muestras de alimentos y aguas las cuales son representativas de todo el estado de Sinaloa. Además, los patotipos de EAEC y EPEC presentaron proporciones más altas de resistencia a tetraciclina, ampicilina y trimetropim-sulfametoxazol que el resto de los patotipos evaluados en el presente estudio. Además, existe una alta prevalencia de cepas DEC's resistentes a antibióticos (>85%, al menos a uno) y una alta presencia de cepas multi fármaco resistentes (>71%) en el Estado de Sinaloa. Por otra parte, no encontramos una asociación entre la presencia de plásmidos en las cepas DEC's y la resistencia a los diferentes antibióticos evaluados, así como la presencia de estos elementos genéticos móviles por cada uno de los patotipos y la resistencia a antibióticos. En base a los patotipos evaluados, DAEC y EAEC presentan la mayor proporción de cepas multi fármaco resistente. La resistencia a tetraciclina esta codificada principalmente por el gen **tet-B**, seguido por el gen **tet-A**, de igual manera la resistencia a ampicilina es codificada principalmente por el gen **blaTEM**.y la resistencia a trimetropim-sulfametoxazol es codificada por los genes **sul-2** y **sul-1**. Por último, encontramos que existe una alta prevalencia de los genes que codifican para proteínas autotransportadoras (**espC, pic, pet, eat, sat y tib**) en las cepas de las diferentes categorías de *Escherichia coli* diarreogenicas. Este es el primer trabajo que se realiza en el noroeste del país donde se evalúa la presencia de otros factores de virulencia (proteínas autotransportadoras) y genes que confieren resistencia en cepas DEC aisladas de pacientes, alimentos y agua. Por lo cual, esto ayudara a conocer la prevalencia de cepas DEC's con

otros atributos de virulencia para evitar posibles brotes y además conocer los antibióticos más eficaces para controlar estos patógenos.

II. INTRODUCCIÓN

Escherichia coli, nombrada también *E. coli* probablemente es el organismo procariota más estudiado por el ser humano, *E. coli* es una bacteria mesófila, es decir se desarrollan a temperatura de 20 a 45 grados Celsius. Con una temperatura optima del 37C° y se desarrollan a un pH de 6-8. Es una enterobacteria, anaerobia facultativa que normalmente coloniza el tracto gastrointestinal a las primeras horas de vida del neonato y después de esto ambos reciben beneficio mutuo, también se encuentra en los intestinos de animales, esta bacteria normalmente no causa ningún daño a la luz intestinal; al menos que este sea un hospedero debilitado, inmunosuprimido o cuando las barreras intestinales sean superadas aun siendo *E. coli* “no patógena” puede causar una infección (Kaper, Nataro et al. 2004). *E. coli* fué descrita por primera vez en 1885 por Theodor Von Escherich, bacteriólogo alemán, quién la denominó *Bacterium coli*. Posteriormente la taxonomía le adjudicó el nombre de *E. coli*, en honor a su descubridor (Prescott and Fricker 1999).

Las cepas de *E. coli* pueden causar diarrea aguda o severa así como otros síntomas en humanos, estas cepas constituyen un grupo heterogéneo de microorganismos con diferentes propiedades de virulencia, epidemiología y enfermedades asociadas; Las *E. coli* diarreogénicas (DEC's) son los agentes etiológicos más comunes de diarrea, basados en sus factores específicos de virulencia y características fenotípicas, estas cepas de *E. coli* diarrogénicas se dividen en 6 categorías denominados “patotipos” los cuales son; *E. coli* Enteropagénica (EPEC), *E. coli* Enteroagregativa (EAEC), *E. coli* Enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* de Adherencia difusa (DAEC), *E. coli* Enteroinvasiva (EIEC) y *E. coli* Enterohemorrágica (EHEC) que son productora de toxina Shiga o llamada también vero-toxina las cuales incluyen el bien conocido subgrupo llamado STEC, (Kaper, Nataro et al. 2004). Una vez que la

colonización se establece, las estrategias patogénicas de *E. coli* diarreogénica muestran una variedad remarcable. Tres paradigmas generales han sido descritos por el cual *E. coli* puede causar diarrea: i) producción de enterotoxinas (ETEC y EAEC), ii) invasión (EIEC), y/o iii) adherencia con señalizadores de membrana (EPEC, EHEC y DAEC). Sin embargo, la interacción del microorganismo con la mucosa intestinal es específica para cada categoría (Eslava C 1994; Kaper 1998).

La diarrea es una alteración de las heces en cuanto a volumen, fluidez o frecuencia en relación anormal a la fisiológica, lo cual conlleva una baja absorción de líquidos y nutrientes, pudiendo estar acompañada de dolor, fiebre, náuseas, vómito, debilidad o pérdida del apetito. En países en desarrollo, los niños menores de tres años sufren en promedio, tres episodios de diarrea al año privando al niño de nutrientes necesarios para su crecimiento. En consecuencia, la diarrea es una importante causa de malnutrición, y los niños malnutridos son más propensos a enfermar por enfermedades diarreicas (WHO, 2009). De acuerdo con cifras de la Organización Mundial de la Salud, la diarrea es una de las principales causas de muerte en todo el mundo, íntimamente asociada a la deshidratación. Además de la gran pérdida de agua que supone las evacuaciones diarreicas, los pacientes, por lo general niños, pierden cantidades peligrosas de sales importantes, electrolitos y otros nutrientes. La diarrea afecta a todas las razas, sexos, edades y regiones geográficas del mundo (Mandell 1999).

México es una de las naciones que registran a nivel mundial las tasas de mortalidad más elevadas por estos padecimientos, siendo muy elevados los costos de vidas humanas tanto de recursos médicos destinados a su atención. Olarte 1986, menciona que esto se relaciona a grandes pérdidas de tiempo laborable, siendo una de las primeras causas de ausentismo laboral. Durante los últimos años en Sinaloa se ha presentado un incremento en el número

casos de enfermedades gastrointestinales, donde los agentes etiológicos no han sido identificados ni evaluados, en donde el principal diagnóstico en los laboratorios es que el paciente presenta Flora normal en las heces incluyendo las *E. coli* diarreogénicas. Esto debido a que las DEC's no son identificadas por los laboratorios convencionales y a la emergencia de nuevos factores de virulencia en las cepas de *E. coli* (Canizalez-Roman, Gonzalez-Nunez et al. 2013), es de gran importancia contar con estudios que demuestran la presencia de estos patotipos así como sus nuevos factores de virulencia adquiridos por estos microorganismos.

III. REVISIÓN DE LITERATURA

A. Antecedentes.

E. coli es una de las especies bacterianas más minuciosamente estudiadas, y no solamente por sus capacidades patogénicas, sino también como sustrato y modelo de investigaciones metabólicas, genéticas, poblacionales y de diversa índole (Neidhardt, Punreddy et al. 1999). La amplia variedad de especies de *E. coli* incluyen diferentes patotipos que causan epidemias de enfermedades severas alrededor del mundo, así también existe la *E. coli* no patogénica, esta forma parte de la flora normal en los intestinos, o bien cepas bien caracterizadas como el serotipo de EHEC, O157:H7 y cepas a salvo en laboratorios de investigación. La patogenicidad de una cepa de *E. coli* es principalmente determinada por sus específicos factores de virulencia la cual incluye adhesinas, invasinas, toxinas y capsulas (Kunhnert 2000). Puesto que esta bacteria presenta eventos de mutación de su genoma y de transferencia de genes, ha dado lugar a la enorme divergencia y es así que existen clonas (variedades) que habitan de manera natural en el intestino y clonas relacionadas con infecciones intestinales y extraintestinales como son las infecciones del tracto urinario, meningitis, peritonitis, mastitis, septicemia y neumonías (Eslava C 1994).

Las infecciones causadas por *E. coli* principalmente son del tipo gastrointestinal, en donde la vía principal de la bacteria es a través de los alimentos contaminados. En México comerciantes en las calles proveen comida rápida a una gran proporción de los habitantes, estos sin cuidados del estatus microbiológico de los alimentos, higiene general y prácticas del manejo de los alimentos; Los vendedores de comida usan baldes (reusándolos todo el día), trabajan con faltas de facilidades para ir al baño y además preparan las

alimentos el día anterior. El consumir comida rápida en las calles por gente local y turistas genera un riesgo de salud pública, ocasionando enfermedades diarreogénicas (Estrada-Garcia, Lopez-Saucedo et al. 2004). Las cepas diarreogénicas a menudo infectan turistas provenientes de países desarrollados que viajan a México o países en vías de desarrollo, causando la conocida “diarrea del viajero”, las cepas diarreogénicas son típicamente transmitidas por comida y agua contaminada. De cualquier forma la prevalencia de estas cepas en los productos de comida que se produce, consume y algunas veces se exporta en el noroeste de México han sido evaluados solo en algunos trabajos previos (Canizalez-Roman, Gonzalez-Nunez et al. 2013). El posible incremento epidemiológico de estos patógenos se debe al aumento en viajes internacionales y globalización del comercio, viajeros individuales de países donde hay casos de enfermedades diarreogénicas. Por ejemplo, viajeros que consumen alimentos contaminados no solo adquieren el riesgo de adquirir una enfermedad diarreogénica sino también de transmitirla en su retorno a su país de origen; esto implica la necesidad de realizar una rigurosa vigilancia microbiológica en bebidas y alimentos (Organización Mundial de la Salud 2013).

1. Identificación de *E. coli* diarreogénicas

La identificación de cepas diarreogénicas de *E. coli* incluye la detección de genes que codifican para proteínas que le confieren las principales características fenotípicas, (ej. La producción de toxinas y patrones de adherencia en las células epiteliales). Así las cepas de EPEC, contienen los genes *eae* y *bfpA* que codifican para las proteínas intimina y fimbrias formadoras de pilis (BFP) respectivamente, las cuales están implicados en el fenotipo de adherencia localizada (LA) en cultivos celulares. Por otro lado, EAEC está comúnmente asociado con la diarrea del viajero en países en

desarrollo, las cepas de EAEC son distinguidas por su adherencia típica en células en cultivo, un patrón de adherencia agregativa, debido a la variedad de los factores de virulencia (gen fimbriae, *aaf*; promotor de colonización, dispersina; y plásmido *pCVD432*) regulados por el factor agregativo (*AggR*). A diferencia de las ETEC que son definidas por la presencia de uno o dos plásmidos que codifican para una enterotoxina, (codificadas por el gen *lt*). Sin embargo, ETEC es una importante causa de diarrea en niños y la más frecuente causa de diarrea en viajeros a países en vía de desarrollo. Por su parte las cepas de DAEC son definidas por un patrón difuso de adherencia en ensayos de adherencia en cultivo de células HEp-2, una fimbria conocida como F1845 (codificada por el gen *daaE*), es la principal involucrada en el fenotipo de DAEC, las cepas de EIEC muestra similitudes patogénicas, fenotípicas y genéticas con cepas de *Shigella*, por lo que este patotipo puede ser identificado por su capacidad de invadir las células epiteliales (mediados en parte por los genes *ipaH* y *virF*) en asociación con disentería. Por último, EHEC está asociada con diarrea sanguinolenta y síndrome urémico hemolítico, también contiene el locus de la isla de patogenicidad del desvanecimiento del enterocito y expresa uno o dos genes parecidos a la toxina Shiga (codificadas por los genes *stx1* y *stx2*). El serotipo más común asociado con epidemias en los Estados Unidos y Europa, es el serotipo O157:H7 (Calderon Toledo C1 2011).

2. Participación de *E. coli* como parte de la flora intestinal

El tubo digestivo alberga un gran número de bacterias, también a este nivel se pueden reconocer distintos nichos ecológicos, la flora bacteriana intestinal contribuye a la síntesis de vitaminas K así como también vitaminas del complejo B y colabora con procesos digestivos, además compete con los microorganismos patógenos por nutrientes, receptores y elabora bacteriocinas (Kaper 1998) . Se calcula que la flora intestinal en el aparato digestivo de un adulto pesa aproximadamente 1 Kg. Son más de 400 especies diferentes de

microorganismos las denominadas bacterias beneficiosas, bifidobacterias y lactobacilos. Sin embargo cambios en la alimentación, en el estilo de vida, estrés, tratamientos con antibióticos, agentes quimioterapéuticos o radioterapia, producen un desequilibrio en la flora intestinal que produce diarrea, estreñimiento, flatulencias y halitosis entre otros (Eckburg, Bik et al. 2005).

En casos de este tipo es necesario restablecer el equilibrio en la flora intestinal, mediante la administración de probióticos y prebióticos, ya que los probióticos son microorganismos vivos seleccionados específicamente con comportamientos benéficos, que ingeridos en la cantidad adecuada, colonizan la flora intestinal restableciendo el equilibrio y produciendo sustancias antimicrobianas beneficiosas para el organismo y los prebióticos son hidratos de carbono no digeribles cuya ingestión induce el crecimiento de microorganismos beneficiosos para la flora intestinal (Olagnero, Abad et al. 2007). Sucede que al perderse este equilibrio se favorece el desarrollo de microorganismos patógenos que estos a su vez mediante sus factores de virulencia y mecanismos de acción, causan enfermedades diarreogénicas, Síndrome urémico hemolítico (SUH), Colitis hemorrágica (CH), Meningitis (MNEC), entre otros. Por lo que se considera de gran importancia este proyecto sobre la caracterización molecular de los factores de virulencia y acción antimicrobiana de las DEC's (Kaper, Nataro et al. 2004).

3. Patotipos de *E. coli*

***Escherichia coli* Enteropatógena (EPEC)**

Este patotipo causa diarrea en humanos y en algunos animales, carece de fimbrias y utiliza la proteína intimina, esta es una adhesina que sirve para adherirse a las células intestinales, por lo que al adherirse a la mucosa intestinal causa una reordenación de la actina en la célula hospedante, que induce una

deformación significativa; estas bacterias son moderadamente invasivas ya que penetran en las células hospedadoras provocando una respuesta inflamatoria, la causa probable de diarrea en los afectados por esta cepa son seguramente los cambios provocados en la estructura de las células intestinales (Levine 1987; Rodríguez-Angeles 2002).

***Escherichia coli* Enterotoxigénica (ETEC)**

Este patotipo se adhiere a la mucosa del intestino delgado, no la invade, solo elabora toxinas que producen diarrea como la denominada “diarrea del viajero”. Esta cepa no provoca cambios histológicos en las células de la mucosa, ocasiona muy poca inflamación y produce diarrea no sanguinolenta en niños y adultos, sobre todo en países en vías de desarrollo; aunque los desarrollados también se ven afectados debido al incremento de la globalización de mercados y viajes turísticos de gente proveniente de diferentes países; Este patotipo emplea varias toxinas, incluyendo la enterotoxina termoestable y la enterotoxina termolábil (Smith, Zurita et al. 1988; Kennan and Monckton 1990).

***Escherichia coli* Enteroinvasiva (EIEC)**

La cepa de EIEC invade el epitelio intestinal, causando diarrea sanguinolenta en niños y adultos, por un mecanismo de liberación de calcio en grandes cantidades impidiendo la solidificación ósea, produciendo artritis y en algunos casos arterioesclerosis. Es una de las bacterias que causa más daño debido a la invasión que produce en el epitelio intestinal (Schulze, Schiemann et al. 2006).

***Escherichia coli* Enterohemorrágica (EHEC)**

La EHEC produce la toxina Shiga o también llamada verotoxina que actúan en el colon, provocando colitis hemorrágica, luego pudiendo ocasionar daño renal (Síndrome urémico hemolítico), y por último, púrpura trombocitopénica trombótica. Este patotipo posee un fago, donde se encuentra codificada la toxina Shiga, además posee una fimbria polar larga que usa para su adherencia (Hussein and Bollinger 2005).

***Escherichia coli* Enteroagregativa (EAEC)**

Son llamadas enteroagregativas porque tienen fimbrias con las que aglutinan células en los cultivos de tejidos, este patotipo se unen a la mucosa intestinal causando diarrea acuosa sin fiebre, su mecanismo no es invasivo con una producción de hemolisina y una enterotoxina ST similar a la de las enterotoxigénicas. Se le asocian dos toxinas: 1. toxina termoestable enteroagregante (east) y toxina codificada por plásmidos “pet” (Kaper 1998).

***Escherichia coli* de Adherencia difusa (DAEC)**

Este patotipo DAEC, tiene la característica de adherirse a la totalidad de la superficie de las células epiteliales y habitualmente causa enfermedad en niños inmunosuprimidos o desnutridos, no se ha demostrado que pueda causar diarrea en niños mayores de un año de edad, ni en adultos y ancianos (Kaper 1998).

Cuadro 1. Características de las categorías de *E. coli* causantes de diarrea (Eslava C 1994).

Categorías	Síntomas Clínicos	Edad de Incidencia	Factores de Virulencia
ETEC	Diarrea aguda acuosa	Niños menores de 2 años y diarrea del viajero adultos	ST y LT (Toxina Termoestable y Termolábil).
EHEC	SUH, CH, diarrea con sangre ó sin sangre	Niños y Adultos	Citotoxina stx1 y stx2 (Toxina semejante a shiga), gen cromosomal eae (intimina), Enterohemolisina Hly_a , serotipo O157:H7 .
EIEC	Diarrea con moco o Diarrea acuosa	Niños mayores de 1 año	Enterotoxina ipaH y VirF (Necesarias para el fenotipo de invasividad y movimiento a través del citoplasma).
EPEC	Diarrea aguda	Niños menores de 6 meses hasta 2 años	Gen cromosomal eae y bfp (Fimbrias formadoras de penachos).
EAEC	Diarrea líquida, diarrea persistente hasta 20 días	Recién nacidos y niños menores de 2 años	aafII (Adherencia agregativa fimbria), Gen regulador AggR .
DAEC	Diarrea acuosa sin sangre	Niños de 5 años, preescolares	Gen cromosomal daaE (fimbria de F-1845).

4. Características de patogénesis de las DEC's.

a) *E. coli* enterotoxigénica

ETEC coloniza la mucosa del intestino delgado por medio de pilis o fimbrias que tienen diversas formas denominadas CFA (colonization factor antigens), siendo su principal mecanismo de patogenicidad la síntesis de alguna o ambas enterotoxinas llamadas toxina termolábil (LT) la cual es codificada por el gen *eltB* y toxina termoestable (ST) la cual es codificada por el gen *estA*. Sus genes están en un plásmido que también puede tener información genética para los CFA's, aunque algunos genes de ST se han encontrado en transposones (Kaper 1998). Las toxinas LT y ST aumentan el nivel intracelular de cAMP y cGMP respectivamente, que se encuentran en la membrana de las células intestinales, provocando la salida de iones y agua (Kaper 1998).

ETEC, se presenta principalmente en niños menores de dos años, y en particular durante los primeros seis meses de vida (lactancia); los síntomas se llevan en un periodo de incubación de 14 a 50 hrs. El cuadro clínico es caracterizado por diarrea aguda, generalmente sin sangre, sin moco, sin pus y en pocos casos se presenta fiebre y vómito; La diarrea producida por ETEC puede ser leve, breve y autolimitada, pero también puede ser grave. La contaminación fecal de agua y alimentos es la principal fuente de infección por ETEC en países en vías de desarrollo, siendo la dosis infectiva de 10^6 UFC (unidades formadoras de colonias)(Kaper 1998; Fragoso Arbelo 2010).

b) *E. coli* enterohemorrágica

Este patotipo se caracterizó molecularmente debido a brotes epidémicos fundamentalmente en países desarrollados, el serotipo más observado en EE.UU, Europa y Japón ha sido O157:H7. (Su and Brandt 1995), EHEC se relaciona con brotes caracterizados por dolor abdominal, diarrea acuosa con sangre y poco o nada de fiebre, cuadro al que se le llamó colitis hemorrágica (CH) y que era debido a la ingestión de carne cruda o mal cocida (Riley, Remis et al. 1983). La bacteria aislada de todos los casos fue *E. coli* del serotipo O157:H7. Los factores de virulencia de las cepas enterohemorrágicas se caracterizan por la presencia de la citotoxina stx, ya que es el principal mecanismo de patogenicidad de EHEC y su síntesis está relacionada con la presencia de material genético de un bacteriófago stx, que está insertado en el genoma.

La stx actúa a nivel de síntesis de proteínas ya que se une a la subunidad 60S de los ribosomas de las células intestinales o renales del hospedero, de las cepas EHEC aisladas, se han encontrado las variantes stx1 y stx2 que son inmunológicamente diferentes, de tal manera que se pueden

aislar bacterias que sintetizan alguna de las toxinas o ambas (Kaper 1998; Jaime Fagundo, Delgado Giniebra et al. 2003). Además de la toxina, las EHEC tienen otros mecanismos de patogenicidad como el fenómeno de adherencia y enfacelación (A/E), y presentan el gen cromosomal *eae* que codifica para la proteína de membrana externa (OMP) de 94 kilodaltones (kDa), llamada intimina, cuya expresión es regulada por genes plasmídicos; el gen *eae* también se encuentra en cepas EPEC. El periodo de incubación de EHEC es de 1 a 8 días; esta inicialmente produce diarrea sin sangre, con o sin vómito, dolor abdominal, fiebre y después de 1 a 2 días la diarrea se torna sanguinolenta y se intensifica el dolor abdominal de una duración de 4 a 10 días, con heces abundantemente sanguinolentas, estas patologías se puede llegar a curar sin ninguna complicación o bien llegar hasta un SUH (Fasano and Shea-Donohue 2005). La dosis de patogénesis para EHEC, es extremadamente baja para producir la enfermedad (se estima que son menos de 100 células de EHEC para provocar la infección) (Beutin, Zimmermann et al. 1998).

c) *E. coli* enteroinvasiva

El mecanismo de patogenicidad de EIEC es la invasión del epitelio del colon, para ello el primer paso es la adherencia de la bacteria a las vellosidades de la mucosa requiriendo de mucinasa y adhesinas, para después entrar por endocitosis a la célula, y posterior multiplicación de la bacteria dentro de la célula y diseminación a células sanas adyacentes (Kaper 1998); (Rodríguez-Angeles 2002). La información genética para este mecanismo está en el *loci* del cromosoma y del plásmido, además de tener la capacidad de elaborar una o más enterotoxinas que pudieran ser importantes en la producción de diarrea. Los genes necesarios para la invasión se encuentran en el plásmido de invasividad de 140 MDa llamado *pInv*, que codifica para las proteínas, como por ejemplo las *IpaH* y *Vir-F*. Entre otras que están involucradas en el proceso de

patogénesis (Eslava C 1994). Los síntomas característicos en personas infectadas por EIEC son diarrea acuosa, con sangre y moco, pero algunos casos sólo presentan diarrea, las cepas EIEC se asocian más con brotes que con casos aislados, en los cuales la transmisión puede ser de persona a persona, por ingestión de alimentos y agua contaminada, convirtiéndose en un patógeno importante principalmente en niños mayores de seis meses (Eslava C 1994).

d) *E. coli* enteropatógena

EPEC fue la primera categoría que se identificó serológicamente y se asoció con casos de diarrea en infantes, siendo la adherencia su principal factor de patogenicidad. El proceso de adherencia íntima entre la bacteria y la membrana de las células del epitelio intestinal, seguida de la destrucción de la microvellosidad, con polimerización de actina, que lleva a la alteración del citoesqueleto en el sitio de la unión de la bacteria, debido al aumento de los niveles de calcio intracelular y de proteína cinasa C, lo cual ha sido denominado adherencia y esfacelamiento (A/E) (Eslava C 1994). La adherencia está mediada por pilis o fimbrias rizadas que se llaman Bfp (bundle-forming pilus), cuya información genética está codificada en un plásmido de 50-70 MDa denominado EAF (factor de adherencia de EPEC) y de algunos genes cromosomales (Rodríguez-Angeles 2002). La forma de transmisión de la enfermedad es fecal-oral, posiblemente por manos contaminadas de manipuladores de alimentos. Los reservorios de EPEC pueden ser niños y adultos con o sin síntomas, el cuadro clínico que produce EPEC se manifiesta con diarrea, la, vómito, fiebre baja y mala absorción (Eslava C 1994).

e) *E. coli* enteroagregativa

EAEC fue descrita por primera vez por Nataro y colaboradores quienes encontraron cepas aisladas de pacientes con diarrea, las cuales por serología no correspondían el grupo EPEC pero si presentaban un patrón característico de adherencia diferente a EPEC. En estudios posteriores se encontró el fenotipo de adherencia agregativa, caracterizada por autoaglutinación de las bacterias entre sí y por ser inespecífica, porque las bacterias se adhieren a la superficie de las células HEp-2 y a la superficie del cubreobjetos libre de células HEp-2 (Eslava C 1994). La adherencia a células HEp-2 y la hemaglutinación de eritrocitos humanos se debe a la presencia de la fimbria de adherencia agregativa (AAF/I), codificada por el gene *aggA* que se encuentra en un plásmido de 60 MDa. También se ha descrito la fimbria AAF/II inmunológicamente diferente a AAF/I y que está codificada por el gene *aafA*; sin embargo, no todas las EAEC presentan estas fimbrias (Rodríguez-Angeles 2002). En el mecanismo de patogenicidad de EAEC están implicados la bacteria y los productos que produce; también se sabe que las cepas EAEC tienen la capacidad de incrementar en la mucosa la producción y secreción de moco que atrapa a las bacterias que se autoaglutinan en una fina película en el epitelio intestinal. La producción de moco puede estar relacionada con la capacidad de EAEC para colonizar persistentemente el intestino y causar diarrea. El sitio blanco de daño de EAEC puede ser la mucosa del intestino grueso y delgado, con un periodo de incubación de menos de ocho horas y puede durar hasta 18 a 20 días. Esta bacteria puede causar brotes o casos aislados de diarrea persistente, también en niños puede manifestarse con diarrea líquida, de color verde, con moco, sin sangre, y que en ocasiones puede llegar a ser severa y requerir rehidratación intravenosa (Rodríguez-Angeles 2002).

f) *E. coli* de adherencia difusa

Las cepas de *E. coli* de adherencia difusa, no forman microcolonias cuando se adhieren a células HEp-2. Se sabe poco de su mecanismo de patogenicidad pero se ha caracterizado una fimbria de superficie, conocida como FI845, involucrada en el fenómeno de adherencia difusa, los genes que codifican para esta fimbria se pueden encontrar en el cromosoma o en un plásmido. El fenómeno de adherencia difusa también se ha asociado con una proteína de membrana externa de 100 kDa, en una cepa del serotipo 0126:H27, cuyos genes se han secuenciado pero sólo se han encontrado en una minoría de las cepas aisladas (Itoh, Sugita-Konishi et al. 1998). Al realizar ensayos *in vitro* en células CaCo y HEp-2, las cepas DAEC tienen la capacidad de inducir la formación de estructuras protuberantes, semejantes a dedos, las cuales confieren protección a las bacterias, pero la presencia de dichas estructuras no se ha demostrado *in vivo*. El grupo DAEC se puede aislar tanto de personas sanas como en personas con diarrea, siendo más importante en niños de 4 a 5 años. Los principales síntomas que se presentan son diarrea acuosa sin sangre y sin leucocitos (Rodríguez-Angeles 2002). Existen muy pocos estudios clínicos que permitan adecuar una descripción del síndrome clínico asociado con la infección por DAEC. En un estudio en Francia, observaron que la mayoría de los pacientes infectados con DAEC tuvieron diarrea acuosa sin sangre o leucocitos fecales (Poitrineau, Forestier et al. 1995). En diversos estudios se ha implicado a cepas de DAEC como agentes causantes de diarrea, Esto sugiere que *E. coli* adherencia difusa, quizás sea un patógeno importante causante de diarrea en niños, sin embargo, la prevalencia de DAEC no se conoce.

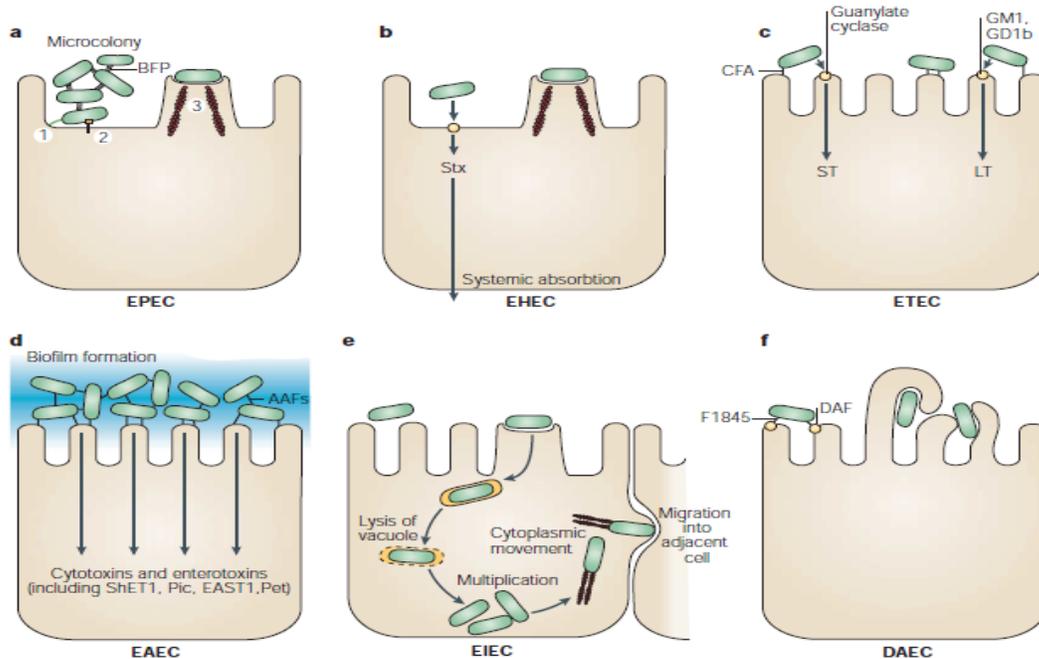


Figura 1. Patogenesis de Escherichia coli diarreogenicas: Este diagrama nos muestra los diferentes mecanismos de patogenesis utilizados por las DEC's **EPEC-** Se adhiere a las pequeñas cavidades de los enterocitos, pero destruye la arquitectura normal de las microvellosidades y adhesión con pequeñas lesiones (superficiales). Los cambios en el citoesqueleto son acompañados por una respuesta inflamatoria y diarrea. 1.- adhesión inicial 2.- translocación de la proteína del sistema de secreción tipo III 3.- formación en la base. **EHEC-** se adhiere a las pequeñas cavidades de los enterocitos pero en el colon la característica principal de EHEC es la elaboración de la shiga-toxina (stx), una absorción sistémica la cual amenaza al desarrollo de SUH. **ETEC-** Similarmente a EHEC, ETEC se adhiere a las pequeñas cavidades de los enterocitos e induce diarrea acuosa, por la secreción de las toxinas (Lt) y (ST). **EAEC-** Se adhiere a pequeñas o grandes cavidades epiteliales en una bicapa gruesa y elabora enterotoxinas secretoras y citotoxinas. **EIEC-** Esta invade la célula

epitelial colonica rompe el fagosoma y se mueve atravez de la célula, nucleando microfilamentos de actina. La bacteria podria moverse lateralmente por contacto con celula-celula propagandose ó podria salir y atravezar la membrana basolateral. **DAEC-** Nos muestra una característica, de efecto de transduccion de señal, en pequeñas cavidades de los enterocitos, que se manifiestan como un crecimiento de proyeccion celular la cual envuelve a la bacteria, AAF (agregative adherence fimbrae) , BFP (Bundle- forming pilus), CFA (cononization factor antogen) , DAF (decay aceleration factor), EAST1 (Enteroagregative E. coliST1), LT(heat labil enterotoxin), SHET1 (shigella enterotoxin1), ST (shiga-toxin enterotoxin). Tomado de Kaper y col. 2004.

5. Brotes epidemiológicos.

En Alemania del 2 de mayo al 13 junio del 2011, se notificaron 3,224 casos de STEC y SUH asociado con el brote del serotipo de E. coli O154:H4 , de los cuales 781 presentaron el SUH de los cuales fallecieron 22 y otros por STEC falleciendo 13 hasta esa fecha. El Síndrome Urémico Hemolítico (SUH), que puede producir insuficiencia renal, es una complicación de la infección por un tipo particular de *Escherichia coli* enterohemorrágica, productora de toxinas (toxinas tipo Shiga o verotoxinas) que dañan los glóbulos rojos y los riñones (Rivero, Padola et al. 2004). En los últimos años se han reportado varios brotes en diferentes países. En la actualidad los casos de diarrea más comunes y con más frecuencia en países en vías de desarrollos como los es México, son las enfermedades diarreogénicas ocasionados por EPEC, esta principalmente se presenta en niños menores de 2 años de edad, diferentes estudios realizados en México, Brasil, y África del Sur refieren que entre 30 y 40% de los casos de diarrea puede ser atribuido a cepas EPEC (Eslava C 1994) Dentro de la vigilancia epidemiológica que llevan a cabo las autoridades de salud en México,

se ha comunicado que EPEC se presenta en forma endémica hasta en 6% de la población (Flisser, Velasco-Villa et al. 2002), una cifra muy parecida a la informada para países industrializados como Alemania y Australia, en los que se ha encontrado que 5.9 y 7.6%, respectivamente, de niños sanos son portadores normales de cepas de EPEC (Beutin, Marchís et al. 2003).

En Mexico, particularmente en Sinaloa se ha investigado sobre los perfiles de resistencia a antibióticos para las muestras DEC's; el Dr. Adrian Canizalez Román y colaboradores en el año 2013, realizaron una investigación sobre "La prevalencia y perfiles de resistencia a antibióticos de muestras de *E. coli* diarreogénicas aisladas de alimentos en el noroeste de México", esta tipo de investigaciones se realizan con el fin de estar preparados para cualquier brote epidemiológico que pueda transcurrir y hacer conciencia sobre el uso indiscriminado de antibióticos.

6. Importancia de la resistencia antimicrobiana

Antes del descubrimiento y la utilización de los antimicrobianos, las enfermedades infecciosas eran la principal causa de muerte del ser humano, y lo siguen siendo en gran parte del mundo en países en vías de desarrollo en los cuales no hay acceso a medicamentos para controlar estos agentes causales. La resistencia antibiótica es un problema emergente a nivel mundial presente en diversas bacterias, en especial en *Escherichia coli*, que tiene altos porcentajes de resistencia hacia los principales antibióticos utilizados como ampicilina, trimetoprim-sulfametoxazol, tetraciclina, cloranfenicol y ácido nalidíxico, lo que supone grandes complicaciones en el tratamiento antibiótico cuando este es requerido, ya que una misma bacteria puede desarrollar varios mecanismos de resistencia frente a uno o varios antibióticos y de la misma manera un antibiótico puede ser inactivado por distintos mecanismos de

diversas especies bacterianas, por lo cual esto complica el tratamiento de las bacterias. Las infecciones por microorganismos resistentes relacionadas con la atención sanitaria son una importante causa de muerte en todos los países, habitualmente no hay diferencias de gravedad entre las enfermedades causadas por cepas sensibles y cepas resistentes. La resistencia no suele ser un problema de patogénesis, sino de limitación de las opciones terapéuticas debido a que la resistencia a los antibióticos es un problema de salud pública condicionado por las prácticas asistenciales, y en particular por el uso excesivo de los antibióticos en trastornos en los que no aportan beneficios, la resistencia es una característica de muchos patógenos causantes de diferentes enfermedades, por consiguiente, las estrategias de contención deben adaptarse a las necesidades de los programas de control y tratamiento de enfermedades específicas (Paredes, De La Peña et al. 1996).

Los seres humanos pueden ser colonizados con *E. coli* de origen animal y debido a la resistencia a los antimicrobianos de uso común, estas bacterias pueden causar infecciones para las que limitan las opciones terapéuticas disponibles. Esto puede llevar al fracaso del tratamiento y puede tener consecuencias graves para el paciente. Además *E. coli* de origen animal puede actuar como un donante de genes de resistencia antimicrobianos para otra *E. coli* patógena. Por lo tanto, el uso intensivo de los agentes antimicrobianos en animales productores de alimentos puede aumentar la carga de la resistencia a los antibióticos en los seres humanos (Hammerum and Heuer 2009).

7. Mecanismos de Resistencia a los antibióticos.

Debido a que las bacterias tienen distintos mecanismos de resistencia a los antibióticos esto puede llevar a una falla terapéutica por tal motivo es de gran importancia conocer los mecanismos de resistencia más prevalentes en las

bacterias Gram-negativas y específicamente en las DEC's. Estos mecanismos de resistencia podrían desglosarse en cuatro categorías según menciona (Sussmann, Mattos et al. 2002).

a) Modificación enzimática del antibiótico.

Las bacterias expresan enzimas capaces de crear cambios en la estructura del antibiótico haciendo que este pierda su funcionalidad. Las β -lactamasas son las más prevalentes, estas son proteínas capaces de hidrolizar el anillo β -lactámico que poseen los antibióticos de esta familia, de igual forma, las enzimas modificadoras de los aminoglucósidos son capaces de modificar estos antibióticos mediante reacciones de acetilación, adenilación y fosforilación. En este mecanismo de resistencia bacteriana se modifican algunos sitios específicos de la anatomía celular, como pared celular, subunidad 50s, 30S ribosomales, etc. De esta manera la modificación de enzimas catalizadoras en la producción de proteoglicanos celulares, conferirán resistencia a los β -lactámicos dados que es esta enzima su sitio de acción. (Sussmann, Mattos et al. 2002).

b) Bombas de expulsión

Este mecanismo se basa en tomar el antibiótico del espacio periplásmico y expulsarlo al exterior, con lo cual evitan que llegue a su sitio de acción. Este mecanismo es frecuentemente utilizado por las bacterias Gramnegativas como *E. coli* (Sussmann, Mattos et al. 2002).

c) Cambios en la permeabilidad de la membrana externa.

Las bacterias pueden generar cambios en la bicapa lipídica, aunque la permeabilidad de la membrana se vea alterada principalmente por cambios en las porinas, entre ellos, los antibióticos y los cambios en su conformación pueden llevar a que la membrana externa no permita el paso de estos agentes al espacio periplásmico. También existe una permeabilidad de la membrana interna, esta otra forma de resistencia de la bacteria consiste en una modificación energética que compromete el transportador aniónico que lleva el antibiótico hacia el interior de la célula, así también la presencia de la capa lipídica actuando como un mecanismo de resistencia para medicamentos hidrofóbicos (Sussmann, Mattos et al. 2002).

d) Alteraciones del sitio de acción

Las bacterias pueden alterar el sitio donde el antibiótico se une a la bacteria para interrumpir una función vital de esta, este mecanismo es principalmente utilizado por las bacterias grampositivas, las cuales generan cambios estructurales en los sitios de acción de los antibióticos β -lactámicos a nivel de las proteínas unidoras de penicilinas (Figura No. 2). La presencia de proteínas de membrana especializadas, altera la producción de energía y disminuye no solamente la entrada del antibiótico sino que a su vez las bacterias reducen la concentración del antibiótico y se promueve la extracción activa del mismo, así mismo confiere resistencia a tetraciclinas, fluoroquinolonas, cloramfenicol y B-lactámicos, antisépticos y desinfectantes de tipo amonio cuaternario (Sussmann, Mattos et al. 2002).

No es esta la única manera en que la presión selectiva durante la administración de un tipo de antimicrobiano genera resistencia. Por ejemplo una vez que la administración de ampicilina y derivados de penicilina da lugar a bacterias resistentes, fácilmente puede adquirirse resistencia a cefalosporinas de tercera generación debido a cambios puntuales en el gen de β -lactamasa. Otro ejemplo sería la resistencia debida a cambios en la permeabilidad de la bacteria, que generalmente impide la entrada de diversos grupos de antimicrobianos, cada día se conocen mayores detalles de estos procesos a nivel molecular ya que todo esto constituye un instrumento importante para el diseño de nuevos y mejores antimicrobianos con mayor especificidad y eficacia para tratar de controlar la resistencia bacteriana (Henderson, Navarro-Garcia et al. 2004).

Sin embargo, el hecho más importante es que este conocimiento lleva a la conclusión de que es necesario caracterizar genotípica así como fenotípicamente cada una de las cepas de *E. coli* diarreogénicas para la detección de la contribución o ausencia de elementos genéticos móviles, así también un uso más adecuado y racional de los antimicrobianos en la lucha constante contra las infecciones bacterianas.

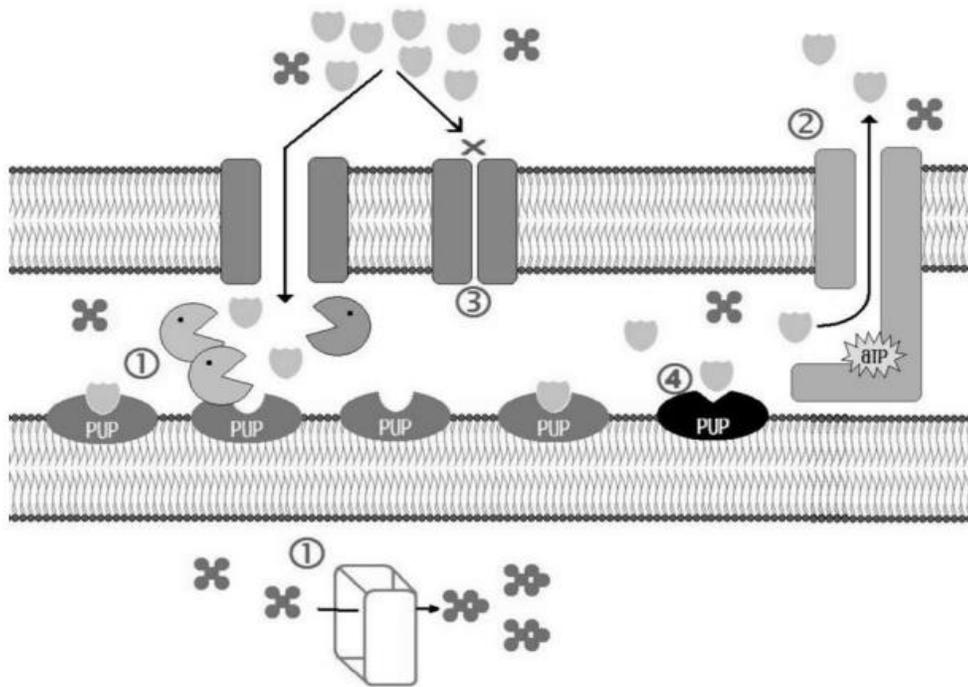


Figura 2. Principales mecanismos de resistencia a los antibióticos. 1. Enzimas modificadoras. 2. Bombas de expulsión. 3. Cierre de porinas. 4. Proteínas unidoras de penicilinas. Proteínas de unión a penicilinas (PUP).

Cuadro 2. Mecanismo de acción de las principales familias de antibiótico.

FAMILIA DE ANTIBIÓTICOS	FUNCIÓN
TETRACICLINAS	Inhibición de la síntesis proteica en el ribosoma de la bacteria, impidiendo la unión del ácido ribonucleico de transferencia (tRNA) a este y alteran la membrana citoplasmática de organismos susceptibles, permitiendo la salida de compuestos intracelulares.
B- LACTÁMICOS	Interfieren en la síntesis de la pared celular durante la replicación, debido a un efecto inhibitorio de la síntesis de la pared celular de la bacteria en sus últimas dos etapas. Uniéndose a las proteínas fijadoras de penicilinas (PBP), lo que lleva a la destrucción de la pared celular y la consiguiente lisis celular e inhibe la formación de puentes en la capa de peptidoglicano.
QUINOLONAS	Bloquea la actividad de la subunidad A del ADN girasa bacteriana. Tiene acción bactericida rápida (dosis dependiente), e interfiere en la replicación del ADN al bloquear o inhibir las enzimas esenciales topoisomerasas II y IV.
AMINOGLUCÓSIDOS	Inhibe la síntesis proteica, actuando sobre la unidad 30S de los ribosomas. Efecto bactericida debido a que además de actuar sobre la subunidad menor del ribosoma, actúa también aumentando la expresión genética del transportador (opp) lo cual genera un mayor gasto de ATP.
CLORANFENICOL	Inhibe la síntesis de proteínas, bloqueando la actividad de la enzima peptidil-transferasa, al unirse a la subunidad 50S del ribosoma, evitando la formación de enlaces peptídicos.
TMP-SMX	Trimetoprim inhibe a la enzima dihidrofolato reductasa, por lo que su inhibición impide la división del microorganismo, junto con las sulfamidas produce un bloqueo secuencial de la cadena metabólica.

8. Contribución de elementos genéticos móviles en *E. coli* patogénicas.

Los factores de virulencia pueden codificar para varios elementos genéticos móviles, incluyendo transposones (Tn) (por ejemplo, enterotoxina termoestable (ST) de ETEC), plásmidos (por ejemplo, enterotoxina termolábil (LT) de ETEC y factores invasivos de EIEC), bacteriófago (por ejemplo, Shiga toxina de EHEC) e islas de patogenicidad (PAIs) por ejemplo el locus de efacemento del enterocito, (LEE) de EPEC/EHEC y PAIs y II de UPEC (Figura 3.)

Una importante característica de patogenicidad de *E. coli*, es la asociación de genes que codifican factores de virulencia con elementos genéticos móviles, esta característica fue mostrada primeramente en cepas ETEC hace 30 años aproximadamente, en la cual la actividad enterotóxica era transferida junto con un mismo plásmido transmisible, en muchos casos, estos plásmidos fueron también mostrados para codificar resistencia a antibióticos, hoy en día se conocen numerosos ejemplos de plásmidos que codifican factores de virulencia de *E. coli* patogénica, incluyendo plásmidos en EAEC que codifican fimbria y toxinas; plásmidos en EIEC/Shigella que codifican el sistema de secreción tipo III y factores de invasión, el plásmido eaf de EPEC, que codifica bfp, y el plásmido pO157 de EHEC, que codifica toxinas accesorias. Aunque muchos de estos plásmidos se transmiten entre ellos mismos, la falta de conjugación de genes, puede ser solo transferido con un plásmido conjugado. Para ETEC, los genes que codifican ambos LT y ST son encontrados en plásmidos, pero algunos genes codifican STa, estos se encuentran en transposones que pueden ser insertados aun en plásmidos o bien en el cromosoma. El principal factor de virulencia de EHEC, Stx, es codificado en un bacteriófago lambda; la adquisición de este fago era de gran importancia para la evolución de EHEC. La secuencia genómica de EHEC EDL933 contiene 18 regiones con homología para conocer bacteriófagos, pero muchos parecen ser genomas incompletos de fagos. Aunque solamente el fago Stx parece ser capaz de incrementar la lisis y producción de partículas infecciosas, la secuencia criptica del fago es incapaz de continuar la evolución de estas cepas por recombinación homóloga de fagos hacia diferentes sitios del cromosoma.

La habilidad para producir Stx transmitido por transducción de los genes codificando el fago Stx a K-12 o *E. coli* comensal, pero este paso probablemente es insuficiente para conferir la virulencia por que la sepa de no-

O157:H7 conteniendo los genes Stx son otro factor de virulencia de EHEC, puede ser aislado de productos comerciales como la carne, esta observación refuerza el concepto de un simple gen es insuficiente para convertir *E. coli* comensal en *E. coli* patogénica, y esto en una combinación de genes codificando toxinas, factores de colonización y otras funciones que son requeridas para convertir *E. coli* en patógena (Kaper, Nataro et al. 2004)

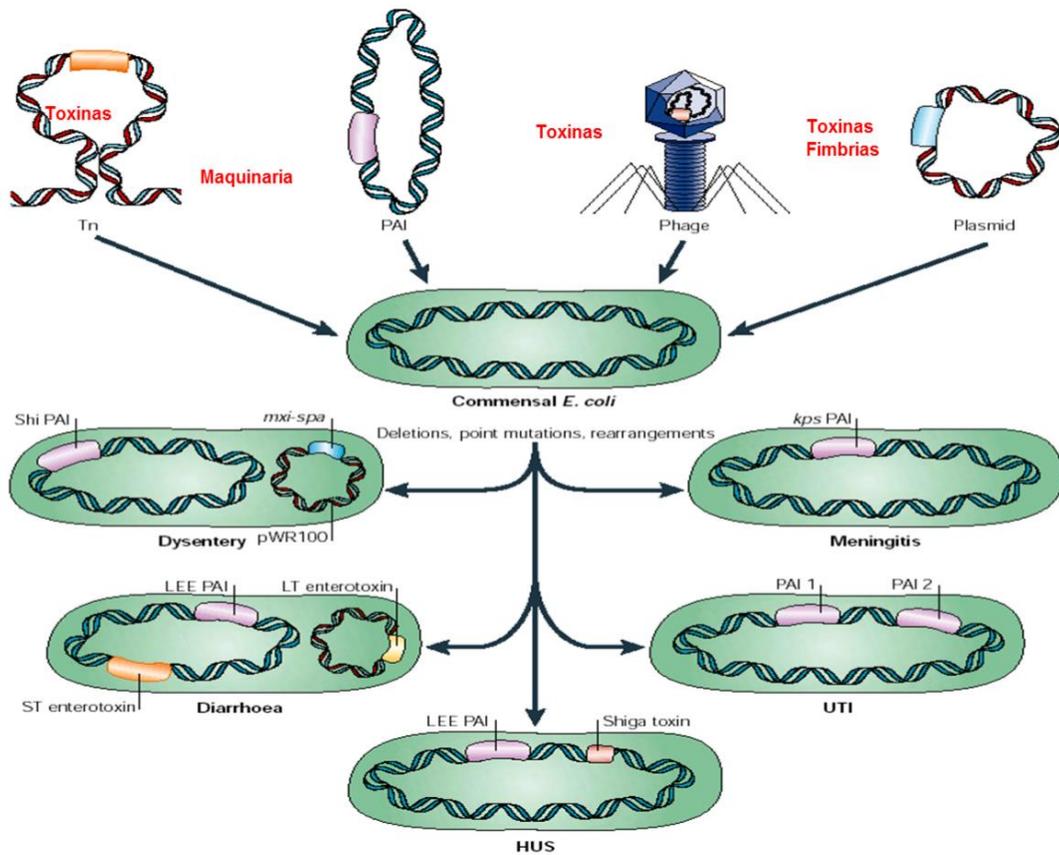


Figura 3. Los factores de virulencia. Estos pueden ser codificados por varios elementos genéticos móviles, incluyendo transposones (Tn) (por ejemplo, enterotoxina termoestable (ST) de ETEC), plásmidos (por ejemplo, enterotoxina termolábil (LT) de ETEC y factores invasivos de EIEC), bacteriófago (por ejemplo, Shiga toxina de EHEC) e islas de patogenicidad (PAIs)- por ejemplo el

locus de efacemento del enterocito, (LEE) de EPEC/EHEC y PAIs y II de UPEC. Las *E. coli* comensal pueden también generar deleciones en “Ollos negros”, mutaciones puntuales u otros reareglos de DNA que pueden contribuir en la virulencia. Estas adiciones, deleciones y otros cambios genéticos que pueden incrementar la patogenicidad de *E. coli* capaces de causar diarrea (EPEC, EHEC, EAEC, DAEC), disentería (EIEC), síndrome urémico hemolítico (EHEC), infecciones del tracto urinario (UPEC) y meningitis (MNEC). HUS, síndrome urémico hemolítico; UTI, infecciones del tracto urinario. Tomada de Kaper y col. 2004.

9. Proteínas autotransportadoras y mecanismos de secreción

Las bacterias secretan un gran número de proteínas al medio extracelular entre las que se incluyen toxinas, adhesinas y diversas enzimas hidrolíticas que se requieren en diferentes aspectos del ciclo de vida bacteriano, como por ejemplo en la biogénesis de organelos, adquisición de nutrientes y la expresión de factores de virulencia; la secreción de proteínas en bacterias es un área de investigación que ha sido extensamente estudiada en las últimas dos décadas, debido a la problemática que existe sobre la resistencia antimicrobiana. A pesar del número, la diversidad y la amplia variedad de funciones que desempeñan las proteínas secretadas (proteólisis, hemólisis, citotoxicidad, reacciones de fosforilación, etc.), éstas son translocadas utilizando un número limitado de mecanismos (González-Pedrajo and Dreyfus 2003) Las vías de secreción en las bacterias Gram-negativas han sido clasificadas en cinco grupos principales: secreción tipo I, II, III, IV y los autotransportadores (González-Pedrajo and Dreyfus 2003).

a) Sistema de secreción tipo I (SSTI)

Este mecanismo es utilizado por una amplia gama de bacterias para la secreción de toxinas, proteasas y lipasas, es una vía Sec-independiente, por lo que no se requiere del procesamiento de un péptido líder para atravesar la membrana citoplasmática; la secreción proteica se da en un solo paso desde el citosol hasta el exterior celular. Los sustratos al exportarse por este sistema presentan una señal de secreción en el extremo carboxilo terminal, que sin embargo, no es procesada ya que esta señal es específica para ciertas subfamilias de sustratos como por ejemplo, las proteasas; sin embargo, aún se desconoce la naturaleza de dicha señal y el mecanismo mediante el cual es reconocido (González-Pedrajo and Dreyfus 2003).

b) Sistema de secreción tipo II (SSTII)

El SSTII es responsable de secretar una gran cantidad de enzimas hidrolíticas y toxinas. Esta vía también se conoce como sistema general de secreción y ocurre en dos etapas. Primero, la maquinaria Sec transloca el sustrato con péptido líder a través de la membrana plasmática, por lo que el SSTII es una vía Sec-dependiente, dicho péptido es generalmente una secuencia corta (de aproximadamente 30 aminoácidos), de los que uno o varios presentan carga positiva, además de una secuencia de 10 a 20 aminoácidos hidrofóbicos (González-Pedrajo and Dreyfus 2003) En una segunda etapa, la proteína pierde el péptido señal y adquiere su conformación nativa en el espacio periplásmico, para posteriormente ser secretada a través de la membrana externa por un complejo sistema multiproteico llamado tipo II (González-Pedrajo and Dreyfus 2003).

c) Sistema de secreción tipo III (SSTIII)

El SSTIII constituye un área de investigación que ha sido extensamente estudiada en los últimos años, este sistema es una vía Sec-independiente en donde la secreción ocurre en un solo paso desde el citosol hasta el exterior celular, que desempeña un papel central en la patogenicidad de muchas bacterias Gram-negativas como *E. coli*. El SSTIII ha sido identificado en una gran variedad de patógenos en humanos, animales y plantas, incluyendo especies de *Bordetella*, *Chlamydia*, *Erwinia*, *E. coli*, *Pseudomonas*, *Ralstonia*, *Rhizobia*, *Salmonella*, *Shigella*, *Xanthomonas* y *Yersinia*. Mediante este sistema los factores de virulencia se pueden translocar hasta el citosol de la célula eucarionte. La maquinaria está conservada entre los diferentes patógenos, sin embargo las proteínas secretadas difieren completamente, por lo que el mismo mecanismo de transporte puede generar una amplia gama de enfermedades. Además de su papel en la patogénesis, el SSTIII se requiere para la biogénesis flagelar y es también esencial para el establecimiento de la relación simbiótica entre *Rhizobium* y plantas leguminosas (González-Pedrajo and Dreyfus 2003).

d) Sistema de secreción tipo IV

El SSTIV es una vía recientemente identificada, homóloga a los sistemas de conjugación y al sistema *VirB* de *Agrobacterium tumefaciens*, que facilitan la translocación de DNA. Este sistema es un transportador versátil que secreta tanto ácidos nucleicos como proteínas, la exportación de la toxina pertussis (agente causante de la tos ferina) por *Bordetella pertussis* se lleva a cabo a través de esta vía y se han identificado sistemas homólogos en diferentes patógenos como *Legionella*, *pneumophila*, *Helicobacter pylori* y *Brucella suis*, entre otros (González-Pedrajo and Dreyfus 2003).

e) Autotransportadores

A través de este sistema se exportan proteínas con diferentes funciones incluyendo proteasas, toxinas, adhesinas e invasinas. Los autotransportadores representan una vía Sec-dependiente ya que utilizan la maquinaria Sec para atravesar la membrana interna; sin embargo, las proteínas no requieren de factores adicionales para transmitir del periplasma hacia el exterior celular, como su nombre lo indica, dirigen su propia exportación. El extremo carboxilo terminal de la proteína dirige la secreción de la región amino terminal a través de la membrana externa (González-Pedrajo and Dreyfus 2003). Recientemente, varias proteínas autotransportadoras han sido descritas, algunas de ellas identificadas en *E. coli* y en distintas bacterias Gram negativas, estas a menudo asociadas con funciones de virulencia como se menciona, la adherencia, agregación, invasión, formación de la Biocapa y toxicidad. Las proteínas autotransportadoras son secretadas por el sistema de secreción tipo V, la ruta de secreción más amplia para el transporte a través de la membrana externa en bacterias gram negativas, incluyendo la ruta autotransportadora (también conocida como AT-1 o tipo Va), además de la segunda ruta que acompaña la secreción (también conocida como tipo Vb), y el sistema Oca también conocido como AT-2, tipo Vc, ó adhesión autotransportadora trimétrica.

El proceso de las proteínas autotransportadoras comprende una estructura general de tres dominios funcionales, la secuencia amino-terminal, la cual inicia el transporte del precursor a través de la membrana interna; el dominio pasajero el cual confiere la función de secretar proteínas y una carboxilo terminal dominio β , que forma un poro de barril β , que permite la secreción de la proteína pasajera hacia la membrana externa (Abreu, Bueris et al. 2012). Se han identificado en la última década diferentes proteínas autotransportadoras y actividades principales para cada DEC, entre ellas Pet

(efectos enterotoxícos y citopáticos) (Barnard, Dautin et al. 2007) y Pic (con actividad mucinasa y secreción de tipo factor V) (Henderson and Nataro 2001). Estos se encuentran en el patotipo enteroagregativo de *E. coli*; Este mecanismo transcurre dentro de un mecanismo de secreción de un autotransportador para ejercer su función (Figura No. 4)

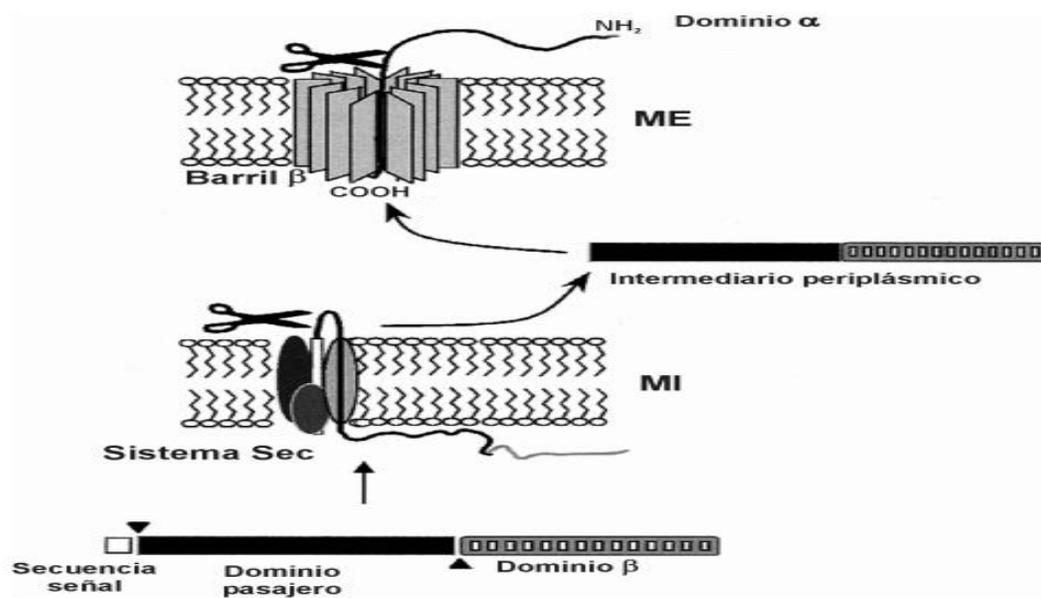


Figura 4. Mecanismo de secreción de un auto-transportador. La proteína a secretarse tiene tres dominios: la secuencia señal, el dominio pasajero y el dominio β en el carboxilo terminal. El péptido líder dirige la secreción vía el sistema Sec- y se procesa en la cara periplásmica de la MI. El dominio β del intermediario periplásmico adquiere la conformación de barril-β y se inserta en la ME para formar el poro. Por último se transloca el dominio pasajero a la superficie celular en donde puede permanecer unido o bien procesarse.

Cuadro 3. Principales factores de virulencia de las diferentes proteínas autotransportadoras para *E. coli*.

	PROTEINAS AUTOTRANSPORTADORAS	FUNCIÓN	REFERENCIA
Aida-I	(Adhesin involved in diffuse adherence)	Adherencia y formación de biofilm.	Alfonso G. Abreu et al. 2013
Cah	(Calcium-binding antigen 43 homologue)	Formación de biofilm y autoagregación.	(Restieri,2007)
eatA	(ETEC Autotransporter A)	Serina proteasa	(Restieri,2007)
ehaA	(EHEC Autotransporter A)	Formacion de biofilm	Alfonso G. Abreu et al. 2013
ehaB	(EHEC Autotransporter B)	Formacion de biofilm	Alfonso G. Abreu et al. 2013
ehaC	(EHEC Autotransporter C)	Desconocida	Alfonso G. Abreu et al. 2013
ehaD	(EHEC Autotransporter D)	Formacion de biofilm	Alfonso G. Abreu et al. 2013
epeA	(EHEC Plasmid encoded autotransporter)	Proteasa y actividad mucinolítica	Alfonso G. Abreu et al. 2013
espC	(E. coli secreted protein C)	Actividad enterotóxica y canales de espectrina, pepsin y factor V.	(Restieri,2007)
espl	(E. coli secreted proteasa)	Degradacion de proteínas plasmáticas	(Schmidt,2001)
espP	(Extracelular serina proteasa)	Canals de espectrina, pepsin y factor V.	(Restieri,2007)
Pet	(Plasmid encoding toxin)	Toxina enterotóxica, citopática y efectos de canales de espectrina.	(Restieri,2007)
Pic	(Protein involved in colonization)	Activada mucinasa y canales de factor V.	(Henderson,Czeczulin et al. 1999)
Sab	(STEC Autotransporter)	Formacion de biofilm	Herold S.,2009
Sat	(Secreted Autotransporter toxin)	Efectos de toxinas citopáticas, canales de espectrina y factor V.	(Boisen, Ruiz-Perez et al. 2009)
Tib-A	(TibA)	Formación de biofilm, adherencia y autoagregación.	Alfonso G. Abreu et al. 2013

IV. JUSTIFICACIÓN

Hoy en día ha habido un considerable incremento de brotes ocasionados por *Escherichia coli* (*E. coli*) diarreogénicas, afectando a miles de personas (morbilidad y mortalidad) en diferentes países, así como también en México y en particular al Estado de Sinaloa. El caracterizar de forma fenotípica y molecular la resistencia antimicrobiana así como identificar a sus factores de virulencia en las diferentes *Escherichia coli* diarreogénicas aisladas de Aguas, Alimentos y de heces de pacientes con un cuadro diarreico en Sinaloa nos permitirá avanzar en el mejor entendimiento de la importancia de estos organismos como agentes etiológicos de diarreas, particularmente en Sinaloa y contar con un panorama actual de los factores de virulencia y resistencia a antibióticos presentes en las *E. coli* diarreogénicas reflejando su prevalencia en el noroeste del País. Esta información puede apoyar al sector salud para tomar acciones preventivas (del sistema estatal de vigilancia epidemiológica), para reducir la morbilidad en la población por estos patógenos.

IV. HIPÓTESIS

Las cepas de *E. coli* patógenas aisladas de pacientes y de alimentos en el estado de Sinaloa presentan diferentes mecanismos de resistencia antimicrobiana y otros factores de virulencia (proteínas autotransportadoras).

VI. OBJETIVOS

A. Objetivo General

Caracterizar molecularmente la resistencia antimicrobiana y los factores de virulencia en *E. coli* patógenas aisladas de pacientes y de alimentos.

B. Objetivos específicos

1. Identificar los genes asociados a resistencia de antibióticos en las cepas de *E. coli* diarreogénicas aisladas de pacientes y alimentos.
2. Determinar el perfil de los diferentes plásmidos encontrados en las cepas de *E. coli* diarreogénicas aisladas de pacientes y alimentos.
3. Caracterizar molecularmente la presencia de las proteínas autotransportadoras en las cepas diarreogénicas.

VII. MATERIALES Y MÉTODOS

A. Población de Estudio.

El estudio se llevó a cabo en la Unidad de Investigación de la Facultad de Medicina, en el laboratorio de Biología Molecular, de donde se utilizaron 306 muestras de *E. coli* diarreogénicas aisladas de pacientes, alimentos y aguas de un total de 6,545 muestras. Se analizarán 235 cepas provenientes de 1,037 (22.6%) Pacientes, 42 cepas provenientes de 5,036 (0.83%) Alimentos y 29 cepas provenientes de 472 (6.1 %) aguas en el estado de Sinaloa.

B. Susceptibilidad a los antibióticos.

Las cepas DEC fueron analizadas por el método estándar de difusión en disco en agar Mueller-Hinton II (CLSI 2011). Los sensi-discos de antibióticos (BD BBL, Sensi-Disc, Becton, Dickinson and Company, USA) utilizados fueron los siguientes: ampicilina (10 µg), tetraciclina (30 µg), trimetoprim-sulfametoxazol (1.25 µg/23.75 µg), cloranfenicol (30 µg), ácido nalidixico (30 µg), ciprofloxacino (5 µg), ceftazidima (30 µg), gentamicina (10 µg), y cefotaxima (30 µg). Para la interpretación de la susceptibilidad antimicrobiana nos basamos en el manual de la Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI 2011). para la determinación de las zonas en sensibles, intermedios o resistentes en las enterobacterias. En resumen las cepas DEC fueron descongeladas en caldo Mueller-Hinton e incubadas en agitación durante toda la noche a 37 °C para el día siguiente ser diluidas en solución salina estéril hasta ajustar al 0.5 de la escala de McFarland que representa $1-2 \times 10^8$ UFC/mL. Posteriormente con la ayuda de un hisopo de rayón estéril, la suspensión fue inoculada en agar Mueller-Hinton II, seguido a esto depositamos los sensi-

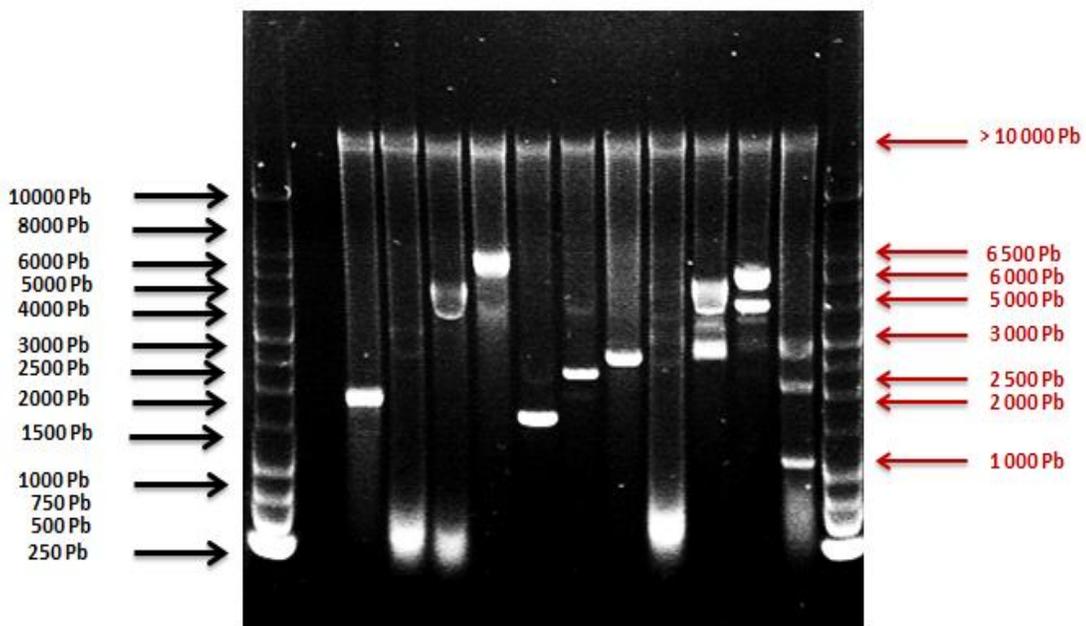
discos con la ayuda de un dispensador de 8 plazas, el noveno antibiótico lo depositamos de manera manual. Este cultivo, se incubo por 18-24 horas a 37°C, posteriormente con la ayuda de un vernier digital se procedió realizar las mediciones de los halos de inhibición y de esta manera identificar y clasificar si la cepa era sensible, intermedio o resistente al antibiótico evaluado.

C. Extracción e identificación de ADN plasmídico

El proceso de extracción de ADN plasmídico se realizó a temperatura ambiente, se transfirieron 600 µl de cultivo bacteriano crecido en medio LB en un microtubo de 1.5 ml. Posteriormente se añadieron 100 µl de buffer de lisis y se mezcló invirtiendo el tubo 6 veces (la solución cambió de opaco a azul claro, indicando una lisis completa), se le añadieron 350 µl de la solución neutralizadora fría (4-8 °C) y se mezcló invirtiendo el tubo (la muestra se tornó color amarillo indicando el final de la neutralización formando un precipitado amarillo, posteriormente se centrifugo la mezcla a máxima velocidad (14,000xg) en una microcentrifuga por 3 minutos, luego se transfirió el sobrenadante (alrededor de 900 µl) a una microcolumna PureYield™ para luego centrifugar a máxima velocidad por 15 segundos. Se desechó el filtrado y en la misma microcolumna PureYield™ se añadió 200 µl de lavado de endotoxina, se centrifugó a máxima velocidad por 15 segundos. Se agregó la solución de lavado en la minicolumna y posteriormente se centrifugó a máxima velocidad por 30 segundos. Finalmente, se transfirió la minicolumna a un tubo de microcentrifuga limpio de 1.5 ml y se añadió 30 µl de buffer de elución en la microcolumna, se dejó reposar 1 min a temperatura ambiente, para por último se centrifugo a máxima velocidad. Se desechó la minicolumna obteniéndose el ADN plasmídico. El ADN plasmídico purificado se identificó mediante una electroforesis en gel de agarosa al 0.8 % bajo las siguientes condiciones: a 90 volts por 1 hora y 45 min (se utilizó una mezcla del colorante 6X Dye (2 µl) y 5 µl

de DNA plasmídico) como referencia se utilizó un marcador de tamaño molecular de 1 kb marca Promega.

Figura 5.- Gel de agarosa para visualizar el ADN plasmídico. Gel de agarosa al 0.8% teñido con el colorante GelRed. Carril 1 y 13 Marcador de tamaño molecular 1 Kb, carril 2 agua, Carril 3 al 12 DNA plasmídicos, presentes en *E. coli* diarreogénicas.



D. Extracción de ADN genómico.

El proceso de extracción y purificación de ADN genómico se realizó a temperatura ambiente, se transfirió 1 ml de cultivo bacteriano en medio LB a un microtubo de 1.5 ml. Posteriormente se centrifugó a máxima velocidad (14,000 x g) por 2 min, eliminando el sobrenadante y luego se añadieron 600 µl de la solución “*Nuclei Lysis Solution*” (para resuspender la pastilla bacteriana formada). Se incubó a 80 °C durante 5 min y posteriormente se enfría a

temperatura ambiente. A continuación se añadieron 3 μl de “*RNasa Solution*” (Mezclando de 2 a 5 veces). Para luego incubar a 37 °C por 45 min. Una vez terminada la incubación se añadieron 200 μl de “*Protein Precipitation Solution*” y se agito con vortex a máxima velocidad durante 20 segundos y se incubo durante 5 minutos en hielo, al finalizar la incubación se centrifuga a máxima velocidad durante 5 min.

Posteriormente, se transfirió el sobrenadante a un tubo de 1.5 ml que contenga 600 μl de isopropanol y se mezcló por inversión hasta formarse una masa visible, luego se centrifugó a máxima velocidad (14,000 x *g*) durante 2 min. Se desechó el sobrenadante y se drenó en papel absorbente, luego se añadieron 600 μl de etanol al 70 % y se invirtió varias veces para lavar DNA pellet y se centrifugó a máxima velocidad (14,000 x *g*) durante 2 min. Se eliminó el etanol cuidadosamente y se drenó en papel absorbente hasta que la pastilla se secó durante 10 a 15 min. Finalmente, se añadieron 100 μl de “*DNA Rehydration Solution*” para rehidratar el DNA incubando a 65 °C por 1 hora mezclando periódicamente para la obtención de DNA genómico y posterior se almaceno a una temperatura de -20 °C.

E. Identificación de genes relacionados a resistencia mediante PCR punto final

La identificación de cada uno de los genes asociados a resistencia se realizó por medio de la Reacción de Cadena de la Polimerasa (PCR) punto final. Para cada uno de los genes asociados a resistencia se siguieron las condiciones descritas por los autores en el Cuadro 4. Sin embargo, la mezcla maestra se ajustó a un volumen final de 25 μl , la cual consistió en 1x GoTaq Green Master Mix (Promega) 1 μL de cada primer (concentración 10 nM) y 1 μg de DNA genómico, finalmente se ajustó el volumen con de agua grado biología

molecular. La PCR se llevó acabo en un Termociclador C1000 (Bio-Rad Laboratories, Hércules, California), El control negativo se realizó simultáneamente sustituyendo el DNA por agua grado biología molecular en la mezcla de PCR.

Por último, se utilizaron 10 μ l de alícuotas para cada producto de amplificación, los cuales fueron separados por electroforesis en geles de Agarosa al 2% y teñidos con el colorante GelRed a una concentración de 1000X en 30 mL de Agarosa, para la visualización de fragmentos de DNA con un sistema de imagen digital (Model E1 logia 100 Imagen System; Kodak). El tamaño de los fragmentos de PCR fueron comparados con un marcador de tamaño molecular de 100pb (Promega DNA step ladder).

Cuadro 4. Oligonucleótidos que se utilizaron en la PCR, para la amplificación de los diferentes genes relacionados con los mecanismos de resistencia a antibióticos.

Familia de Antibióticos	Genes	Secuencias	Amplicón (pb)	Tm (°C)	Referencia
Tetraciclinas	tetA	F: GTAATTCTGAGCACTGTTCGC R: CTGCCTGGACAACATTGCTT	956	60	(Ng, Mulvey et al. 1999)
	tetB	F: CTCAGTATTCCAAGCCTTTG R: ACTCCCCTGAGCTTGAGGGG	414	60	
	tetG	F: GCAGCGAAAGCGTATTTGCG R: TCCGAAAGCTGTCCAAGCAT	662	60	
B-Lactámicos	CTXM	F:CAAGCGCAGGTGGGCGACAGCAC R:CTTTTGCCGTCTAAGGCGATAAAC	950	59	(Morita, Takai et al. 2010)
Quinolonas	qnrA	F: TTCAGCAAGAGGATTTCTCA R: GGCAGCACTATTACTCCCAA	627	55	(Wu, Ko et al. 2008)
	qnrB	F: CCTGAGCGGCACTGAATTTAT R: GTTTGCTGCTCGCCAGTCGA	408	55	
Aminoglucocidos	aaC(3)	F: TTGATCTTTTCGGTCGTGAGT R: TAAGCCGCGAGAGCGCCAACA	750	64	(Frana, Carlson et al. 2001)
	aadB	F: GAGCGAAATCTGCCGCTCTGG R: CTGTTACAACGGACTGGCCGC	320	64	
Ampicilinas	bla-TEM-1	F: TTGGGTGCACGAGTGGGT R: TAATTGTTGCCGGGAAGC	503	60	(Gallardo, Ruiz et al. 1999)
	bla-CYM-2	F: CGATCCGGTCACGAAATACT R: CCAGCCTAATCCCTGGTACA	556	60	(Dahshan, Chuma et al. 2010)
Cloranfenicol	cmIA1	F: TGTCAATTTACGGCATACTCG R: ATCAGGCATCCCATTCCCAT	435	55	(Guerra, Soto et al. 2001)
Sulfonamidas	Sul 1	F: CTTGATGAGAGCCGGCGGC R: GCAAGGCGGAAACCCGCGCC	435	60	(Chu, Chiu et al. 2001)
	Sul 2	F: GCGCTCAAGGCAGATGGCATT R: GCGTTTGATACGGCACCCGT	293	60	
Trimetoprim-sulfametoxazol	dfra12	F: ACTCGGAATCAGTACGCA R: GTGTACGGAATTACAGCT	462	60	(Sandvang, Aarestrup et al. 1997)

F. Identificación de genes que codifican para proteínas autotransportadoras mediante PCR punto final

La identificación de cada uno de los genes que codifican para proteínas autotransportadoras se realizó por medio de la Reacción de Cadena de la Polimerasa (PCR) punto final. Para cada uno de los genes se siguieron las condiciones descritas por los autores en el Cuadro 3. Sin embargo, la mezcla maestra se ajustó a un volumen final de 25 μ l, la cual consistió en 1x GoTaq Green Master Mix (Promega), 1 μ L de cada primer (concentración 10 nM) y 1 μ g de DNA genómico, finalmente se ajustó el volumen con de agua grado biología molecular. La PCR se llevó acabo en un Termociclador C1000 (Bio-Rad Laboratories, Hércules, California). El control negativo se realizó simultáneamente sustituyendo el DNA por agua grado biología molecular en la mezcla de PCR.

Por último, se utilizaron 10 μ l de alícuotas para cada producto de amplificación, los cuales fueron separados por electroforesis en geles de Agarosa al 2% y teñidos con el colorante GelRed a una concentración de 1000X en 30 mL de Agarosa, para la visualización de fragmentos de DNA con un sistema de imagen digital (Model E1 logia 100 Imagen System; Kodak). El tamaño de los fragmentos de PCR fueron comparados con un marcador de tamaño molecular de 100pb (Promega DNA step ladder).

G. Estadístico de prueba.

Todos los datos obtenidos se analizaron en el programa Sigma Plot[®] versión 12, y se utilizó una prueba de Chi cuadrada para las comparaciones de las proporciones con un nivel de significancia del 95% ($p \leq 0.05$).

Cuadro 5. Secuencias de oligonucleótidos de proteínas autotransportadoras que se utilizaron en la amplificación por PCR y su mecanismo de acción.

Proteínas	Secuencias	Mecanismos de acción	Tamaño (Pb)	Temp. °C	Referencia
Aida-I	F:CTTCTCTCTGATGGTTATGC R:AACATTGAACCATACCGCCG	Adhesinas involucradas en adherencia difusa	342	60	(Abreu, Bueris et al. 2012)
Sat	F:TCAGAAGCTCAGCGAATCATTG R:CCATTATCACCAGTAAAACGCACC	Efectos toxina citopática, canal de espectrina y factor V.	930	59	(Boisen, Ruiz-Perez et al. 2009)
tibA	F:ATGGTTGGCAGTGACGGTA R:GGTTGTTGACGGACGGAAA	Formación de biofilm, adherencia y autoagregación	480	58	(Abreu, Bueris et al. 2012)
eatA	F:CAGGAGTGGGAACATTAAGTCA R:CGTACGCCTTTGATTTTCAGGAT	Serina proteasa	743	60	
espC	F:TAGTGCAGTGCAGAAAGCAGTT R:AGTTTTCTGTTGCTGTATGCC	Actividad enterotoxica y canal de espectrina, Pepsina y factor V.	301	55	(Restieri, Garriss et al. 2007)
Pet	F:GGCACAGAATAAAGGGGTGTTT R:CCTCTTGTTCACGACATAC	Efectos de toxina Enterotoxica y citopática y un canal de espectrina.	302	58	
Pic	F:GGGTATTGTCCGTTCCGAT R:ACAACGATACCGTCTCCCG	Actividad musinasa y canal de factor V.	1,176	60	(Henderson, Czczulin et al. 1999)
Cah	F:CGTATCGCTGTGCCGATAAC R:CCGTATACGAGTTGTCAGAATCA	Formación de la Biocapa Y autoagregación.	707	58	(Restieri, Garriss et al. 2007)
Sab	F:CGTGGATACAGCAGGTAATC R:TATCTCACCACTGCTATCG	Formación de biofilm	163	59	(Herold, Paton et al. 2009)
ehaA	F:CACAGATGACAGAAGGGAC R:GTTACCCCACTCGTCAG	Formación de biofilm	326	59	
ehaB	F:CAGGGTTATGAGTGGGAAG R:CCACTTGCTGCCGTTGTT	Formación de biofilm	423	59	
ehaC	F:TAATGACGGCAAAGGTGGT R:CATTCATCAGGGAGTTGCT	Desconocida	599	59	(Abreu, Bueris et al. 2013)
ehaD	F:GGCAGTTGACACGATTATTA R:CTGTGCTTTGCCATTATC	Formación de biofilm	821	59	
epeA	F:GGGAGAGTTCAGGCATTTA R:CAGCGTTACCTTACTTGAC	Actividad proteasa y mucinasa	783	57	
espl	F:ATGGACAGAGTGGAGACAG R:GCCACCTTTATTCTCACCA	Degradación de proteínas plasmáticas.	560	52	(Schmidt, Zhang et al. 2001)
espP	F:GTCCATGCAGGGACATGCCA R:TCACATCAGCACCGTTCTCTAT	Daño por espectrina, pepsina y factor V.	547	55	(Restieri, Garriss et al. 2007)

VIII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las *Escherichia coli* diarreogénicas en los últimos años se han vuelto un riesgo para la salud pública a nivel mundial, principalmente en niños y personas en países en vías de desarrollo como el nuestro, estos agentes causan un cuadro de diarrea persistente y la principal vía de infección para humanos es el consumo de agua y alimentos contaminados con estos microorganismos. Por lo cual, en el presente trabajo se caracterizó molecularmente las cepas *E. coli* patógenas aisladas de muestras clínicas, alimentos y aguas mediante la evaluación de la resistencia antimicrobiana, los genes que codifican para dicha resistencia y otros factores de virulencia (proteínas autotransportadoras).

Las cepas de *Escherichia coli* productoras de diarrea (DEC`s) analizadas en este trabajo fueron aisladas de diferentes fuentes, en donde 235 cepas (235/1,037) fueron aisladas de heces de pacientes con un cuadro diarreico a partir de las cuales se aislaron los patotipos EAEC, EPEC, ETEC, DAEC, EIEC y STEC, 42 cepas (42/5,036) fueron aisladas de diferentes tipos de alimentos, encontrando a los patotipos EAEC, EPEC, ETEC y STEC y por último, 29 (29/472) cepas fueron aisladas de muestras de aguas de riego, canales o ríos de las cuales se logró el aislamiento de los patotipos EAEC, EPEC, ETEC y DAEC. Todas las muestras fueron obtenidas a lo largo del estado de Sinaloa (clínicas, de alimentos y de aguas), desde la zona norte, centro y sur del mismo. Durante el desarrollo del presente estudio se analizaron un total de 306 cepas DEC, a las cuales primero se le determinó el perfil de resistencia a fármacos mediante el método Kirby-bauer. Encontramos que las cepas aisladas de muestras clínicas y de alimentos presentaron mayor resistencia al antibiótico tetraciclina (72.7%,171/235 y 38%,16/42, respectivamente), seguido de las

cepas resistentes a ampicilina (69.7%,164/235 y 26.1%,11/42; Cuadro 6), y las cepas resistentes a Trimetoprim-Sulfametoxazol (64.6%,152/235 y 19%,8/42, respectivamente). Por otra parte, las cepas procedentes de aguas presentaron principalmente resistencia a ampicilina (44.8%,13/29), seguido por tetraciclina (37.9%,11/29) y trimetoprim-sulfametoxazol (13.7%,4/29).

Cuadro 6. Resistencia fenotípica a los diferentes fármacos evaluados en las cepas de *E. coli* diarreogénicas por fuente de aislamiento.

DEC'S POR FUENTE DE AISLAMIENTO	Tetraciclinas		B-lactámicos		Quinolonas		Aminoglucósidos	Cloranfenicol	TMP-SMX
	Tetraciclina R (%)	Ceftazidima R (%)	Ampicilina R (%)	Cefotaxima R (%)	Ácido Nalidixico R (%)	Ciprofloxacina R (%)	Gentamicina R (%)	Cloranfenicol R (%)	Trim-Sulfa R (%)
CLÍNICAS n=235	171(72.7%)	19(8%)	164(69.7%)	69(29.3%)	80(34%)	51(21.7%)	48(20.4%)	56(23.8%)	152(64.6%)
ALIMENTOS n=42	16(38%)	2(4.7%)	11(26.1%)	11(26.1%)	3(7.1%)	2(4.7%)	3(7.1%)	2(4.7%)	8(19%)
AGUAS n=29	11(37.9%)	3(10.3%)	13(44.8%)	14(48.2%)	1(3.4%)	1(3.4%)	2(6.8%)	1(3.4%)	4(13.7%)
TOTAL n=306	198(64.7%)	24(7.8%)	188(61.4%)	94(30.7%)	84(27.4%)	54(17.6%)	53(17.3%)	59(19.2%)	164(53.5%)

NOTA: Los valores en la tabla representan el número de cepas resistentes a cada uno de los antibióticos evaluados.

La proporción de cepas DEC resistentes a tetraciclina, ampicilina y Trimetoprim-Sulfametoxazol aisladas de muestras clínicas fue mayor estadísticamente significativa ($p < 0.05$) que las cepas DEC aisladas de alimentos y aguas. Sin embargo, las cepas DEC aisladas de cualquier fuente (Clínica, alimento y agua) presentaron una menor proporción de cepas resistentes a los antibióticos ceftazidima, cefotaxima, gentamicina, cloranfenicol, ácido nalidíxico y ciprofloxacino (Cuadro 6).

Una vez evaluada la resistencia a los principales antibióticos de forma integral para todas las cepas DEC de acuerdo al origen de aislamiento, decidimos analizar dicha resistencia por categoría de *E. coli*. Las cepas de EAEC y EPEC presentaron principalmente resistencia a tetraciclina

(68.8%,95/138 y 67.3%,62/92) respectivamente, seguido por la resistencia a ampicilina (65.9%,91/138 y 51%,47/92), y resistencia a Trimetoprim-sulfametoxazol (61.5%,85/138 y 51%,47/92 respectivamente; Cuadro 7). Por otra parte, estas cepas fueron más susceptibles a los antibióticos ácido nalidixico, cefotaxima, cloranfenicol, gentamicina, ciprofloxacino y ceftazidima, este último fue el antibiótico con mayor eficacia debido a que solo el 5 y 8% de las cepas de EAEC y DAEC fueron resistentes (Cuadro 7). En las cepas de DAEC, y de ETEC, presentaron mayor resistencia a ampicilina (73.9%,17/23 y 61.3%,27/44 respectivamente), seguido por las cepas resistentes a tetraciclina (60%,14/23 y 45.4%,20/44), y trimetoprim-sulfametoxazol (52.1%,12/23 y 36.3%,16/44 respectivamente; Cuadro 7). Al igual que los patotipos anteriores las cepas de DAEC y ETEC fueron más susceptibles a los antibióticos ácido nalidixico, cefotaxima, cloranfenicol, gentamicina, ciprofloxacino y ceftazidima, siendo ciprofloxacino el antibiótico más eficaz en DAEC (13% de cepas resistentes) y ceftazidima para las cepas de ETEC (6.8%).

Cuadro 7. Resistencia fenotípica a los diferentes fármacos evaluados en las cepas de *E. coli* diarreogénicas por patotipo.

DEC'S POR CATEGORÍA	Tetraciclinas		B-lactámicos		Quinolonas		Aminoglucósidos	Cloranfenicol	TMP-SMX
	Tetraciclina R (%)	Ceftazidima R (%)	Ampicilina R (%)	Cefotaxima R (%)	Ácido Nalidixico R (%)	Ciprofloxacina R (%)	Gentamicina R (%)	Cloranfenicol R (%)	Trim-Sulfa R (%)
EAEC n=138	95(68.8%)	7(5%)	91(65.9%)	30(21.7%)	39(28.2%)	19(13.7%)	20(14.4%)	23(16.6%)	85(61.5%)
EPEC n=92	62(67.3%)	8(8.6%)	47(51%)	32(34.7%)	32(34.7%)	27(29.3%)	12(13%)	27(29.3%)	47(51%)
ETEC n=44	20(45.4%)	3(6.8%)	27(61.3%)	15(34%)	8(18.1%)	5(11.3%)	12(27.2%)	5(11.3%)	16(36.3%)
DAEC n=23	14(60%)	6(26%)	17(73.9%)	14(60.8%)	5(21.7%)	3(13%)	7(30.4%)	4(17.3%)	12(52.1%)
STEC n=7	5(71.4%)	0	6(85.7%)	1(14.2%)	0	0	1(14.2%)	0	3(42.8%)
EIEC n=2	2(100%)	0	0	2(100%)	0	0	1(50%)	0	1(50%)
TOTAL n=306	198(64.7%)	24(7.8%)	188(61.4%)	94(30.7%)	84(27.4%)	54(17.6%)	53(17.3%)	59(19.2%)	164(53.5%)

Las cepas de STEC mostraron una mayor proporción de cepas resistentes al antibiótico ampicilina (85.7%, 6/7), seguido por tetraciclina (71.4%, 5/7) y trimetoprim-sulfametoxazol (42.8%, 3/7), pero al igual que los patotipos anteriormente analizados encontramos una baja proporción de cepas resistentes a cefotaxima y gentamicina (14.2%) y además todas las cepas STEC evaluadas fueron susceptibles a ácido nalidixico, cloranfenicol, ciprofloxacino y ceftazidima. Por último, se identificaron dos cepas EIEC mismas que fueron resistentes a tetraciclina y cefotaxima y solo una fue resistente a gentamicina y trimetoprim-sulfametoxazol (Cuadro 7).

En los últimos años, las consecuencias para la salud asociadas a las infecciones con DEC se ha agravado por la aparición de cepas resistentes y multi resistentes a los antibióticos. En nuestro estudio encontramos una alta frecuencia de cepas DEC resistente a los antimicrobianos comúnmente utilizados para el tratamiento de las infecciones provocadas por *E. coli* diarreogénica como tetraciclina ampicilina y trimetropim-sulfametoxazole. Estos resultados son comparables con estudios previos en cepas DEC aisladas de adultos en Iran que muestran altos niveles de resistencia a ampicilina, cotrimoxazole y tetraciclina (Alikhani, Hashemi et al. 2013). Resultados similares fueron reportados en cepas DEC aisladas de pacientes pediátricos con diarrea en Iran, donde las cepas DEC fueron resistentes a Ampicilina y tetraciclina (>83%) (Heidary, Momtaz et al. 2014). En un estudio realizado en niños de Nicaragua se encontró que la prevalencia de las cepas DEC resistentes a ampicilina y trimetropim-sulfametoxazole fue significativamente mayor que el resto de los antibióticos evaluados (Amaya, Reyes et al. 2011). En Mexico, Estrada-Garcia y col. 2005 encontraron en un estudio en niños que el 70% de las cepas DEC eran resistentes a ampicilina y trimetropim-sulfametoxazol pero los antibiótico cefotaxima y ciprofloxacino fueron activos de manera uniforme en las cepas evaluadas (Estrada-Garcia, Cerna et al. 2005). La alta resistencia a

antibióticos observada en nuestro estudio puede ser el resultado del uso excesivo o el mal uso de los diferentes antibióticos en los tratamientos de las infecciones y la presión selectiva que los antibióticos ejercen sobre estos microorganismos, asociado con el uso en la industria alimentaria y el tratamiento agropecuario que son los principales factores asociados con la evolución de los diferentes fenotipos resistentes (Hawkey and Jones 2009).

Por otra parte, al comparar los patrones de resistencia entre las diferentes categorías de DEC encontramos que la proporción de EAEC resistentes a tetraciclina, ampicilina y trimetopim-sulfametoxazol fue mayor que el resto de las DEC. Estos resultados concuerdan con el estudio realizado en Irán donde demostraron que las cepas de EAEC, EPEC y ETEC fueron más resistentes a ampicilina y co-trimoxazole que el resto de los patotipos (Alikhani, Hashemi et al. 2013). Al igual que en Perú donde la prevalencia de EAEC resistente a ampicilina, co-trimoxazole, tetraciclina y ácido nalidíxico fue significativamente mayor que EPEC y ETEC (Ochoa, Ruiz et al. 2009). En niños mexicanos y nicaragüenses EAEC fue significativamente más resistente a ampicilina y Trimetoprim-sulfametoxazol que las cepas de EPEC (Estrada-Garcia, Cerna et al. 2005; Amaya, Reyes et al. 2011). Sin embargo, en contraste con nuestros resultados en Brasil se reportó que EPEC, EAEC y ETEC fueron más resistentes a un antibiótico que los otros patotipos identificados en su estudio (Garcia, Silva et al. 2011).

Los altos niveles de resistencia antimicrobiana observada en nuestro estudio puede explicarse debido a que en varios países existe una alta prescripción de antibióticos como tratamiento para las infecciones entéricas ocasionadas por bacterias Gram-Negativas (Livermore, James et al. 2002; Yang, Lin et al. 2009) y además el riesgo de los pacientes al auto medicarse de manera empírica para controlar dichas infecciones. En México y otros países en

vías de desarrollo los antibióticos son medicamentos con un alto consumo el cual está asociado principalmente a la poca eficacia de los mismos (Dreser, Wirtz et al. 2008). Por lo que hemos llegado a la hipótesis de que los altos niveles de resistencia encontrados en las cepas DEC es debido al frecuente uso de los antibióticos ya que comúnmente estos patotipos son los agentes causales de diarrea persistente o que están presentes en los portadores asintomáticos.

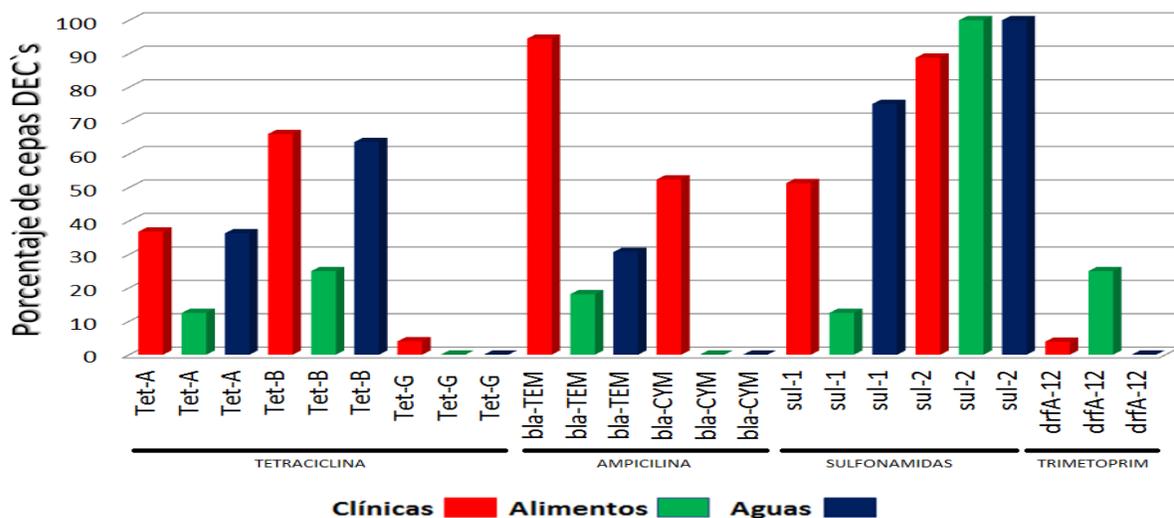
Una vez evaluados los perfiles de resistencia fenotípica de las cepas DEC y debido a que dicha resistencia a fármacos esta mediado por genes que codifican para proteínas que intervienen en los diferentes mecanismos de resistencia, los cuales pueden estar albergados en el cromosoma o plásmidos bacterianos, decidimos extraer el material genético total de estas cepas DEC´s e identificar mediante PCR punto final los genes que codifican para dicha resistencia a los antibióticos y que se han reportado más prevalentes en la literatura.

De acuerdo a los resultados descritos previamente encontramos que las cepas aisladas de muestras clínicas, alimentos y ambientales, presentaban resistencia fenotípica principalmente a los antibióticos tetraciclina, ampicilina y Trimetoprim-Sulfametoxazol. Por lo cual evaluamos la presencia de los genes que codifican para la resistencia a tetraciclina en las cepas de *E. coli*, identificamos que la resistencia a dicho antibiótico es mediada principalmente por el gen **tet-B** en las cepas aisladas de muestras clínicas (66%), alimentos (25%) y de aguas (63.6%), seguido del gen **tet-A** (36.8%, 36.3% y 12.5% respectivamente; Figura 6). Sin embargo, el gen **tet-G** solo lo identificamos en las muestras clínicas y en una baja proporción (4%), pero no en muestras procedentes de alimentos y de agua. A pesar de que en las cepas DEC se identificaron los genes tet-A y tet-B en alta proporción por lo cual se atribuye

dicha resistencia, existen cepas en las cuales no identificaron estos genes, indicándonos que la resistencia fenotípica esta mediada por otros genes que codifican para dicha resistencia y que no fueron evaluados en este trabajo.

Se sabe que en las cepas comensales y patógenas de *E. coli* los principales genes involucrados en la adquisición de resistencia a tetraciclina son los genes que codifican para proteínas de eflujo **tet(A)** y **tet(B)** (Bryan, Shapir et al. 2004). Por lo que nuestros resultados concuerdan con lo descrito por la literatura ya que el gen **tet(B)** fue el que se identificó con mayor frecuencia en nuestro estudio. Sin embargo, en un estudio realizado en cepas de *E. coli* resistentes a doxiciclina aisladas de cerdos sanos en España, se evaluó la presencia de los genes **tet (A)**, **tet (B)** y **tet(M)** y encontraron como resultado que fue mayor la prevalencia del gene **tet(A)** que el resto de los genes evaluados(Jurado-Rabadan, de la Fuente et al. 2014).

Figura 6. Presencia de genes que confieren resistencia a los principales antibióticos encontrados en las DEC's aisladas de muestras clínicas, alimentos y agua en este estudio.



Las enzimas β -lactamasa, confiere resistencia a los antibióticos de la familia de las penicilinas como ampicilina, y es codificado por el gen **blaTEM** el cual es encontrado en un grupo de transposones relacionados que representan tres de los primeros transposones que confieren resistencia identificados. Además Los genes **blaCTX-M** y **blaCYM**, son los genes que codifican para las enzimas β -lactamasa más prevalentes a nivel mundial (Moore, Watabe et al. 2010). Por lo cual analizamos la presencia de los mismos, identificamos principalmente el gen **bla-TEM**, en la cepas aisladas de muestras clínicas (94.5%), alimentos (18.1%) y de aguas (30.7%), seguido del gen **bla-CYM** para las muestras clínicas (52.4%; Figura 6). Sin embargo no se identificó este último gen en las cepas aisladas de alimento y agua resistentes a ampicilina. También se evaluó la presencia del gen **CTXM** y se identificó en el 26.3% de las cepas de origen clínico y el 15.7% de las cepas aisladas de alimentos, pero no se logró identificar en las cepas aisladas de muestras de agua (Figura 7). Esta alta incidencia de la presencia de estos genes en nuestro trabajo concuerdan con lo reportado en un estudio realizado en adultos australianos sanos donde se identificó al gen **blaTEM** como el gen más dominante que codifica para la resistencia a ampicilina en *E. coli* comensales (Bailey, Pinyon et al. 2010). Sin embargo, en un estudio realizado en carcasa de pollo en Canadá, evaluaron la presencia del gen **blaTEM** en cepas de *E. coli* y encontraron una menor prevalencia ya que solo detectaron en el 19% de las muestras analizadas (Bonnet, Diarrassouba et al. 2009).

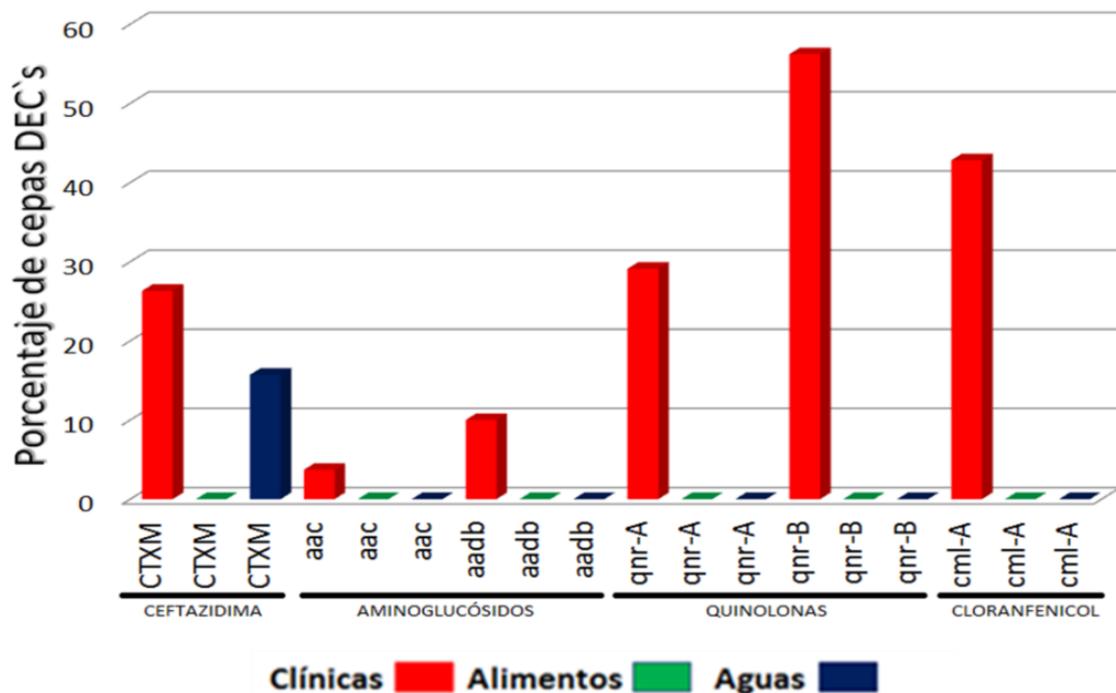
El sulfametoxazol es un antibiótico de la familia de las sulfonamidas utilizado comúnmente con Trimetoprim como opción de primera línea en el tratamiento de las infecciones ocasionadas por *E. coli*. Entre los mecanismos de resistencia a las sulfonamidas en *E. coli* encontramos a los genes **sul1**, **sul2**, and **sul3** como los principales asociados a dicha resistencia. Sin embargo, el

gen ***sul2*** genera un alto nivel de expresión de la dihidropteroato sintetasa que media la resistencia. Muchos estudios a nivel mundial han demostrado una fuerte asociación entre la presencia de estos genes y la resistencia a sulfametoxazol (Skold 2001). Motivo por el cual se evaluó la presencia de los genes que confieren la resistencia a trimetoprim-sulfametoxazol en el presente trabajo, identificando que la resistencia a dicho antibiótico es mediada principalmente por el gen ***sul-2*** ya que se identificó en todas las cepas DEC aisladas de alimentos y de aguas (100%), y el 88.8% de las cepas DEC aisladas de muestras clínicas (Figura 6), sin embargo el gen ***sul-1*** se identificó en una menor proporción con un 75% en cepas aisladas de aguas seguidas por las cepas aisladas de muestras clínicas y alimentos con un 51.3% y un 12.5%, respectivamente.

Estos resultados son similares a los reportados en un hospital de Brasil donde se reportó que más del 66% de las cepas de *E. coli* aisladas de pacientes con cuadro de infecciones de vías urinarias contenían el gen ***sul-2*** (Teichmann, Agra et al. 2014). De igual manera, en un estudio realizado en un hospital de Suecia se encontró que en las cepas de *E coli* aisladas de pacientes con infecciones de vías urinarias contaban con la presencia del gen ***sul-2*** en mayor proporción con respecto al gen ***sul-1*** (Grape, Sundstrom et al. 2003). Por otra parte, el mecanismo más común involucrado en la expresión de cepas resistentes a trimetoprim está asociado a elementos genéticos móviles como plásmidos, transposones e integrones (Skold 2001). Hasta ahora, se conocen más de 22 variantes del gen *dfra* de resistencia a trimetoprim y la mayoría de ellos están asociados principalmente a casetes de resistencia (Grape, Sundstrom et al. 2007). Por lo que en el presente trabajo, nos dimos a la tarea de identificar el gen ***drfA-12***, el cual encontramos en una baja proporción en muestras alimentos y clínicas (25% y 3.9% respectivamente), y no se identificó la presencia de este gen en las cepas procedentes de aguas.

Por último, la resistencia a las fluoroquinolonas puede ser causada por mutaciones en los genes cromosomales o por la presencia de plásmidos conjugativos o no conjugativos que portan el gen *qnr* u otros genes (Cavaco and Aarestrup 2009). Motivo por el cual se identificaron los genes *qnr-A* y *qnr-B* que codifican para resistencia a dichos antibióticos en un 29.1 y 56.2% de las cepas resistentes. Estos datos son similares a los reportados por Armas-Freire y col. 2015, quienes reportaron una prevalencia del 31% para cepas de *E. coli* aisladas de pacientes sanos en un hospital de Quito en Ecuador (Armas-Freire, Trueba et al. 2015).

Figura 7. Presencia de genes que confieren resistencia a los antibióticos encontrados, que presentaron baja resistencia o susceptibilidad en las DEC's aisladas de muestras clínicas, alimentos y agua.

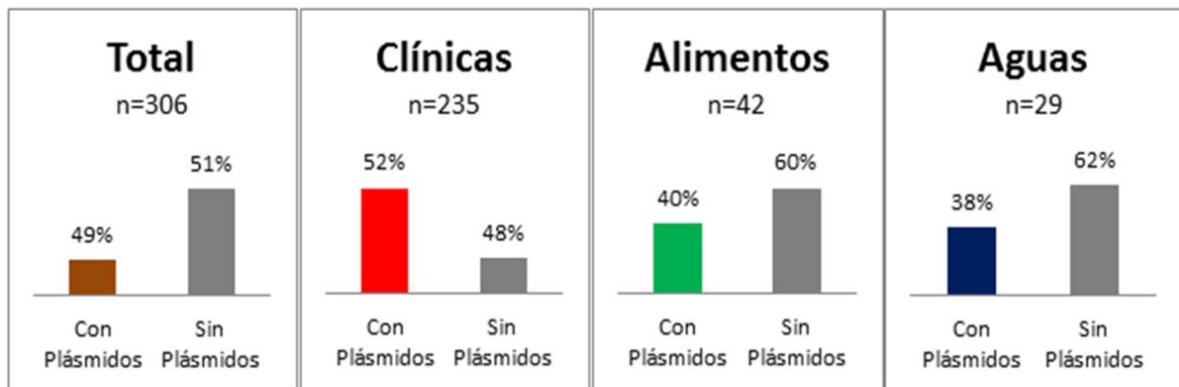


La presencia de enzimas que modifican aminoglucosidos son la causa más frecuente de la resistencia bacteriana dicha familia de antibióticos y a pesar de que la mayoría de los genes que codifican para estas enzimas se encuentran asociados a plasmidos o transposones también se han localizado en el cromosoma bacteriano (Costa, Galimand et al. 1993). Por su parte el gen *aacC3* que codifica para la enzima 3 N-acetil transferasa de aminoglucosido ha sido reportada como una de las principales involucradas en los mecanismos de resistencia para aminoglucosidos como gentamicina (van Boxtel and van de Klundert 1998). En nuestro trabajo encontramos que los genes *aac* y *aadb* que codifican para la resistencia a los aminoglucosidos en 3.7% y 10% de las cepas resistentes y finalmente el gen *cml-A* que codifica para resistencia a cloranfenicol en un 42.8% de las cepas resistentes, sin embargo es importante

mencionar que todos estos genes fueron identificados únicamente en cepas aisladas de muestras clínicas (Figura 7) y además que no se encontraron diferencias significativas al comparar las proporciones de estos genes entre los diferentes patotipos.

Al finalizar la evaluación de la resistencia fenotípica de las cepas DEC y la presencia de genes que codifiquen para dicha resistencia, se llevó a cabo la extracción de ADN plasmídico esto debido a que los genes de resistencia a antibióticos en las bacterias pueden estar albergados en el cromosoma bacteriano o en plásmidos (material genético móvil). Para analizar si existe relación entre la resistencia a los antibióticos determinada en las cepas DEC's con la presencia de plásmidos. Encontramos que al evaluar todas las cepas DEC solo el 42% de las mismas contenían plásmidos, sin embargo en las cepas de origen clínico incremento la proporción de cepas con plásmidos a 52% y por su parte en las cepas aisladas de alimentos y aguas disminuyó la proporción a 40 y 38% respectivamente de las cepas DEC (Figura 8).

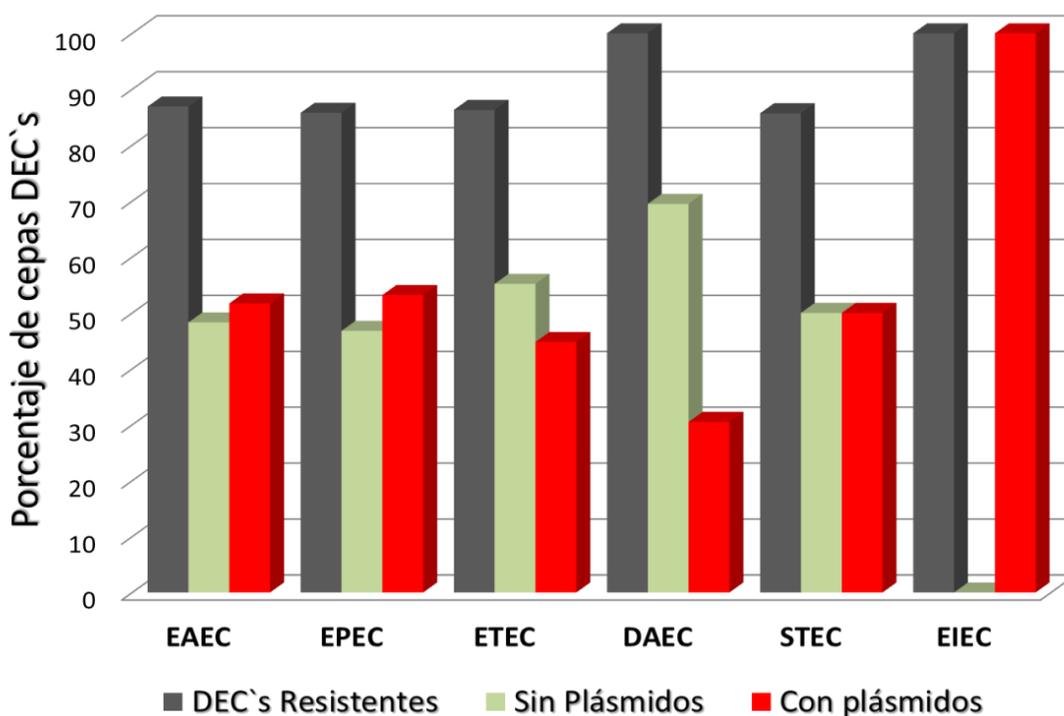
Figura 8. Presencia de plásmidos en cepas DEC's, por fuente de aislamiento.



Posteriormente se evaluó la presencia de plásmidos y su asociación con la resistencia a antibióticos por cada una de las categorías de *E. coli* y encontramos que más del 85% de las cepas de cada patotipo era resistente al

menos a uno de los antibiótico evaluados, sin embargo al comparar la proporción de cepas con plásmidos y las cepas sin plásmidos no encontramos diferencias estadísticamente significativas para cada patotipo ($p \geq 0.05$) ya que las proporciones son muy similares para cada categoría (Figura 9) lo que nos indica que no existe una asociación entre la presencia de estos elementos genéticos móviles con la resistencia a antibióticos en las cepas DEC.

Figura 9. Presencia de plásmidos identificada en los diferentes patotipos aislados de clínicas, alimentos y aguas, en cepas resistentes a los principales fármacos.



Uno de los grandes problemas que hoy en día se presentan a nivel mundial es la multi fármaco resistencia (resistencia a dos o más antibióticos) por parte de los microorganismos como las DEC, por lo cual en el presente trabajo evaluamos la asociación de la presencia de plásmidos con cepas MFR de cada patotipo. En base a los resultados obtenidos encontramos que a partir

del número de fármacos a los cuales son resistentes las DEC's (de uno a nueve), solo en los patotipos de EAEC (resistentes a 5 antibióticos) y EPEC (resistentes a 5 y 6 antibióticos) hubo una proporción mayor de cepas con la presencia de plásmidos y asociado a la resistencia a más de dos fármacos (Cuadro 8). Por otra parte, encontramos que más del 71% de las cepas DEC evaluadas en el presente trabajo fueron MFR, y de acuerdo a la categoría DAEC fue la que presente la mayor proporción de cepas MFR (82.6%), seguida por EAEC y EPEC (73.1% y 68.4% respectivamente; Cuadro 8).

Estos altos niveles de MFR encontrados en nuestro trabajo son comparables a los datos reportados en DEC aisladas de adultos en Irán que muestran altos niveles de resistencia además encontraron que más del 67% de las DEC fueron MFR (Alikhani, Hashemi et al. 2013). Resultados similares fueron reportados en cepas DEC aisladas de pacientes pediátricos con diarrea en Irán, donde todas las cepas DEC identificadas en dicho estudio fueron MFR (Heidary, Momtaz et al. 2014). En México, Estrada-Garcia y col. 2005 encontraron en un estudio en niños que el 62% de las cepas DEC aisladas eran MFR (Estrada-Garcia, Cerna et al. 2005).

Cuadro 8. Multi-Fármaco Resistencia a antibióticos en las cepas DEC's y presencia de plásmidos.

PATOTIPOS DEC'S n=306																			
Resistencia	EAEC N=138			EPEC n=92			ETEC n=44			DAEC n=23			STEC n=7			EIEC n=2			
	n (%)	Sin Plásmidos	Con Plásmidos	n (%)	Sin Plásmidos	Con Plásmidos	n (%)	Sin Plásmidos	Con Plásmidos	n (%)	Sin Plásmidos	Con Plásmidos	n (%)	Sin Plásmidos	Con Plásmidos	n (%)	Sin Plásmidos	Con Plásmidos	
		N=69	N=69		N=46	N=46		N=22	N=22		N=16	N=7		N=3	N=4		N=0	N=2	
*MFR	101 (73.1%)	48 (47.5%)	53 (52.5%)	63 (68.4%)	25 (39.6%)	38 (60.4%)	30 (68.1%)	17 (56.6%)	13 (43.4%)	19 (82.6%)	13 (68.4%)	6 (31.6%)	5 (71.4%)	3 (60%)	2 (40%)	1 (50%)	0	1 (100%)	
R 1	19 (15.8%)	10 (47.5%)	9 (47.4%)	16 (20.2%)	12 (75%)	4 (25%)	8 (21%)	4 (50%)	4 (50%)	4 (17.3%)	3 (75%)	1 (25%)	1 (16.6%)	0	1 (100%)	0	-	-	
R 2	14 (11.6%)	6 (42.8%)	8 (57.2%)	12 (15.1%)	8 (66.6%)	4 (33.4%)	9 (23.6%)	4 (44.4%)	5 (55.6%)	4 (17.3%)	4 (100%)	0	0	-	-	1 (50%)	0	1 (100%)	
R 3	31 (25.8%)	15 (48.3%)	16 (51.7%)	12 (15.1%)	4 (33.4%)	8 (66.6%)	8 (21%)	6 (75%)	2 (25%)	4 (17.3%)	2 (50%)	2 (50%)	5 (83.3%)	3 (60%)	2 (40%)	0	-	-	
R 4	29 (24.1%)	14 (48.2%)	15 (51.8%)	10 (12.6%)	6 (60%)	4 (40%)	6 (13.7%)	3 (50%)	3 (50%)	2 (8.6%)	1 (50%)	1 (50%)	0	-	-	1 (50%)	0	1 (100%)	
R 5	15 (12.5%)	5 (33.3)	10 (66.7%)*	4 (5.0%)	1 (25%)	3 (75%)*	5 (13.1%)	4 (80%)	1 (20%)	6 (26%)	5 (83.3%)	1 (16.7%)	0	-	-	0	-	-	
R 6	9 (7.5%)	6 (66.6%)	3 (33.4%)	20 (25.3%)	5 (25%)	15 (75%)*	2 (5.2%)	0	2 (100%)	1 (4.3%)	0	1 (100%)	0	-	-	0	-	-	
R 7	1 (0.8%)	1 (100%)	0	1 (1.2%)	1 (100%)	0	0	-	-	2 (8.6%)	1 (50%)	1 (50%)	0	-	-	0	-	-	
R 8	1 (0.8%)	1 (100%)	0	1 (1.2%)	0	1 (100%)	0	-	-	0	-	-	0	-	-	0	-	-	
R 9	1 (0.8%)	0	1 (100%)	0	-	-	0	-	-	0	-	-	0	-	-	0	-	-	

En base al número de antibióticos a los cuales las DEC fueron resistentes, la proporción de EAEC resistentes a cuatro antibióticos fue mayor estadísticamente significativa a EPEC ($p=0.04$), sin embargo la proporción de cepas DAEC resistentes a cinco antibióticos (26%) fue mayor estadísticamente significativa que la de EAEC y EPEC (12.5% y 5% respectivamente; $p\leq 0.05$), por otro lado la proporción de cepas de EPEC resistentes a 6 antibióticos (25.3%) fue mayor estadísticamente significativa que las de EAEC (7.5%; $p\leq 0.05$). Cabe mencionar que en las cepas DEC resistentes a uno, dos y tres antibióticos no hubo diferencias estadísticamente significativas entre las diferentes categorías evaluadas, además también es importante mencionar que encontramos cepas resistentes a siete (EAEC, EPEC y DAEC), ocho (EAEC y EPEC) y nueve antibióticos (EAEC) Cuadro 8.

Una vez evaluada la presencia de plásmidos y su asociación con la resistencia a antibióticos, es importante mencionar que estos elementos

genéticos móviles (plásmidos) pueden albergar también otros factores de virulencia. Por lo que en el presente trabajo evaluamos la presencia en cepas DEC's de otros factores de virulencia como son las proteínas autotransportadoras, las cuales son característicos de cada patotipo de *Escherichia coli*, y que además se ha demostrado su participación en la patogénesis de estas bacterias. Las proteínas autotransportadoras están asociadas según la fuente o procedencia filogenética o patotipo, esto sugiere que sería de gran importancia un análisis comparativo de las cepas de *E. coli* aisladas de diferentes fuentes como lo son clínicas, alimentos y ambientales en algunos casos para analizar el perfil de genes que codifican para proteínas autotransportadoras (Restieri, Garriss et al. 2007).

Para determinar si estas cepas DEC's poseen estas proteínas autotransportadoras, purificamos el DNA total (genómico y plasmídico) e identificamos los genes que codifican para proteínas autotransportadoras mediante PCR punto final. Al analizar la presencia de genes que codifican a proteínas autotransportadoras para EAEC, encontramos a los genes ***pet*** y ***pic*** en un 18% y 47%, respectivamente, del total de las cepas aisladas. Estos genes se encontraron principalmente en las cepas de origen clínico y en mayor proporción en las cepas de EAEC categorizadas como típicas (***pet*** 24.4%, ***pic*** 57.7%) y en menor proporción en las EAEC atípicas (***pet*** 13.6%, ***pic*** 41.0%), sin embargo no encontramos diferencias estadísticamente significativas de la presencia de estas proteínas autotransportadoras entre cepas de EAEC típicas y atípicas de origen clínico (Cuadro 9). Los genes ***pet*** y ***pic*** no fueron identificados en las cepas de EAEC (típicas y atípicas) de origen de alimentos, pero en las cepas de EAEC típicas aisladas de aguas se identificó en una proporción menor, (20%) de cepas con presencia del gen ***pic*** que fue estadísticamente significativa, comparada con lo identificado en las cepas de EAEC típicas (57.7%) de origen clínico ($p \leq 0.05$). Y por último el gen ***pet*** no fue

identificado en las cepas EAEC aisladas de agua. Lo anterior nos indica que los factores de virulencia **pet** y **pic** están presentes principalmente en cepas de EAEC (mayor proporción en cepas típicas) aisladas de muestras clínicas. Posteriormente se evaluó la presencia de la proteína autotransportadora **espC** en las cepas de EPEC que fue el segundo patotipo con mayor frecuencia identificado en el estudio. Encontramos una alta frecuencia de **espC** en las cepas de EPEC, en más del 58% de las cepas. Al evaluar la presencia de esta proteína autotransportadora en las cepas de EPEC categorizadas como típicas y atípicas la proporción de **espC** fue similar con una prevalencia del (50-66%) por lo cual no encontramos diferencias significativas de la presencia de esta proteína en las categorías de EPEC, sin embargo fue más común encontrarlas en las cepas atípicas de origen clínico con un 66% de las cepas, seguidas por las cepas típicas de EPEC aisladas de alimentos 62% lo que nos indica que esta proteína es prevalente en las cepas de EPEC identificadas en el presente trabajo sin importar el origen de la muestra que se aisló.

En las cepas de ETEC por su parte se analizó la presencia de los genes que codifican para las proteínas autotransportadoras **eatA** y **tibA**, encontramos la presencia de ambas en un 31 y 20% de las cepas respectivamente. Estos genes se encontraron únicamente en cepas de origen clínico, y el gen **eatA** se encontró en mayor proporción (34.1%), que el gen **tibA** (22%), por lo cual es más predominante en las cepas ETEC aisladas.

Cuadro 9. Presencia de genes que codifican para proteínas autotransportadoras por patotipo y fuente de aislamiento.

DEC's	Gen	CLÍNICAS		ALIMENTOS		AGUAS		TOTAL	
		Típicas	Atípicas	Típicas	Atípicas	Típicas	Atípicas	Típicas	Atípicas
		n=78	n=44	n=2	n=3	n=10	---	n=90	n=48
*EAEC (Genes AggR y PCVD) (n= 138)	Pet	19(24.4 %)	6(13.6 %)	0	0	0	---	19(21.1%)	6(12.5%)
	Pic	45(57.7 %)	18(41 %)	0	0	2 (20%)	---	47(52.2%)	18(37.5 %)
		n=17	n=35	n=8	n=23	n=8	n=1	n=33	n=59
*EPEC (Gen eaē y bfp) (n= 92)	espC	9(53%)	23(66 %)	5(62.5 %)	14(60.9 %)	3 (37.5 %)	0	17(51.5%)	37(62.7 %)
		n=41		n=1		n=2		n=44	
ETEC (Toxinas Lt y St) (n= 44)	eatA	14(34.1%)		0		0		14(31.8%)	
	TibA	9 (22%)		0		0		9(20.5%)	
		n=15		---		n=8		n=23	
DAEC (Gen daaC) (n= 23)	Aida-I	0		---		0		0	
	sat	7 (45%)		---		0		7(30.4%)	
		n=3		n=4		---		n=7	
STEC (Toxinas Stx1 y Stx2) (n= 7)	Cah	2 (66.6)		0		---		2(28.6%)	
	ehaA	1 (33.3%)		1 (25%)		---		2(28.6%)	
	ehaB	2 (66.6%)		2 (50%)		---		4(57.1%)	
	ehaC	3 (100%)		4 (100%)		---		7(100%)	
	ehaD	1 (33.3%)		2 (50%)		---		3(42.8%)	
	epeA	0		0		---		0	
	espl	2 (66.6%)		1 (25%)		---		3(42.8%)	
	espP	2 (66.6%)		1 (25%)		---		3(42.8%)	
	Sab	0		0		---		0	

Así mismo, se evaluó la presencia de los genes que codifican para las proteínas autotransportadoras **sat** y **aida-I** en las cepas de DAEC donde encontramos solamente la presencia del gen **sat** en un 30.4% de las cepas y se identificó únicamente en las cepas de origen clínico. Por otra parte no se identificó el gen que codifica para la proteínas autotransportadora **aida-I** y finalmente al analizar la presencia de genes que codifican para proteínas

autotransportadoras en STEC, se encontró el gen **ehaC** en todas las cepas evaluadas seguido por los genes **ehaB**, **ehaD** (57.1%), **espl** y **espP** en un 42.8% de las cepas y los genes **cah** y **ehaA** en un 28.6% de las mismas, pero por otro lado los genes que codifican para las proteínas **epeA** y **sab** no se identificaron en las cepas de STEC analizadas. Además las proporciones de cepas de STEC con presencia de proteínas autotransportadoras fue muy similar para las cepas clínicas que para las cepas aisladas de alimentos.

Existen otros trabajos a nivel mundial donde se ha evaluado la presencia de estos factores de virulencia, como el trabajo realizado en cepas de EPEC en Brasil donde se evaluó la presencia de 17 diferentes proteínas autotransportadoras de cada patotipo y encontraron prevalencias de 0.8% al 39% solamente en EPEC (Abreu, Bueris et al. 2013). En otro trabajo realizado en Tokio se evaluó la presencia de la proteína autotransportadora **pet** en EAEC aisladas de casos esporádicos de diarrea y se encontró en un 23% de las cepas evaluadas (Yamazaki, Inuzuka et al. 2000). Este es el primer trabajo que se realiza en el noroeste del país donde se evalúa la presencia de otros factores de virulencia en (proteínas autotransportadoras) en cepas DEC aisladas de pacientes, alimentos y agua. Esto ayudara a conocer la presencia la prevalencia de cepas DEC`s con otros atributos de virulencia para evitar posibles brotes y además conocer los principales antibióticos y los más eficaces para controlarlos. Sin embargo, es de gran importancia continuar realizando monitoreo de alimentos, aguas y pacientes con cuadro diarreico para conocer los diferentes grupos de cepas patógenas que se encuentran en el estado de Sinaloa y a su vez evitar posibles brotes ocasionados por estos patógenos.

IX CONCLUSIONES

Las conclusiones de esta investigación, sobre la caracterización molecular de los factores de virulencia y acción antimicrobiana de *E. coli* patógena, aisladas de pacientes, agua y alimentos se describen a continuación:

1. Las cepas de *Escherichia coli* diarreogénicas aisladas de muestras de pacientes con diarrea fueron más resistentes a tetraciclina, ampicilina y trimetropim-sulfametoxazol que las cepas aisladas de muestras de alimentos y aguas las cuales son representativas de todo el estado de Sinaloa.
2. Los patotipos de *Escherichia coli* enteroagregativa y enteropatógena presentaron las proporciones más altas de resistencia a tetraciclina, ampicilina y trimetropim-sulfametoxazol que el resto de los patotipos evaluados en el presente estudio.
3. Existe una alta prevalencia de cepas *Escherichia coli* diarreogénicas resistentes a antibióticos (>85%, al menos a uno) y una alta presencia de cepas multi fármaco resistentes (>71%) en el Estado de Sinaoa.
4. No encontramos una asociación entre la presencia de plásmidos en las cepas de *Escherichia coli* diarreogénicas y la resistencia a los diferentes antibióticos evaluados, así como la presencia de estos elementos genéticos móviles por cada uno de los patotipos y la resistencia a antibióticos.

5. En base a los patotipos de *Escherichia coli* diarreogénicas evaluados DAEC y EAEC presentan la mayor proporción de cepas multi fármaco resistente.

6. La resistencia a tetraciclina esta codificada principalmente por el gen **tet-B**, seguido por el gen **tet-A**, por su parte la resistencia a ampicilina es codificada principalmente por el gen **blaTEM** y por último la resistencia a trimetropim-sulfametoxazol es codificada por el gen **sul-2** y **sul-1**.

7. Existe una alta prevalencia de los genes que codifican para proteínas autotransportadoras (**espC**, **pic**, **pet**, **eat**, **sat** y **tib**) en las cepas de las diferentes categorías de *Escherichia coli* diarreogénicas.

X. BIBLIOGRAFIA

- Abreu, A. G., V. Bueris, et al. (2012). "Autotransporter protein-encoding genes of diarrheagenic *Escherichia coli* are found in both typical and atypical enteropathogenic *E. coli*." *Applied and Environmental Microbiology*: AEM. 02635-02612.
- Abreu, A. G., V. Bueris, et al. (2013). "Autotransporter protein-encoding genes of diarrheagenic *Escherichia coli* are found in both typical and atypical enteropathogenic *E. coli* strains." *Appl Environ Microbiol* **79**(1): 411-414.
- Alikhani, M. Y., S. H. Hashemi, et al. (2013). "Prevalence and antibiotic resistance patterns of diarrheagenic *Escherichia coli* isolated from adolescents and adults in Hamedan, Western Iran." *Iran J Microbiol* **5**(1): 42-47.
- Amaya, E., D. Reyes, et al. (2011). "Antibiotic resistance patterns of intestinal *Escherichia coli* isolates from Nicaraguan children." *J Med Microbiol* **60**(Pt 2): 216-222.
- Armas-Freire, P. I., G. Trueba, et al. (2015). "Unexpected distribution of the fluoroquinolone-resistance gene *qnrB* in *Escherichia coli* isolates from different human and poultry origins in Ecuador." *Int Microbiol* **18**(2): 85-90.
- Bailey, J. K., J. L. Pinyon, et al. (2010). "Commensal *Escherichia coli* of healthy humans: a reservoir for antibiotic-resistance determinants." *J Med Microbiol* **59**(Pt 11): 1331-1339.
- Barnard, T. J., N. Dautin, et al. (2007). "Autotransporter structure reveals intra-barrel cleavage followed by conformational changes." *Nature structural & molecular biology* **14**(12): 1214-1220.
- Beutin, L., O. Marchís, et al. (2003). "HEp-2 cell adherence, actin aggregation, and intimin types of attaching and effacing *Escherichia coli* strains isolated from healthy infants in Germany and Australia." *Infection and Immunity* **71**(7): 3995-4002.
- Beutin, L., S. Zimmermann, et al. (1998). "Human infections with Shiga toxin-producing *Escherichia coli* other than serogroup O157 in Germany." *Emerging infectious diseases* **4**(4): 635.
- Boisen, N., F. Ruiz-Perez, et al. (2009). "Short report: high prevalence of serine protease autotransporter cytotoxins among strains of enteroaggregative *Escherichia coli*." *Am J Trop Med Hyg* **80**(2): 294-301.
- Bonnet, C., F. Diarrassouba, et al. (2009). "Pathotype and antibiotic resistance gene distributions of *Escherichia coli* isolates from broiler chickens raised on antimicrobial-supplemented diets." *Appl Environ Microbiol* **75**(22): 6955-6962.
- Bryan, A., N. Shapir, et al. (2004). "Frequency and distribution of tetracycline resistance genes in genetically diverse, nonselected, and nonclinical *Escherichia coli* strains isolated from diverse human and animal sources." *Appl Environ Microbiol* **70**(4): 2503-2507.
- Calderon Toledo C1, A. I., Karpman D. (2011). "Cross-reactive protection against enterohemorrhagic *Escherichia coli* infection by enteropathogenic *E. coli* in a mouse model." *Infection and Immunity* (nfect Immun; **79**(6)): 2224-2233.

- Canizalez-Roman, A., E. Gonzalez-Nunez, et al. (2013). "Prevalence and antibiotic resistance profiles of diarrheagenic *Escherichia coli* strains isolated from food items in northwestern Mexico." Int J Food Microbiol **164**(1): 36-45.
- Cavaco, L. M. and F. M. Aarestrup (2009). "Evaluation of quinolones for use in detection of determinants of acquired quinolone resistance, including the new transmissible resistance mechanisms qnrA, qnrB, qnrS, and aac(6')Ib-cr, in *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* and determinations of wild-type distributions." J Clin Microbiol **47**(9): 2751-2758.
- CLSI (2011). Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Twenty-First Informational Supplement. **31**: M02-A10 and M07-A08.
- Costa, Y., M. Galimand, et al. (1993). "Characterization of the chromosomal aac(6')-II gene specific for *Enterococcus faecium*." Antimicrob Agents Chemother **37**(9): 1896-1903.
- Chu, C., C. H. Chiu, et al. (2001). "Large drug resistance virulence plasmids of clinical isolates of *Salmonella enterica* serovar Choleraesuis." Antimicrob Agents Chemother **45**(8): 2299-2303.
- Dahshan, H., T. Chuma, et al. (2010). "Characterization of antibiotic resistance and the emergence of AmpC-producing *Salmonella Infantis* from pigs." J Vet Med Sci **72**(11): 1437-1442.
- Dresler, A., V. J. Wirtz, et al. (2008). "[Antibiotic use in Mexico: review of problems and policies]." Salud Publica Mex **50** Suppl 4: S480-487.
- Eckburg, P. B., E. M. Bik, et al. (2005). "Diversity of the human intestinal microbial flora." Science **308**(5728): 1635-1638.
- Eslava C, M. J., Cravioto A. (1994). "***Cepas de Escherichia coli relacionadas con la diarrea.***" Scientific Electronic Library Online
- (diagnóstico de laboratorio de infecciones Gastrointestinales).**
- Estrada-Garcia, T., J. F. Cerna, et al. (2005). "Drug-resistant diarrheogenic *Escherichia coli*, Mexico." Emerg Infect Dis **11**(8): 1306-1308.
- Estrada-Garcia, T., C. Lopez-Saucedo, et al. (2004). "Prevalence of *Escherichia coli* and *Salmonella* spp. in street-vended food of open markets (tianguis) and general hygienic and trading practices in Mexico City." Epidemiol Infect **132**(6): 1181-1184.
- Fasano, A. and T. Shea-Donohue (2005). "Mechanisms of disease: the role of intestinal barrier function in the pathogenesis of gastrointestinal autoimmune diseases." Nature clinical practice Gastroenterology & hepatology **2**(9): 416-422.
- Flisser, A., A. Velasco-Villa, et al. (2002). "Infectious diseases in Mexico. A survey from 1995 al 2000." Archives of medical research **33**(4): 343-350.
- Fragoso Arbelo, T. (2010). "Diarrea funcional como causa de diarrea crónica." Revista Cubana de Medicina General Integral **26**(4): 706-711.
- Frana, T. S., S. A. Carlson, et al. (2001). "Relative distribution and conservation of genes encoding aminoglycoside-modifying enzymes in *Salmonella enterica* serotype typhimurium phage type DT104." Appl Environ Microbiol **67**(1): 445-448.
- Gallardo, F., J. Ruiz, et al. (1999). "Increase in incidence of resistance to ampicillin, chloramphenicol and trimethoprim in clinical isolates of *Salmonella* serotype

- Typhimurium with investigation of molecular epidemiology and mechanisms of resistance." J Med Microbiol **48**(4): 367-374.
- Garcia, P. G., V. L. Silva, et al. (2011). "Occurrence and antimicrobial drug susceptibility patterns of commensal and diarrheagenic *Escherichia coli* in fecal microbiota from children with and without acute diarrhea." J Microbiol **49**(1): 46-52.
- González-Pedrajo, B. and G. Dreyfus (2003). "Sistemas de secreción de proteínas en las bacterias Gram negativas: Biogénesis flagelar y translocación de factores de virulencia." Mensaje bioquímico **27**: 45-62.
- Grape, M., L. Sundstrom, et al. (2003). "Sulphonamide resistance gene *sul3* found in *Escherichia coli* isolates from human sources." J Antimicrob Chemother **52**(6): 1022-1024.
- Grape, M., L. Sundstrom, et al. (2007). "Two new *dfr* genes in trimethoprim-resistant integron-negative *Escherichia coli* isolates." Antimicrob Agents Chemother **51**(5): 1863-1864.
- Guerra, B., S. M. Soto, et al. (2001). "Multidrug resistance is mediated by large plasmids carrying a class 1 integron in the emergent *Salmonella enterica* serotype [4,5,12:i:-]." Antimicrob Agents Chemother **45**(4): 1305-1308.
- Hammerum, A. M. and O. E. Heuer (2009). "Human health hazards from antimicrobial-resistant *Escherichia coli* of animal origin." Clinical Infectious Diseases **48**(7): 916-921.
- Hawkey, P. M. and A. M. Jones (2009). "The changing epidemiology of resistance." J Antimicrob Chemother **64 Suppl 1**: i3-10.
- Heidary, M., H. Momtaz, et al. (2014). "Characterization of Diarrheagenic Antimicrobial Resistant *Escherichia coli* Isolated From Pediatric Patients in Tehran, Iran." Iran Red Crescent Med J **16**(4): e12329.
- Henderson, I. R., J. Czczulin, et al. (1999). "Characterization of *pic*, a secreted protease of *Shigella flexneri* and enteroaggregative *Escherichia coli*." Infect Immun **67**(11): 5587-5596.
- Henderson, I. R. and J. P. Nataro (2001). "Virulence functions of autotransporter proteins." Infection and Immunity **69**(3): 1231-1243.
- Henderson, I. R., F. Navarro-Garcia, et al. (2004). "Type V protein secretion pathway: the autotransporter story." Microbiology and Molecular Biology Reviews **68**(4): 692-744.
- Herold, S., J. C. Paton, et al. (2009). "Sab, a novel autotransporter of locus of enterocyte effacement-negative shiga-toxigenic *Escherichia coli* O113:H21, contributes to adherence and biofilm formation." Infect Immun **77**(8): 3234-3243.
- Hussein, H. S. and L. M. Bollinger (2005). "Prevalence of Shiga toxina "producing *Escherichia coli* in beef cattle." Journal of Food Protection **68**(10): 2224-2241.
- Itoh, Y., Y. Sugita-Konishi, et al. (1998). "Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157: H7 present in radish sprouts." Applied and Environmental Microbiology **64**(4): 1532-1535.
- Jaime Fagundo, J. C., Y. Delgado Giniebra, et al. (2003). "Síndrome hemolítico urémico." Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia **19**(2-3): 0-0.
- Jurado-Rabadan, S., R. de la Fuente, et al. (2014). "Detection and linkage to mobile genetic elements of tetracycline resistance gene *tet*(M) in *Escherichia coli* isolates from pigs." BMC Vet Res **10**: 155.
- Kaper, J. B., J. P. Nataro, et al. (2004). "Pathogenic *Escherichia coli*." Nature Reviews Microbiology **2**(2): 123-140.
- Kaper, J. P. N. a. J. B. (1998). "Diarrheagenic *Escherichia coli*." Clinical Microbiology Reviews **Vol. 11**(1): 142-201.

- Kennan, R. and R. Monckton (1990). "Adhesive fimbriae associated with porcine enterotoxigenic *Escherichia coli* of the O141 serotype." Journal of Clinical Microbiology **28**(9): 2006-2011.
- Kunhnert, P. (2000). "**Target genes for virulence assessment of *Escherichia coli* isolates from water, food and the environment.**"
- ." microbiology review **24**: 107-117.
- Levine, M. M. (1987). "Escherichia coli that cause diarrhea: enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic, and enteroadherent." Journal of Infectious Diseases **155**(3): 377-389.
- Livermore, D. M., D. James, et al. (2002). "Trends in fluoroquinolone (ciprofloxacin) resistance in enterobacteriaceae from bacteremias, England and Wales, 1990-1999." Emerg Infect Dis **8**(5): 473-478.
- Mandell, G. L. (1999). "Rational Antibiotic Use: Simple and Not so Simple." Curr Infect Dis Rep **1**(3): 210-214.
- Moore, J. E., M. Watabe, et al. (2010). "Screening of clinical, food, water and animal isolates of *Escherichia coli* for the presence of blaCTX-M extended spectrum beta-lactamase (ESBL) antibiotic resistance gene loci." Ulster Med J **79**(2): 85-88.
- Morita, M., N. Takai, et al. (2010). "Plasmid-mediated resistance to cephalosporins in *Salmonella enterica* serovar Typhi." Antimicrob Agents Chemother **54**(9): 3991-3992.
- Neidhardt, E. A., S. R. Punreddy, et al. (1999). "Expression and characterization of *E. coli*-produced soluble, functional human dihydroorotate dehydrogenase: a potential target for immunosuppression." J Mol Microbiol Biotechnol **1**(1): 183-188.
- Ng, L. K., M. R. Mulvey, et al. (1999). "Genetic characterization of antimicrobial resistance in Canadian isolates of *Salmonella* serovar Typhimurium DT104." Antimicrob Agents Chemother **43**(12): 3018-3021.
- Ochoa, T. J., J. Ruiz, et al. (2009). "High frequency of antimicrobial drug resistance of diarrheagenic *Escherichia coli* in infants in Peru." Am J Trop Med Hyg **81**(2): 296-301.
- Olagnero, G., A. Abad, et al. (2007). "Alimentos funcionales: fibra, prebióticos, probióticos y simbióticos." Diaeta **25**(121): 20-33.
- Organización Mundial de la Salud, O. (2013). "Enfermedades diarreicas." (OMS).
- Paredes, P., M. De La Peña, et al. (1996). "Factors influencing physicians' prescribing behaviour in the treatment of childhood diarrhoea: knowledge may not be the clue." Social science & medicine **42**(8): 1141-1153.
- Poitrineau, P., C. Forestier, et al. (1995). "Retrospective case-control study of diffusely adhering *Escherichia coli* and clinical features in children with diarrhea." Journal of Clinical Microbiology **33**(7): 1961-1962.
- Prescott, A. M. and C. R. Fricker (1999). "Use of PNA oligonucleotides for the in situ detection of *Escherichia coli* in water." Mol Cell Probes **13**(4): 261-268.
- Restieri, C., G. Garriss, et al. (2007). "Autotransporter-encoding sequences are phylogenetically distributed among *Escherichia coli* clinical isolates and reference strains." Appl Environ Microbiol **73**(5): 1553-1562.
- Riley, L. W., R. S. Remis, et al. (1983). "Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype." New England Journal of Medicine **308**(12): 681-685.

- Rivero, M. A., N. L. Padola, et al. (2004). "Escherichia coli enterohemorrágica y síndrome urémico hemolítico en Argentina." Medicina (B. Aires) **64**(4): 352-356.
- Rodríguez-Angeles, G. (2002). "Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de Escherichia coli." salud pública de méxico **44**(5): 464-475.
- Sandvang, D., F. M. Aarestrup, et al. (1997). "Characterisation of integrons and antibiotic resistance genes in Danish multiresistant Salmonella enterica Typhimurium DT104." FEMS Microbiol Lett **157**(1): 177-181.
- Schmidt, H., W. L. Zhang, et al. (2001). "Identification and characterization of a novel genomic island integrated at selC in locus of enterocyte effacement-negative, Shiga toxin-producing Escherichia coli." Infect Immun **69**(11): 6863-6873.
- Schulze, J., M. Schiemann, et al. (2006). "120 years of E. coli." Hagen, Germany: Alfred-Nissle-Gesellschaft.
- Skold, O. (2001). "Resistance to trimethoprim and sulfonamides." Vet Res **32**(3-4): 261-273.
- Smith, P., L. Zurita, et al. (1988). "Aislamiento de Escherichia coli enteroadhesiva (K99) en terneros con síndrome diarreico." Avances en Ciencias Veterinarias **3**(1).
- Su, C. and L. J. Brandt (1995). "Escherichia coli O157: H7 infection in humans." Annals of Internal Medicine **123**(9): 698-707.
- Sussmann, O. A., L. Mattos, et al. (2002). "Resistencia bacteriana." Universitas MÃ©dica **43**(1): 91-96.
- Teichmann, A., H. N. Agra, et al. (2014). "Antibiotic resistance and detection of the sul2 gene in urinary isolates of Escherichia coli in patients from Brazil." J Infect Dev Ctries **8**(1): 39-43.
- van Boxtel, R. A. and J. A. van de Klundert (1998). "Expression of the Pseudomonas aeruginosa gentamicin resistance gene aacC3 in Escherichia coli." Antimicrob Agents Chemother **42**(12): 3173-3178.
- Wu, J. J., W. C. Ko, et al. (2008). "Prevalence of Qnr determinants among bloodstream isolates of Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae in a Taiwanese hospital, 1999-2005." J Antimicrob Chemother **61**(6): 1234-1239.
- Yamazaki, M., K. Inuzuka, et al. (2000). "Plasmid encoded enterotoxin (Pet) gene in enteroaggregative Escherichia coli isolated from sporadic diarrhea cases." Jpn J Infect Dis **53**(6): 248-249.
- Yang, C. M., M. F. Lin, et al. (2009). "Characterization of antimicrobial resistance patterns and integrons in human fecal Escherichia coli in Taiwan." Jpn J Infect Dis **62**(3): 177-181.

Abreviaturas

(AE): Adherencia y Enfacelación.

CH: Colitis Hemorrágica.

DEC's: *E. coli* diarreogénicas

E. coli: *Escherichia coli*.

STEC: *E. coli* productora de la toxina shiga.

VTEC: *E. coli* productora de verotoxina

(ETEC): *Escherichia coli* ENTEROTOXIGÉNICA.

(EHEC): *Escherichia coli* ENTEROHEMORRÁGICA.

(EIEC): *Escherichia coli* ENTEROINVASIVA.

(EPEC): *Escherichia coli* ENTEROPATÓGENA.

(EAEC): *Escherichia coli* ENTEROAGREGATIVA.

(DAEC): *Escherichia coli* DE ADHERENCIA DIFUSA.

Kb: Kilobase

LT: Toxina Termolábil.

MNEC: Meningitis.

ml: mililitros

Seg: Segundos

ST: Toxina Termoestable.

SUH: Síndrome Urémico Hemolítico

Tn: Transposones.

PAIs: Islas de patogenicidad.

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa.

SHU: Síndrome Urémico Hemolítico.

ST: Toxina Termoestable.

STX1: Toxina Shiga.

STX2: Toxina Shiga.

UPEC: *E. coli* Uropatógeno

UTI: Infecciones del tracto urinario

WHO: Organización Mundial de la Salud.