



Ministerio de Salud Pública

Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kouri"

Título: Identificación de patotipos de *Escherichia coli* diarrogénicas y susceptibilidad antimicrobiana en Cuba, en el periodo de enero a diciembre 2016.



Autor: Lic. Coralía Salina Quesada

Tutor: Dr. Adalberto Águila Sánchez. MsC

Lic. Alberto Baly Gil. DrC

Trabajo para optar por el título de Master en Bacteriología-Micología

LA HABANA, 2017

*Hay una fuerza motriz más poderosa que el vapor,
la electricidad y la energía atómica: la voluntad.*

Albert Einstein

DEDICATORIA

A la memoria inolvidable de mi madre, Zaida Pérez Quesada

A mis queridas hijas, Marlan y Melissa

AGRADECIMIENTOS

Siempre que se culmina un propósito, de la naturaleza que sea, su trayectoria va acompañada de seres que contribuyen a construir la ruta de la meta alcanzada. Algunos nos inician; otros van llegando intercaladamente, unos para tendernos la mano o para estremecernos, otros que nos levantan cuando la fatiga nos alcanza, muchos que tal vez ni lo saben pero están, y esos que nos soportan, apoyan y sostienen todo el camino. A todos, sin importar en qué momento llegaron o cuánto aportaron, quiero darles mi más sincero agradecimiento.

Especial e infinito agradecimiento a mis hijas por haber aceptado con increíble comprensión todas las horas de privación como resultado de este trabajo.

A Mario de Nuez de la Teja, mayito, por su apoyo y motivación en todos los sentidos, por quererme y soportarme, muchísimas gracias.

A Lachi, por darme la mejor idea para la realización de mi tesis, por soportarme durante todo el tiempo, su apoyo incondicional y por el café a toda hora, para él mi gratitud y afectos.

A Aristides, el paisano que me tendió la mano desde el primer momento y quererme de a gratis, para él mi gratitud y afectos.

A mis queridos compañeros de maestría, por los difíciles y buenos momentos, en especial mi amiga angolana Engracia Chico, a Nuris (La pija) por su cariño y apoyo y a Tuniti Secretario Chilemo, para ellos mi aprecio y gratitud y doy gracias a Dios por conocerlos.

Agradezco enormemente a todos mis profesores de estos dos años por el conocimiento transmitido. En especial a las profesoras Hilda y Rosabel por su constante preocupación y a Ana María y Toni por su gran ayuda, a todos mi gratitud y afectos.

A Dania y Osvaldo por acogerme y soportarme, para ellos mi gratitud y afectos.

Al mi tutor Alberto Baly, en primer lugar por aceptar ser uno de mis tutores y en segundo por la ayuda brindada sin objeción, para él mi gratitud y afectos.

Partiendo de que creo que el conocimiento no tiene precio, A mi tutor Dr. Adalberto por el compartir todo su conocimiento sobre el tema, muchísimas gracias, además por su apoyo y ayuda incondicional, para él mi gratitud y afectos.

RESUMEN

Escherichia coli diarrogénica (ECD) se ha clasificado con base en criterios clínicos, epidemiológicos y moleculares en seis grupos, cada uno con factores de virulencia específicos. En el presente trabajo se determinaron los fenotipos de resistencia antimicrobiana y los patotipos de ECD entre los aislamientos con diagnóstico presuntivo, procedentes de las diferentes regiones del país, durante el periodo comprendido de enero a diciembre del 2016 y su relación con la relación entre los multirresistencia antimicrobiana. La susceptibilidad antimicrobiana se realizó mediante el método de difusión en agar y los patotipos se determinaron por la aplicación de dos PCR múltiples. Del total de aislamientos analizados, el 71,34% (127/178) presentó algún factor de virulencia compatible con uno de los seis patotipos de ECD. La frecuencia de los patotipos fue la siguiente: 92 (51,18%) EPEC, 14 (7,82%) EAEC, 12 (6,74%) EHEC, 5 (2,80%) ETEC, 1 (0,56%) EIEC y 2 (1,12%) EHEC/EAEC, 1 (0,56%) EHEC/DAEC. Ningún aislamiento perteneció al patotipo específico DAEC. Todos los aislamientos (n=178) de ECD fueron resistentes al menos a un antimicrobiano. Entre ECD el 41,73% (53/127) mostró fenotipo de multirresistencia y el patrón de multirresistencia predominante fue ampicilina/sulfametoxazol-trimetoprim/tetraciclina, concentrándose en EPEC, patotipo predominante. Este trabajo demuestra la factibilidad de la detección de forma rápida y precisa de ECD por métodos moleculares y de la vigilancia de los fenotipos de resistencia antimicrobiana, constituyendo una herramienta útil para el trabajo de los clínicos y epidemiólogos.

ÍNDICE

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN.....	1
OBJETIVOS	5
CAPÍTULO II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	6
2.1 Enfermedades diarreicas agudas (EDA)	6
2.2 Características generales de <i>Escherichia coli</i>.....	7
2.2.1 Taxonomía (Bergey's 2005)	8
2.2.2 Fisiología de <i>E. coli</i>	9
2.2.4 Patogenicidad de <i>E. coli</i>	12
2.2.5 Aislamiento y Tipificación de <i>E. coli</i>	14
2.2.5.1 Métodos tradicionales	14
2.2.5.2 Métodos moleculares	15
2.2.6 Principales categorías de ECD: patotipos.....	15
2.2.6.1 <i>E. coli</i> enteropatogénica (EPEC; del inglés: Enteropathogenic <i>E. coli</i>).....	16
2.2.6.2 <i>E. coli</i> enterotoxigénica (ETEC, del inglés Enterotoxigenic <i>E. coli</i>).....	20
2.2.6.3 <i>E. coli</i> enteroinvasiva (EIEC, del inglés Enteroinvasive <i>E. coli</i>).....	23
2.2.6.4 <i>E. coli</i> enterohemorrágica (EHEC, del inglés Enterohemorrhagic <i>E. coli</i>).....	26
2.2.6.5 <i>E. coli</i> enteroagregativa (EAEC, del inglés Enteroaggregative <i>E. coli</i>).....	31
2.2.6.6 <i>E. coli</i> Adherente Difusa (DAEC, del inglés, Diffusively Adherent <i>E. coli</i>).....	35
2.3 Prevención y control de las infecciones entéricas	36
2.4 Susceptibilidad antimicrobiana.....	37
2.4.1 Antimicrobianos.....	39
2.4.2 Resistencia antimicrobiana	39
2.4.2.1 Mecanismos de resistencia a los antimicrobianos en bacterias gram negativas	39
2.4.2.2 Resistencia antimicrobiana en <i>E. coli</i>	40
CAPÍTULO III. Materiales y Métodos.....	42
3.1 Tipo de estudio	42
3.1.1 Universo	42
3.1.2 Muestra.....	42
3.2 TECNICAS Y PROCEDIMIENTOS DE LABORATORIO	42
3.2.1 CARACTERIZACION FENOTÍPICA DE <i>E. coli</i>	42
3.2.1.1 Identificación bioquímica de <i>E. coli</i> para la confirmación fenotípica de los aislados de ECD. (MacFadding, 2003).....	42
3.2.1.2 Marcadores fenotípicos empleados para el screening molecular de los aislados de ECD.....	43
3.2.2 SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA.....	45
3.2.2.1 Pruebas de susceptibilidad de ECD	45
3.2.2.2 Definición de los patrones de multiresistencia	46
3.2.3 CARACTERIZACIÓN GENOTÍPICA: MÉTODO MOLECULAR (PCR).....	47
3.2.3.1 Extracción del ADN bacteriano por método térmico	47
3.2.3.2 Detección de genes de virulencia específicos por medio de mPCR	47

3.2.3.3 Mezcla de reacción	50
3.2.3.4 Visualización del producto amplificado	50
3.3 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	51
3.4 ASPECTOS ÉTICOS.....	51
CAPÍTULO IV. Resultados y Discusión	52
4.1 Aislamiento clínico	52
4.2 Resultados de las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana de los aislamientos confirmados como <i>E. coli</i> diarrogénicas.....	54
4.3 Frecuencia y distribución de patotipos de ECD identificados por mPCR.	60
4.4 Patotipos de ECD y su relación con la multirresistencia.....	65
CAPÍTULO V. CONCLUSIONES.....	70
CAPÍTULO VI. RECOMENDACIONES	71
BIBLIOGRAFÍA	1
ANEXOS.....	1

SÍMBOLOS y ABREVIATURAS

Simbología	Significado
%	Por ciento, porcentaje
β	Beta
°C	Grados Celcius
μg	Microgramos
μl	Microlitros
μm	Micrometro
ADN	Acido desoxirribonucleico
AK	Amikacina
ATCC	American Type Culture Collection
AMP	Ampicilina
CTS	Caldo Triptona Soya
C	Cloranfenicol
CIP	Ciprofloxacino
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CPHEM	Centro Provincial de Higiene Epidemiología y Microbiología
CN	Gentamicina
CTX	Cefotaxima
DAEC	<i>E. coli</i> de adherencia difusa
dNTP	Desoxirribonucleótidos trifosfato
EAEC	<i>E. coli</i> enteroagregativa
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECD	<i>E. coli</i> diarrogénicas
EHEC	<i>E. coli</i> enterohemorrágica

EIEC	<i>E. coli</i> enteroinvasiva
EPEC	<i>E. coli</i> enteropatógena
tEPEC	<i>E. coli</i> enteropatógena típica
aEPEC	<i>E. coli</i> enteropatógena atípica
ETEC	<i>E. coli</i> enterotoxigénica
<i>et al.</i>	y colaboradores
F	Nitrofurantoína
GUD -	β -glucuronidasa negativa
ICC	Agar infusión cerebro corazón
LIA	Agar Hierro-Lisina
MAC	Agar MacConkey
MgCl ₂	Cloruro de magnesio
min	minutos
NA	ácido nalidíxico
NaCl	Cloruro de sodio
nm	Nanómetros
OMS	Organización Mundial de la Salud
OPS	Organización Panamericana de la Salud
OMSA	Organización Mundial de Sanidad Animal
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
pH	Potencial de hidrógeno
SMAC	Agar MacConkey sorbitol
SNS	Sistema Nacional de Salud
STEC	<i>E. coli</i> shigatoxigénica
SXT	Sulfametoxazol/trimetoprim
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TE	Tetraciclina

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN

Las Enfermedades Diarreicas Agudas (EDAs) constituye un problema de salud en el mundo, principalmente en los países en vías de desarrollo, ⁽¹⁾ pese a los avances en las últimas décadas en el manejo y prevención de esta enfermedad⁽²⁾; no solo son afectadas las poblaciones marginadas de África, Asia, y América Latina, debido a los elevados índices de pobreza y a las deficientes condiciones higiénico-sanitarias en las que viven, sino también, estas poblaciones en los países industrializados⁽³⁻⁴⁾. En el mundo se estima que 1.7 billones de episodios de diarrea en infantes son reportados anualmente y entre 0,8 y 2 millones de niños en edades comprendidas entre cero y cinco años mueren a causa de las EDA⁽⁷⁻⁸⁾.

Las EDA están consideradas como una de las causas más importantes de morbilidad y mortalidad en niños menores de cinco años, en países de escasos y medianos recursos y en países industrializados⁽⁵⁻⁶⁾ y la segunda causa de muerte después de las infecciones respiratorias⁽⁹⁻¹⁰⁾. En América Latina, son responsables del 10% de las muertes en la infancia^(6, 11). El Centro para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC) de los Estados Unidos ha estimado que al año ocurren 47.8 millones de casos⁽⁷⁾, con gastos económicos superiores a 150 millones de dólares⁽¹²⁾.

Cuba, en el 2015 registró 387 507 atenciones médicas por EDA, de ellas 148 482 (38,31%) correspondieron a menores de cinco. Coincide con lo reportado en el mundo, el hallazgo de que continúan siendo las edades pediátricas las más vulnerables, y que la tasa de morbilidad para los menores de un año y entre 1 y 4 años son las más elevadas, (435.2 x 1000 habitantes y 185.9 x 1 000 habitantes, respectivamente). Sin embargo, la tasa de mortalidad por EDA ha descendido en el período de 1980 al 2000 en comparación con los datos registrados para 2001 al 2015⁽¹³⁾.

Las EDA infecciosas pueden transmitirse directamente de persona a persona, de animal a persona o indirectamente a través del agua o los alimentos contaminados⁽¹⁴⁾. Las causas bacterianas de EDA ocupan un segundo lugar en frecuencia, siendo *Escherichia coli* (*E. coli*), responsable del 30%-40% de los episodios de diarrea aguda y

persistente en niños, seguida de *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Campylobacter jejuni* y *Vibrio cholerae*⁽¹⁵⁻¹⁷⁾.

E. coli es un microorganismo anaerobio facultativo, gram negativo, perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae*, uno de los más importante de la microbiota normal del intestino de humanos, mamíferos y aves endotermos⁽¹⁸⁻¹⁹⁾, que coloniza el intestino del hombre pocas horas después del nacimiento, y coexiste en el mismo en una relación de mutuo beneficio⁽²⁰⁾.

E. coli diarrogénicas (ECD), asociadas a formas endémicas de diarrea están distribuidas entre humanos, animales, alimentos y fuentes ambientales en diferentes regiones geográficas del mundo⁽²¹⁾. La detección presuntiva de ECD como causa de diarrea en humanos, es posible hacerla a través del coprocultivo (diagnóstico microbiológico convencional). Sin embargo, éste no permite discriminar entre *E. coli* comensal y las causantes de patología gastrointestinal⁽²²⁻²⁴⁾, para lo cual, existen pruebas bioquímicas complementarias⁽²⁵⁾, ensayos de serotipificación y pruebas fenotípicas basadas en la determinación de factores de virulencia (Ensayos de adherencia en células Hep-2 y detección de toxinas Shiga por efecto citopáticos en células Vero) y la confirmación por métodos de biología molecular entre los que se incluyen la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR por su siglas en inglés "*Polymerase Chain Reaction*"), técnica que muestra alta sensibilidad y especificidad⁽²⁶⁾.

La PCR, posibilita clasificar seis patotipos de ECD, sobre la base de factores de virulencia específicos⁽²⁷⁻²⁸⁾, que presentan características relacionadas con su epidemiología, patogénesis, manifestaciones clínicas y respuesta al tratamiento⁽²⁹⁾. Entre los patotipos identificados hasta el momento están: *E. coli* enteropatogénica (EPEC, por sus siglas en inglés), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC, por sus siglas en inglés) o *E. coli* productora de toxina Shiga (STEC, por sus siglas en inglés), *E. coli* enterotoxigénica (ETEC, por sus siglas en inglés), *E. coli* enteroagregativa (EAEC, por sus siglas en inglés), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC, por sus siglas en inglés) y *E. coli* (EAAdEC, por sus siglas en inglés), con sus variantes de adherencia localizada (LA), por sus siglas en inglés) y adherencia difusa (DAEC, por sus siglas en inglés)⁽³⁰⁻³¹⁾.

Habitualmente las diarreas asociadas a ECD son cuadros autolimitados, cuyo manejo debe centrarse en la reposición hidro-electrolítica de acuerdo al grado de deshidratación⁽³²⁾.

En caso de existir compromiso del sistema inmune, enfermedades crónicas de base, edades extremas de la vida o donde la causa del cuadro clínico tenga como etiología un agente invasor además del tratamiento de sostén, se recurre a la terapia antimicrobiana cuando por decisión clínica lo requiera⁽³³⁾. En este sentido, a nivel mundial la familia *Enterobacteriaceae*, incluyendo *E. coli*, ha mostrado grandes cambio respecto a la respuesta a los antimicrobianos, complicándose el tratamiento para este grupo microbiano, debido a la emergencia de cepas resistentes a la mayoría de los antibióticos que en décadas atrás formaron parte de la primera línea de elección para el tratamiento de las infecciones entéricas⁽³⁴⁻³⁵⁾.

La resistencia antimicrobiana y su diseminación a nivel mundial constituyen un desafío a la salud pública mundial. ECD muestran resistencia universal a antibióticos como: ampicilina, sulfametoxazol/trimetoprim, tetraciclina y ácido nalidíxico⁽³⁶⁻³⁷⁾. En la actualidad se ha limitado considerablemente su uso, primero por el vertiginoso aumento del porcentaje de resistencia que habían alcanzado en anteriores décadas y segundo por el advenimiento de nuevos antimicrobianos con mayor sensibilidad y eficacia para la resolución de procesos infecciosos como las quinolonas fluoradas de segunda generación (ciprofloxacino) y cefalosporinas de tercera generación (ceftriaxona y cefotaxima). En los últimos años, se ha reportado un aumento en los porcentajes de resistencia a estos antibióticos, limitando aún más las opciones terapéuticas⁽³⁸⁾. Los carbapenémicos, son considerados los antimicrobianos de elección para el tratamiento de enterobacterias productoras de β - lactamasas de espectro extendido (BLEE), aunque se han reportado *E. coli* productoras de carbapenemasas⁽³⁹⁾. El panorama se hace más alarmante con la aparición en 2014 de cepas de *E. coli* resistente a la colistina (gen *mcr-1* y *mcr-2*), porque esta droga constituye la reserva terapéutica para el tratamiento de las bacterias gram negativas extremadamente resistentes (XDR)⁽⁴⁰⁻⁴¹⁾.

En Cuba, como en el resto del mundo existen pocas evidencias de ECD, estas enterobacterias no escapan a la epidemia silente del siglo XXI, el fenómeno emergente de la resistencia y multirresistencia antimicrobiana, además en los laboratorios de microbiología de las instituciones asistenciales no se realiza el diagnóstico definitivo, existiendo un sub-registro de la prevalencia de estos enteropatógenos como causa de diarrea.

Por lo anterior expuesto se propuso la realización de la presente investigación.

OBJETIVOS

Para lograr los resultados de la investigación se definieron los siguientes objetivos:

Determinar la susceptibilidad de los aislados de *Escherichia coli* diarrogénicas recuperados en Cuba durante 2016.

Determinar los patotipos de *Escherichia coli* diarrogénicas y su relación con las multirresistencia antimicrobiana.

CAPÍTULO II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 Enfermedades diarreicas agudas (EDA)

Enfermedad diarreica aguda (EDA), término adoptado por la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Organización Panamericana de la Salud (OPS) para referirse a un proceso inflamatorio gastrointestinal infeccioso o no infeccioso asociado a una disminución de la consistencia y al aumento en la frecuencia (>3 veces por día) de las deposiciones lo que puede provocar o no algún grado de deshidratación. La diarrea puede ser líquida, semilíquida y puede contener moco y sangre^(17, 42). Otras manifestaciones clínicas de las EDA son náusea, vómito, dolor abdominal, fiebre y deshidratación. Como en algunos pacientes el vómito, la deshidratación, y la fiebre pueden ser las manifestaciones predominantes, un término apropiado para describir los órganos afectados y las manifestaciones clínicas de los pacientes afectados sería el de gastroenteritis aguda. Teniendo en cuenta que EDA es el término adoptado por la OMS, por lo tanto será el que se usará a todo lo largo de esta revisión^(17, 32).

La diarrea consiste en una eliminación demasiado rápida de deposiciones, que contienen principalmente agua. Esta definición simplificada permite incluir los dos mecanismos principales de las diarreas infecciosas: las diarreas por trastornos de la secreción y las diarreas invasivas por trastornos de la absorción⁽⁴³⁾.

Las toxinas de ciertos agentes patógenos (enterotoxina colérica, toxina termolábil o termoestable de colibacilos enteropatógenos, término habitualmente referido a los miembros de la familia *Enterobacteriaceae* y ciertas toxinas víricas, como la NSP4 del rotavirus) estimulan diferentes receptores, como la adenilciclase de la membrana, que incrementa la secreción de sodio y de cloro hacia la luz intestinal provocando una secreción aumentada que arrastra agua y provoca una diarrea de tipo acuosa⁽⁴³⁾.

Las diarreas invasivas se caracterizan por la penetración y la multiplicación de bacterias invasivas que conducen a la destrucción de los enterocitos en el intestino delgado en el caso de los virus y en la porción ileocólica para la mayoría de las bacterias. Se produce una reacción exudativa inflamatoria que conduce a la

emisión de heces mucosanguinolentas y a una reducción de la capacidad de absorción intestinal debida a las lesiones enterocíticas y a la atrofia más o menos importante de las vellosidades⁽⁴⁴⁾.

Las EDA son la segunda causa de mortalidad y morbilidad en el mundo, afectan a todos los grupos etarios pero los más afectados son los niños, reportándose en la literatura a nivel mundial, los menores de cinco años como el período de mayor vulnerabilidad pues son los que se deshidratan con mayor rapidez⁽⁴⁵⁾. Los agentes infecciosos asociados a la alta morbilidad y mortalidad de la EDA incluyen virus, bacterias y, en menor proporción los parásitos. Sin embargo, en algunos estudios incluidos los multicéntricos, se reportan a las bacterias como los agentes etiológicos más frecuente⁽⁴⁶⁾. La frecuencia de estos enteropatógenos puede variar en su incidencia, y diversidad entre regiones y poblaciones, independientemente del método utilizado para su identificación (epidemiológico o microbiológico) según grupo etario, zona geográfica y el escenario donde se registran los casos (comunitario vs hospitalario)^(2, 47).

Una de las especies bacterianas más vinculadas a este síndrome multifactorial es *Escherichia coli*, este grupo en la actualidad ha adquirido gran relevancia implicados en casos de epidemias y enfermedades diarreicas endémicas en todo el mundo, fundamentalmente en países en vía en desarrollo. Las relaciones evolutivas entre y dentro de los diferentes patotipos ha ayudado a dilucidar cómo han emergido y cómo se comportan epidemiológicamente⁽⁴⁸⁻⁴⁹⁾.

2.2 Características generales de *Escherichia coli*

E. coli fue descrita por primera vez en 1885 por el pediatra alemán Theodor Escherich, quien la denominó *Bacterium coli comunne* para indicar su aparición en heces de neonatos y niños sanos en el laboratorio “Otto von Bollinger” en Munich; en su honor en 1919 fue renombrada como *Escherichia coli*, aunque el nombre *Escherichia coli* no fue plenamente reconocido hasta 1954⁽⁵⁰⁻⁵¹⁾.

2.2.1 Taxonomía (Bergey`s 2005)

Reino: *Procariote*

Dominio: *Bacteria*

Phylum: *Proteobacteria*

Clase: *Gammaproteobacteria*

Orden: *Enterobacteriales*

Familia: *Enterobacteriaceae*

Género: *Escherichia*

Especie: *Escherichia coli*

Escherichia coli, frecuentemente encontrada en la literatura como *E. coli*, encabeza una gran familia bacteriana, *Enterobacteriaceae*, donde se encuentran diferentes bacterias entéricas las cuales forman parte del microbioma normal del tracto intestinal del hombre. Un gran número de géneros dentro de esta familia son agentes patógenos intestinales humanos (Ej. *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Yersinia* spp.) mientras que otras son colonizadores normales del tracto gastrointestinal (Ej., *Citrobacter* spp., *Enterobacter* spp., *Klebsiella* spp., *Proteus* spp., *Plesiomonas* spp.)⁽⁵²⁻⁵³⁾. Además de *E. coli* hay otras especies dentro de este género: *E. adecarboxylata*, *E. blattae*, *E. fergusonii*, *E. hermanii* y *E. vulneris*. En la actualidad no se cuenta con una información amplia acerca de los aspectos relacionados con la distribución, ecología, biología y el potencial patogénico de estas especies⁽¹⁴⁾.

El hábitat natural de *E. coli* es el intestino de mamíferos y aves de sangre caliente (endotermos), donde existe una microbiota intestinal con más de 500 especies y cuyo contenido intestinal tiene unas 10^{12} bacterias por gramo. A pesar de que las bacterias anaeróbicas obligatorias en el intestino superan a *E. coli* de 100/1 a 10,000/1, *E. coli* es el organismo anaerobio facultativo predominante en el tracto intestinal, gracias a que es capaz de desarrollar diversos mecanismos de competencia que han sido descrito en la literatura, que incluyen la producción de bacteriocinas (referidas como colicinas y microcinas), formación de biofilm, competencia por nutrientes y su flexibilidad en la utilización de una gran variedad de nutrientes⁽⁵⁴⁻⁵⁶⁾. *E. coli* coloniza el intestino humano pocas horas después del nacimiento donde establece una relación de mutuo beneficio con su hospedero, ejerciendo una función útil al organismo cuando suprime la fijación y desarrollo de especies bacterianas perjudiciales en el tracto intestinal, por ejemplo produciendo ácidos activos contra ciertas *Shigellas* y sintetiza importantes cantidades de vitaminas, como la B2 y K⁽⁵⁷⁻⁵⁸⁾. Habitualmente se asume que no sobrevive durante

mucho tiempo fuera de este medio, y por ello se utiliza como indicador de contaminación fecal de aguas. Sin embargo, recientemente se han descrito cepas ambientales, capaces de crecer y dividirse en suelos y aguas dulces⁽⁵⁹⁻⁶¹⁾.

E. coli se caracteriza por ser un grupo de bacterias genéticamente heterogéneo, que le permite mostrar un lado alternativo, revelado por la ganancia y la pérdida de genes, que hace que se convierta en un patógeno diverso y altamente adaptado a diferentes nichos, produciendo enfermedades en humanos y animales además de contaminar agua y alimentos, así como poder sobrevivir en diferentes microambientes^(48, 62).

La variabilidad genética de *E. coli*, dentro de la misma especie, conduce a la colonización diferencial de los hospederos y explica el poder encontrarse provocando infecciones fuera de su ambiente natural y encontrarla asociada a enfermedades extraintestinales tales como: infección del tracto urinario, sepsis y meningitis en el recién nacido, bacteriemia y sepsis en pacientes inmunodeprimidos y en pacientes con dispositivos intravasculares, además puede causar infecciones en tejidos blandos y neumonía⁽⁶³⁾.

2.2.2 Fisiología de *E. coli*

De modo característico, *E. coli* reduce los nitratos a nitritos; presenta ambos tipos de metabolismo, respiratorio y fermentativo por tanto puede crecer tanto en presencia como en ausencia de oxígeno. Bajo condiciones anaeróbicas, se desarrolla por vía fermentativa produciendo las clásicas combinaciones de ácidos y gas como productos finales. Sin embargo, también puede desarrollarse utilizando amoníaco, amonio o fumarato como aceptor final de electrones de la cadena respiratoria. Son bacterias quimioorganotróficas, ya que pueden desarrollarse en medios que contienen glucosa, como único constituyente orgánico⁽⁴⁸⁾.

En general, *E. coli* fermenta lactosa y no produce SH₂ (gas sulfhídrico); en particular la mayoría de las cepas de EIEC no fermentan lactosa, así que la precaución se debe tener en cuenta cuando se utiliza este diagnóstico para diferenciar con el género de *Shigella*. *E. coli* puede fermentar una variada gama de sustratos: alcoholes como D-manitol, D-sorbitol y carbohidratos como D-sorbosa, L- arabinosa, maltosa, D-xylosa,

trehalosa y D-manosa. Se recuperan con facilidad en el laboratorio a partir de muestras clínicas sembradas en medios comunes (agar sangre) o selectivos (agar MacConkey, agar eosina azul de metileno, entre otros) Su crecimiento es óptimo a 37°C en condiciones aerobias con tiempo de duplicación aproximadamente de 20 min⁽⁶⁴⁾.

E. coli, produce gran cantidad de ácido y gas (generalmente H₂ y CO₂) a partir de la fermentación de los hidratos de carbono (prueba del rojo de metilo positiva) y no utiliza la vía que produce acetil-metil-carbinol (acetoína) (prueba de Voges-Proskauer negativa). Habitualmente, utiliza el acetato de sodio como única fuente de carbono; no ocurre lo mismo con el citrato de sodio (agar citrato de Simmon's, negativo) y no es capaz de hidrolizar urea. En las pruebas bioquímicas tradicionales de los laboratorios clínicos, la mayoría de las cepas producen indol por desdoblamiento del triptófano y descarboxilan la lisina⁽⁶⁵⁾.

2.2.3 Estructura antigénica

En 1944, Kauffman propuso un esquema para la clasificación de *E. coli* con las variedades de los antígenos O (somático), H (flagelar) y K (capsular). Así las cepas de *E. coli* también se pueden clasificar por el serogrupo, de manera que O se refiere al antígeno del lipopolisacárido (LPS), o por serotipo, de manera que H se refiere al antígeno flagelar; por ejemplo *E. coli* O157:H7. Sin embargo, como cada patotipo contiene muchos serotipos (Ej., se han identificado 200 serotipos de ETEC) y algunos serotipos pueden pertenecer a más de un patotipo (Ej., O26:H11 puede ser EPEC o EHEC dependiendo de los genes de virulencia que estén presentes), por tal razón la serotipificación muchas veces no ofrece la identificación definitiva de los patotipos. Sólo un pequeño subconjunto de combinaciones O: H están asociados con la enfermedad. Mientras que la serotipificación es informativo para determinados serotipos (por ejemplo, STEC O157: H7), no siempre es útil para otros, debido a la reactividad cruzada entre los antígenos. La designación de NM o H⁻ indica una ausencia del antígeno H, y por ende el aislado no es móvil⁽⁴⁸⁾.

Esta forma de clasificación serológica resultó ser muy útil en los estudios epidemiológicos y en su día representó el primer método que permitió hacer una aproximación al estudio de la clonalidad de las cepas, facilitando la diferenciación entre

cepas virulentas e inoñas, y permitiendo la detección de brotes. La determinación de los antígenos O y H se realizan por técnicas de aglutinación en láminas, mientras que la identificación del antígeno K es recomendable que se realice por contraínmunoeléctroforesis. Los métodos moleculares tales como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en Inglés) de genes implicados en la biogénesis del antígeno O (por ejemplo genes *wzx* y *wzy*) y del gen *fliC* para el antígeno H, también se pueden utilizar para identificar el serotipo. Actualmente, son reconocidos 185 antígenos O, 56 antígenos H y 60 antígenos K de *E. coli*⁽⁶⁶⁾.

La mayoría de las cepas de *E. coli* no son patógenas y residen inofensivamente en el lumen intestinal. Sin embargo, en hospederos inmunosuprimidos o cuando las barreras gastrointestinales son violadas, estas cepas pueden desencadenar procesos infecciosos. Las infecciones producidas por *E. coli* patogénicos, pueden limitarse a las superficies mucosas o diseminarse a través del organismo. La diversidad patogénica de estas bacterias, en individuos aparentemente sanos, está atribuida a la posesión de una gran variedad de factores de virulencia⁽⁶⁰⁾.

Las cepas de *E. coli* patogénicas de diferentes hospederos han mostrado tener factores de virulencia en común, tales como los sistemas de secuestro de hierro mediado por sideróforos (aerobactina), hemolisinas, toxinas, formación de cápsula, formación de biofilm. Asimismo, estas cepas expresan en común varias adhesinas implicadas en la unión bacteriana a epitelios, entre ellas, las fimbrias⁽⁶⁷⁻⁶⁹⁾.

Se considera que el genoma de *E. coli* está compuesto por una región conservada de genes "core", que proveen el esqueleto de la información genética requerida para los procesos celulares esenciales y un conjunto de genes flexibles, no comunes a todas las cepas, que consiste en una característica individual de información genética cepa-específica, la cual le provee propiedades especiales para adaptarse a condiciones ambientales determinadas⁽⁷⁰⁾. Por lo tanto, las diferencias en el tamaño del genoma reflejan las variaciones que ocurren en el conjunto de genes flexibles y se deben principalmente a la adquisición o pérdida de ADN genómico. Otro constituyente de esta zona es el grupo de elementos genéticos accesorios móviles: plásmidos, transposones, secuencias de inserción, bacteriófagos e islas genómicas (PAIs)⁽⁷¹⁻⁷²⁾. Estos se pueden

integrar al cromosoma o pueden replicarse independientemente como elementos extracromosomales. Varios tipos de estos elementos se transfieren horizontalmente (HGT, del inglés Horizontal Gene Transfer, también conocida como transferencia lateral), y probablemente, estén presentes en la mayoría de los grupos bacterianos filogenéticos, contribuyendo a la variabilidad de contenido genómico inter/intraespecie⁽⁷³⁾.

2.2.4 Patogenicidad de *E. coli*

Dado que *E. coli* pertenece al microbioma intestinal normal de animales y del humano, la patogenicidad se define por la demostración de factores de virulencia y la asociación de dichos factores con la enfermedad. El mecanismo por el que *E. coli* produce diarrea suele implicar la adherencia de la bacteria a un receptor glucoproteico o glucolipídico, tras lo que se produce alguna sustancia nociva que lesiona las células intestinales o que altera su función⁽⁷⁴⁻⁷⁵⁾.

Diversos estudios muestran que algunas de estas cepas patógenas pueden derivar de cepas comensales que han adquirido de forma horizontal fragmentos cromosómicos o extra-cromosómicos relacionados con virulencia y resistencia a antibióticos como son: genes de virulencia, Islas de Patogenicidad (PAIs) y plásmidos. En la transmisión de plásmidos y PAIs se transfieren múltiples genes de una vez. La presencia de estos genes y a su vez la expresión de las proteínas codificadas por los mismos forma parte esencial del mecanismo de patogénesis único de cada uno de estos tipos de *E. coli* diarrogénicas⁽⁷⁵⁻⁷⁶⁾. Estos genes de resistencia si bien no están implicados en el propio proceso de la infección sí lo están en el desarrollo de la misma y en el tratamiento utilizado para combatirla⁽⁷⁷⁾.

Según su patogenicidad, las cepas de *E. coli* pueden clasificarse en tres grandes grupos: comensales, patógenos intestinales y patógenos extraintestinales⁽⁷⁸⁾.

***E. coli* comensales.** Las cepas de *E. coli* pertenecientes a este grupo se encuentran formando parte de la flora intestinal. Como parte de la flora intestinal, *E. coli* puede ser un comensal, o puede formar una relación mutualista con el hospedero proporcionándole algunas vitaminas⁽⁷⁹⁾. Estas cepas coexisten con su hospedero sin producir enfermedad, por lo que se consideran avirulentas o de baja virulencia, aunque

éste es un concepto mal definido, puesto que se basa en la ausencia de evidencia de virulencia⁽⁷⁹⁾.

***E. coli* patógenos.** Estas cepas pueden formar parte de la flora intestinal pero por diversas razones pueden llegar a causar infecciones intestinales o extraintestinales. Las cepas causantes de infecciones intestinales pueden ser comensales en las poblaciones de zonas endémicas, que desarrollan tolerancia, y por tanto sólo afectan a aquellos individuos que entran en contacto con las cepas por primera vez, niños pequeños y viajeros procedentes de zonas no endémicas. También pueden ser comensales de animales, y producen la infección al colonizar a otros huéspedes. Los patógenos intestinales suelen tener mecanismos de patogenicidad y genes de virulencia bien definidos que utilizan para interactuar con la mucosa intestinal^(17, 80).

E. coli diarrogénicas (ECD) fueron reconocidas en 1889, sin embargo la caracterización de sus mecanismos de patogenicidad y su posterior clasificación en las seis patotipos que hoy conocemos, no fue posible por muchos años debido a que los ensayos de microbiología convencional no permiten distinguir *E. coli* patógenas de comensales. Cada patotipo representa un grupo de clones que muestran factores de virulencia específicos. Los estudios sobre *E. coli* (intestinales) enteropatógenas se limitaron por muchos años a laboratorios de investigación en países industrializados donde se lograron caracterizar fenotípicamente y genotípicamente diferentes tipos de ECD^(17, 81).

Como otros patógenos localizados en mucosas, *E. coli* debe seguir la siguiente estrategia de infección: a) colonización de la mucosa, b) evasión de los mecanismos de defensa del hospedero, c) multiplicación y d) daño en el hospedero. Una de las características más conservadas de ECD, es su habilidad para colonizar la mucosa de la superficie intestinal a pesar del peristaltismo, el movimiento ciliar, el flujo de líquidos, el recambio de células del epitelio y de la capa mucosa y la competencia nutricional con la flora nativa del intestino, incluyendo otras cepas de *E. coli*⁽⁸²⁻⁸³⁾.

Una vez establecida la colonización, las estrategias patogénicas de las cepas de ECD exhiben una marcada variedad. Se describieron tres paradigmas generales a través de los cuales se produce la diarrea: a) producción de enterotoxinas (ETEC y EAEC), b) invasión (EIEC), y c) íntima adherencia a membranas (EPEC y EHEC). Sin embargo,

la interacción entre el microorganismo y la mucosa intestinal es específica para cada patotipo^(82, 84).

2.2.5 Aislamiento y Tipificación de *E. coli*

2.2.5.1 Métodos tradicionales

Cultivo. ECD representa un grupo de bacterias, fenotípicamente diverso. Se describieron varios métodos con la finalidad de detectar y/o aislar estos microorganismos a partir de diferentes tipos de muestras⁽⁸⁵⁾.

Tipificación bioquímica. El método convencional de identificación de *E. coli* implica la utilización de una serie de pruebas bioquímicas que pueden realizarse de manera tradicional o mediante algún sistema comercial, como pueden ser las galerías multi-sustrato API 20-E o mediante sistemas automatizados rápidos y sencillos de realizar como el VITEK que se basan en la clasificación de los diferentes aislamientos en función de la capacidad y cinética de degradación de los diferentes sustratos analizados^(84, 86).

El biotipado bioquímico se basa en diferenciar las cepas por su capacidad de fermentar un determinado número de carbohidratos como: manitol, xilosa, lactosa, sorbosa, sorbitol, entre otros o de degradar determinados aminoácidos como: lisina, ornitina o arginina u otros compuestos que ponen de manifiesto la presencia de determinadas enzimas como la β -D-glucuronidasa.

Serotipificación. La serotipificación se basa en la utilización de antisueros y la detección de los antígenos somáticos O y flagelares H, presentes en estos microorganismos.

Ensayos de adherencia en células Hep-2. Uno de los ensayos fenotípicos más útiles para el diagnóstico de ECD, es el ensayo de adherencia en células Hep-2. Fue descrito por primera vez en 1979, por Cravioto *et al.* En la actualidad, el aislamiento y el ensayo de adherencia en células Hep-2, continúan siendo el “estándar de oro” para el diagnóstico de EAEC y DAEC^(82, 87-88).

Ensayos de toxicidad en células Vero. La capacidad de STEC para producir verotoxinas, puede ser evaluada por la inducción del efecto citopático sobre células Vero⁽⁸⁹⁾.

2.2.5.2 Métodos moleculares

Para complementar los métodos tradicionales de tipificación, en los últimos años se han desarrollado una serie de técnicas moleculares basadas en la caracterización del genotipo microbiano mediante los análisis del ADN cromosómico y plasmídico. De todos estos métodos, el genotipado, se ha convertido en la prueba estándar usada para el diagnóstico de los diferentes patotipos de ECD^(87, 90-91).

Las cepas de ECD se encuentran dentro de los primeros patógenos por los cuales comenzaron a desarrollarse métodos de diagnóstico moleculares. En verdad, estos métodos son las técnicas más difundidas y realizables para diferenciar cepas diarrogénicas de los miembros no-patógenos de la flora intestinal. La PCR, representa el mayor avance ocurrido en la biología molecular para el diagnóstico de microorganismos patógenos en general y de estas bacterias en particular⁽⁹²⁻⁹³⁾. Las pruebas moleculares han constituido una valiosa herramienta clínico epidemiológica, desde hace varios años, y continuarán empleándose en el futuro porque han demostrado su gran utilidad en término costo-beneficio. Estos métodos basados en PCR son rápidos, muy confiables con alta sensibilidad y alta especificidad para el diagnóstico molecular de estos patotipos. Además estas pruebas facilitan la detección de marcadores de virulencia específicos en cultivos bacterianos o en muestras directas de pacientes⁽⁹⁴⁻⁹⁵⁾.

2.2.6 Principales categorías de ECD: patotipos

Al grupo de cepas de la especie *E. coli* causantes de infecciones entéricas son nombradas *ECD*, tipos patogénicos, patotipos o virotipos que incluye patógenos emergentes de importancia en salud pública a nivel mundial. Cada uno de los patotipos representa un grupo de clones que portan factores de virulencia específicos. Sin embargo dada la plasticidad del genoma de *E. coli*, se han aislado ciertas cepas que combinan más de una de estas características de virulencia de diferentes patotipos, denominándose híbridos, considerándose potencialmente más virulentas que las cepas patogénicas específicas^(76, 81).

Se han caracterizado seis grupos principales de ECD basados en evidencias epidemiológicas, mecanismos de patogenicidad, características clínicas de la enfermedad ocasionada y factores de virulencia específicos: *E. coli* enteropatógena (EPEC), *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC) y *E. coli* difusamente adherente (DAEC). En muchos estudios se han encontrado patotipos de ECD en una proporción elevada de niños sanos asintomáticos que viven en países desarrollados. La contaminación fecal (humana y animal), que es frecuente en los entornos desfavorecidos en los que viven muchos niños en países subdesarrollados, facilita la transmisión de estos patógenos^(88, 95-96). Además, con los actuales métodos microbiológicos, muy sensibles, se pueden detectar pequeños números de bacterias en muestras de heces. Por tanto, es importante evaluar la prevalencia de diversos patógenos intestinales en niños con y sin diarrea para interpretar los resultados. La excreción de patógenos intestinales por personas sin diarrea se puede explicar por las características de los patógenos (heterogeneidad en la virulencia), el huésped (susceptibilidad del huésped, edad, estado nutricional, lactancia materna, inmunidad) y factores ambientales (tamaño del inóculo)⁽⁹¹⁾.

En los países en vías de desarrollo los diversos ECD provocan infecciones frecuentes en los primeros años de vida; como grupo, ECD son responsable del 30-40% de todos los casos de diarrea en el mundo. Son más habituales en los meses cálidos en los climas templados y en los meses de la estación lluviosa en los climas tropicales⁽⁹¹⁾.

2.2.6.1 *E. coli* enteropatógena (EPEC; del inglés: Enteropathogenic *E. coli*)

A mediados de la década de los cuarenta, se identificaron en Inglaterra brotes de diarrea en niños de guarderías asociados a *E. coli*, el término EPEC fue utilizado por primera vez en 1955 para describir las cepas de *E. coli* que estuvieron relacionadas epidemiológicamente con los brotes de diarrea infantiles ocurridos entre las década de los años 40 y 50 para diferenciar este tipo virulento de las saprófitas⁽⁹⁷⁾. Cravioto *et al.*, 1977 reportaron que las cepas de *E. coli* del grupo EPEC presentaban la capacidad de adherirse a células HEp-2 (del inglés “Human Epidermoid carcinoma” -strain N°2)

formando microcolonias^(82, 98). Scaletsky *et al.*, 1985 informaron que algunas cepas de EPEC se adhieren a células HeLa (Células de carcinoma de cérvix humano), nombradas así en honor a la mujer de las que se extrajeron por primera vez, Henrietta Lacks) o HEP-2 según tres patrones diferentes, conocidos como adherencia localizada, adherencia difusa y adherencia agregativa⁽⁹⁹⁾. Estas cepas producen un daño histológico característico en las células epiteliales conocido como “efecto de adhesión y barrido” (*attaching and effacing, A/E*) y no producen toxinas Shiga. La prueba de FAS (tinción fluorescente para actina, por sus siglas en inglés) es una técnica alternativa que ha sido ampliamente usada para la identificación de esta alteración histopatológica en el intestino⁽¹⁰⁰⁾.

Originalmente definida por serotipo, en la actualidad la clasificación de EPEC está basada en la detección de sus factores de virulencia⁽⁹³⁾.

Factores de virulencia y patogenicia

EPEC, se describen como típico (tEPEC) y atípico (aEPEC) en función de su dotación de factores de virulencia⁽¹⁰¹⁾. En general, EPEC típicos son más homogéneos en cuanto a sus características de virulencia con respecto a los atípicos. EPEC típico posee un gran plásmido de virulencia de 70 – 100 Kb denominado pEAF (EPEC *adherence factor*), que codifica un pili tipo IV, llamado pili en “forma de ramillete o penacho” (bundle-forming pilus) (BFP) que media el fenotipo de adherencia localizada entre las bacterias o la adherencia con las células epiteliales⁽¹⁰²⁾; además contribuye a la antigenicidad, autoagregación y a la formación de biofilm. El plásmido EAF también contiene el locus *per* (regulador codificado en un plásmido), cuyo producto regula al operón *bfp* y *Ler* (*LEE-encoded regulator*), el cual regula la expresión génica de LEE (*locus of enterocyte effacement*)⁽⁹⁷⁾. EPEC atípico, contiene la isla de patogenicidad LEE pero el plásmido EAF está ausente. Las EPEC típicas son *eae+/bfp+* y las EPEC atípicas son *eae+/bfp-*⁽¹⁰³⁾. EPEC atípicos podrían ser menos virulentos que los típicos. Una razón posible sería la pérdida del plásmido EAF, aunque la presencia de otros factores de virulencia podría compensar la pérdida del plásmido⁽¹⁰¹⁾.

Retomando los patrones de adherencia, se encuentra la siguiente diferencia entre tEPEC y aEPEC, las cepas típicas sólo muestran el patrón de adherencia localizada

(LA), mientras que las cepas atípicas pueden presentar los patrones de adherencia difusa (DA), similar a la adherencia localizada (LAL) y la adherencia agregativa (AA). El patrón LAL es producido por cepas de la mayoría de los serotipos y está principalmente mediado por la intimina⁽¹⁰⁴⁾.

Frecuentemente, estas cepas producen una toxina termoestable enteroagregativa (EAST1), y otros potenciales factores de virulencia no codificados en LEE⁽⁸¹⁾. En LEE se encuentran los genes *eae*, *tir*, *esp*, y *sep*. El gen *eae* (*attaching and effacing*) codifica una proteína de membrana externa de 94-kDa llamada intimina que es responsable de la íntima adherencia entre la bacteria y la membrana del enterocito. La unión de la intimina con Tir determina la polimerización de la actina y la acumulación de elementos del citoesqueleto por debajo de las bacterias ancladas, con pérdida de la integridad de la superficie celular y muerte de la célula^(97, 105).

Se describieron 19 variantes alélicas del gen *eae*, las cuales codifican diferentes tipos y subtipos de intimina. Estas variaciones pueden dar lugar a la especificidad por los diferentes tejidos del hospedero y son utilizadas para la subtipificación de cepas EPEC y STEC. El gen *tir* (*translocated intimin receptor*) codifica el receptor celular Tir al que se une la intimina. Los genes *esp* (*E. coli secreted proteins*) codifican las proteínas EspA, EspB y EspD involucradas en la producción de la lesión A/E. El gen *sep* (*secretion of E. coli proteins*) codifica las proteínas involucradas en el sistema de secreción tipo III (T3SS), mediante el cual las proteínas Esp y el receptor Tir son transportados al interior del enterocito^(97, 106).

Una vez en el interior de la célula, Tir es fosforilado por las proteínas quinasas celulares, promoviéndose así la polimerización de actina y la formación del pedestal, en el lugar donde la bacteria queda adherida. Estos pequeños promontorios son estructuras ricas en actina que se forma en los sitios de adhesión de EPEC a las células del epitelio intestinal, quedando la bacteria pegada en la parte exterior de la célula. Desde esta posición EPEC altera a la célula dañándola⁽¹⁰⁷⁾.

Estudios realizados por Nataro y Kaper (1998), revelaron que la lesión A/E se lleva cabo mediante un complejo mecanismo de virulencia, que induce la degeneración de las microvellosidades y altera la morfología normal de la región apical del enterocito.

Para fines prácticos, el modelo de patogénesis de EPEC se divide en tres fases: a) adherencia inicial localizada, b) inyección de factores y transducción de señales y c) La unión de EPEC al enterocito produce un desequilibrio electrolítico, permitiendo el ingreso de iones positivos de sodio (Na^+) y salida de iones negativos de cloruro (Cl^-). La secreción de iones cloruros puede activar la diarrea acuosa. Asimismo, la destrucción de las microvellosidades ocasiona una disminución de la absorción a nivel del intestino delgado lo que permite explicar la gran persistencia de este cuadro diarreico⁽¹⁰⁹⁾.

Manifestaciones clínicas

Cepas de tEPEC pueden causar abundantes diarreas secretorias con moco, con pérdida significativa de agua y electrolitos en las heces, afecta la mucosa intestinal al conducir a la disolución del borde en cepillo por vesiculación de las microvellosidades, con pérdida de enzimas disacaridasas, lo que a su vez altera la absorción y conduce a la producción de una diarrea secretora, que puede estar asociada a fiebre. Aunque la diarrea por EPEC es autolimitada, esto depende de la respuesta inmune del hospedero, y puede dar lugar a diarrea secretora persistente, deshidratación y muerte⁽⁶⁹⁾. EPEC puede además producir una mala absorción de nutrientes que podría agravar la malnutrición y también provocar diarreas persistentes. Las cepas de aEPEC se han reportado asociadas a brotes de diarreas tanto en niños como en adultos⁽⁸⁸⁾.

Una vez que se inician los trastornos intestinales, las manifestaciones de la enfermedad incluyen diarrea, anorexia y desgaste rápido, que puede causar la muerte en el transcurso de días si no se maneja adecuadamente⁽¹¹⁰⁾.

Epidemiología

Uno de los aspectos más importantes de la epidemiología de la diarrea producida por EPEC es la población afectada. Esta se presenta principalmente como una enfermedad de niños menores de dos años de edad. En la actualidad los casos de diarrea por cepas EPEC en países industrializados son poco frecuentes. Sin embargo, en los últimos años se han reportado varios brotes en diferentes países, principalmente en guarderías y otros centros de atención a niños. En los países en desarrollo, la

incidencia de diarrea producida por EPEC sigue siendo alta^(108, 111). 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^(84, 105).

Generalmente es considerado al hombre como único reservorio de tEPEC, mientras que animales y humanos pueden ambos, ser reservorios de aEPEC. Un estudio realizado en China por Xuet *al.*, 2015, donde investigaron 143 cepas de aEPEC obtenidas de diferentes fuentes, encontraron que había una alta heterogeneidad entre las cepas, revelado por análisis mediante electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE, por sus siglas en Ingles) que arrojó 119 patrones polimórficos distintos en todos los genotipos de adhesinas detectados, y sugirieron que dentro de aEPEC existía una gran diversidad genética y que tanto las vacas como su carne son una importante fuente de aEPEC y por tanto podrían constituir un vehículo de transmisión de este patotipo⁽¹¹²⁾.

Estudios epidemiológicos indican que aEPEC son más prevalentes que tEPEC tanto en países industrializados como en países en desarrollo. Además algunas cepas de aEPEC están genéticamente relacionadas con EHEC y ambas son consideradas como causa emergente de diarrea endémica en niños y brotes de diarrea en adultos^(91, 104).

2.2.6.2 *E. coli* enterotoxigénica (ETEC, del inglés Enterotoxigenic *E. coli*)

En 1959 se descubre la toxina colérica y *E. coli* enterotoxigénica fue descrita por primera vez en 1968, como causante de diarrea en ganado porcino, en el que sigue provocando importantes pérdidas económicas. Pero no fue hasta 1971 cuando DuPont *et al.* demostraron que al inocular dos cepas de *E. coli* obtenidas de dos soldados británicos en Vietnam, quienes habían sido diagnosticados con una “colitis”, probablemente similar a lo que se conoce como diarrea del viajero y que producían enterotoxina termolábil (LT, del inglés heat-labile enterotoxine) eran capaces de causar diarrea en humanos adultos voluntarios y encontraron que siete de diez voluntarios desarrollaron un cuadro diarreico parecido al causado por *Vibrio cholerae* y en seis de los voluntarios se detectó respuesta de anticuerpo contra LT⁽¹¹³⁻¹¹⁵⁾.

ETEC se define como aquellas cepas de *E. coli* que expresan la enterotoxina termolábil LT y/o la enterotoxina termoestable ST (ST, del inglés heat-stable enterotoxin) que son capaces de colonizar el intestino humano mediante factores de colonización^(17, 116).

ETEC en humanos colonizan la mucosa del intestino delgado por medio de pili o fimbrias denominadas factores de colonización intestinal CFA (del inglés Colonization Factor Antigens) (CFA/I, CFA/II, CFA/III o CFA/IV), identificados por Evans *et al.*, 1975, demostrando su importante papel en la virulencia de ETEC; en la literatura actual a los CFA también se les puede encontrar como antígeno de superficie de coli (CS), ETEC presenta al menos 25 factores de colonización distintos antigénicamente, que se han descrito hasta la actualidad. La síntesis de dos enterotoxinas: LT y/o ST unidas a los factores de colonización constituyen el principal mecanismo de patogenicidad de ETEC. Las cepas de ETEC aisladas de casos clínicos en humanos han mostrado la combinación de estas toxinas con uno, dos o tres factores de colonización^(113, 116-117).

Factores de virulencia y patogenia

Las cepas ETEC elaboran una o las dos enterotoxinas (LT y/o ST), denominadas así por su sensibilidad y tolerancia al calor respectivamente. LT es semejante en estructura y función a la toxina causante del cólera (CT) producida por *V. cholerae* O1; tiene el mismo receptor celular gangliósido (GM-1) y actividad biológica similar⁽¹¹⁸⁾. Esta toxina es un dímero con peso molecular de 86-kDa, compuesta por una subunidad A de 28-kDa y 5 subunidades B iguales de 11.5-kDa cada una. Las subunidades B están arregladas en forma circular y es el componente de la toxina que se une al receptor GM1 y/u otras glucoproteínas intestinales. La subunidad A constituida por las fracciones A1 y A2 unidas entre sí por un enlace disulfuro, es la porción de la toxina que tiene la actividad enzimática. Los genes que codifican para la expresión de LT se localizan en plásmidos que también pueden tener los genes que codifican ST y/o los antígenos del factor de colonización (CFAs). Los factores de colonización son fimbrias que reconocen unos receptores glucoproteicos específicos de la célula anfitriona (definen la especificidad de anfitrión)⁽¹¹⁹⁾.

El blanco celular de LT es la enzima adenilato ciclasa, la fracción A1 posee actividad de ADP-ribosiltransferasa por lo que transfiere una molécula de ADP-ribosa del NAD a la subunidad alfa de la proteína GS (proteína que acopla GTP) lo que estimula la actividad de la adenilato ciclasa. Esta ADP-ribosilación ocasiona que la adenilato ciclasa se mantenga permanentemente activada conduciendo a un incremento de los niveles intracelulares del AMP cíclico (AMPc), activando entonces la proteína quinasa A(120). El resultado de dicho proceso es la estimulación de la secreción de iones Cl⁻ por las células de las criptas y la inhibición de la absorción de cloruro de sodio (NaCl) por las células de las vellosidades. El efecto es una diarrea osmótica y deshidratación. LT tiene un alto poder inmunogénico y por tanto constituye el blanco de estudio para el desarrollo de vacunas contra ETEC^(118, 120).

ST tiene variedades que son de bajo peso molecular. Los enlaces disulfuro de éstas son los que contribuyen a la estabilidad térmica que presentan estas enterotoxinas. Son dos clases STs que, difieren tanto en su estructura como en su mecanismo de acción. Los genes que codifican para la expresión de ambas se encuentran en plásmidos. La enterotoxina Sta descrita también como ST-I es producida tanto por cepas ETEC como por otras bacterias gramnegativas, es una toxina poco inmunogénica debido a su pequeño tamaño (19 aminoácidos) pero es una potente enterotoxina. Sin embargo STb, la otra variedad de estas enterotoxinas, solo es elaborada por cepas ETEC^(114, 117).

El blanco celular de STa es la enzima guanilato ciclasa C (GC-C) que se localiza en la membrana apical de las células del epitelio intestinal; la actividad de GC da lugar a un incremento en los niveles intracelulares de GMPc. Esta activación estimula la secreción de cloro y/o la inhibición de la absorción de cloruro de sodio cuyo resultado es la secreción de líquido intestinal. STa es producida por cepas de ETEC tanto de origen humano como animal.⁽¹¹⁸⁾ Con respecto a la enterotoxina STb, se le ha relacionado principalmente con cepas de ETEC de origen veterinario, aunque se ha identificado también en cepas de origen humano⁽¹¹⁷⁾.

Manifestaciones clínicas

La aparición de enfermedad requiere la actuación de la toxina y los factores de colonización. El cuadro clínico que inducen estas bacterias es similar al que se observa en el caso del cólera, presentándose de ocho a doce evacuaciones al día por un periodo de cuatro a cinco días. Las cepas ETEC son una causa importante de diarrea en niños menores de cinco años de edad y una de las causas más frecuentes de diarrea del viajero⁽¹²¹⁾.

Epidemiología

ETEC son consideradas en la actualidad, junto con las *E. coli* enteropatógenas (EPEC) y los rotavirus, los patógenos que con mayor frecuencia causan gastroenteritis infantil, diarrea colérica y diarrea del viajero en países con condiciones higiénico-sanitarias deficientes. La tasa de morbilidad aumenta en un 7% por cada grado de aumento en la temperatura ambiental que se acompaña con el crecimiento y proliferación de las bacterias contaminando agua y alimentos⁽¹¹⁹⁾.

Las cepas ETEC son una causa frecuente de diarrea en lactantes de países en desarrollo, así como la causa más común de diarrea en individuos de países industrializados que viajan a zonas menos desarrolladas del mundo. En estudios realizados en Asia, África e Iberoamérica, los ETEC se aíslan de entre el 10% y el 50% de los pacientes con diarrea^(118, 121). En los países desarrollados, los ETEC se aíslan muy raramente de casos esporádicos de diarrea (0-4%). Se cree que la razón de que los ETEC causen diarrea principalmente en países poco desarrollados es que las bacterias deben ser ingeridas en cantidades elevadas (10^8 - 10^{10}) para llegar a provocar deshidratación. Concentraciones tan elevadas de bacterias fecales solo se dan cuando las condiciones higiénico-sanitarias son deficientes. No obstante, aún en los países desarrollados han de controlarse los ETEC, ya que en los últimos años han provocado algunos brotes de gastroenteritis en EE.UU y Noruega⁽¹²²⁻¹²³⁾.

2.2.6.3 *E. coli* enteroinvasiva (EIEC, del inglés Enteroinvasive *E. coli*)

EIEC fue identificada en voluntarios en 1971. Estudios filogenéticos de ARN ribosomal y de análisis de ADN de los plásmidos de virulencia indican que EIEC es un ancestro

cercano a la *Shigella*. Brenner *et al.*, (1982) determinaron que la similitud nucleotídica entre *E. coli* y *Shigella* era de 80-90%, basada en la secuencia del gen que codifica la subunidad 16S del ácido ribonucleico ribosomal (rARN); este gen es altamente conservado en *E. coli* y es usado en taxonomía⁽¹²⁴⁻¹²⁵⁾. La secuenciación de genes conservados y aún del genoma completo de EIEC y *Shigella*, indican un alto grado de relación entre ambas⁽¹²⁶⁾. En varios estudios, incluyen a ambas bacterias dentro de un mismo patotipo, sin embargo, actualmente, los dos organismos continúan siendo considerados como dos géneros diferentes, basado en la percepción histórica de su potencial de enfermedad y ecología⁽¹²⁷⁻¹²⁸⁾.

Shigella y EIEC pueden ser separadas en el laboratorio basado en sus características fisiológicas y bioquímicas. La mayoría de las cepas de *E. coli* (>80%) son motiles, lisina descarboxilasa (LDC) positiva, forman gas a partir de la fermentación de la glucosa, algunas cepas de EIEC fermentan la lactosa tardíamente (48-72 horas), producen indol, son capaces de utilizar el acetato como única fuente de carbono y además son β -galactosidasa positiva (ONPG+) y también β -glucuronidasa positiva (MUG+). Por lo contrario las cepas de *Shigella* son no motiles, LDC negativa, no forman gas a partir de la glucosa, excepto *Shigella flexneri* serotipo 6. *Shigella* no produce indol, no produce ácido a partir de la salicina, no es capaz de hidrolizar la esculina, ONPG+ y MUG+^(81, 126).

Factores de virulencia y patogenia

Aunque varias cepas de *E. coli* podrían ser internalizada dentro de células epiteliales esto ocurre de forma poco frecuente, sólo EIEC se comporta como un verdadero patógeno intracelular, siendo capaz de invadir y replicarse en el interior de células epiteliales y macrófagos, dado que portan un plásmido indispensable para conferir el fenotipo invasivo a estos microorganismos. EIEC es productor de diarrea disenteriforme a causa de su capacidad para invadir el epitelio intestinal, la cual se debe, entre otros determinantes de patogenicidad, al gen *lpaH*⁽⁸¹⁾.

La patogenicidad de EIEC depende de los factores de virulencia codificados por genes que se encuentran localizados en islas de patogenicidad en el cromosoma o en plásmidos de invasión (pINV) presente en todas las cepas virulentas de EIEC. En los

individuos infectados, EIEC evade la respuesta inmune porque entra fácilmente a las células epiteliales del colon por medio de adhesinas, moviéndose lateralmente para invadir otras células. EIEC, al igual que *Shigella* spp, posee un plásmido de virulencia pINV que codifica para el T3SS, 25 proteínas (entre ellas OscpB, VirA, VirF, OspG) y los antígenos de invasión de plásmidos (Ipa: *Invasión plasmid antigens*) Ipa A, Ipa B, Ipa C, Ipa D, entre otros^(17, 81).

En la mucosa del colon, EIEC invade inicialmente las células M y en una vacuola fagocítica por transcitosis la bacteria atraviesa la barrera epitelial e invade los macrófagos e induce apoptosis. Posteriormente, la bacteria ingresa a las células intestinales mediante el reconocimiento de los receptores CD44 y $\alpha 5\beta 1$ integrina gracias a IpaB y al complejo IpaBCD bacteriano. Después de su multiplicación en el citoplasma, se libera del fagosoma mediante IpgD y se desplaza lateralmente entre una y otra célula⁽¹⁰⁹⁾. Para esto, VirG, localizada al extremo de EIEC, es esencial para la nucleación de filamentos de actina y promueve el proceso de invasión a células proximales. En este proceso, la liberación de interleuquina (IL-1) por parte de los macrófagos apoptóticos y de IL-8 en los enterocitos infectados favorece la migración de polimorfonucleares (PMN), los que adicionalmente facilitan la entrada, vía luminal, de la bacteria al epitelio. Este fenotipo caracterizado por destrucción celular explica el síndrome disentérico en el paciente afectado⁽¹⁷⁾.

Manifestaciones clínicas

Las cepas EIEC afectan la mucosa del colon y producen un cuadro disentérico similar, aunque menos severo, al que produce *Shigella* spp. También se asocia a diarrea acuosa y afecta a niños, principalmente en países de bajos recursos. Las manifestaciones clínicas asociadas con ésta infección son evacuaciones escasas acompañadas de moco y sangre, dolor abdominal tipo cólico y fiebre. Con presencia de sangre y leucocitos en heces^(109, 127).

Epidemiología

Debido a las dificultades que acarrea la diferenciación entre EIEC y *Shigella*, la prevalencia de EIEC a nivel mundial puede estar subestimada. EIEC presenta una

distribución mundial y se ha reportado como causa frecuente de diarrea en Brasil, Estados Unidos y Europa. Estudios epidemiológicos realizados en México, muestran que las cepas EIEC son poco frecuentes como agentes causales de diarrea, identificándose preferentemente después del sexto mes de vida. Estas cepas se asocian más con brotes que con casos aislados, en los cuales la transmisión puede ser de persona a persona o bien, por ingestión de alimentos y agua contaminada, convirtiéndose en un patógeno importante en niños mayores de seis meses⁽⁸¹⁾.

2.2.6.4 *E. coli* enterohemorrágica (EHEC, del inglés Enterohemorrhagic *E. coli*)

Escherichia coli productor de toxina Shiga (STEC) fue descrito por primera vez por Knowalchuk en 1977 quién informó que cepas de *E. coli* de los serogrupos O18, O26, O111 y O128 aisladas de niños con diarrea y de cerdos con edema de pulmón producían una toxina a la que se denominó Verotoxina (VTEC, del inglés *verotoxigenic E. coli*), debido al efecto citotóxico en células Vero(línea celular de riñón de mono) o las células HeLa⁽¹⁰⁹⁾. Pocos años después se aislaron cepas de *E. coli* que producían un efecto citotóxico en células HeLa, el cual podía ser neutralizado por un antisuero anti-toxina Shiga de *Shigella dysenteriae* tipo 1, por lo cual se le denominó “Shiga – like toxin”⁽¹²⁹⁾.

En 1982, en EUA y en Canadá, ocurrieron tres epidemias de colitis hemorrágica (CH). Una de ellas sucedió en Michigan y la otra en Oregón; ambas estaban relacionadas con hamburguesas de una cadena de comida rápida. La tercera epidemia ocurrió en una casa de reposo para ancianos, en Ottawa, Ontario, causada por sándwiches, donde fallecieron 19 personas, identificándose por primera vez el serotipo de *E. coli* O157:H7 como patógeno humano⁽¹³⁰⁾. La asociación entre el síndrome urémico hemolítico (SUH) e infección por STEC se demostró primero en Canadá entre 1983 y 1985, que posteriormente se confirmó en distintos países⁽¹³¹⁾.

STEC, son generalmente definido como *E. coli* que contienen genes que codifican para la toxina Shiga (*stx*) y el gen *eae* presente en LEE que codifica para la proteína-intimina. El serotipo de STEC se define determinando ambos antígenos O y H. Se estima que existen más de 400 serotipos de STEC, y al menos 150 son patógenos al hombre. Las cepas de STEC son generalmente categorizadas como O157 y no-157,

las cepas pertenecientes al serotipo O157:H7 han sido relacionadas más comúnmente con enfermedades severas en humanos. Se estima que del 5% al 10% de los individuos infectados desarrollan tales complicaciones, fundamentalmente en aquellos de alto riesgo entre los que se encuentran incluidos niños, ancianos e individuos inmunocomprometidos⁽¹³²⁾. Sin embargo las infecciones por *E. coli* de otros serotipos no-O157 se están incrementando gradualmente. Este grupo bacteriano incluye cepas de diferentes serotipos que presentan las mismas características clínicas, epidemiológicas y patogénicas del serotipo O157:H7, considerado como prototipo del grupo y el más frecuente; en la actualidad constituye este serotipo el más ampliamente caracterizado y estudiado dentro de STEC⁽¹³³⁾. Además es considerado clínicamente el más importante, aunque se estima que hasta un 50 % de las infecciones por STEC son causadas por serotipos no-O157. Esto puede deberse a que los otros serotipos toxigénicos (non-O157) producen toxina en menor cantidad o adolecen de algún cofactor de patogenicidad (gen *eae* u otros)⁽¹³⁴⁻¹³⁵⁾.

Si bien la mayoría de los estudios están orientados a la detección de *E. coli* O157, en la actualidad aumentan los esfuerzos para detectar los diferentes serotipos de STEC. A diferencia de lo que ocurre con O157, que no fermenta el sorbitol y no posee actividad de β -glucuronidasa (MUG), los serotipos no-O157 de STEC no presentan marcadores fenotípicos; basado en estos marcadores fenotípicos presentes en el serotipo O157:H7 se han desarrollado medios selectivos y diferenciales, Con frecuencia, se utiliza agar MacConkey que contiene sorbitol al 1% (SMAC, por sus siglas en inglés), generalmente con cefixima y ramnosa o telurito de potasio. También están disponibles otros medios, incluyendo agares cromogénicos comerciales (por ejemplo, el agar Rainbow). Por lo tanto, para su aislamiento, se requiere la aplicación de estrategias más complejas⁽¹³⁶⁾.

En el laboratorio se puede identificar STEC por: detección de toxina Shiga libre en materia fecal, citotoxicidad específica en células Vero y cultivo. El aislamiento permite la caracterización del microorganismo, su tipificación, (factores de virulencia, biotipo, serotipo), subtipificación (PFGE-Electroforesis en Gel de Campo Pulsado-, fagotipificación y genotipificación de variantes alélicas de Stx1 y Stx2), detección de anticuerpos anti-Stx, y ensayos de neutralización de la citotoxicidad en células Vero⁽¹³⁷⁾.

En el modelo evolutivo de Whittman (1998) se hipotetiza sobre la aparición de *E. coli* O157:H7 a partir del ancestro EPEC. Se considera que primero se adquirió el gen que codifica la producción de la toxina Shiga (*Stx2*) mediante transducción; posteriormente se insertó el gen *rfbO157* y se adquirió el plásmido de EHEC que codifica las hemolisinas; y finalmente se adquirió el gen *stx1*, se perdió la capacidad de fermentar el sorbitol (SOR-) y la actividad de β -glucuronidasa (GUD). Por lo que se considera esta cepa como un clon evolucionado a partir de EPEC y expresa actividad de anclaje y borramiento^(110, 138).

Factores de virulencia y patogenia

La secuencia del proceso patogénico según los conocimientos actuales sería adherencia al enterocito por la fimbria, seguida de adherencia íntima y lesión de la pared del enterocito por producción de la proteína «intimina» codificada por el gen *eae* y posterior liberación de verotoxina⁽¹¹⁰⁾. La interacción de STEC y el enterocito es similar al mecanismo presentado por EPEC y comienza con la lesión celular "Adherencia y Esfacelamiento" (A/E). En este evento participan tanto genes cromosomales como plasmídicos que inducen y/o regulan la expresión de factores de virulencia de la bacteria. Los genes responsables del daño celular A/E están insertados en una PAI de 35kb llamada LEE⁽¹³⁹⁾, la cual incluye los dominios de la intimina, el sistema de secreción tipo III y las proteínas Esp de secreción, los cuales son empleados por EHEC para atacar directamente a las células epiteliales del colon humano⁽¹⁴⁰⁾.

Estas cepas han adquirido la toxina Shiga (es decir *Stx-1*, *Stx-2* o ambas). *Stx-1* es básicamente idéntica a la toxina Shiga producida por *Shigella dysenteriae*; *Stx-2* muestra una homología del 60%; estas toxinas constituyen el principal factor de virulencia y son responsables de las complicaciones intestinales y sistémicas. Como los genes que codifican la producción de estas toxinas se encuentran en un bacteriófago lisogénico (genes que están situados en bacteriófagos que se integran al genoma bacteriano de forma estable), su producción y liberación, dependen de que el fago active su ciclo lítico. Esta inducción, puede ocurrir luego del daño del ADN bacteriano ya sea por agentes tóxicos o antimicrobianos⁽⁷⁷⁾.

Como consecuencia de la lisis de las células hospederas se liberan más fagos libres que infectarán a otras bacterias. Luego de la liberación de las toxinas en el lumen intestinal, se induce la producción de interleuquina 8. Durante la inflamación resultante, la migración de los PMN dentro del lumen intestinal, facilita el pasaje de toxina Shiga dentro de la submucosa. Las toxinas son transportadas al torrente sanguíneo, posiblemente unidas a leucocitos circulantes, a sitios ricos en receptores Gb3 (globo triaosilceramida) como son los glomérulos renales, epitelio del túbulo proximal renal, y en el cerebro. Luego de la unión con su sitio blanco, el ingreso a la célula y la distribución de la toxina hacia diferentes órganos son mediados por tres mecanismos principales: macropinocitosis, transcitosis y endocitosis, desarrollándose la cascada de acontecimientos previamente descritos. Ambas poseen una subunidad A y cinco subunidades B⁽⁸⁹⁾.

Otros factores de virulencia de STEC: adicionalmente, el plásmido pO157 de STEC codifica genes para catalasa-peroxidasa (*kkatP*, adhesina *ToxB*, metaloproteasa dependiente de zinc (*StcE*) y para la enterohemolisina (Ehly) cuya función durante la infección es la de liberar la hemoglobina presente en los glóbulos rojos, proveyendo a las bacterias de una fuente de hierro. Ehly es responsable del fenotipo enterohemolítico observado entre las cepas STEC O157 y no-O157⁽¹³⁶⁾. Las funciones del resto están principalmente enfocadas en mediar la unión a la célula hospedera, degradación de mucinas y glicoproteínas, regular mecanismos de inflamación y citotoxicidad, efector del sistema de secreción tipo II, entre otras⁽¹¹⁰⁾.

Manifestaciones clínicas

STEC es un patógeno emergente de carácter zoonótico de gran importancia en salud pública, que causa dolor abdominal, diarrea sanguinolenta y poca fiebre. La infección por STEC se puede presentar como casos esporádicos o brotes de diarrea, Colitis Hemorrágica (CH) y Síndrome Urémico Hemolítico (SUH) y ocasionalmente lesiones en el sistema nervioso central. STEC O157:H7 es el principal agente etiológico del SUH, el cual ocurre aproximadamente en 5 y 10% de los casos y es una de las principales causas de daño renal en niños, se define por la presencia de anemia hemolítica microangiopática, insuficiencia renal aguda y trombocitopenia (afectación vascular y de

otras células de la sangre como las plaquetas)⁽¹¹⁰⁾. La colitis hemorrágica es un padecimiento autolimitado, caracterizado por diarrea de inicio brusco con dolor abdominal. Las evacuaciones líquidas se acompañan de una descarga hemorrágica. La CH está mediada por las toxinas Stx, que puede progresar a colitis gangrenosa, perforación del intestino, peritonitis y sepsis⁽¹⁴¹⁾.

Epidemiología

La infección por STEC es considerada por la Organización Mundial de Sanidad Animal (OMSA), originalmente Oficina Internacional de Epizootias, como una zoonosis de origen alimentario y aparece como causa de brotes epidémicos con una gran explosividad en su presentación, sobre todo en países desarrollados, constituyendo el patotipo de *E. coli* a la que más atención se presta en el denominado primer mundo, debido a su participación en el SUH⁽¹⁴²⁾. Los rumiantes han sido identificados como el principal reservorio de cepas de STEC. No obstante, aunque el ganado vacuno es, con toda probabilidad, la fuente más importante de infecciones humanas (carne y productos lácteos de vacuno, vegetales y agua contaminados con heces de vacuno), los STEC se han aislado también del ganado ovino y caprino y también de rumiantes silvestres como ciervos⁽⁸¹⁾. Pistone Creydt *et al.*, 2005 demostraron que cepas STEC aisladas de terneros con diarrea sanguinolenta tienen efecto citopático sobre el colon humano *in vitro*⁽¹⁴³⁾. Por este motivo es que los rumiantes, en particular los bovinos, son señalados como el principal reservorio de STEC y la fuente de la infección para el hombre. La materia fecal de los rumiantes está reconocida como la fuente de un gran porcentaje de infecciones humanas por STEC. Ésta puede contaminar la carne durante el sacrificio en matadero, puede ser arrastrada a ríos, lagos o fuentes de agua de consumo, o puede depositarse en frutas y verduras por el uso de abonos orgánicos o por uso de agua de riego contaminada con aguas residuales⁽¹⁴⁴⁾.

Algunos animales como insectos, aves, roedores y otros silvestres, pueden transportar esas bacterias desde las heces al agua de consumo y los alimentos. Además, las cepas STEC pueden ser ingeridas inconscientemente por las personas que interactúan o trabajan con animales. Los seres humanos, por tanto, pueden infectarse a través del

contacto directo con una persona infectada o un animal portador, o indirectamente a través del medio ambiente, alimento, agua de consumo o agua superficial que contenga material fecal contaminada con STEC de origen humano o animal⁽¹³²⁾.

Diferentes serotipos STEC se han relacionado con la etiología de la diarrea esporádica en adultos, en brotes asociados a la ingesta de alimentos contaminados, CH, SUH y púrpura trombocitopénica. Estos padecimientos se han observado con mayor frecuencia en países con climas templados como los Estados Unidos, Canadá, Argentina, Alemania y Japón. Los serogrupos involucrados más comunes son: O26, O111, O121, O145 y particularmente O157:H7. Brotes de EHEC O157:H7 se producen en todo el mundo, se han informado infecciones en todos los continentes, excepto en la Antártida. La importancia de algunos serotipos puede variar con la región geográfica⁽¹⁴⁵⁻¹⁴⁶⁾.

STEC es prevalente en países desarrollados como Estados Unidos, Canadá, Australia y en Europa. En Latinoamérica, es endémica en Argentina con una prevalencia aproximada de 500 casos por año y una incidencia de 12 a 14 casos por cada 100.000 en niños bajo cinco años, presentándose el mayor número de casos de SHU en el mismo grupo etario, con una mortalidad entre 3 y 5%. Sin embargo, STEC puede afectar a todos los grupos etarios, en los cuales puede provocar enfermedad grave^(134, 144). Hoy día, EHEC se considera dentro del grupo de infecciones emergentes (como la gripe aviar o el Síndrome Respiratorio Agudo Severo (SARS)), ya que la aparición de brotes y epidemias se produce desde hace relativamente poco tiempo tras el desarrollo vertiginoso de grandes granjas de animales (ganado principalmente, pero también aves) en condiciones de hacinamiento y con una práctica desmedida en la administración de antibióticos para aumentar la producción y abaratar los costos. La dificultad del control y saneamiento en dichas granjas y sus trabajadores, y la larga cadena posterior en el proceso de comercialización y distribución a grandes distancias condicionan este carácter de infección emergente⁽¹³²⁾.

2.2.6.5 *E. coli* enteroagregativa (EAEC, del inglés Enteroaggregative *E. coli*)

EAEC se presenta como un patógeno emergente y genéticamente heterogéneo; el cual fue descrito por primera vez en 1987 por Nataro *et al.* Actualmente se considera a

este patotipo como un problema de salud pública, sin distinción entre países desarrollados y en vías de desarrollo⁽¹⁴⁷⁻¹⁴⁸⁾. Este patotipo se asocia con casos de diarrea aguda o persistente en niños y adultos a nivel mundial, y también está relacionado con el retardo del crecimiento en este último grupo etario. En los últimos diez años ha recibido mayor atención como causante de diarrea acuosa, la cual se presenta como patología persistente e inflamatoria (>14 días) en infantes y niños de países en desarrollo. Se ha observado, de manera reciente, un aumento de la incidencia de aislados EAEC resistentes a antibióticos⁽¹⁴⁹⁻¹⁵⁰⁾.

Las cepas EAEC derivan su nombre por la forma de adherencia que presentan en células HEp-2 en cultivo. Esta adherencia se caracteriza por la formación de agregados bacterianos, con apariencia de ladrillos apilados ("stacked brick"), observados tanto sobre células epiteliales HEp-2 como en la superficie del vidrio de la preparación en biocapa⁽¹⁵¹⁾. La adherencia de tipo agregativo ha sido asociada con un plásmido de 65 mDa, que codifica para las fimbrias (AAF/I y AAF/II), unas adhesinas parecidas a los BFP responsables de la formación de microcolonias en EPEC. AAF/I media la adherencia a células HEp-2 y hemaglutinación de eritrocitos humanos en la cepa EAEC⁽⁵⁴⁾.

Entre los patotipos de ECD, EAEC es la más difícil de identificar debido a su heterogeneidad como grupo, el método "estándar de oro" es la caracterización de su patrón de adherencia agregativa característico. Sin embargo, este procedimiento resulta engorroso y no es fácil implementarlo en laboratorios de mediana complejidad. Por tanto el diagnóstico de esta entidad se realiza mediante técnicas moleculares que permiten la detección rápida del grupo heterogéneo de genes de virulencia presentes en el aislamiento y constituye, además, una herramienta epidemiológica. Ejemplo de esta técnica es la PCR múltiple donde se detectan cuatro genes de virulencia, dos plasmídico y dos cromosomales (*aggR*, *aatA*, *aaiAy* *aaiG*) respectivamente⁽¹⁵²⁻¹⁵³⁾.

Factores de virulencia y patogenicidad

Las diferencias esenciales entre las cepas patogénicas y no patogénicas se desconocen, en gran medida, pero los estudios realizados sugieren tres etapas en la

infección: 1) Adherencia a la mucosa intestinales mediante fimbrias de adherencia agregativa u otros factores; 2) La estimulación de la producción de moco, con la formación de una biocapa en la superficie de la mucosa. Esta película o biofilm protege a las bacterias agregadas frente a los antibióticos y las células fagocíticas y toxicidad hacia la mucosa, que se manifiesta por la liberación de citocinas, exfoliación celular, secreción intestinal e inducción de la inflamación de la mucosa⁽¹⁴⁷⁾.

La presencia del plásmido pAA, donde se encuentran codificados el mayor número de genes de virulencia, permite diferenciar entre cepas típicas y atípicas de este patotipo. Las cepas portadoras de este plásmido que alberga el gen *AggR* (activador transcripcional), que regula la expresión de genes de virulencia, representan un importante subgrupo considerado como cepas típicas de EAEC, mientras que las atípicas (*AggR*⁻) son las que han perdido el plásmido en cuestión pero muestran el patrón fenotípico de adherencia en las células HEp-2 en forma de ladrillos apilados⁽¹⁵⁴⁾.

Entre los genes más estudiados de este patotipo se encuentran el *AggR*, el *aap* que codifica a la dispersina, el *AA probe*, también conocido como CVD432 que codifica una proteína de membrana externa, la cual forma parte de un sistema de proteínas transportadoras y el *astA* que codifica la enterotoxina⁽¹⁴⁹⁾.

Numerosas adhesinas, citoxinas, enterotoxinas y proteínas secretoras han sido caracterizadas en EAEC desde que se definió el patotipo. La mayoría de las adhesinas son fimbrias de adherencia agregativa (AAf/I-AAf/V), ellas median el patrón de adherencia agregativa (AA) y la formación de biofilm. Una de las primeras enterotoxinas identificadas en EAEC fue EAST1, (por sus siglas en inglés *enteroaggregative E. coli heat-stable toxin1*)⁽¹⁴⁸⁾. El gen que codifica para esta proteína (*astA*) está localizado en un plásmido mencionado. EAST1 incrementa los niveles de GMPc y en el modelo *in vitro* (en cámaras de Ussing) produce un incremento en la corriente de corto circuito (debido a la secreción de líquidos), sugiriendo un efecto enterotóxico semejante al producido por la enterotoxina termoestable de ETEC (STa), sin embargo, no existe reactividad cruzada al utilizar anticuerpos producidos contra Sta⁽¹⁵⁵⁾.

Manifestaciones clínicas

Las características clínicas de la infección intestinal por EAEC es una diarrea secretora acuosa con moco, con o sin sangre y dolor abdominal, vómito y fiebre baja. Un gran porcentaje de pacientes presentan lactoferrina fecal detectable (un indicador sensitivo de leucocitos fecales) y niveles elevados de IL-8 en las heces. La proteína Pet tiene efecto estimulante sobre macrófagos e induce en estos, la expresión de interleucinas pro-inflamatorias. Esto sugiere que la infección por EAEC puede estar acompañada de una forma sutil de inflamación de la mucosa. Las diarreas prolongadas ocurren dependiendo del estado inmunológico, nutricional y la susceptibilidad genética del paciente⁽⁸¹⁾.

EAEC ha emergido en los últimos años como agente causal de infecciones de tracto urinario (UTI), reportándose marcadores de *E. coli* uropatógena (UPEC) en EAEC como la fimbria AAF/I. En Dinamarca fue la primera vez que se reportó un brote de EAEC extraintestinal por el serotipo O78:H10⁽¹⁵⁶⁻¹⁵⁷⁾.

Epidemiología

El hombre es el principal reservorio, aunque algunas cepas han sido identificadas a partir del cerdo y bovinos. Las vías de transmisión son, principalmente, el agua y los alimentos contaminados, aunque las manos también pueden ser vía de transmisión, sobre todo para los recién nacidos⁽¹⁵⁸⁾.

Cravioto reportó una estrecha asociación entre el aislamiento de cepas EAEC y la presencia de diarrea persistente en niños menores de dos años. Existen una gran cantidad de estudios epidemiológicos que demuestran la asociación de EAEC y diarrea, principalmente en países en desarrollo tales como Bangladesh, India, Brasil, Irán y Venezuela. Se ha reconocido como el más importante patógeno entérico en paciente con Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA) en África, siendo el responsable del 10 al 40% de la diarrea aguda y del 40 al 80% de la diarrea persistente en pacientes con VIH. También se ha reportado como la segunda causa de diarrea del viajero (30% de los casos) y alta tasa de excreción en pacientes asintomáticos por lo que reviste gran importancia su estudio por su papel potencial en la malnutrición y en el

retardo del crecimiento en los infantes⁽¹⁵⁹⁻¹⁶⁰⁾. Cabe mencionar un extenso brote en Alemania, en la primavera del 2011 causado por una cepa híbrida de EAEC O104:H4 productora de verotoxinas (EAEC/EHEC) que afectó a 12 países de Europa y en América del Norte a Canadá y EE. UU⁽¹⁵⁴⁾. La amenaza a la Salud Pública debida a las EAEC, hace importante identificar los reservorios animales a partir de los cuales se podrían originar epidemias o brotes en humanos. En un estudio realizado por Orden, JA *et al.*, 2016 sugirieron que las cabras, al igual que las vacas y ovejas, no son probablemente un reservorio importante de EAEC, al encontrar que en 920 muestras fecales de vacas, ovejas y cabras, ninguna de las muestras resultó positiva a los genes de EAEC analizados⁽¹⁵¹⁾.

2.2.6.6 *E. coli* Adherente Difusa (DAEC, del inglés, Diffusively Adherent *E. coli*)

DAEC forma un patrón de adherencia difusa sobre los enterocitos del intestino delgado, a través de adhesinas. Se conoce poco de los mecanismos de patogenicidad de DAEC a pesar de su amplio estudio. Las cepas de DAEC expresan adhesinas afimbriales (Afa) y adhesinas fimbriales (Dr). Estas adhesinas se encuentran en la superficie de la membrana externa de la bacteria, confiriendo el principal mecanismo de patogenicidad. Se subdividen en dos clases, la típica (Afa/DrDAEC) y la atípica (Afa/DrDAEC) que tienen como características la misma organización genética y la unión al factor de aceleración (hDAF: human *Decay Accelerating Factor*). Este es una glicoproteína de 70 KDa que se encuentra distribuida en todas las células de la sangre, en el epitelio del intestino, tracto genito-urinario y células endoteliales. Tiene como función regular la cascada del complemento en el paso de la convertasa C3, cumple un papel importante en la interacción entre el patógeno y las células del hospedero para favorecer la infección⁽⁷⁸⁾.

Se conocen dos adhesinas principales de DAEC que permiten la adherencia al enterocito. Adhesina fimbrial 1845 (F1845) y la adhesina involucrada en la adherencia difusa (AIDA I: *Adhesin Involved in Diffuse Adherence*). F1845 es una adhesina fimbrial que pertenece a la cepa C1845 de tipo silvestre que tiene como receptor hDAF. Al originarse esta unión, ocurre un alargamiento de las microvellosidades. La otra adhesina es AIDA-I, que pertenece a la familia de autotransportadores de membrana

externa de 100 kDa. Una vez Afa/Dr adhesina se une con los receptores de la membrana del enterocito hDAF, se produce la activación de la quinasa Src, la cual es necesaria para la movilización y organización de hDAF alrededor de las bacterias. La lesión de la membrana celular inducida por la bacteria ocasiona elongación, daño en las microvellosidades y reordenamiento de las proteínas en el citoesqueleto, lo que genera aumento de la permeabilidad del enterocito. Luego de la asociación Afa/Dr, se activa la MAP quinasa (MAP: *Mitogen-Activated Protein*) e induce la producción de IL-8 con la consecuente migración transepitelial de PMN. Esto favorece el daño de los enterocitos por la síntesis de citoquinas pro-inflamatorias como factor de necrosis tumoral (FNT- α) e IL-1 β ⁽¹⁰⁹⁾.

Sus factores de virulencia asociados al fenotipo de adherencia difusa incluyen las fimbrias Afa/Dr, AIDA, y Daa (Difuse adhesin) codificadas en operones con su mismo nombre los cuales se han detectado también en cepas de *E. coli* no patógenas. DAEC se identifican por su patrón de adherencia difusa (DA, por sus siglas en inglés) sobre líneas celulares HEP-2/HeLa⁽¹⁶¹⁾.

Estas cepas se pueden aislar tanto de personas sanas como con diarrea, siendo más importante en niños de cuatro a cinco años. Los principales síntomas que se presentan incluyen: diarrea acuosa sin sangre y sin leucocitos⁽¹⁷⁾. Además pueden ser el responsable de infecciones del tracto urinario en adultos. Se ha sugerido que las cepas DAEC pueden ser patógenos importantes causantes de diarrea en países desarrollados, sin embargo, la prevalencia de DAEC no se conoce⁽⁸²⁾.

El método “estándar de oro” para la detección de cepas DAEC se basa en el fenotipo de la adherencia difusa en cultivo de células HEP-2, o por la detección del gen *daa* mediante PCR⁽¹⁶¹⁾.

2.3 Prevención y control de las infecciones entéricas

El control de las infecciones por cualquier cepa de *E. coli* de forma general exige mejores condiciones sanitarias, ambientales, en la preparación adecuada de alimentos y en la mejoría de la higiene personal. Las medidas son análogas cuando se trata del control de brotes intrahospitalarios^(76, 162). Adicionalmente se están desarrollando trabajos en ese sentido para disponer de productos inmunizantes a base de

enterotoxinas y de factores adhesivos que poseen cepas de los diferentes grupos de *E. coli* asociadas con procesos diarreicos, los cuales podrán contribuir a disminuir la morbilidad causada por estas bacterias, en particular en la población infantil y en los individuos que viajan de una zona de bajo riesgo de diarrea a una de alta prevalencia^(118, 162).

2.4 Susceptibilidad antimicrobiana

El tratamiento de las infecciones comunes se basa en apreciaciones subjetivas y el uso de antimicrobianos es respaldado con el diagnóstico, la epidemiología, la etiología más probable y el perfil de sensibilidad antimicrobiana del patógeno implicado, lo que varía ampliamente según sean las regiones geográficas, incluso entre hospitales de la misma ciudad dentro de un país determinado. Esto unido a la falta de estudios ensombrece las perspectivas de solución de las infecciones adquiridas en la comunidad y en el ambiente hospitalario y aumenta la resistencia bacteriana. La OMS considera la resistencia antimicrobiana como un problema prioritario y propone actualizaciones constantes de acuerdo con lo reportado por los sistemas de vigilancia epidemiológica⁽¹⁶³⁾.

Como no se puede predecir la susceptibilidad de las bacterias a los antimicrobianos, en la actualidad se dispone de varios métodos para determinar el patrón fenotípico de susceptibilidad de una bacteria a los antibióticos. Constituyendo, no sólo una guía valiosa para la terapia con antibióticos, sino también una herramienta epidemiológica importante para el control de microorganismos resistentes. La OMS recomienda que, para las pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos, se deben aplicar las técnicas de difusión en disco, el análisis semi-automático o manual de la concentración inhibitoria mínima o la difusión de gradiente recomendadas por el CLSI o el EUCAST (Comité Europeo de pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos)⁽¹⁶⁴⁾. La técnica más común empleada por la mayoría de los laboratorios de diagnóstico es la prueba de difusión en agar simple (método de Kirby-Bauer), en el que el microorganismo bajo investigación es inoculado en una placa de agar y se expone a un gradiente de difusión del antibiótico impregnado en un disco de papel de filtro colocado en la superficie del agar.

Según OMS los datos de sensibilidad se clasificarán únicamente en “sensible”, “intermedio” y “resistente”⁽¹⁶⁵⁾.

La información generada a partir de las pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos es fundamental para la vigilancia de los perfiles de sensibilidad y la detección de nuevos patrones de resistencia por el laboratorio, lo cual le permitirá optimizar la terapia antimicrobiana al permitirle al clínico seleccionar la droga con mayor sensibilidad para el paciente, y con las características farmacocinéticas más apropiadas según la naturaleza y gravedad de la infección y de esta forma facilitará la toma de medidas necesarias para la contención de la resistencia⁽¹⁶⁶⁾.

Desde un punto de vista clínico, se considera que una cepa bacteriana:

- ❖ **Es sensible (S)** a un antibiótico, cuando la infección debida al microorganismo aislado puede ser tratada apropiadamente con el antibiótico a la dosis recomendada, de acuerdo a la gravedad de la infección. Sin embargo, para la prescripción definitiva del medicamento, el médico tendrá en cuenta algunos factores tales como biodisponibilidad del antibiótico en el tejido o sistema afectado, presentación del medicamento, edad del paciente, condiciones patológicas subyacentes o fisiológicas, entre otras.
- ❖ **Son resistentes (R)** cuando la bacteria aislada no es inhibida por el antibiótico a las concentraciones terapéuticas ideales o la bacteria ha generado mecanismos de resistencia que evaden la actividad del antibiótico, por lo tanto, la eficacia clínica de éste no es confiable. Es recomendable que ante el aislamiento de un microorganismo multirresistente clínicamente significativo se ensayen otras pruebas de susceptibilidad adicionales por ejemplo: Concentración Mínima Inhibitoria (CIM).
- ❖ Cuando las cepas responsables de un cuadro infeccioso son **moderadamente sensibles (I- intermedio)**, indica que el antibiótico tiene aplicabilidad clínica en sitios corporales donde el antibiótico alcance concentraciones terapéuticas adecuadas, como es el caso de β -lactámicos y quinolonas en el tracto urinario. En otros casos, puede utilizarse el medicamento con seguridad en dosis

elevadas que no alcancen los niveles de toxicidad pero que garanticen actividad terapéutica.

2.4.1 Antimicrobianos

Son medicamentos que combaten las infecciones causadas por las bacterias, compuestos de bajo peso molecular, los cuales son producidos naturalmente a partir del cultivo de varias especies de microorganismos (actinomices, bacterias y hongos), los mismos suprimen el crecimiento de otros microorganismos y eventualmente pueden destruirlos. El uso común, ha extendido el término de antimicrobianos a agentes antibacterianos sintéticos como sulfonamidas y quinolonas. Los antimicrobianos pueden conferir una ventaja selectiva a quienes los producen en un ecosistema específico. Los antimicrobianos muestran diferencias notables en sus propiedades físicas, químicas, y farmacológicas, así como en sus espectros antibacterianos y en sus mecanismos de acción⁽¹⁶⁷⁾.

2.4.2 Resistencia antimicrobiana

2.4.2.1 Mecanismos de resistencia a los antimicrobianos en bacterias gram negativas

Desde el punto de vista molecular y bioquímico existen mecanismos por medio de los cuales una bacteria puede hacerse resistente al efecto del antibiótico⁽¹⁶⁸⁾ a saber:

- Pérdida de porinas (que reduce el movimiento de la droga a través de la membrana celular): carbapenémicos (imipenem).
- Presencia de Betalactamasas en el espacio periplásmico (que degrada los betalactámicos): Betalactámicos e incluye algunos carbapenémicos.
- Expresión incrementada de bombas de expulsión transmembrana (que expelen la droga de la bacteria antes de que desarrolle su efecto): Betalactámicos carbapenémicos, quinolonas, aminoglucósidos, tetraciclinas y cloranfenicol.
- Presencia de enzimas modificadores del antibiótico (que convierten al antibiótico incapaz de interactuar con su objetivo): aminoglucósidos, ciprofloxacino.
- Mutaciones del sitio diana (impide que el antibiótico actúe en su lugar de acción): quinolonas (DNA girasa y topoisomerasa IV).

- Mutaciones o modificaciones ribosomales (impide que el antibiótico se una a zonas inhibitoras de síntesis de proteínas): tetraciclinas, aminoglucósidos.
- Mecanismos metabólicos de bypass: trimetoprim (dihidrofolato-reductasa), sulfonamidas (dihidropteroato-sintasa).
- Mutación en el lipopolisacárido (convierte a las polimixinas incapaz de unirse a su órgano diana): Clase de las polimixinas.

Cabe resaltar que más de un mecanismo pueden ocurrir simultáneamente. Los mecanismos de resistencia dependen del tipo de bacteria que los desarrollen⁽¹⁶⁹⁾. Las definiciones de resistencia se clasifican según el número y clase de antibióticos afectados. La multirresistencia (MDR, Multiple Drug-Resistance) se define como la ausencia de sensibilidad a, por lo menos, a un fármaco en tres o más de las clases de antibióticos; la resistencia extrema (XDR, Extensively Drug-Resistant) se refiere a la ausencia de sensibilidad a, por lo menos, un agente en todas las clases de antimicrobianos, excepto en dos de ellas o menos, y bacteria la resistencia a todas las clases de antimicrobianos disponibles se define como pan drogo-resistente (PDR, Pan Drug-Resistant); tales bacterias incluyen *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Klebsiella pneumoniae*^(39, 170).

2.4.2.2 Resistencia antimicrobiana en *E. coli*

La resistencia antibiótica es un problema emergente a nivel mundial, presente en diversas bacterias, en especial en *E. coli*⁽¹⁷¹⁾. El tratamiento antimicrobiano de las infecciones diarreicas ocasionadas por los patotipos de *E. coli* ha cambiado en los últimos años, debido a que las bacterias se han seleccionado como resistentes a algunos antibióticos que en el pasado eran considerados de primera elección como ampicilina (APM), tetraciclina (T) y trimetoprim-sulfametoxazol (TMP-SMX)^(77, 164, 172). Se ha reportado que esta bacteria tiene altos porcentajes de resistencia hacia la ampicilina, cloranfenicol, ácido nalidíxico y ciprofloxacino debido entre otros factores al uso excesivo de los mismos, tanto en cepas de origen humano y animal como las aisladas del ambiente (agua y suelo), lo que supone grandes complicaciones en el tratamiento antibiótico cuando este es requerido⁽³⁶⁾

Este aumento de la resistencia a los antimicrobianos se debe principalmente a mecanismos moleculares, tales como mutaciones puntuales a nivel cromosómico o transferencia horizontal de genes a través de elementos móviles en este grupo de enteropatógenos⁽¹⁷³⁾.

Existen diversos mecanismos de resistencia de *E. coli*, a través de la acción de enzimas como las betalactamasas, mutaciones en el ADN, inactivación enzimática y bombas de eflujo.

CAPÍTULO III. Materiales y Métodos

3.1 Tipo de estudio

Se realizó un estudio observacional de corte transversal en el período de enero a diciembre del 2016, de todos los aislados con diagnóstico presuntivo de ECD, recibidos en el Laboratorio Nacional de Referencia de enfermedades Diarreicas Agudas del Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourí” (LNR/EDA/IPK)⁽⁴⁶⁾.

3.1.1 Universo

Estuvo conformado por todos (n=198) los aislados con diagnóstico presuntivo de ECD de pacientes pediátricos y adultos con procesos diarreicos agudos, procedentes de ocho Centro Provincial de Higiene Epidemiología y Microbiología (CPHEM) y del municipio especial Isla de la Juventud que tributan al LNR/EDA/IPK.

3.1.2 Muestra

Se estudiaron todos (n=178) los aislados viables y no contaminados, que fueron confirmados fenotípicamente como ECD.

3.2 TECNICAS Y PROCEDIMIENTOS DE LABORATORIO

Para la realización del presente trabajo se desarrollaron dos flujogramas de trabajo, para cumplimentar el objetivo#1 se desarrolló el flujograma de caracterización fenotípica y para darle salida al objetivo #2 se llevó a cabo el flujograma de identificación genotípica.

3.2.1 CARACTERIZACION FENOTIPICA DE *E. coli*

3.2.1.1 Identificación bioquímica de *E. coli* para la confirmación fenotípica de los aislados de ECD. (MacFadding, 2003)

Para la identificación de ECD se tuvieron en cuenta las pruebas bioquímicas propuesta por MacFadding, *et al.*, 2003. Los aislados en medio de conservación para

enterobacterias fueron sembrados en medio líquido, Caldo Cerebro-Corazón (CCC, BioCen, Cuba) e incubados durante 18-24 horas a 37°C⁽¹⁷⁴⁾. Posteriormente se inocularon en medios selectivos y diferenciales, agar MacConkey (AMC, Biolife, Italia). De estas placas se seleccionaron de 3 a 5 colonias rosadas, brillantes, de bordes lisos y convexas, típicas fermentadoras de lactosa, y colonias translúcidas que indica la no fermentación de la lactosa. Las colonias seleccionadas se inocularon por punción en medios diferenciales primarios, agar Hierro y dos azúcares de Kligler (AHK, BioCen, Cuba) y agar Hierro y Lisina (AHL, BioCen, Cuba), se incubaron durante 24 horas a 37°C para su posterior lectura, interpretación y registro de los resultados.

Una vez visualizada la imagen compatible con *E. coli* en AHK y el AHL según procedimientos propuesto por MacFadding *et al.*, 2003, se realizó la prueba de oxidasa utilizando tiras de Oxidase test strips (Biolife, Italia). Aquellos que resultaron ser oxidasa negativa se les realizó la identificación bioquímica por medio de una serie de pruebas o fermentos bioquímicos: utilización de citrato como única fuente de carbono (agar citrato de Simons) (BioCen, Cuba), hidrólisis de la urea (medio base de urea) (BioCen, Cuba), motilidad (medio motilidad) (MERCK, Alemania) y producción de indol (medio Indol) (BioCen, Cuba).

3.2.1.2 Marcadores fenotípicos empleados para el screening molecular de los aislados de ECD.

A todos los aislados objetos de estudio, se les realizaron a la par las pruebas bioquímicas descritas anteriormente y los marcadores fenotípicos que se describen a continuación. Ver anexo #1.

Fermentación de sorbitol y sorbosa

El serotipo 0157:H7 de STEC, presenta un carácter atípico con respecto a la especie *E. coli*, por no fermentar sorbitol y no producir la enzima β -D-glucuronidasa (MUG⁻). Estos marcadores fueron las bases para el pesquisaje de este serotipo emergente⁽¹⁷⁵⁻¹⁷⁷⁾.

Partiendo de cuñas de agar Cerebro Corazón con crecimiento de 18-24 h, se tomó una asada y se inoculó en tubos que contenían 3mL de caldo para Fermentación Entérica, formulado según manual Difco, a los que se le adicionó sorbosa (Oxoid, Inglaterra)

como sustrato a una concentración final de 1% e igualmente de sorbitol (Oxoid, Inglaterra), ambos fueron incubados a 37°C durante 18-24h. En el caso de la sorbosa, cuando no se observó positividad a las 24h, se prolongó la incubación hasta las 48h. Se consideró positiva la prueba cuando se observó cambio de color, de rosa pálido al rosa intenso debido a la fermentación de los sustratos y negativa cuando no ocurrió cambio⁽¹⁷⁸⁾.

Prueba de la enzima β glucuronidasa

La actividad de la enzima β -glucuronidasa se evidenció mediante el uso del medio fluorogénico⁽¹⁷⁹⁾. El medio Caldo EC (*E. coli*) con MUG (4 -metilumbeliferil- β -glucurónido) sustrato sobre el que actuó la enzima, transformándolo en 4-metilumbeliferona, éste compuesto emite fluorescencia cuando se ilumina con una lámpara de luz ultravioleta (UV, con longitud de onda de 366 nm)⁽¹⁸⁰⁾. La mayoría de las cepas de *E. coli* producen la enzima β -glucuronidasa, excepto el serotipo *E. coli* O157: H7. Por tanto se utilizó esta característica para diferenciar el serogrupo O157 del resto de *E. coli*⁽¹⁸¹⁾. Aquellos aislados que resultaron negativos a la fermentación de sorbitol y sorbosa durante 72 h de incubación fueron a los que se les realizó la prueba. Se utilizaron como control positivo la cepa *E. coli* 25922 ATCC y como control negativo *Klebsiella pneumoniae*, estas cepas son procedentes de la colección del Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas de Argentina para el diagnóstico de *E. coli*⁽¹⁷⁹⁾.

Para la prueba se inocularon los tubos con 5mL de Caldo EC con MUG y se incubaron a 37°C durante 24h, tiempo al que se realizó la lectura de la prueba. Se utilizó una lámpara de luz UV, los resultados se registraron en el libro de registro del LNR/EDA⁽¹⁸¹⁾.

Luego estos aislados fueron subcultivados en cuñas de agar Cerebro Corazón para la realizar la prueba de susceptibilidad y además fueron conservadas a -20°C en viales Eppendorf de 1.5mL, con medio caldo Triptona Soya (CTS) y glicerol a una concentración final de 15%.

3.2.2 SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA

3.2.2.1 Pruebas de susceptibilidad de ECD

Para dar salida al primer objetivo se analizaron los diferentes fenotipos de susceptibilidad de todos los aislamientos de ECD (n=178) mediante el método de difusión en agar (antibiograma) propuesto por Kirby-Bauer *et al.*⁽¹⁸²⁾ Se trabajó acorde a la marcha técnica para la susceptibilidad implementada en el LNR- EDA-IPK y teniendo en cuenta las recomendaciones del Comité Internacional de Normas para Laboratorio Clínico del año 2016 (CLSI, por sus siglas en inglés “Clinical and Laboratory Standards Institute”)⁽¹⁸³⁾.

Para la validez de los resultados se utilizó la cepa control *E. coli* ATCC 25922, garantizando que los parámetros estén dentro de los rangos establecidos (verificar la carga de los discos de antibióticos).

El medio que se utilizó para la obtención de colonias aisladas y la posterior realización del estudio de antibiograma fue el agar Mueller-Hinton (Biolife, Italia). Se evaluaron 11 antimicrobianos, drogas recomendadas por el CLSI y otras que son utilizadas frecuentemente en el tratamiento empírico de infecciones por ECD en las instituciones de asistencia en nuestro país.

Los discos de antibióticos evaluados provienen de la casa comercial CPM_{sas} SCIENTIFICA, Italia. La familia a la que pertenece cada antibiótico, las concentraciones o potencia en el disco y sus respectivos puntos de corte para definir las categorías de: Sensible (S), Intermedio (I) y Resistente (R) se enlistaron en la tabla referida en los anexos. Ver anexo #2.

Los antibióticos evaluados fueron: ampicilina (AMP, 10 µg), ceftriaxona (CRO, 30 µg), cefotaxima (CTX, 30 µg), gentamicina (GEN, 10 µg), amikacina (AMK, 30 µg), ciprofloxacino (CIP, 5 µg), ácido nalidíxico (NA, 30 µg), tetraciclina (TE, 30 µg), trimetoprim-sulfametoxazol (SXT, 25 µg), cloranfenicol (C, 30 µg) y nitrofurantoína (F, 300 µg).

Para realizar la susceptibilidad antimicrobiana, se partió del crecimiento en las cuñas de agar Cerebro Corazón, de este se transfirió una asada a tubos con caldo de Muller-Hinton, se incubaron en aerobiosis a 37°C durante 24h, luego se transfirió una asada a placas de Muller-Hinton (Biolife, Italia) con el objetivo de obtener colonias aisladas, estas placas se incubaron a 37°C de 18 a 24h. El inóculo se preparó obteniendo una suspensión con 3 a 4 colonias en tubos con 3mL de caldo Mueller-Hinton, hasta obtener una turbidez correspondiente al testigo 5 de la escala de McFarland (BaCl₂ 0,5). Las placas de agar Mueller-Hinton, se inocularon estriando la superficie del medio con un hisopo embebido en el inóculo, en tres direcciones, para garantizar una siembra uniforme y obtener un crecimiento confluyente, dejar secar la superficie de la placa durante 15 min. Luego con pinza estéril se depositaron de manera aséptica los discos seleccionados, presionándolos suavemente sobre la superficie del agar. Posteriormente se incubaron a 37°C en condiciones de aerobiosis de 16-18 horas. La lectura se realizó midiendo con Pie de Rey los halos de inhibición para cada antibiótico. Los resultados quedaron recogidos en los libros de registro del laboratorio.

La interpretación de los resultados para otorgar las diferentes categorías de susceptibilidad (Sensible, Intermedio o Resistente), se realizó teniendo en cuenta los valores de los puntos de corte establecidos por las normas CLSI de 2016 para cada antimicrobiano evaluado.

3.2.2.2 Definición de los patrones de multirresistencia

Los patrones de multirresistencia para todos los aislados de ECD que mostraron fenotipos de multirresistentes, se definieron según el siguiente criterio:

Multirresistencia antimicrobiana: se consideraron multirresistentes aquellos patotipos de ECD que presentaron resistencia a tres o más antimicrobianos de diferentes familias⁽¹⁸⁴⁻¹⁸⁵⁾.

3.2.3 CARACTERIZACIÓN GENOTÍPICA: MÉTODO MOLECULAR (PCR)

Para cumplimentar el objetivo #2 del estudio se siguió el flujograma de trabajo para la caracterización genotípica de los aislados de *E. coli* verificados en la etapa anterior, mediante la PCR; partimos de las cepas conservadas en ATS-glicerol al 15%.

Se empleó la técnica de PCR múltiple (mPCR, por sus siglas en inglés) a punto final, según protocolo desarrollado por Gómez-Duarte, *et al.*, 2009 con cebadores diseñados específicamente para amplificar los siguientes genes de virulencia (*eae*, *bfp*, *AggR*, *aspU*, *VT*, *LT*, *ST*, *ipaH*, *virF* y *daaE*) de los seis patotipos objeto de estudio⁽¹⁸⁶⁾. Ver anexo #3

3.2.3.1 Extracción del ADN bacteriano por método térmico

A partir de los cultivos puros de las células bacterianas de ECD conservados en caldo Triptona soya-glicerol, se les realizó procedimiento estándar, de extracción por lisis a través del calor, según protocolo descrito por Bertín *et al.*, 2001⁽¹⁸⁷⁾, se pasaron a placas de agar Mueller-Hinton (BioCen, Cuba) y se incubaron para obtener colonias aisladas, luego se tomaron de 3 a 5 colonias con igual morfología, se suspendieron en vial Eppendorf de 1,5mL con 500µL de agua destilada calidad molecular estéril y se trataron térmicamente por ebullición a 100°C durante 15 min. Luego se centrifugaron a 14000 rpm por 10 min y se tomaron 200µL del sobrenadante que se usó como templado en la mezcla de reacción de las mPCR, luego se conservó este producto en un vial estéril Eppendorf de 1,5mL a -20°C hasta su utilización⁽¹⁸⁸⁻¹⁸⁹⁾.

3.2.3.2 Detección de genes de virulencia específicos por medio de mPCR

Los ensayos de mPCR se realizaron en un termociclador Rotor-Gene Q (QIAGEN, Alemania). Para esta técnica se utilizaron ADN de las cepas de referencia internacional como controles positivos, procedentes de la colección del Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas “Dr. Carlos G. Malbrán”, Centro de Referencia Regional de Argentina para el diagnóstico de *E. coli*. Como control negativo se utilizó la cepa de

E. coli DH5 α , que no posee ninguno de los factores de virulencia en estudio, mientras que la mezcla sin templado se utilizó como control de reactivos para evitar falsos positivos, para la validación de los resultados. (Ver tabla 2.1)

Tabla 2.1. Cepas de referencia, controles positivos y control negativo de *E. coli* que fueron utilizadas en el estudio.

Cepas	Factores de virulencia	Patotipos
<i>E. coli</i> (10 407)	<i>LT/ST</i> (+)	ETEC
<i>E. coli</i> (E-23 48/69 ,	<i>eae</i> (+)	EPEC(O127:H6)
<i>E. coli</i> (17-2)	<i>CVD432; aspU</i>	EAEC
<i>E. coli</i> (EDL 933)	<i>stx 1 y 2, eae</i> (+)	EHEC(O157:H7)
<i>E. coli</i> (12-2)	<i>ipaH</i>	EIEC
<i>E. coli</i> * DH5 α	<i>sin factores</i> (-)	Control (-)

* Esta cepa se utilizó como control negativo en el mPCR.

Siguiendo el protocolo desarrollado por Gómez-Duarte, con el mismo se amplificaron 11 genes diana, los que definen seis patotipos de ECD, (EPEC, ETEC, EHEC, EAEC, EIEC y DAEC); por medio de dos mPCR: mPCR-1(EPEC, EHEC y EAEC) y mPCR-2 (ETEC, EIEC y DAEC). Ver anexo #3.

Con la aplicación de los mPCR se detectaron los siguientes marcadores de virulencia. Para mPCR-1: gen estructural *bfp*, este gen codifica para una fimbria formadora de penachos; gen estructural *eae*, codificado en la región LEE (del inglés Locus of Enterocyte Effacement) del cromosoma, que codifica una proteína, intimina de EPEC, este gen también se encuentra presente en EHEC; gen *VT* (toxina Shiga, de EHEC codificada por bacteriófagos lisogénicos) y para EAEC los genes *aspU* y *AggR*, este último codifica para un regulador global de los genes de virulencia en este patotipo. Con la mPCR-2 se detectan los siguientes genes: gen *LT* y/o *ST* (toxina termolábil, *LT* y toxina termoestable, *ST* por sus siglas en inglés) de ETEC; los genes *ipaH* (antígeno de invasión) y *virF* (gen regulador), ambos pertenecientes a EIEC y para el patotipo de DAEC el gen *daaE*, que codifica para una fimbria de adherencia difusa. (Ver Tablas 2.2 y 2.3)

Tabla 2.2. Datos de los cebadores para definir patotipos de EPEC, EHEC y EAEC.

mPCR-1				
Gen blanco	Localización	Talla del fragmento amplificado	Secuencia nucleotídica (5'-3')	Patotipos
<i>eae</i>	Cromosoma	917	5'CTGAACGGCGATTACGCGAA-3'	EPEC, EHEC
<i>VT</i>	Cromosoma	518	5'GAGCGAAATAATTTATATGTG-3'	EHEC
<i>bfpA</i>	Plásmido	326	5'AATGGTGCTTGCGCTTGCTGC-3'	EPEC
<i>AggR</i>	Plásmido	254	5'GTATACACAAAAGAAGGAAGC-3'	EAEC
<i>aspU</i>	Cromosoma	282	5'GCCTTTGCGGGTGGTAGCGG-3'	

*Fuente: Gómez- Duarte., 2009

Tabla 2.3. Datos de los cebadores para definir patotipos de ETEC, EIEC y DAEC.

mPCR-2				
Gen blanco	Localización	Talla del fragmento amplificado (pb)	Secuencia nucleotídica (5'-3')	Patotipos
<i>Lt</i>	Plásmido	218	5'GCACACGGAGCTCCTCAGTC-3'	ETEC
<i>St</i>	Plásmido	147	5'-GCTAAACCAGTAGAG© TCTTCAAAA-3'	
<i>daaE</i>	Plásmido	542	5'GAACGTTGGTTAATGTGGGGTAA-3'	DAEC
<i>virF</i>	Cromosoma	618	5'AGCTCAGGCAATGAACTTTGAC-3'	EIEC
<i>IpaH</i>	Plásmido	933	5'CTCGGCACGTTTTAATAGTCTGG-3'	

Fuente: Gómez- Duarte., 2009

3.2.3.3 Mezcla de reacción

Para la mezcla de reacción de mPCR fue utilizada la Hot Start Taq Master Mix Plus (QIAGEN, Alemania)⁽²⁸⁾ conteniendo 2.0µM de MgCL₂ como cofactor enzimático y contribuye a la estabilización de los fragmentos de ADN; 0,2µM concentración final de cada uno de los dioxinucleósidos trifosfato (dNTP, dCTP, dGTP, y dTTP), 2U de Hot Start Taq ADN polimerasa y la concentración final para cada primers individual, presente en la mezcla de primers fue de 0.2 µmol/Ly por último se adicionó 2 µL de ADN molde (se incluyeron los controles positivos y negativos), el agua tridestilada se utilizará para llevar la master mix a volumen, el cual será de 25µL en los dos mPCR de acuerdo al protocolo descrito por el fabricante (QIAGEN, Alemania)⁽²⁸⁾. A la mezcla de reacción se le adicionó el colorante Coral Load para visualizar la corrida electroforética. Esta mezcla se utilizó tanto para mPCR-1 como para la mPCR-2.

El programa de mPCR utilizado para la amplificación fue el mismo para ambos mPCR. (Ver Tabla 2.4).

Tabla 2.4. Programa de amplificación aplicado para definir patotipos de ECD en el LNR/EDA/IPK en el periodo enero a diciembre 2016.

Paso (Nº)	Etapas	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Ciclos
1	Desnaturalización	95	5	30
2	Desnaturalización	95	1	
3	Anillamiento	55	1	
4	Extensión	72	1	
5	Extensión	72	5	
6	Pausa	4		

Fuente: Gómez- Duarte., 2009

3.2.3.4 Visualización del producto amplificado

El ADN amplificado de los diferentes genotipos (productos de las mPCR) de *E. coli* fueron revelado por electroforesis en gel de agarosa al 2% con solución amortiguadora

de Tris-borato-EDTA (TBE) y teñida con Bromuro de Etidio (concentración final de 0,5 mg/L)⁽¹⁹⁰⁾ para visualizar las bandas de ADN. Para la corrida de los productos de PCR se usó la cámara electroforética MAX FILL modelo SCHU20 (Inglaterra) y se utilizó un marcador de tamaño molecular en cada gel, Gel Pilot® 100pb Plus ladder (QIAGEN, Alemania). La fuente de corriente utilizada fue Consort EV245, (Bélgica) la que se ajustó a 100 Volt, 60 mA y con 60 min de duración⁽¹⁸¹⁾. Los geles fueron fotografiados bajo luz ultravioleta, utilizando el sistema de fotodocumentación de geles^(28, 191) modelo UVIsave D-55/20M (UVTEC, Cambridge, Inglaterra).

El gel de agarosa con Bromuro de Etidio se manipuló con precaución y se desechó siguiendo las normas para la eliminación de residuos tóxicos, implementadas en el LNR/IPK.

3.3 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

La información registrada en los formatos de extracción de datos se consolidó en una base de datos en Excel®. Se realizó un análisis descriptivo mediante el cual se calcularon las frecuencias absolutas y relativas (porcentajes) de los aislamientos de *E. coli* y los fenotipos de resistencia. Además se compararon las proporciones de los porcentajes de multirresistencia de los patotipos identificados con el porcentaje de fenotipo de multirresistencia de los aislamientos no identificados (NI) con un nivel de confianza de 95%, mediante los estadísticos para variables cualitativas: prueba de ji cuadrado (X^2) de comparación de proporciones en muestras independientes y la prueba exacta de Fisher

3.4 ASPECTOS ÉTICOS

El estudio fue revisado y aprobado por el Comité de Ética del IPK. Código: (CEI-IPK 81-17).

CAPÍTULO IV. Resultados y Discusión

4.1 Aislamiento clínico

ECD constituye un riesgo potencial para la salud de niños menores de 5 años y adultos inmunodeprimidos sobre todo en países en vía de desarrollo, estos causan cuadros diarreicos agudos y persistentes que pueden poner en riesgo la vida del paciente. En el presente estudio se identificaron y definieron los patotipos de ECD procedentes ocho CPHEM y del municipio especial Isla de la Juventud.

De 198 aislamientos recibidos en el LNR/EDA/IPK con diagnóstico presuntivo de ECD se determinaron 178 aislamientos como útiles para el estudio (89,89%) y 20 como no útiles (11,11%), quedando excluidas del estudio: 4 (2,02%) aislados que resultaron identificadas como otras enterobacterias (*Enterobacter* spp. y *Citrobacter* spp.) y 16 (8,08%) aislamientos que resultaron no viables. Los aislamientos identificados mediante métodos y marcadores fenotípicos resultaron pertenecer al género y especie *E. coli*, conformando la muestra del estudio. Estos resultados se muestran en el Gráfico 1.

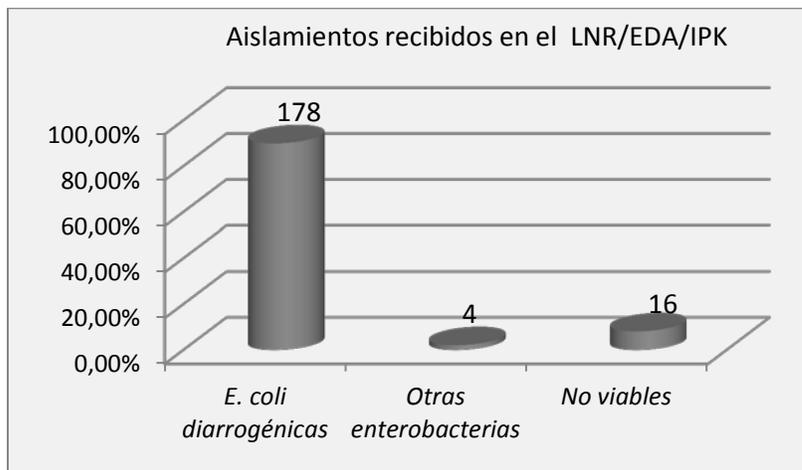


Gráfico 1. Distribución de los aislamientos de ECD que resultaron útiles y no útiles en el presente estudio realizado en el LNR/EDA/IPK en el año 2016.

Un elevado porcentaje de aislamientos fue confirmado fenotípicamente 89,89%, la identificación de ECD contribuye positivamente a la vigilancia que se lleva a cabo en el LNR-EDA. El Programa Nacional de Enfermedades de Transmisión Digestiva (ETD) conjuntamente con el LNR-EDA-IPK trabaja en lograr la calidad de la identificación de enteropatógenos bacterianos, la sincronización en el envío de manera sistemática y como describen las buenas prácticas de los aislamientos de ECD para su confirmación y estudio de caracterización en el LNR. A través de las visitas a los laboratorios de la Red del país, para confirmar y auditar lo relacionado con el trabajo y los registros de envíos de aislamientos de brotes y de casos esporádicos hacia el LNR-IPK, por otra parte la realización de Talleres Nacionales de capacitación dirigidos al personal de laboratorio también ha contribuido al mejoramiento de los resultados en el trabajo de referencia y vigilancia de las ECD. El conocimiento actualizado acerca de ECD como agente causal de diarreas agudas en el país es de gran importancia para el Sistema Nacional de Salud (SNS) porque contribuye acercarnos a la realidad epidemiológica de estos enteropatógenos. Además permite delinear nuevas estrategias de prevención y control, sobre todo en países en desarrollo donde las condiciones higiénico sanitarias son deficientes⁽³⁶⁾.

Respecto a los aislamientos no viables se presume que perdieron la capacidad de reproducirse, condicionado tal vez por la exposición a diversos factores externos, como pudieran ser: la demora en el envío desde las provincias, la calidad de los medios de transporte, la hermeticidad de los tubos contenedores en la que se transportan los aislamientos, otras condiciones de transportación que pueden favorecer la desecación por exposición a un ambiente no adecuado⁽¹⁹²⁾.

La confirmación de otras enterobacterias diferentes a *E. coli* realizada por el LNR/EDA no coincidió con el diagnóstico presuntivo de los CPHEM. En esto pudieron intervenir varios aspectos, los que van desde los recursos disponibles por los Centros Provinciales de Higiene para realizar el diagnóstico correctamente (calidad de los medios de cultivo, recursos para realizar las pruebas bioquímicas y determinación de género y especie), hasta el grado de experiencia del personal encargado de realizarlo en los laboratorios en diferentes niveles de la Red. Consideramos que es saludable

continuar intensificando la comunicación entre el LNR-EDA con los CPHEM del país y de éstos con el resto de los laboratorios de la Red Nacional de Salud con el objetivo de perfeccionar la calidad del diagnóstico de estas enterobacterias patógenas⁽¹⁹³⁾. Todo lo anteriormente expuesto impacta de forma negativa desde el punto de vista científico y económico al SNS por las pérdidas que genera la conservación y el transporte interprovincial de aislamientos que finalmente no puedan ser confirmados en el LNR/EDA/IPK.

En el presente estudio el porcentaje de aislamientos útiles (89,89%) fue mayor en comparación con los resultados reportados (80%) en un estudio realizado en Cuba por Hernández, (2014) en el LNR/EDA/IPK; mientras que el porcentaje de aislamientos no útiles en la actual investigación fue menor (11,11%), respecto al resultado reportado (20%) en el anterior estudio mencionado. Cabe señalar que ambos estudio fueron realizados en igual periodo de tiempo (un año)⁽¹⁹⁴⁾.

Por otro lado la determinación de aislamientos no útiles no es un problema observado solo en Cuba, en el resto del mundo también se reporta. Huong, *et al.* en un estudio de Caso y Control retrospectivo con cepas conservadas en el laboratorio procedentes de un estudio anterior realizado en Vietnam en 2008, registró elevados porcentajes de aislamientos no útiles tanto para los aislamientos procedentes de los casos con diarrea como para los aislamientos obtenidos en el grupo control (15,3% y 57,8% respectivamente)⁽¹⁹⁵⁾.

4.2 Resultados de las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana de los aislamientos confirmados como *E. coli* diarrogénicas.

La susceptibilidad antimicrobiana es considerada como la primera prueba de aproximación a la predicción de la eficacia clínica de los antibióticos. Según la OMS constituye un método “*in vitro*” de supervisión de la resistencia, el método fenotípico empleado en la presente investigación fue el método de difusión en agar propuesto por Kirby-Bauer en 1966. La susceptibilidad antimicrobiana constituye, además, una

herramienta útil para la conducta antimicrobiana a seguir y en el caso específico donde el clínico perciba fallo terapéutico, desarrollar nuevas estrategias de tratamiento.

El tratamiento de ECD como causa de diarrea ha sufrido cambios con el cursar del tiempo, debido a la aparición de cepas resistentes y multirresistentes que han ido agotando la disponibilidad de antibióticos eficaces; antibióticos como ampicilina, sulfametoxazol/trimetoprim, tetraciclina y ácido nalidíxico que en décadas atrás formaron parte de la primera línea de elección en el tratamiento en la disolución de estas infecciones, ya que eran antibiótico que se administraban por vía oral, eran bien tolerados y poco costosa su producción, se ha limitado su uso en la actualidad, en primer lugar por los elevados porcentajes de resistencia mostrado, presentando resistencia universal, y en segundo lugar por el advenimiento de nuevos antimicrobianos, más eficaces y con espectro de acción más amplio⁽³⁶⁾. De esta forma se empezaron a utilizar en el tratamiento de estas infecciones ciprofloxacino, una quinolona fluorada de segunda generación, pero el reporte de cepas resistentes a esta droga ha dado paso al uso de cefalosporinas de tercera generación como cefotaxima y ceftriaxona. En nuestros días dado a que el mundo se encuentra hiperconectado, la diseminación de los genes de resistencia que codifican para mecanismos de resistencia y cuya expresión son los diferentes fenotipos de resistencia y multirresistencia que muestran las bacterias, este fenómeno toma dimensiones mundiales y se ha convertido en una crisis global. Por supuesto ECD no escapa a este fenómeno, reportándose cepas resistentes a cefalosporinas de tercera y cuarta generación y a otras familias de antimicrobianos que constituyen la reserva para el tratamiento de cepas extremadamente resistentes (XDR) como carbapenémicos⁽³⁹⁾ y más recientemente en el 2014 la aparición de cepas resistente a la colistina⁽¹⁹⁶⁻¹⁹⁷⁾.

Los resultados de la prueba de susceptibilidad del actual estudio se muestran en el gráfico 2. En el actual estudio se encontraron elevados porcentajes de resistencia para ampicilina 100%, tetraciclina 33,14%, cefotaxima 25,84%, ácido nalidíxico 25,28% y sulfametoxazol/trimetoprim 24,71%.

Según criterios de expertos internacionales en el tema de resistencia antimicrobiana, aquellos antimicrobianos que muestren porcentajes de resistencia por encima del 20%, no deben ser recomendados para el tratamiento empírico de infecciones entéricas causadas por ECD, por tanto teniendo en cuenta los altos porcentajes mostrados por ampicilina, tetraciclina, ácido nalidíxico y sulfametoxazol/trimetoprim no se recomienda su uso en la terapia antimicrobiana de cuadros diarreicos agudos causados por ECD, en los casos que por decisión clínica se decida imponer tratamiento antimicrobiano. Consideramos que estos datos pueden ser útiles a los clínicos a modo de actualización terapéutica, sobre todo ante la problemática de imponer una terapia antimicrobiana empírica a un paciente que la requiera⁽¹⁹⁸⁾.

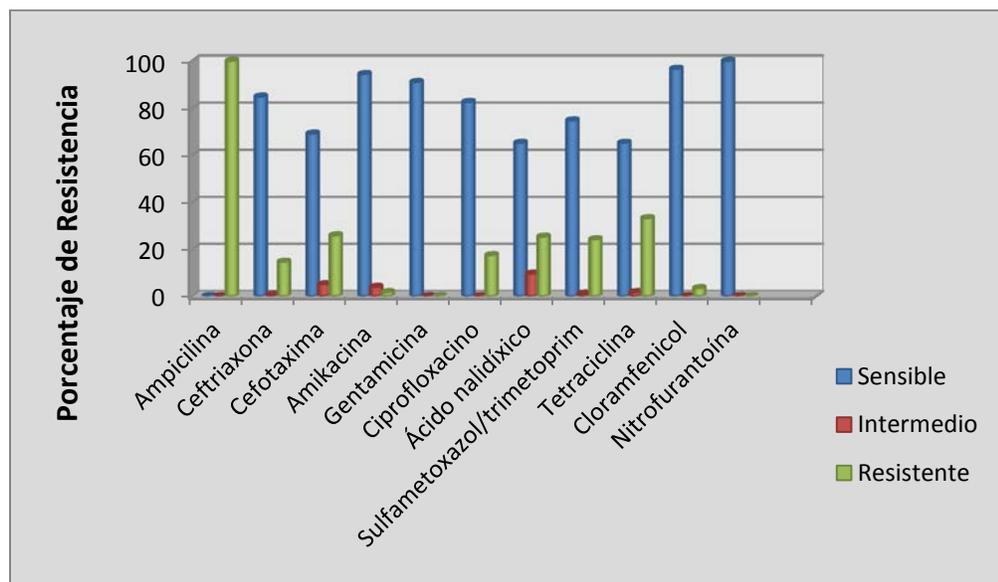


Gráfico. 2. Susceptibilidad antimicrobiana de aislamientos de ECD frente a los antimicrobianos evaluados en el presente estudio realizado en el LNR/EDA/IPK durante 2016.

Los elevados porcentajes de resistencia observado en el estudio pudiesen deberse al uso excesivo de estos antibióticos en el tratamiento de las enfermedades infecciosas, por la presión selectiva que han ejercido estos antimicrobianos⁽¹⁷²⁾. En Cuba, país con pocos recursos, el uso de estos antibióticos, al ser menos costosos garantizaban la disponibilidad de los mismos y la accesibilidad a la población, así ampicilina, sulfametoxazol/trimetoprim, ácido nalidíxico, drogas que se administran por vía oral, formaron parte de las drogas de primera línea de elección para el tratamiento de

enfermedades infecciosas, no solo infecciones entéricas, sino también fueron utilizados en el tratamiento de infecciones urinarias, respiratorias y de tejidos blandos (piel).

En el caso particular de la tetraciclina, a pesar de no ser utilizada para el tratamiento de infecciones en niños menores de doce años, por provocar el síndrome de “diente manchado”, constituyó una alternativa en el tratamiento de las infecciones entéricas en pacientes alérgicos a las penicilinas (ampicilina) y a las sulfas. Este antimicrobiano también se utiliza en el tratamiento de las enfermedades de transmisión sexual causadas por *Clamidia* spp. y *Micoplasma* spp., también se utiliza en el tratamiento de infecciones causada por *Leptospira* spp., además esta droga es utilizada en veterinaria, principalmente en el tratamiento de infecciones en aves.

En Cuba, a pesar de que existen regulaciones que limitan el expendio liberado de estos antibióticos en las farmacias y se encuentra implementada una política de uso racional y de los antimicrobianos tanto en el área clínica como en veterinaria factores como: la automedicación en la población y la alta prescripción por complacencia, donde priman las relaciones interpersonales han contribuido al aumento de la resistencia en estos antibióticos. El problema se recrudece en otras partes del mundo donde no existen regulaciones para la venta, ni una política centralizada que norme el uso adecuado y racional de los antibióticos, su utilización sin control en la industria de alimentos de crecimiento para animales, que en determinados países constituye un renglón de alto ingreso económico, utilizan toneladas de antibióticos como suplementos en piensos de engorde para animales y se emplean como profilácticos en acuicultura y la agricultura⁽¹⁹⁹⁾. Constituyendo estos alimentos, así como sus carnes y derivados, reservorios de bacterias que alberguen genes que codifican para mecanismos de resistencia, que pueden propiciar la expresión de los diferentes fenotipos de resistencia. Mediante la transferencia horizontal o lateral de genes por medio de elementos móviles (plásmidos, integrones y bacteriófagos) se pueden transferir a través de la conjugación fragmentos de ADN entre bacterias de la misma especie o de especies diferentes que potencian la diseminación de estos mecanismos de resistencia⁽²⁰⁰⁾.

Los elevados porcentajes de resistencia obtenidos en el actual estudio son similares a los resultados encontrados, en dos estudios precedentes de susceptibilidad antimicrobiana realizados anteriormente en Cuba por Rodríguez- Pérez, 2014⁽²⁰¹⁾ y Díaz-García, 2014 en los mismos se reportan porcentajes de resistencia superiores al 80% para ampicilina, 35% para tetraciclina, 30% para ácido nalidíxico⁽²⁰²⁾, resultando particularmente mayor el porcentaje de resistencia en estos trabajos para el sulfametoxazol/trimetoprim 40%.

La alta resistencia exhibida por ECD a diversos antimicrobianos como los citados anteriormente han sido reportado varios países en vía de desarrollo, en América Latina, en un estudio de susceptibilidad, frecuencia y patotipos de ECD en niños con y sin diarreas, realizada en Perú por Ochoa, *et al.*, 2011⁽⁹¹⁾, se reportaron elevados porcentajes de resistencia al ampicilina (85%), sulfametoxazol/trimetoprim (79%), tetraciclina (65%) y ácido nalidíxico (28%). En otro estudio, este en el continente asiático, específicamente en el sudeste de China, realizado por Wang, *et al.*, 2014, en un estudio de prevalencia y susceptibilidad antimicrobiana de ECD en niños menores de cinco años⁽²⁰³⁾, se reportaron elevados porcentaje de resistencia para ampicilina (81,8%), los porcentajes de resistencia encontrados en este trabajo son prácticamente el doble para tetraciclina (61,3%) y aproximadamente el triple de sulfametoxazol/trimetoprim (72,0%) comparados con los obtenidos en nuestra investigación y respecto a las dos investigaciones realizadas anteriormente en Cuba, como se conoce la resistencia antimicrobiana en el sudeste asiático es crítica, por la influencia de diversos factores.

Relacionado con la cefotaxima, en el reciente estudio encontramos elevados porcentaje de resistencia (25,84%), se trata de una cefalosporina de tercera generación que se utiliza en el tratamiento de infecciones respiratorias, urinarias y entéricas. El hecho de esta droga tener en el país, uso exclusivo en el ámbito hospitalario y ser una droga controlada y de reciente manejo en el área clínica, es de destacar el encontrar, un aumento del porcentaje de resistencia de manera significativa en tan breve tiempo⁽¹⁹⁸⁾. El porcentaje de resistencia a este antimicrobiano en el presente estudio es mayor al que reporta Hernández, 2014⁽¹⁹⁴⁾ (7,22%) en un estudio precedente de susceptibilidad,

lo que pudiera estar condicionado por la extensión del uso de este antibiótico en el área intrahospitalaria; mostrando clara tendencia al aumento de la resistencia a este antimicrobiano, por lo que se considera, alertar al Programa Nacional de Enfermedades de Transmisión Digestiva de estos resultados.

En un estudio realizado por Wang *et al.*, 2014 en China, donde se determinó la prevalencia y resistencia de ECD en niños menores de cinco años con gastroenteritis reportaron elevado porcentaje de resistencia a cefotaxima (72,9%). Similar resultado al anterior fue reportado por Paniagua-Contreras *et al.*, 2015, en un estudio de *E. coli* aisladas de pacientes con infección urinaria adquirida en la comunidad en México, al encontrar 72,7% de resistencia para la cefotaxima⁽²⁰⁴⁾.

Den Reijer, *et al.*, 2016 en un estudio realizado en Holanda determinó la presencia de 131 *E. coli* MDR entre pacientes hospitalizados y de la comunidad, reportó elevados porcentaje de resistencia para cefotaxima en ambos grupos de pacientes 74% y 64% respectivamente⁽²⁰⁵⁾.

En otro sentido, los antimicrobianos que en el actual estudio mostraron bajo perfil de resistencia y elevados porcentajes de sensibilidad antimicrobiana fueron: ciprofloxacino (82,54%), ceftriaxona (84,83%), gentamicina (91,01%), amikacina (94,38%), cloranfenicol (96,62%), y nitrofurantoína (100%) por lo que podrían considerarse alternativas válidas para el tratamiento empírico de infecciones causadas por ECD si se decide imponer tratamiento.

Los resultados de sensibilidad encontrados en este estudio son similares a los reportados por Defrancesco *et al.*, 2017, en un estudio donde se determinó la presencia de BLEE en ECD aisladas en niños que vivían en zona rural en Suráfrica, mostrando altos porcentajes de sensibilidad para ciprofloxacino, amikacina y gentamicina de 100% y en el caso de ceftriaxona 97% de sensibilidad⁽²⁰⁶⁾, estos resultados específicos de este estudio en particular, pueden ser debido a la escasa exposición de estos niños a estos antibióticos. Estas antimicrobianos se administran por vía parenteral y son más costosos, por ende, menos accesibles dadas las condiciones socioeconómicas en las que viven estas personas.

Similares resultados fueron también reportados por Chávez *et al.*, 2012, en el cual identificaron bacterias resistentes a los antibióticos en infecciones asociadas a la atención de la salud en un hospital de mediana complejidad en Colombia, encontrando 100% de sensibilidad para amikacina y para ceftriaxona⁽³⁸⁾.

Con respecto a la nitrofurantoína el elevado porcentaje de sensibilidad (100%) mostrado frente ECD llamó la atención en este estudio ya que no se trata de un antimicrobiano de reciente uso, similares resultados fueron los encontrados por Betrán *et al.*, 2015, en un estudio de evaluación de la resistencia de *E. coli* en infección urinaria adquirida en la comunidad en España, en el cual el porcentaje de sensibilidad para la nitrofurantoína (96,72%, 97,19% y 96,81%) se mantuvo estable en los tres años de estudio analizados (2011, 2012 y 2013 respectivamente), esta estabilidad en el porcentaje de sensibilidad pudo deberse a que este antimicrobiano se emplea muy poco por su potencial toxicidad pulmonar, a pesar de su probada efectividad en el tratamiento de las infecciones urinarias⁽¹⁹⁸⁾.

Teniendo en cuenta la presión selectiva que ejerce el elevado consumo de antibióticos en nuestro entorno, es necesario actualizar los datos relativos a los patrones de resistencia bacteriana, ya que éstos pueden variar entre distintas zonas e incluso en una misma área geográfica con el paso del tiempo. Finalmente, sería necesario tomar las medidas oportunas para el control de la resistencia bacteriana, implicando a todos los que hacen uso de los antibióticos, incluyendo sobre todo el sector veterinario, donde el uso racional y responsable de los mismos es desmedido. Además es importante mantener la supervisión de la resistencia de los antimicrobianos y continuar con el control del uso de los mismos mediante el uso racional y responsable de estas drogas bajo la supervisión de la política de uso óptimo de los antimicrobianos que se lleva a cabo en las instituciones de asistencia en el país.

4.3 Frecuencia y distribución de patotipos de ECD identificados por mPCR.

La PCR es una técnica que por su alta sensibilidad y especificidad permite distinguir los factores de virulencias en aislamientos de ECD y diferenciarlos de *E. coli* pertenecientes a la microbiota normal del intestino. Esta herramienta de gran importancia, posibilita

alcanzar un diagnóstico de certeza que permite conocer la realidad epidemiológica de las EDA. Las *E. coli* causantes de diarrea se cuentan entre los agentes etiológicos bacterianos más frecuentemente asociados a esta entidad, hecho que confirman los resultados de la presente investigación, en la cual de los 178 aislamientos con diagnóstico presuntivo de ECD, estudiados durante el periodo definido, 127 aislamientos (71,34 %) presentaron uno o más de los once genes de virulencia que lo clasifican como patotipos de ECD.

La frecuencia de los patotipos de ECD (71,34 %) encontrada en este estudio fue elevada con respecto a otros estudios realizados en países del continente como en Venezuela por Hannaoui *et al.*, 2010⁽²⁰⁷⁾ con un 19%, Ochoa *et al.*, 2011⁽⁹¹⁾ en Perú con un 35,1%, Canizalez *et al.*, 2016⁽¹⁵⁴⁾ en México con un 23% y Weiler *et al.*, 2017, en el Paraguay con un 13%⁽⁹⁵⁾. Este resultado puede deberse al rango etario que se analiza en cada estudio, en el presente estudio se analiza la población en general, mientras en el resto de los estudios anteriormente mencionados, las subpoblaciones estudiadas correspondieron a niños menores de cinco años. Se destaca la mayor presentación de ECD en niños de uno a tres años, que disminuye a partir de los nueve años, lo que coincide con los estudios de Canizalez *et al.*, 2016. Además, esta enfermedad es más frecuente durante los primeros dos años de vida, lo cual refleja un patrón que combina el declive de los niveles de anticuerpos maternos, la pérdida de inmunidad activa en el infante y la introducción de microorganismos por falta de higiene, los alimentos y el agua contaminada con bacterias fecales⁽⁴⁷⁾.

La distribución de patotipos encontrados con algún gen de virulencia, en este estudio fue (de n= 127) la siguiente: EPEC 92 (51,68%), seguida de EAEC 14 (7,86%), EHEC 12 (6,74%) mientras que ETEC y EIEC se identificaron en menor frecuencia 5 (2,80%) y 1 (0,56%) respectivamente, no encontramos ningún aislamiento que presentara solamente el gen que tipifica para el patotipo DAEC. En el estudio la aparición de híbridos constituyó un importante hallazgo, se encontraron híbridos 2 (1,12%) que mostraron combinación de EHEC/EAEC y un híbrido 1 (0,56%), representado por la combinación de EHEC/DAEC. (Ver gráfico 3). En los anexos #4 y #5, se muestran algunos resultados de la corrida electroforética de los productos de mPCR-1 y mPCR-2

Por otro lado, encontramos que 51 de los aislamientos (28,65%) fueron no identificados (NI) como patotipos por medio de la mPCR utilizada. Los aislamientos NI pudieran pertenecer al grupo de *E. coli* comensal los que no presentan factores de virulencia por lo que no son patógenos, en este caso el cuadro diarreico pudiera estar causado por otros patógenos entéricos como *Rotavirus* y otras bacterias entéricas como *Campylobacter* spp. y *Yersinia* spp., cuyos diagnósticos microbiológicos no se realizan frecuentemente en los laboratorios de microbiología clínica. Por otra parte pudieran formar parte del patotipo IAEC (*E. coli* con Adherencia invasiva), este patotipo se asocia con la enfermedad de Crohn, cuyos genes que codifican para sus factores de virulencia no se incluyen en ninguna de las mPCR utilizadas y por último pudieran ser miembro de EAEC (patotipo más heterogéneo dentro de ECD) del que no se buscaron los cinco genes principales que definen a este patotipo por no contar con los primers.

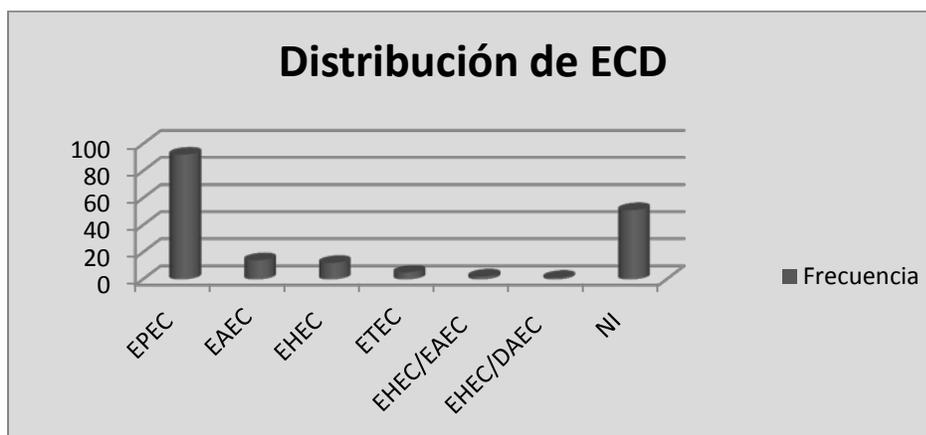


Gráfico 3. Distribución y frecuencia de patotipos de *E. coli* diarrogénicas.

ECD (n=127) NI(n=51), NI: No identificados por mPCR.

Los resultados encontrados en el presente estudio referidos a la distribución y frecuencia de los patotipos, son similares en cuanto a patotipo predominante, pero difieren a la vez en cuanto a la distribución de los restantes patotipos y en cuanto a la frecuencia reportadas por otros estudios como el de Hannaoui *et al.*, 2010, en Venezuela en el que la mayor frecuencia de patotipos fue EPEC, ETEC y EAEC, y los resultados reportados por Tobías *et al.*, 2015, en Israel donde exhibieron el siguiente orden: EPEC, EAEC y ETEC⁽²⁰⁸⁾, aunque sería bueno aclarar que en estos dos

estudios comentados las muestras fueron mucho menores, $n=32$ y $n=59$ respectivamente, que el número de aislamientos estudiados en la actual investigación. Evidentemente se obtuvo un predominio del patotipo EPEC 92 (51,68%), mucho mayor que lo reportado por Hannaoui *et al.*, 2010, en un estudio realizado en Venezuela donde el 10,65% de los aislamientos de ECD correspondieron a EPEC como patotipo predominante⁽²⁰⁷⁾. Por lo contrario en un estudio realizado por Varela *et al.*, 2015 en Uruguay reportó que EPEC (65%) fue el patotipo predominante, acotando que la población estudiada fueron niños mayores de cinco años con alto nivel socioeconómico. EPEC es de gran importancia a nivel clínico como causa de gastroenteritis principalmente en menores de dos años que representan la población infantil con mayor susceptibilidad, reportando la mayor prevalencia particularmente, en lactantes menores de seis meses⁽⁴⁶⁾. La frecuencia disminuye con la edad y los adultos rara vez adquieren infecciones por EPEC, salvo condiciones excepcionales⁽²⁰⁹⁾.

El segundo patotipo más frecuente encontrado en este estudio fue EAEC (7,86%), este patotipo en la última década ha presentado un cambio en el comportamiento epidemiológico y en la mayoría de los estudios revisados del 2010 a la fecha se encuentra en primer o segundo lugar en cuanto a frecuencia de aislamiento entre ECD; estudios realizados por Wang *et al.*, 2013, en China, Rivero *et al.*, 2015, en Perú y Canata *et al.*, 2016 en Paraguay encontraron que el patotipo predominante en sus estudios fue EAEC con 37,8%, 15,1% y 40, 42% respectivamente⁽²⁾⁽⁷⁷⁾. Este cambio de comportamiento pudiese deberse a cambios en los hábitos alimentarios y la forma de elaboración de los alimentos ya que en la actualidad la tendencia al consumo de comidas rápidas y pre-elaboradas (comida chatarra) ha aumentado. Estas comidas son potencialmente contaminadas con bacterias fecales y EAEC tiene como principal vía de transmisión el agua y los alimentos contaminados, aunque las manos también pueden ser vía de transmisión, sobre todo para los recién nacidos^(2, 77).

El tercer patotipo más frecuente encontrado en este estudio fue EHEC (1,12%), este resultado merece especial atención ya que este patotipo emergente y zoonótico, considerado de lo más importante patógenos entéricos de transmisión alimentaria entre ECD. Presenta como principal factor de virulencia, la producción de toxina Shiga o verotoxinas; estas toxinas están asociadas a complicaciones como CH y SUH en los

pacientes cuyo proceso gastroentérico está causado por el serotipo O157:H7 u otro serogrupos non-O157 (O26, O45, O145 entre otros). Por esta razón la OMS y OPS llaman a la vigilancia de este virotipo a nivel mundial porque es imprescindible su diagnóstico oportuno, ya que no existe tratamiento específico ni vacuna, pero además no se puede tratar con antibióticos de acción bactericidas porque acelera la aparición de complicaciones como las mencionadas anteriormente⁽²¹⁰⁾.

En este estudio la cantidad de aislamientos (n=12) que correspondieron con el EHEC es tres veces mayor que lo reportado por Canata *et al.*, 2016, en el cual encontraron que 4 de los aislamientos eran portadores de genes codificadores de toxina Shiga. Lo anterior justifica la búsqueda y detección de estos patógenos entéricos en coprocultivos y la utilización de métodos de biología molecular para arribar a un correcto diagnóstico etiológico que permita comprender mejor la epidemiología de estos patógenos y contribuir al diagnóstico oportuno y a la implementación de medidas sanitarias de prevención y control.

Aunque, dentro de los resultados de este estudio, la frecuencia de ETEC fue baja 2,80%, este patotipo se encuentra dentro de los patotipos que conjuntamente con EAEC y EPEC a nivel mundial se aíslan con mayor frecuencia dentro de los casos de diarrea agudas. En un estudio reciente realizado por Weiler *et al.*, 2017 en niños con síndrome diarreico agudo en Paraguay, encontró que el patotipo predominante fue ETEC, mientras que en otro estudio realizado en México por Patzi-Vargas, *et al.*, 2015⁽¹⁵⁵⁾, el patotipo ETEC ocupó un tercer lugar en frecuencia con un 21%. En una revisión reciente se reportó que para la OPS, los patotipos de EPEC y ETEC son la siguiente prioridad luego de *Rotavirus*, por las tasas de mortalidad que registran como productores de diarrea⁽⁷⁷⁾. Este patotipo es reportado internacionalmente como la principal causa de diarrea del viajero, caracterizada por ser acuosa, profusa y abundantes de tipo colérica fundamentalmente en niños menores de seis meses y dos años de edad.

EIEC con una frecuencia del 0,56% correspondió con el patotipo de más baja identificación dentro de los aislados de CED estudiados, estos resultados coinciden con otros estudios encontrados donde ocupan por lo general el quinto o sexto lugar en cuanto a frecuencia; Ochoa *et al.*, 2011, reportó una frecuencia de 0,6% para EIEC,

mostrando baja frecuencia de aislamientos en su estudio⁽⁹¹⁾. En este mismo sentido, Patzi-Vargas *et al.*, 2015 encontró que este patotipo fue el de menor frecuencia en su estudio 0,4%. EIEC causando diarreas acuosas y disentéricas en seres humanos. Se debe acotar que los genes amplificados por mPRC-2 en el presente estudio (*ipaH* y *virF*), son genes que además los puede portar el género *Shigella*, debido a que ambos patógenos presentan características bioquímicas y genéticas similares. Sin embargo, el aislamiento portador de estos genes de virulencia en este estudio fue Acetato (+) y MUG (+). La prueba MUG adquiere mayor relevancia en la caracterización de EIEC, dado que *E. coli* a excepción del serotipo O157:H7, utiliza la enzima 4-metilumbelilferona-D-glucoronido, mostrando la fluorescencia típica ante la luz ultravioleta, que permitió la identificación rápida del género *Escherichia*⁽²⁰⁷⁾.

Otro resultado importante en el estudio actual fue el hallazgo de híbridos, se encontraron dos para una frecuencia de 1,12% los cuales mostraron la combinación de genes de EHEC/EAEC y solo uno con combinación de genes típicos de EHEC/DAEC con una frecuencia de 0,56%. Este resultado es importante porque muestra aún más la importancia de la identificación genotípica de estos enteropatógenos mediante el uso de PCR, ya no solo para la identificación de los seis patotipos específicos sino que mediante la técnica molecular se puede demostrar también la presencia de híbridos, demostrando la plasticidad genética de *E. coli*, indicativa de una continua transferencia horizontal de genes inter-especie y además permite conocer el comportamiento epidemiológico dentro de ECD.

Este tipo de hallazgo, sobre la detección de ECD híbridos, son reportados también por otros autores como lo reportado por Patzi-Vargas *et al.*, 2015, en México y Weiler *et al.*, 2017, en Paraguay.

4.4 Patotipos de ECD y su relación con la multirresistencia

Desde finales del siglo XX asistimos a un incremento de resistencias a los antimicrobianos utilizados en la práctica clínica. La multirresistencia ha traspasado las barreras hospitalarias y es frecuente el aislamiento de estos microorganismos en el ámbito extrahospitalario. En los últimos años, se han producido cambios en la epidemiología de la resistencia a los antimicrobianos. Por una parte, se produce el

tránsito de patógenos hospitalarios a centros sociosanitarios, lo que convierte a estos centros en reservorio de estos microorganismos. Por otra parte, han aparecido algunas bacterias multirresistentes, como patógenos de adquisición comunitaria (Ej., *E. coli* productora de betalactamasas de espectro extendido). En general, la expresión del fenotipo de multirresistencia se debe a la adquisición de genes que codifican para varios mecanismos de resistencia, aunque en algunas ocasiones sólo uno puede afectar a antimicrobianos de diferentes familias (resistencia pleiotrópica)⁽³⁶⁾.

El estudio de susceptibilidad demostró que en los aislamientos (n=178) evaluados se encontró que el 100% mostraban resistencia al menos a un antimicrobiano. Se obtuvo que el 11,23% de los aislamientos resultó resistente a dos antimicrobianos, mientras que los aislamientos resistentes a tres antibióticos en conjunto representan el 10,11% del total de aislados estudiados. Además, se halló que el 3,37% de los aislamientos resultaron resistentes a cuatro antibióticos y que el 6,74% resultó ser resistente a cinco antimicrobianos. Se comprobó que eran resistentes a seis antibióticos el 2,24% de los aislamientos, el 2,80% resultaron resistentes a siete antimicrobianos y de igual manera 2,80% resultaron resistentes a ocho.

Dentro de los aislamientos de ECD se encontraron 53 aislamientos con fenotipo de MDR para un 41,73%. La mayor frecuencia de aislamientos con fenotipos de MDR se encontró en EPEC con el 32,28%, seguido de EAEC con 3,93% y ETEC con 3,14%. Un resultado a destacar es la frecuencia de aislamientos con fenotipos de MDR encontrado en los aislamientos no identificados que fue de 11,81%. No se pudieron comparar los porcentajes de aislamientos con fenotipos de MDR entre EPEC y el resto de los patotipos por el pequeño tamaño de muestra de los mismos y la comparación se estableció entre EPEC y los aislamientos no identificados, en cuya comparación haciendo uso de estadístico Ji cuadrado encontramos que no había diferencia significativa, porque $p > 0,005$, lo que se traduce que el hecho de portar un gen específico que codifique para un determinado factor de virulencia no parece condicionar la tenencia de un fenotipo de MDR. Ver Tabla 4.1 y anexo #6.

Se debe acotar que la comparación de los porcentajes de aislamientos con fenotipo de MDR entre EPEC y el grupo de los aislados NI, parte de que estos aislamientos formen parte de *E. coli* comensales. En la literatura se reporta que *E. coli* comensales aisladas de muestras de heces tanto de humanos, animales y en agua superficiales, podrían estar actuando como reservorio de genes de resistencia antibiótica, realzando el uso extendido y el impacto de consumo de antimicrobiano en la comunidad, mostrando el riesgo potencial de la pérdida de estos fármacos en el área clínica. Por ello, el análisis de los niveles de resistencia a antimicrobianos en cepas de *E. coli* comensales es un modelo válido para estimar el impacto del uso general de antimicrobianos en un área específica y una aproximación adecuada para predecir la evolución de la resistencia en la comunidad.

Tabla 4.1. Fenotipo de multirresistencia antimicrobiana de patotipos de ECD identificados en LNR-EDA-IPK en el periodo enero-diciembre 2016.

Categoría	Resist No. Aisl.	Total n= 127	Patotipos de ECD							NI
			EPEC	EAEC	EHEC	ETEC	EHEC	EHEC/EAEC	EHEC/DAEC	
Susceptible	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Resistente	1	57	38	6	9	1	1	1	1	31
	2	17	13	3	1	0	0	0	0	5
MDR	3*	19	11	3	0	4	0	1	0	3
	4	6	6	0	0	0	0	0	0	3
	5*	12	10	2	0	0	0	0	0	2
	6	4	4	4	0	0	0	0	0	5
	7	6	5	5	0	1	0	0	0	2
	8	6	5	5	0	1	0	0	0	0
	Total MDR	53	53	41 *	5	2	4	0	1	0
		(41,73)	(32,28)	(3,93)	(1,57)	(3,14)		(0,78)		(29,41)

En el presente trabajo se encontraron 39 patrones de MDR y el patrón predominante correspondió a **AMP/SXT/T**, concentrándose la mayor cantidad de patrones de MDR en

el patotipo EPEC que constituyó el patotipo predominante en el estudio. La distribución de fenotipos de MDR en el patotipo predominante, podrían estar reflejando los antibióticos más usados, la extensión de los mecanismos de resistencia que se diseminan por transferencia horizontal de genes y además la frecuencia de la infección de este patotipo en la población.

Tabla 4.2. Patrones de multirresistencia antimicrobiana más frecuentes encontrados entre los aislados de ECD, en el LNR/EDA/IPK. Periodo enero-diciembre 2016.

Nº de antibióticos	Patrones de MR	Nº de aislamientos de ECD				NI
		EPEC	EAEC	EHEC	ETEC	
3	AMP/CTX/T	2	1	1		
	AMP/SXT/T	3	1	1	2	
5	AMP/CRO/CTX/CIP/NA	4				
7	AMP/CRO/CTX/CIP/NA/SXT/T	3				1
8	AMP/CRO/CTX/CN/CIP/NA/SXT/T	2		1		
Total		14	2	3	2	2

En un trabajo previo realizado por Hernández, 2014⁽¹⁹⁴⁾ en Cuba, detectó 13 patrones de MDR que agruparon 26 aislamientos (26,80%) y cuyo patrón predominante también fue **AMP/SXT/T**, de forma similar fueron los resultados reportados por Alikhani *et al.*, 2013⁽³⁷⁾ y por Canizalez *et al.*, 2016⁽¹⁷²⁾ en los cuales el patrón predominante coincidió con **AMP/SXT/T**. Estos resultados indican la resistencia universal que muestran las ECD a estos antimicrobianos.

Se debe considerar, que las infecciones causadas por aislamientos MDR pudiesen estar asociadas a mayores tasas de morbilidad y mortalidad por las complicaciones del tratamiento y el incremento de la virulencia porque en los elementos móviles transferibles pueden coexistir genes de virulencia con genes de resistencia durante el la transferencia horizontal ya que los antibióticos no solo matan a las bacterias

sensibles y seleccionan a las resistentes, sino que también influyen directamente los mecanismos de variación genética (mutación, recombinación, transposición, intercambio de genes).

CAPÍTULO V. CONCLUSIONES

- ❖ Si por decisión clínica se decide imponer tratamiento antimicrobiano a pacientes con diarreas causadas por *E. coli* diarrogénicas, la ceftriaxona, ciprofloxacino, amikacina, gentamicina, cloranfenicol y nitrofurantoína se consideran de elección por el bajo porcentaje de resistencia antimicrobiana y por otra parte no considerar el uso de ampicilina, tetraciclina, ácido nalidíxico, sulfametoxazol-trimetoprim ni cefotaxima, por el alto porcentaje de resistencia que registraron.
- ❖ La detección de un número creciente de aislamientos del virotipo emergente de *Escherichia coli* enterohemorrágica y el hallazgo de virotipos híbridos, constituye valiosa información desde el punto de vista clínico-epidemiológico.
- ❖ El hecho de portar uno o varios genes de virulencia, que definen los patotipos de *Escherichia coli* diarrogénica, no parece estar asociado a la multirresistencia antimicrobiana.

CAPÍTULO VI. RECOMENDACIONES

- ❖ Alertar al Programa Nacional de ETD del MINSAP, sobre los resultados de susceptibilidad antimicrobiana obtenidos en el estudio para lograr el uso óptimo y eficiente del tratamiento en pacientes que requieran terapia antimicrobiana.
- ❖ Introducir los métodos fenotípicos y moleculares en el LNR/EDA/IPK para la identificación y confirmación de mecanismos de resistencia antimicrobiana en los aislamientos de *Escherichia coli* diarrogénicas.

BIBLIOGRAFÍA

1. Ochoa JT, Mercado, E.H., Durand, D., Rivera, F.P, Mosquito, S., Contreras, C. *et al.* Frecuencia y patotipos de *Escherichia coli* diarrogénicas en niños peruanos con y sin diarrea. *Rev Peru Med Exp Salud Pública.* 2011; 28(1):13-20
2. Riveros M, and Ochoa, T.J. Enteropatógenos de importancia en salud pública. *Rev Peru Med Exp Salud Pública.* 2015; 32(1):135-42.
3. Tobias J, and Svennerholm, A.M. Strategies to overexpress enterotoxigénica *Escherichia coli* (ETEC) colonization factors for the construction of oral whole-cell inactivated ETEC vaccine candidates. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2012; 93:2291-300.
4. Daza-Vergara JA. Informe del evento mortalidad por Enfermedad Diarreica Aguda en niños menores de cinco años y, morbilidad en todos los grupos de edad, año 2012. Colombia: Instituto Nacional de Salud 2012.Contract No.: FOR-R02. 4000-001.
5. Rocha L, Santos, A., Munhoz, D., Cardoso, L., Luz, D., Piazza, R., *et al.* Development of a Rapid Agglutination Latex Test for Diagnosis of Enteropathogenic and Enterohemorrhagic *Escherichia coli* Infection in Developing World: Defining the Biomarker, Antibody and Method. *Plos Negl Trop Dis.* 2014; 8(9):1-10.
6. Ozaki CY, Silveira, C.R.F., Andrade, F.B., Nepomuceno, R., Silva, A., Munhoz, D.D. *et al.* Single Chain Variable Fragments Produced in *Escherichia coli* against Heat-Labile and Heat-Stable Toxins from Enterotoxigenic *E. coli*. *PLoS ONE.* 2015; 10(7):1-14.
7. Saha D, Guin, S., Krishnan, R., Nag, D., Koley, H., Shinoda, S. and Ramamurthy, T. Inflammatory diarrhea due to enteroaggregative *Escherichia coli*: evidence from clinical and mice model studies. *Gut Pathogens.* 2013; 5(36).
8. Zhang R, *et al.* Comparative genetic characterization of Enteroaggregative *Escherichia coli* strains recovered from clinical and non-clinical settings. *Sci Rep.* 2016; 6(24321):1-8.
9. Patzi-Vargas S, Zaidi, MB., Perez-Martinez, I., León-Cen, M., Michel-Ayala, A., Chaussabel, D *et al.* Diarrheagenic *Escherichia coli* Carrying Supplementary Virulence Genes Are an Important Cause of Moderate to Severe Diarrhoeal Disease in Mexico. *PLoS Negl Trop Dis.* 2015; 9(3).
10. Boisen N, Melton-Celsa, A.R., Scheutz, F., O'Brien, A.D., and Nataro, J.P. Shiga toxin 2a and Enteroaggregative *Escherichia coli* a deadly combination. *Gut Microbes.* 2015; 6(4):272-8.
11. Lozer D, Souza, T., Monfardini, M., Vicentini, F., Kitagawa, S., Spano, L., *et al.* Genotypic and phenotypic analysis of diarrheagenic *Escherichia coli* strains isolated from Brazilian children living in low socioeconomic level communities. *BMC Infect Dis* 2013; 13(418):1-7.

12. Riddle MS, DuPont, H.L., and Connor, B.A. ACG Clinical Guideline: Diagnosis, Treatment, and Prevention of Acute Diarrheal Infections in Adults. *Am J Gastroenterol.* 2016; XXX:1-15.
13. Anuario estadístico de salud [database on the Internet]. 2016. Available from: <http://www.sld.cu/sitios/dne/>.
14. Gordon DM. The ecology of *Escherichia coli*. *Escherichia coli*. 2nd Edition Ed: Academic Press; 2013. p. 1-20.
15. O’Ryan M, Vidal, R., del Canto, F., Salazar, JC and Montero, D. Vaccines for viral and bacterial pathogens causing acute gastroenteritis: Part II: Vaccines for *Shigella*, *Salmonella*, enterotoxigenic *E. coli* (ETEC) enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC) and *Campylobacter jejuni*. *Human Vaccines & Immunotherapeutics.* 2015; 11(3): 601--19.
16. Croxen MA, Law, R.J., Scholz, R., Keeney, K.M., Wlodarska, M, *et al.* Recent Advances in Understanding Enteric Pathogenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev* 2013; 26(4):822-80.
17. Gómez-Duarte OG. Enfermedad diarreica aguda por *Escherichia coli* enteropatógenas en Colombia. *Rev Chilena Infectol.* 2014; 31(5):577-86.
18. Li H, *et al.* The outer mucus layer hosts a distinct intestinal microbial niche. *Nat Commun.* 2015; 6(8292):1-12.
19. Tamar E, Koler, M., and Vaknin, A. The role of motility and chemotaxis in the bacterial colonization of protected surfaces. *Scient Rep.* 2016;6.
20. Barroso-Batista *Jet al.* Adaptive immunity increases the pace and predictability of evolutionary change in commensal gut bacteria. *Nat Commun.* 2015; 6(8945).
21. Dhaka P, Vergis, J., Negi, M., Kumar, M., and Mohan, V. Genetic diversity and antibiogram profile of diarrhoeagenic *Escherichia coli* pathotypes isolated from human, animal, foods and associated environmental sources. *Infection Ecology and Epidemiology* 2016; 6:1-10.
22. Fiedoruk K, Rozkiewicz, D., Zaremba, M.L., Oldak, E., Sciepek, M., and Leszczynska, K. Conventional and molecular methods in the diagnosis of community-acquired diarrhoea in children under 5 years of age from the north-eastern region of Poland. *International J Infect Dis.* 2016; 37:145-55.
23. Chin J, Zhang, R., and Al-Jassim, R. Diarrheagenic *Escherichia coli* Pathotypes (DEP) Including Enterohaemorrhagic (EHEC)/Shiga-toxin *E. coli* (STEC). PCR for Clinical Microbiology. Brisbane, Australia: Springer Science+Business Media; 2010. p. 149-55.
24. Riddle MS, DuPont, H.L., and Connor, B.A. ACG Clinical Guideline: Diagnosis, Treatment, and Prevention of Acute Diarrheal Infections in Adults. *Am J Gastroenterol.* 2016; XXX:1-15.
25. Mohammadzadeh M, Goudarzi, H., Dabiri, H., and Fallah, F. Molecular detection of lactose fermenting enteroinvasive *Escherichia coli* from patients with diarrhea in Tehran-Iran. *Iran J Microbiol.* 2015; 7(4):198-202.
26. Virpari PK NJ, Thaker HC, and Brahmabhatt MN. Isolation of pathogenic *E. coli* from stool samples of diarrhoeal patients with history of raw milk consumption *Vet World.* 2013; 6(9):659-63.

27. Van Elsas JD, Semenov, A.V., Costa, R., and Trevors, J.T. Survival of *Escherichia coli* in the environment: fundamental and public health aspects. *The ISME Journal*. 2011; 5:173-83.
28. Benevides-Matos N PF, Penatti M, and Orlandi PP. Adherence and virulence genes of *Escherichia coli* from children diarrhoea in the Brazilian Amazon. *Braz J Microbiol*. 2015;46(1):131-7.
29. Baker KS. Demystifying *Escherichia coli* pathovars. *Nat Rev Microbiol* 2015;13
30. Lozer D, Souza, T., Monfardini, M., Vicentini, F., Kitagawa, S., Spano, L., *et al*. Genotypic and phenotypic analysis of diarrheagenic *Escherichia coli* strains isolated from Brazilian children living in low socioeconomic level communities. *BMC Infect Dis* 2013; 13(418):1-7.
31. Souza T.B. LDM, Kitagawa S.M.S., Spano L.C., Silva N.P., and Scaletsky I.C.A. Real-Time Multiplex PCR Assay and Melting Curve Analysis for Identifying Diarrheagenic *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol*. 2013; 51(3):1031-3.
32. Zulfiquar A. Acute Gastroenteritis in Children. *Nelson Textbook of Pediatrics*. Twentieth Edition ed: Elsevier, Inc.; 2016. p. 1854-75.
33. Lucero A. Etiología y manejo de la gastroenteritis aguda infecciosa en niños y adultos. *RevMedClin Condes*. 2014; 25(3):463-72.
34. Wellington EM, Boxall, A.B., Cross, P., Feil, E.J., Gaze, W.H., Hawkey, P.M., *et al*. The role of the natural environment in the emergence of antibiotic resistance in gram-negative bacteria. *Lancet Infect Dis*. 2013; 13:155-65.
35. Rodríguez-Noriega E, León-Garnica, G., Petersen-Morfín, S., Pérez-Gómez, H., González-Díaz, E y Morfín-Otero, R. La evolución de la resistencia bacteriana en México, 1973-2013. *Biomédica*. 2014; 34:181-91.
36. Mosquito S, Ruiz, J., Bauer, J.L., Ochoa, T.J. Mecanismos moleculares de resistencia antibiótica en *Escherichia coli* asociadas a diarrea. *Rev Peru Med Exp Salud Pública*. 2011; 28(4):648-56.
37. Alikhani M.Y.F, Hashemi, S.H., Aslani, M.M., and Farajnia, S. Prevalence and antibiotic resistance patterns of diarrheagenic *Escherichia coli* isolated from adolescents and adults in Hamedan, Western Iran. *Iran J Microbiol*. 2013; 5(1):42-7.
38. Chávez M, Salazar, M.C., Cabrera, C.E., Gómez, R.F. y Pallares, C. Bacterias resistentes a los antibióticos en infecciones nosocomiales de un hospital en Colombia. *Enf Inf Microbiol*. 2012; 33(1):19-25.
39. Bassetti M, Pecori, D., Sibani, M., Corcione, S., and De Rosa, F.G. Epidemiology and Treatment of MDR *Enterobacteriaceae*. *Curr Treat Options Infect Dis*. 2015; 7:291-316.
40. Yang X, Liu, W., Liu, Y., *et al*. F33: A-: B-, IncHI2/ST3, and IncI1/ST71 plasmids drive the dissemination of *fosA3* and *blaCTX-M-55/-14/-65* in *Escherichia coli* from chickens in China. *Front Microbiol* 2014.
41. Xavier B, Lammens, C., Ruhul, R., Kumar-Singh, S., Butaye, P., Goossens, H. and Malhotra-Kumar, S. Identification of a novel plasmid-mediated colistin-resistance gene, *mcr-2*, in *Escherichia coli*, Belgium, June 2016. *Euro Surveill*. 2016; 21(27).
42. WHO/UNICEF. Ending preventable child deaths from pneumonia and diarrhoea by 2025. The Integrated Global Action Plan for Pneumonia and Diarrhoea (GAPPD). 2014:1-64.

43. Daza-Vergara JA. Informe del evento mortalidad por Enfermedad Diarreica Aguda en niños menores de cinco años y, morbilidad en todos los grupos de edad, año 2012. Colombia: Instituto Nacional de Salud 2012 Contract No.: FOR-R02. 4000-001.
44. Bourrillon A and Benoist, G. Infecciones bacterianas del niño. EMC - Tratado de medicina. [Artículo E – 8-1105]. 2015; 19 (2):1-13.
45. Zhang Y. Persisters, persistent infections and the Yin–Yang model. *Emerging Microbes and Infections*. 2014; 3(e3):1-8.
46. Varela G, Batthyány, L., Bianco, MN., Pérez, W., Pardo, L., Algorta, G *et al.* Enteropathogens Associated with Acute Diarrhea in Children from Households with High Socioeconomic Level in Uruguay. *International Journal of Microbiology*. 2015; 2015:1-8.
47. Michelli ER, H.; Millan, A.; Michelli, M.; Luiggi, J.; Carreño, N.; et al. Identificación de *Escherichia coli* enteropatógena en niños con síndrome diarreico agudo el estado Sucre, Venezuela. *Biomédica* 2016; 336(Supl.11):11 -27.
48. Croxen MF, B.B. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. *Nature Reviews Microbiol*. 2013; 8(1):26-38.
49. Baker DL, Ferguson, C.M., Chier, P., Warnecke, M. and Watkinson, A. Standardised survey method for identifying catchment risks to water quality. *Journal of Water and Health*. 2016; 14(3).
50. Gould D. *Escherichia coli* recognition and prevention. *Primary Health Care*. 2011; 21(8):32-9.
51. Gould D. *Escherichia coli* recognition and prevention. *Primary Health Care*. 2011; 21(8):32-9.
52. Donnenberg MS. *Enterobacteriaceae*. Enfermedades infecciosas Principios y práctica Octava edición ed. Elsevier, España; 2016. P: 2640-55.
53. Bergey's .The Proteobacteria. *Manual of Systematic Bacteriology*. 2nd ed; 2005.
54. Sicha Romero F. Identificación de grupos filogenéticos de *Escherichia coli* aislado de crías de alpacas (*Vicugna pacos*) con diarrea. Lima, Perú: Facultad de Medicina Veterinaria; 2016.
55. Štaudová B, Micenková, L., Bosák, J., Hrazdilová, K., Slaninková, E., Vrba, M., *et al.* . Determinants encoding fimbriae type 1 in fecal *Escherichia coli* are associated with increased frequency of bacteriocinogeny. *BMC Microbiol*. 2015; 15(201).
56. Pringle SL, Palmer, K.L and McLean, R.J.C. Indole production provides limited benefit to *Escherichia coli* during co -culture with *Enterococcus faecalis*. *ArchMicrobiol*. 2017; 199:145-53.
57. Lara F, Nery, DR., de Oliveira, PM., Araujo, ML. Carvalho, FRQ. Messias-Silva, LCF *et al.* Virulence Markers and Phylogenetic Analysis of *Escherichia coli* Strains with Hybrid EAEC/UPEC Genotypes Recovered from Sporadic Cases of Extraintestinal Infections. *Front Microbiol* 2017; 8(146).
58. Fang H, Kang, J and Zhang, Dawe. Microbial production of vitamin B 12: a review and future perspectives. *Microb Cell Fact*. 2017; 16(15).
59. Titilawo Y, Obi, L and Okoh, A. Occurrence of virulence gene signatures associated with diarrhoeagenic and non-diarrhoeagenic pathovars of *Escherichia coli* isolates from some selected rivers in South-Western Nigeria. *BMC Microbiol*. 2015; 15(204).

60. Leimbach A, Hacker, J & Dobrindt, U. *E. coli* as an all-rounder: the thin line between commensalism and pathogenicity. *Current Topics Microbiol Immunol*. 2013; 358(3).
61. Abberton CL, Bereschenko, L., van der Wielen, P.W.J.J. and Smith, C.J. Survival, biofilm formation, and growth potential of environmental and enteric *Escherichia coli* strains in drinking water microcosms. *Appl Environ Microbiol*. 2016; 82:5320-31.
62. Strachan NJC, *et al.* Whole Genome Sequencing demonstrates that Geographic Variation of *Escherichia coli* O157 Genotypes Dominates Host Association. *Sci Rep*. 2015; 5(14145).
63. Kaczmarek A, Skowron, K., Budzy, A., Grudlewska, K. and Gospodarek-Komkowska, E. Virulence genes and antimicrobial susceptibility of lactose-negative and lactose-positive strains of *Escherichia coli* isolated from pregnant women and neonates. *Folia Microbiol*. 2017
64. Choi SY, *et al.* One-step fermentative production of poly (lactate-co-glycolate) from carbohydrates in *Escherichia coli*. *Nat Biotechnol*. 2016; 34(4):435-40.
65. Costa C, Neto Monteiro, V., de Carvalho Santos, BR., Costa Rabelo, BR., Azevedo, A., Lima Serra, J., Benítez Rabello, H. Enterobacteria identification and detection of diarrheagenic *Escherichia coli* in a Port Complex. *Brazilian J Microbiol*. 2014; 45(3):945-52.
66. Fratamico PM, DebRoy, C., Liu, Y., Needleman, D.S., Baranzoni, G.M and Feng, P. Advances in Molecular Serotyping and Subtyping of *Escherichia coli*. *Front Microbiol*. 2016; 7(644).
67. Mirsepasi-Lauridsen HC DZ, Struve C, Charbon G, Karczewski J, Krogfelt KA, *et al.* Secretion of Alpha-Hemolysin by *Escherichia coli* Disrupts Tight Junctions in Ulcerative Colitis Patients. *Clin Transl Gastroenterol*. 2016; 7:1-8.
68. Boisen N. M-CAR, Scheutz F., O'Brien A.D., and Nataro J.P. Shiga toxin 2a and Enterotoxigenic *Escherichia coli* a deadly combination. *Gut Microbes*. 2015; 6(4):272-8.
69. Robins-Browne RM, Holt, K.E., Ingle, D.J., Hocking, D.M., Yang, J. and Tauschek, M. Are *Escherichia coli* Pathotypes Still Relevant in the Era of Whole-Genome Sequencing? *Front Cell Infect Microbiol*. 2016; 6(141).
70. Blount ZD. The natural history of model organisms. The unexhausted potential of *E. coli*. *eLife*. 2015; 4:1-12.
71. Lee H, Popodi, E., Foster, P.L., and Tang, H. Detecting structural variants involving repetitive elements: capturing transposition events of IS elements in the genome of *Escherichia coli*. *BMC Bioinformatics*. 2012; 13(18).
72. Bettelheim KA, and Goldwater, P.N. *Escherichia coli* and sudden infant death syndrome. *Front Immunol*. 2015; 6(343).
73. Lacroix B, and Citovsky, V. Transfer of DNA from Bacteria to Eukaryotes. *mBio*. 2016;7(4).
74. Sun Y., *et al.* Fecal bacterial microbiome diversity in chronic HIV-infected patients in China. *Emerging Microbes and Infections*. 2016; 5(e31).
75. Frömmel U, Böhm, A., Nitschke, J., Weinreich, J., Groß, J., Rödiger, S., *et al.* Adhesion patterns of commensal and pathogenic *Escherichia coli* from humans and wild animals on human and porcine epithelial cell lines. *Gut Pathogens*. 2013; 5(31).

76. Allocati N, Masulli, M., Alexeyev M. F. and Di Ilio, C. *Escherichia coli* in Europe: An Overview. *Int J Environ Res Public Health*. 2013; 10: 6235-54.
77. Canata M, Navarro, R., Velázquez, G., Rivelli, S., Rodríguez, F and Céspedes, A. . Caracterización molecular de factores de virulencia de aislados *Escherichia coli* obtenidas de heces de niños con gastroenteritis del Hospital Central de Instituto de Previsión Social en el 2012. *Pediatr (Asunción)*. 2016; 43(1):13-7.
78. Servin A. Pathogenesis of Human Diffusely Adhering *Escherichia coli* Expressing Afa/Dr Adhesins (Afa/Dr DAEC): Current Insights and Future Challenges. *ClinMicrobiolReviews*. 2014; 27(4).
79. Bentley R, and Meganathan, R. "Biosynthesis of vitamin K (menaquinone) in bacteria." *Microbiol Rev*. 1982;46(3):241-80.
80. Lobos O, Padilla, A. y Padilla, C. Análisis genético y propiedades virulentas de cepas de *Escherichia coli* aisladas desde infección vaginal. *Rev Chilena Infectol* 201330(4):381-4.
81. Gomes TAT, Elias, W.P., Scaletsky, I.C.A., Guth, B.E.C., Rodrigues, J. F., Piazza, R.M.F. *et al.* Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Braz J Microbiol*. 201647:3-30.
82. NataroJPaK, J.B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev*. 1998; 11(1):142-201.
83. Vidales-Rodríguez LE, Miranda-Delgado, P., De Santiago -Franco, D., Sánchez-Rodríguez, S.H y Ramírez-Santoyo, R.M. Los patrones de adherencia de *Escherichia coli* patogénica aviar y *E.coli* patogénica de humanos a células epiteliales en cultivo son similares. *Arch Med*. 2014; 10(1).
84. Patzi-Vargas S, *et al.* Diarrheagenic *Escherichia coli* Carrying Supplementary Virulence Genes Are an Important Cause of Moderate to Severe Diarrhoeal Disease in Mexico. *PLoS Negl Trop Dis*. 20159(3).
85. Murray PR, Rosenthal, K.S., Michael, A. and Pfaller, M.D. *Enterobacteriaceae*. *Medical Microbiology*. Eighth edition. ed: Elsevier Inc.; 2016. p. 261-64.
86. García-Blancas PyM-M, A. Pruebas bioquímicas tradicionales y de resolución para la identificación manual de enterobacterias. *Acta Bioquím Clín Latinoam*. 2014; 48(2):549-54.
87. Kubiak-Szeligowska AB, Bartnicka, M., Jarych, D and Majchrzak, M. TRS-PCR profiling for discrimination of *Escherichia coli* strains isolated from children with diarrhea under 5 years of age in Lodz region, Poland. *Mol Biol Rep*. 2016; 43:871-80.
88. Canizalez-Roman AF-V, HM.; Gonzalez-Nuñez, E.; Velazquez-Roman J, Vidal JE.; Muro-Amador S, Alapizco-Castro, G.; Díaz-Quiñonez, JA and León-Sicairos, N. . Surveillance of Diarrheagenic *Escherichia coli* Strains Isolated from Diarrhea Cases from Children, Adults and Elderly. *Front Microbiol*. 2016; 7.
89. Licznarska K, Nejman-Faleńczyk, B., Bloch, S., Dydecka, A., Topka, G., Gdsior, T *et al.* Oxidative Stress in Shiga Toxin Production by Enterohemorrhagic *E. coli*. *Oxidative Med Cell Long*. 2016; 8:8.
90. Souza TB, *et al.* Real-Time Multiplex PCR Assay and Melting Curve Analysis for Identify in Diarrheagenic *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol*. 2013;51(3).

91. Ochoa JT ME, Durand D, Rivera FP, Mosquito S, Contreras C, *et al.* frecuencia y patotipos de *Escherichia coli* diarrogénica en niños peruanos con y sin diarrea. *Rev Peru Med Exp Salud Publica.* 2011;28(1):13-20.
92. Toma C, Lu, Y., Higa, N., Nakasone, N., Chinem, I., Baschkier, A., Rivas, M & Iwanaga, M. Multiplex PCR assay for identification of human diarrheagenic *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol.* 2003;41:2669-71.
93. Gómez-Duarte OG, Bai, J., and Newell, E. . Detection of *Escherichia coli*, *Salmonella spp.*, *Shigella spp.*, *Yersinia enterocolitica*, *Vibrio cholerae*, and *Campylobacter spp.* enteropathogens by 3-reaction multiplex polymerase chain reaction. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease.* 2009;63:1-9.
94. Lozer D, Souza, T., Monfardini, M., Vicentini, F., Kitagawa, S., Spano, L., *et al.* Genotypic and phenotypic analysis of diarrheagenic *Escherichia coli* strains isolated from Brazilian children living in low socioeconomic level communities. *BMC Infect Dis* 2013; 13(418):1-7.
95. Weiler N, Orrego, M., Alvarez, M., and Huber, C. . Detección molecular de *Escherichia coli* diarrogénica en pacientes pediátricos con síndrome diarreico agudo en Paraguay. *Mem Inst Investig Cienc Salud* 2017; 15(1):16-21.
96. Acosta GJ, Vigo N.I., Durand, D., Riveros, M., Arango, S., Zambruni, M., and Ochoa, T.J. Diarrheagenic *Escherichia coli*: Prevalence and Pathotype Distribution in Children from Peruvian Rural Communities. *Amer J Trop Med Hyg.* 2016; 95(3).
97. Franzin FM, and Sircili, M.P. Locus of Enterocyte Effacement: A Pathogenicity Island Involved in the Virulence of Enteropathogenic and Enterohemorrhagic *E. coli* Subjected to a Complex Network of Gene Regulation. *Bio Med Research International.* 2015; 15.
98. Cravioto A, Gross, R.J., Scotland, S.M. and Rowe, B. An Adhesive Factor Found in Strains of *Escherichia coli* Belonging to the Traditional Infantile Enteropathogenic Serotypes. *Current Microbiol.* 1979; 3:95-9.
99. Scaletsky IC, Silva, M.L., and Trabulsi, L.R. Distinctive patterns of adherence of enteropathogenic *Escherichia coli* to HeLa cells. *Infect Immun.* 1984;45:534-36.
100. Riveros M, Barletta, F., Cabello, M., Durand, D., Mercado, E.H., Contreras, C *et al.*, patrones de adherencia de cepas de *Escherichia coli* difusamente adherente (DAEC) provenientes de niños con y sin diarrea. *Rev Peru Med Exp Salud Publica.* 2011; 28(1):21-8.
101. Kallonen T, and Boinett, C.J. EPEC: a cocktail of virulence. *Nat Reviews Microbiol.* 2016;14.
102. Hazen T, Donnenberg, MS., Panchalingam, S., Antonio, A., Hossain, A., Mandomando, I., *et al.* Genomic diversity of EPEC associated with clinical presentations of differing severity. *Nat Microbiol.* 2016; 1(14).
103. Lluque A, Mercado, E., Riveros, M., Alvarado, L., Carlos, E., Colichón, A *et al.* Comparación entre el Diagnóstico Serológico y el Diagnóstico por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para *Escherichia coli* Enteropatogénica (EPEC). *Rev Gastroenterol.* 2010; 30(2):121-25.
104. Silva LEP, Souza T.B., Neusa P Silva and Scaletsky I.C.A. Detection and genetic analysis of the enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin

- (EAST1) gene in clinical isolates of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) strains. BMC Microbiol. 2014; 14(135):3-6.
105. Ingle DJ, Tauschek, M., Edwards, D.J., Hocking, D.M., Pickard, D.J., Azzopardi, K.I., *et al.* Evolution of atypical enteropathogenic *E. coli* by repeated acquisition of LEE pathogenicity island variants. *Nat Microbiol* 2016; 1:1-8.
106. Jayamani E, and Mylonakis, E. Effector triggered manipulation of host immune response elicited by different pathotypes of *Escherichia coli*. *Virulence*. 2014; 5(7).
107. Nieto-Pelegrin E, Meiler, E., Martín-Villa, J.M., Benito-León, M and Martínez-Quiles, N. Crk Adaptors Negatively Regulate Actin Polymerization in Pedestals Formed by Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) by Binding to Tir Effector. *PLoS Pathol* 2016; 10(3).
108. Michelli E, Rodolfo, H., Millan, A., Michelli, M., Luiggi, J., Carreño, N., *et al.* Identificación de *Escherichia coli* enteropatógena en niños con síndrome diarreico agudo el estado Sucre, Venezuela. *Biomédica* 2016; 336(Supl.11):11 -27.
109. Farfán García A.E, Ariza Rojas, S.C., Vargas Cárdenas, F.A y Vargas Remolina, L.V. Mecanismo de virulencia de *Escherichia coli* enteropatógena. *Rev Chilena Infectol*. 2016; 33(4):438-50.
110. Robins-Browne RM, Holt, K.E., Ingle, D.J., Hocking, D.M., Yang, J. and Tauschek, M. Are *Escherichia coli* Pathotypes Still Relevant in the Era of Whole-Genome Sequencing? *Front Cell Infect Microbiol*. 2016; 6(141).
111. Santona S, Diaz, N., Fiori, P.L., Francisco, M., Sidat, M., Cappuccinelli, P. *et al.* Genotypic and phenotypic features of enteropathogenic *Escherichia coli* isolated in industrialized and developing countries. *J Infect Dev Ctries*. 2013; 7(214-9).
112. Xu Y, Bai, X., Zhao, A., Zhang, W., Ba, P., Liu, K., *et al.* Genetic Diversity of Intimin Gene of Atypical Enteropathogenic *Escherichia coli* Isolated from Human, Animals and Raw Meats in China. *PLoS ONE*. 2016; 11(3).
113. Sack RB. The discovery of cholera - like enterotoxins produced by *Escherichia coli* causing secretory diarrhoea in human. *Indian J Med Res*. 2011;133:171-8.
114. Jafari A, Aslani, M.M., and Bouzari, S. *Escherichia coli*: a brief review of diarrheagenic pathotypes and their role in diarrheal diseases in Iran. *Iran J Microbiol*. 2012; 4(3):102-17.
115. Melkebeek V, Goddeeris, B. M., and Cox, E. ETEC vaccination in pigs. *Vet Immunol Immunopathol*. 2013; 152(1):37-42.
116. vonMentzer A, Connor, TR., Wieler, LH., Semmler, T., Iguchi, A and Thomson, NR. Identification of enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) clades with long-term global distribution. *Nat Genet* 2014; 46(12):1321-6.
117. Ruan X, Sack, DA., and Zhang, W. Genetic Fusions of a CFA/I/II/IV MEFA (Multi-epitope Fusion Antigen) and a Toxoid Fusion of Heat-Stable Toxin (STa) and Heat-Labile Toxin (LT) of Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) Retain Broad Anti-CFA and Antitoxin Antigenicity. *PLoS ONE*. 2015; 10(3):e0121623.
118. Fleckenstein JM, and Sheikh, A. Designing Vaccines to Neutralize Effective Toxin Delivery by Enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Toxins*. 2014; 6:1799-812.
119. Cavalcante A, Caldas dos Santos, M.E., Morais Mariúba, L.A. and Afonso Nogueira, P. Expression of proteins Heat-Labile (Lt-1) and Heat-Stable (STa)

- Escherichia coli* expression of proteins Heat-Labile (Lt-1) and Heat-Stable (STa) *Escherichia coli*. BMC Proceedings. 2014; 8(4).
120. O’Ryan M, Vidal, R., del Canto, F., Salazar, JC and Montero, D. . Vaccines for viral and bacterial pathogens causing acute gastroenteritis: Part II: Vaccines for Shigella, Salmonella, enterotoxigenic *E. coli* (ETEC) enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC) and *Campylobacter jejuni*. Human Vaccines & Immunotherapeutics. 2015; 11(3): 601-19.
 121. Ozaki CY, Silveira, C.R.F., Andrade F.B., Nepomuceno R., Silva A., Munhoz D.D., *et al.* Single Chain Variable Fragments Produced in *Escherichia coli* against Heat-Labile and Heat-Stable Toxins from Enterotoxigenic *E. coli*. PLoS ONE. 2015; 10(7):1-14.
 122. Harrison C, Hanson, H., Reddy, V., Stavinsky, F., Kornstein, L., Chicaiza, L., Lee, L., and Balter, S. . A series of unusual investigations: Three outbreaks of enterotoxigenic *Escherichia coli* in New York City., Conference presentation. . New York City Health/Council of State and Territorial Epidemiologists.; 2012.
 123. MacDonald E, Møller, K.E., Wester, A.L., Dahle, U.R., Hermansen, N.O., Jenum, P.A., Thoresen L. & Vold, L. An outbreak of enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) infection in Norway, 2012: a reminder to consider uncommon pathogens in outbreaks involving imported products. Epidemiology and Infection. 2015; 143(3):486-93.
 124. Brenner D, Steigerwalt, AG., Wathen, HG-, Gross, RJ. and Rowe B. Confirmation of aerogenic strains of *Shigella boydii* 13 and further study of *Shigella* serotypes by DNA relatedness. J Clin Microbiol Rev. 1982; 16(3):432-6.
 125. Pettengill E, Pettengill ,J B. and Binet, R. Phylogenetic analyses of *Shigella* and enteroinvasive *Escherichia coli* or identification of molecular epidemiological markers: hole-genome comparative analysis does not support distinct genera designation. Front Microbiol. 2016; 6(1573).
 126. van den Beld MJC, and Reubsæet, F.A.G. Differentiation between *Shigella*, enteroinvasiva *Escherichia coli* (EIEC) and non-invasive *Escherichia coli*. Eur J Clin Microbiol Infects Dis. 2012; 31:899-904.
 127. Mohammadzadeh M, Goudarzi, H., Dabiri, H., and Fallah, F. Molecular detection of lactose fermenting enteroinvasive *Escherichia coli* from patients with diarrhea in Tehran-Iran. Iran J Microbiol. 2015; 7(4):198-202.
 128. da Silva LC, de Mello Santos, A.C., and Silva, R.M. Uropathogenic *Escherichia coli* pathogenicity islands and other ExPEC virulence genes may contribute to the genome variability of enteroinvasive *E. coli*. BMC Microbiol. 2017; 17(68).
 129. O’Brien AD, La Veck, G.D., Thompson, M.R. and Formal, S.B. Production of *Shigella dysenteriae* type-1- like cytotoxin by *Escherichia coli*. J Infect Dis. 1982; 146:763-9.
 130. Riley L, Remis, RS., Helgerson, SD., Mc Gee, HB., Wells, JG., Davis, BR et al. . Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. N Engl J Med. 1983; 308(68).
 131. OPS/OMS. Oficina Regional para las Américas de la Organización Mundial de la Salud. Peligros biológicos: Inocuidad de Alimentos 2016 [cited 2017 20 de julio]: Available

from:http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_topics&view=article&id=266&Itemid=40906&lang=es.

132. Comité Científico de España. Medidas de prevención y recomendaciones aplicables para evitar posibles infecciones alimentarias por cepas de *E. coli* verotoxigénicos productores de toxinas Shiga/enterohemorrágicos (VTEC/STEC/EHEC). (2012).
133. Vallières E, *et al.* Comparison of three different methods for detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in a tertiary pediatric care center. *J Clin Microbiol.* 2013; 51(2):481-6.
134. Steyert SR, Sahl, J.W, Fraser, C.M., Teel, L.D., Scheutz, F and Rasko, D.A. Comparative genomics and stx phage characterization of LEE-negative Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *Front Cell Infect Microbiol.* 2012; 2(133):1-14.
135. Nguyen Y, and Sperandio, V. Enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC) pathogenesis. *Front Cell Infect Microbiol Rev.* 2012; 12:2-90.
136. Ishijima N, Ken-ichi, E., Kuwahara, T., Nakayama-Imaohji, H., Yoneda, S., Iguchi, A., Ogura, Y *et al.* Identification of a New Virulent Clade in Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O26:H11/H- Sequence Type 29. *Sci Rep.* 2017; 7(43136).
137. Moredo F. Prevalencia de *Escherichia coli* enterotoxigénico y *Escherichia coli* productor de toxina Shiga en cerdos sin manifestación clínica de diarrea de la provincia de Buenos Aires. Universidad Nacional de la Plata, Argentina: 2012.
138. Margal N, Domínguez, Á., Prats, G y Salleras, L. *Escherichia coli* enterohemorrágica. *Rev Esp Salud Pública.* 1997; 71:437-43.
139. Montero DA, Velasco, J., Del Canto, F., Puente J.L., Padola, D.L., Rasko, DA., *et al.* Locus of Adhesion and Autoaggregation (LLAA), a pathogenicity island present in emerging shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains. *Scientific Reports* 2017; 7(7011).
140. Le Bihan G, Sicard, J.F., Garneau, P., Bernalier-Donadille, A., Gobert, A.P., Garrivier, A. *et al.* The NAG Sensor NagC Regulates LEE Gene Expression and Contributes to Gut Colonization by *Escherichia coli* O157:H7. *Front Cell Infect Microbiol.* 2017; 7(134).
141. Rivero M, Passucci, J., Lucchesi, P., Signorini, M., Alconcher, L., Rodríguez, E. *et al.* Epidemiology of hemolytic uremic syndrome in two regions of Buenos Aires Province. *Medicina (B Aires).* 2013; 73(2):127-35.
142. Chui L, *et al.* Comparison between Immuno Card STAT! ((R)) and real-time PCR as screening tools for both O157:H7 and non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in Southern Alberta, Canada. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2013; 77(1):8-13.
143. Pistone-Creydt V, Venzano, A., Vilte, DA., Mercado, EC. and Ibarra, C. Cytotoxic effect in human colon of enterohemorrhagic *Escherichia coli* isolated from calves with bloody diarrhea. *Rev Argent Microbiol.* 2005; 37:117-21.
144. Honish L, Punja, N., Nunn, S., Nelson, D., Hislop, N., Gosselin, G., *et al.* *Escherichia coli* O157:H7 infections associated with contaminated pork products. Alberta, Canada, July-October 2014. *Can Commun Dis Rep* 2017; 43(1):4.21.

145. Bosilevac JM, Wang, R., Luedtke, B., Hinkley, S., Wheeler, T.L. and Koohmaraie, M. Characterization of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* on Veal Hides and Carcasses. *Journal of Food Protection*. 2017; 80(1):136-45.
146. Franco-Anaya PA, Ramírez-Medina L.M., Orozco-Ugarriza, M.E y López-Gutiérrez, L.A. Determinación de *Escherichia Coli* e identificación del serotipo O157:H7 en carne de cerdo comercializada en los principales supermercados de la ciudad de Cartagena. *Rev Lasallista Invest*. 2013; 10(1).
147. Boisen N, Melton-Celsa, A.R., Scheutz, F., O'Brien, A.D., and Nataro, J.P. Shiga toxin 2a and Enteroaggregative *Escherichia coli* a deadly combination. *Gut Microbes*. 2015; 6(4):272-8.
148. Estrada-García T, and Navarro-García, F. Enteroaggregative *Escherichia coli* pathotype: a genetically heterogeneous emerging foodborne enteropathogen. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2012; 66:281–98.
149. Löscha L, Gariboglio-Vázquez, M.L., Rivasc, M y Merinoa, L.A. Detección de genes de virulencia del patotipo enteroagregativo en cepas de *Escherichia coli* aisladas de fuentes de agua subterránea de la provincia del Chaco, Argentina. *Rev Argent Microbiol*. 2015; 47(2):88-94.
150. Blanco J. *Escherichia coli* enteroagregativa O104:H4-ST678 productora de Stx2a. ¿Diagnóstico microbiológico ya, de este y otros serotipos de STEC/VTEC! *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2012; 30(2):84-9.
151. Orden JA, Domínguez-Bernal, G., Horcajo, P., Ruiz-Santa-Quiteria, J.A., García, Á. and Carrión, J. Ruminants are not a reservoir of enteroaggregative *E. coli*. *Austral J Vet Sci*. 2017; 1:25-6.
152. Nataro J, Steiner, T. and Guerrant, RL. Enteroaggregative *Escherichia coli*. *Emer Infect Dis*. 1998; 4(2).
153. Panchalingam S, Antonio, M., Hossain, A., *et al*. Diagnostic microbiologic methods in the GEMS-1 case/control study. *Clin Infect Dis*. 2012; 55:294-302.
154. Canizalez-Roman A, Flores-Villaseñor, HM., González-Nuñez, E., Velázquez-Roman J., Vidal, JE., Muro-Amador, S., *et al*. Surveillance of Diarrheagenic *Escherichia coli* Strains Isolated from Diarrhea Cases from Children, Adults and Elderly at Northwest of Mexico. *Front Microbiol* .2016; 7(1924).
155. Patzi-Vargas S, *et al*. Diarrheagenic *Escherichia coli* Carrying Supplementary Virulence Genes Are an Important Cause of Moderate to Severe Diarrhoeal Disease in Mexico. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015; 9(3).
156. Boll EJ, Ayala-Lujan, J., Szabady, R.L., Louissaint, C., Smith, R.Z., Krogfelt, K.A., Nataro, J.P., Ruiz-Perez, F. and McCormick, B.A. Enteroaggregative *Escherichia coli* adherence fimbriae drive inflammatory cell recruitment via interactions with epithelial MUC1. *mBio*. 2017;8.
157. Olesen B, Scheutz, F., Andersen, RL. *et al*. Enteroaggregative *Escherichia coli* O78:H10, the cause of an outbreak of urinary. *J Clin Microbiol*. 2012; 50:3703-11.
158. Paddock ZD, Bai, J., Shi, X., Renter, D.G. and Nagaraja, T.G. Detection of *Escherichia coli* O104 in the feces of feedlot cattle by a multiplex PCR assay designed to target major genetic traits of the virulent hybrid strain responsible for the 2011 German outbreak. *Appl Environ Microbiol* 2013; 79(3522-25).

159. Boisen N, Krogfelt, K.A., and Nataro, J.P. Enteroaggregative *Escherichia coli*. *Escherichia coli*. 2nd Ed: Academic Press; 2013. p. 247-73.
160. Steiner TS. The Worst of Both Worlds: Examining the Hypervirulence of the Shigatoxigenic/Enteroaggregative *Escherichia coli* O104:H4. *The Journal of Infectious Diseases*. 2014; 210:1860-2.
161. Dias RCB, dos Santos, B.C., dos Santos, L.F., Vieira, M.A, Yamatogi, R.S., Mondelli, A.L., *et al*. Diarrheagenic *Escherichia coli* pathotypes investigation revealed atypical enteropathogenic *E. coli* as putative emerging diarrheal agents in children living in Botucatu, Sao Paulo State, Brazil. *APMIS*. 2016; 124: 299 -308.
162. Das J, Salam, RA., Hoda, M., Lassi, ZS & Bhutta, ZA. Interventions to control flies for preventing diarrhoea in children under five years of age. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2015(4).
163. Vázquez-Solís MG, Villa-Manzano, A. I., Medina-García, L.H., Zamora-López, X., Pulido-Galaviz, C. y Zamora-López, D. F. Tendencia de sensibilidad antimicrobiana en una terapia intensiva neonatal y pediátrica. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc*. 2016; 54(1):8-15.
164. Aarestrup F. The livestock reservoir for antimicrobial resistance: a personal view on changing patterns of risks, effects of interventions and the way forward. *Phil Trans R Soc*. 2015; 370.
165. Belkum AV, and Dunne, W. M. Next-generation antimicrobial susceptibility testing. *J Clin Microbiol* 2013; 51(7):2018-24.
166. Momtaz H, Rahimi, E. and Moshkelani, S. Molecular detection of antimicrobial resistance genes in *E. coli* isolated from slaughtered commercial chickens in Iran. *Veter Med*. 2012;57(4):193-7.
167. Martens E, and Demain, AL. The antibiotic resistance crisis, with a focus on the United States. *J Antibiot*. 2017; 12:1-7.
168. García CV. Resistencia antibiótica de *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* y *Proteus* spp., en el Hospital Regional de Occidente de Quetzaltenango. Universidad de San Carlos; Guatemala.2014.
169. Cruz-Cruzso EM. Antibióticos vs. resistencia bacteriana. *Revista Electrónica Dr Zoilo E Marinello Vidaurreta*. 2015; 40(2).
170. Nakayama T, Jinnai, M., Kawahara, R., Thi Diep, K., Nam, Nguyen, T., Thi -Hoa, T., *et al*. Frequent use of colistin-based drug treatment to eliminate extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in backyard chicken farms in Thai Binh Province, Vietnam. *Trop Anim Health Prod* 2017; 49:31-7.
171. Corona A, and Colombo, R. Towards the end of the antibiotic era: let's save the ancient soldier Colistin! *Intensive Care Med*. 2013; 39:1660-11.
172. Canizalez-Roman A, Gonzalez-Nunez, E., Vidal, J. E., Flores-Villasenor, H., and Leon-Sicairos, N. . Prevalence and antibiotic resistance profiles of diarrheagenic *Escherichia coli* strains isolated from food items in northwestern Mexico. *J Food Microbiol*. 2013;164(36-45).
173. Ruiz del Castillo B. VL, Román E.J., Guerra B., Carattoli A., Torres C, and Martínez-Martínez L. Molecular characterization of multiresistant *Escherichia coli* producing or not extended-spectrum β -lactamases. *BMC Microbiology*. 2013; 13(84):1-12.

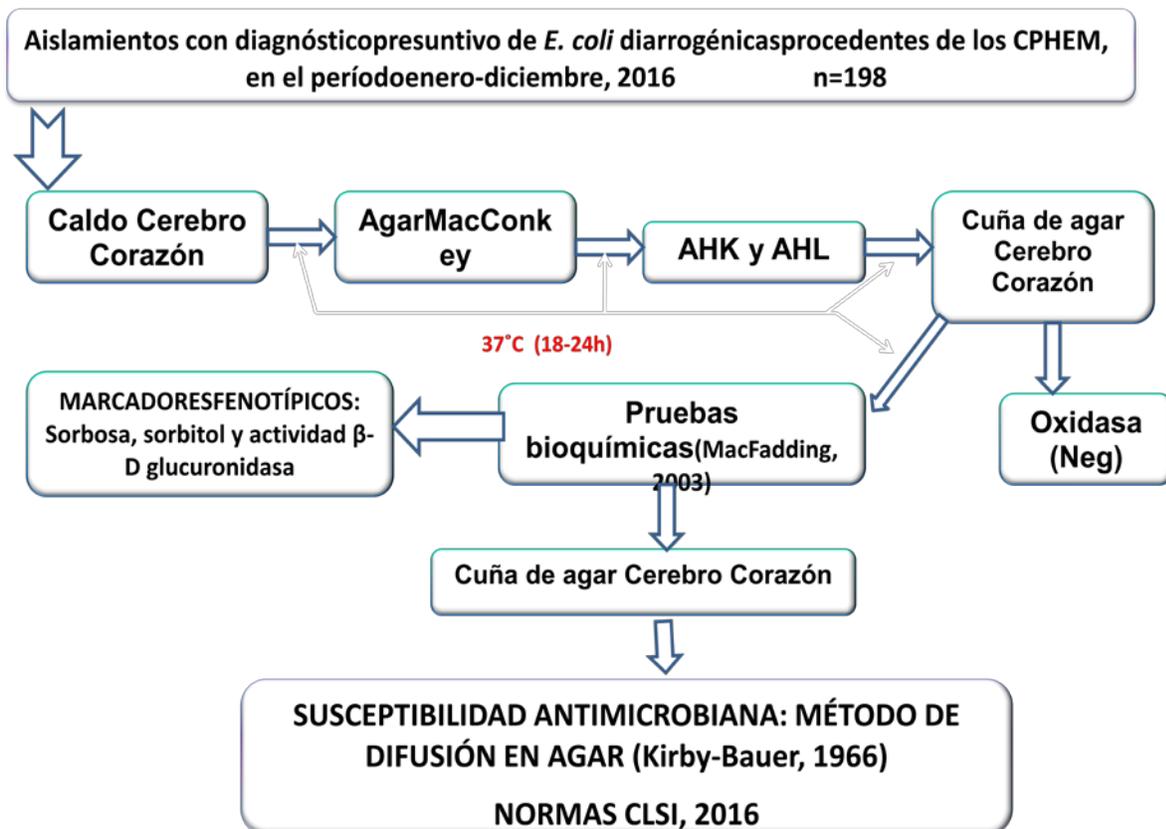
174. MacFaddin J. Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. 3^{era} ed. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana; 2003.
175. March S, and Ratman, S. Sorbitol-MacConkey medium for detection of *E coli* O157: H7 associated with hemorrhagic colitis. J clinMicrobiol 2002; 2 3:869-72.
176. Blanco J, and Blanco, M. ECET, ECNC y ECVT de origen humano y bovino. Patogénesis, epidemiología y diagnóstico microbiológico. Diputación Provincial San Marcos. Lugo (Galicia). España. : Servicios de publicaciones. ; 2000.
177. Cordero Rodríguez M, Barreto Argilagos, G., Sanchén Casas, A., Hernández Cisneros, R.I. *et al.* Diagnóstico de *Escherichia coli* enterohemorrágica en niños con diarrea. Revista "ArchMéd Camagüey" 2006; 10(3).
178. Águila A, Bernedo, R., Llop, A., Ramírez, M., Bravo, L., Fernandez, A., and Ledo, Y. Estudio de marcadores fenotípicos y de susceptibilidad antimicrobiana en cepas de *Escherichia coli* entéricas. Rev Cub Med Trop. 2007; 59(2).
179. Norma Interna DIBICO. Standart Methods for examination of water and wastewater. In: Association APH, editor. 15th ed. Washington D.C1980
180. Camacho A, Giles, M., Ortegón, A., Palao, M., Serrano, B., y Velázquez, O. Método para la determinación de bacterias coliformes, coliformes fecales y *Escherichia coli* por la técnica de dilución en tubo múltiple (Número más Probable o NMP). Técnicas para el análisis microbiológicos de los alimentos. 2^a ed. México: Facultad de Química, UNAM; 2009.
181. Rivas M, Leotta, G., y Chinen, I. Diagnóstico y caracterización de *Escherichia coli* O157 productor de toxina Shiga a partir de alimentos. In: ANLIS, editor: Centro Regional de Referencia del WHO Global SalmSurv para América del Sur. Argentina.; 2008.
182. Bauer A., Kirby., Sherris J. C., and Turk M. . Antibiotics susceptibility testing by a standardized single disk method. Am J Clin Pathol. 1966; 45:493-6.
183. CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). Performance Standard for Antimicrobial Susceptibility Testing; Seventeenth Informational Supplement M100S25. 2016.
184. Magiorakos AP, *et al.* Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. Euro Clin Microbiol-Infect Dis. 2012; 18:268-81.
185. Cergole-Novella M.C., and Guth B.E.C. Adhesion, biofilm and genotypic characteristics of antimicrobial resistant *Escherichia coli* isolates. Brazilian J Microbiol 2015; 46(1):167-71.
186. Gómez-Duarte OG, Bai, J., and Newell, E. Detection of *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Yersinia enterocolitica*, *Vibrio cholerae*, and *Campylobacter* spp enteropathogens by 3-reaction multiplex polymerase chain reaction. Diagnostic . 2009. Microbiol Infect Dis. 2009;63:1-9.
187. Bertin Y, Boukhors, K., Pradel, N., Livrelli, V., and Martin, C. Stx2 subtyping of Shiga toxin producing *Escherichia coli* isolated from cattle in France: detection of a new stx2 subtype and correlation with additional virulence factors. J Clin Microbiol. 2001; 39 (9):3060-65.
188. Alak A, *et al.* Antibioqram Typing and ERIC-PCR Genotyping of *Escherichia coli* isolated from different Clinical Samples. J Pharm Pharmaceut Sci. 2014; 3(7):27-37.

189. Millán Y, Hernández, E., Millán, B., y Araque, M. Distribución de grupos filogenéticos y factores de virulencia en cepas de *Escherichia coli* uropatógena productora de β -lactamasa CTX-M-15 aisladas de pacientes de la comunidad en Mérida, Venezuela. *Rev Argent Microbiol.* 2014; 46(3):175-81.
190. Eisenstein B. The polymerase chain reaction. A new method of using molecular genetics for medical diagnosis. *New Engl J Med* 1990; 322:178-83.
191. Bozçal E. YG, Uzel A., and aydemir S. Ş. Investigation of enteropathogenic *Escherichia coli* and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* associated with hemolytic uremic syndrome in İzmir Province, Turkey. *Turkish Journal of Medical Sciences.* 2016; 46: 733-41.
192. Valdés-Dapena MM. Enterobacterias. *Microbiología y parasitología médica.* Ciudad de La Habana.: Editorial Ciencias Médicas.; 2001. p. 251-80.
193. Dominguez-Guilarte OL. Estandarización del diagnóstico de *Escherichia coli* con capacidad de producir verotoxinas y enterohemolisina. La Habana: Universidad de La Habana; 2004.
194. Hernández Velázquez E. Susceptibilidad antimicrobiana de *Escherichia coli* entérica aisladas de pacientes con procesos diarreicos agudos. La Habana: Ciencias Médicas de Girón.; 2014.
195. Hien BTT, Scheutz, F., Cam, P.D., Serichantalergs, O., Huong, T.T., Thu, D.T and Dalsgaard, A. Diarrheagenic *Escherichia coli* and *Shigella* Strains Isolated from Children in a Hospital Case-Control Study in Hanoi, Vietnam. *J Clin Microbiol.* 2008; 46(3).
196. Rodríguez-Noriega E, León-Garnica, G., Petersen-Morfín, S., Pérez-Gómez, H., González-Díaz, E. and Morfín-Otero, R. . La evolución de la resistencia bacteriana en México, 1973-2013. *Biomédica.* 2014; 34:181-90.
197. Yang Q, Wang, H., Sun, H., Chen, H., Xu, Y., and Chen, M. Phenotypic and Genotypic Characterization of Enterobacteriaceae with Decreased Susceptibility to Carbapenems: Results from Large Hospital-Based Surveillance Studies in China. *Antimicrob Agents Chemoth.* 2010; 54(1):573-7.
198. Betrán A, Cortés, A.M., and López, C. Evaluación de la resistencia antibiótica de *Escherichia coli* en infecciones urinarias adquiridas en la comunidad del Sector Sanitario de Barbastro (Huesca). *Rev Esp Quimioter* 2015; 28(5):263-66.
199. Alós JI. Resistencia bacteriana a los antibióticos: una crisis global. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2015; 53(10):692-9.
200. Osella M, Nugent, E and Lagomarsino, MC. Concerted control of *Escherichia coli* cell division. *PNAS.* 2014; 111(9):3431-35
201. Rodríguez Pérez A. Determinación de patotipos de *Escherichia coli* entérico y el antibiotipo del genogrupo dominante. Universidad de La Habana.; La Habana: 2014.
202. Díaz García E. Susceptibilidad antimicrobiana de *Escherichia coli* entéricas y la relación de patotipos con patrones de multirresistencia. Universidad de La Habana; La Habana: 2014.
203. Wang C, Yang, L., Shah, A.A., Choi, E.S., and Kim, SW. Dynamic interplay of multidrug transporters with TolC for isoprenol tolerance in *Escherichia coli*. *Sci Rep.* 2015; 5:1-8.

204. Paniagua-Contreras GL, Monroy-Pérez, E., Rodríguez-Moctezuma, J. R., Domínguez-Trejo, P., Vaca-Paniagua, F., and Vaca, S. Virulence factors, antibiotic resistance phenotypes and O-serogroups of *Escherichia coli* strains isolated from community-acquired urinary tract infection patients in Mexico. *J Microbiol-Immunol Infect.* 2015; xx:1-8
205. Den Reijer PM, van Burgh, S., Burggraaf, A., Ossewaarde, J.M., and van der, Z.A. The Widespread Presence of a Multidrug-Resistant *Escherichia coli* ST131 Clade among Community-Associated and Hospitalized Patients. *PLoS ONE.* 2016; 11(3).
206. DeFrancesco AS, Tanih, N. F., Samie, A., Guerrant, R. L., and Bessong, P. O. Antibiotic resistance patterns and beta-lactamase identification in *Escherichia coli* isolated from young children in rural Limpopo Province, South Africa: The MAL-ED cohort. *S Afr Med J.* 2017; 107(3):205-14.
207. Hannaoui E, Villalobos, L., Martínez, R., Maldonado, A., Hagel, I., y Bastardo, J. *Escherichia coli* diarreogénica asociada a casos de diarrea aguda en niños de Cumaná, Venezuela. *Invest Clin.* 2010; 51(4):489-500.
208. Tobias J KE, Rubinstein U, Bialik A, Vutukuru SR, Navaro A, *et al.* Involvement of main diarrheagenic *Escherichia coli*, with emphasis on enteroaggregative *E. coli*, in severe non-epidemic pediatric diarrhea in a high-income country. *BMC Infectious Diseases.* 2015; 15(79):1-7.
209. Weiler N,. Orrego, M., Alvarez, M., and Huber, C. Detección molecular de *Escherichia coli* diarreogénica en pacientes pediátricos con síndrome diarreico agudo en Paraguay. *Mem Inst Investig Cienc Salud* 2017; 15(1):16-21.
210. Ayaz N, Gencay, YE and Erol, I. Phenotypic and genotypic antibiotic resistance profiles of *Escherichia coli* O157 from cattle and slaughterhouse wastewater isolates. *Ann Microbiol.* 2015; 65:1137-44.

ANEXOS

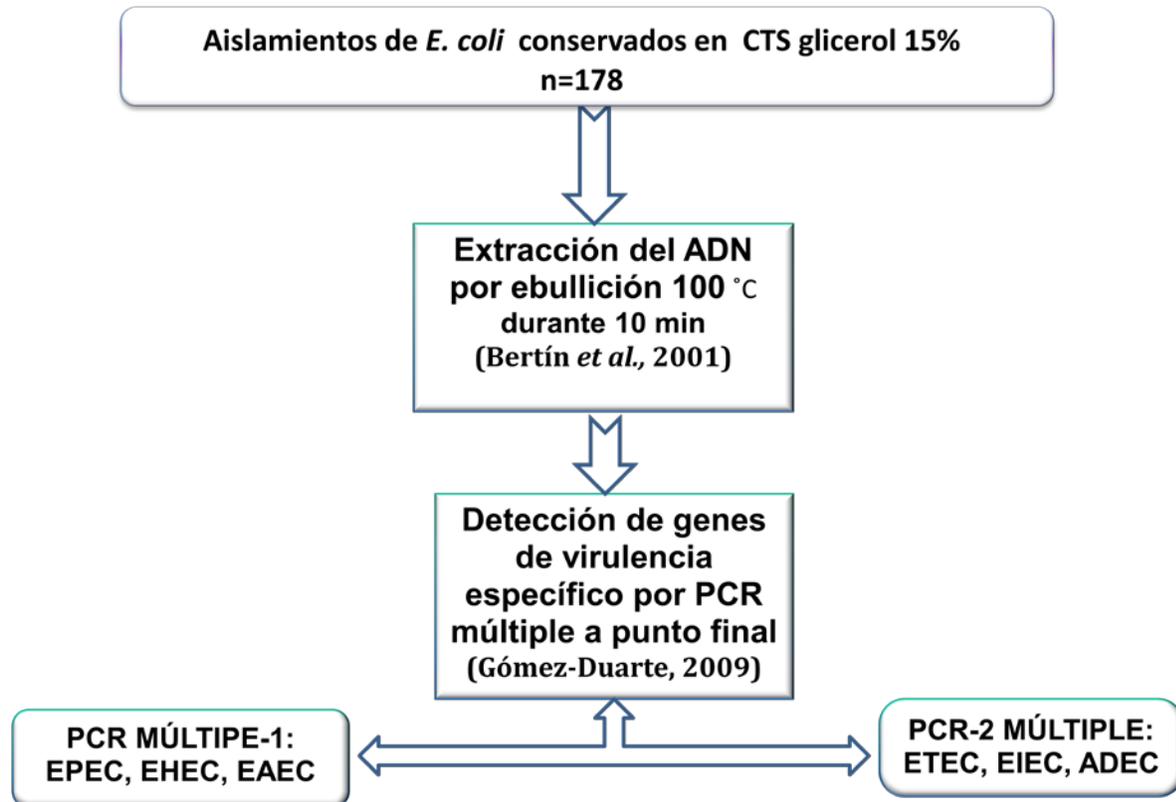
Anexo #1: Flujoograma para la identificación fenotípica de *E. coli*.



Anexo #2: Tabla 1: Discos de antibióticos para evaluar la susceptibilidad de los aislados y sus respectivos puntos de cortes según las normas del CLSI, 2016.

Familia de antimicrobianos	Agentes antimicrobianos	Concentración en el disco(μg)	Diámetros en mm para definir categorías		
			R	I	S
Aminopenicilinas	Ampicilina (AMP)	10 μg	≤ 13	14-16	≥ 17
Cefalosporinas	Ceftriaxona (CRO)	30 μg	≤ 13	14-20	≥ 21
	Cefotaxima (CTX)	30 μg	≤ 26	23-25	≥ 22
Aminoglucósidos	Gentamicina (CN)	10 μg	≤ 12	13-14	≥ 15
	Amikacina (AK)	30 μg	≤ 14	15-16	≥ 17
Quinolonas	Ciprofloxacina (CIP)	5 μg	≤ 15	16-20	≥ 21
	Ácido Nalidíxico (NA)	30 μg	≤ 13	14-18	≥ 19
Tetraciclina	Tetraciclina (T)	30 μg	≤ 14	15-18	≥ 19
Sulfamidas/ Diaminopirimidinas	Trimetoprim-sulfametoxazol (STX)	1.25/23.75 μg	≤ 10	11-15	≥ 16
Anfenicoles	Cloramfenicol (C)	30 μg	≤ 12	13-17	≥ 18
Nitrofuranos	Nitrofurantoína (F)	300 μg	≤ 14	15-16	≥ 17

Anexo #3: Flujograma para la identificación genotípica de ECD.



Anexo #4: Resultados de la corrida electroforética mPCR-1.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21

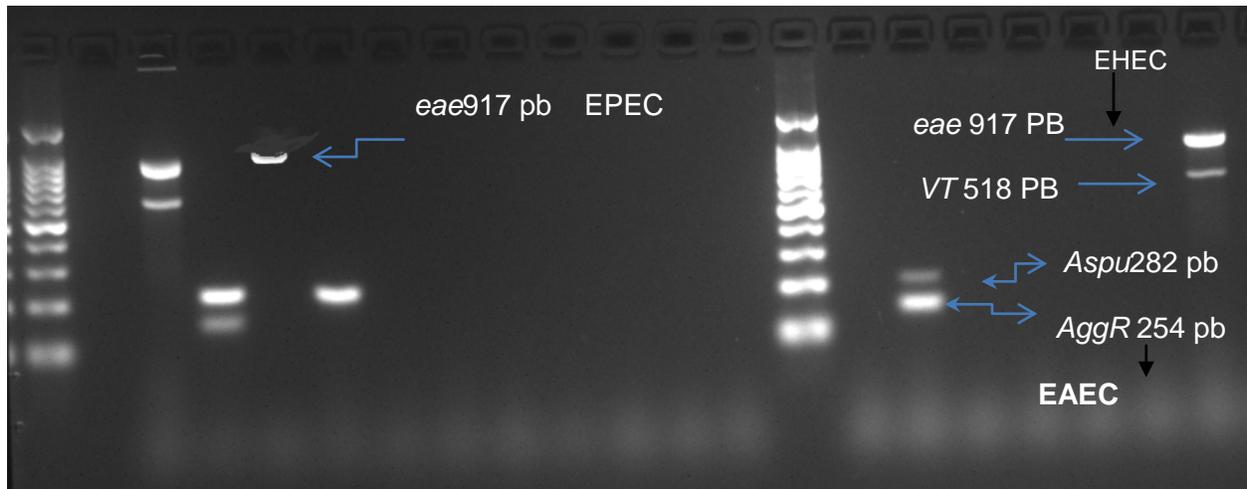


Figura: Corrida electroforética donde se aprecian los productos amplificados correspondientes a la mPCR-1. En el carril 1: patrón de peso molecular 100pb, carril 2: cepa *E. coli* DH5 α control (-), carril 3 cepa EHEC, carril 4EAEC, carril 5 EPEC, carril 6 EAEC, carriles del 7 al 13 aislamientos negativos, carril 14 patrón de peso molecular 100pb, Carril 15 aislado negativo, carril 16 EAEC, carriles negativos del 17 al 20 y carril 21EHEC.

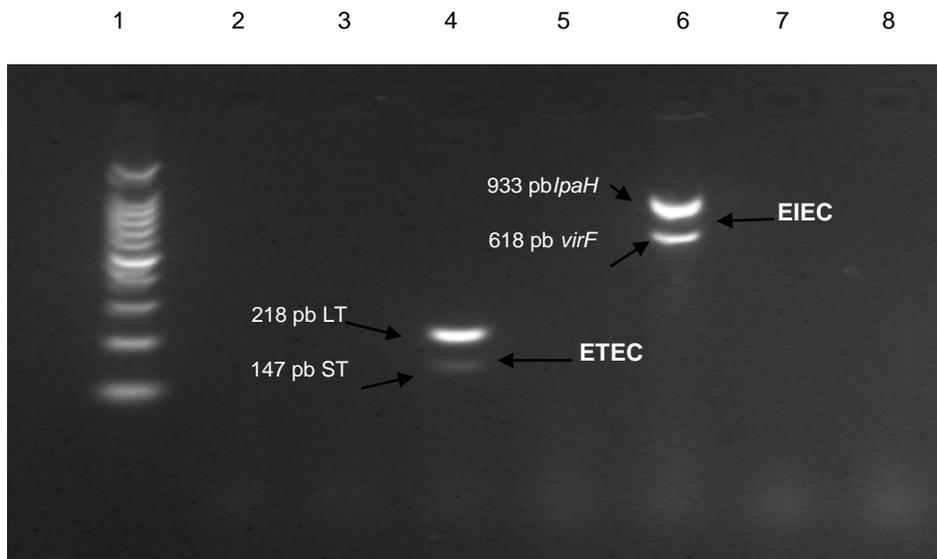
Anexo #5: Resultados de la corrida electroforética mPCR-2.
EIEC

Figura: Corrida electroforética donde se aprecian los productos amplificados correspondientes a la mPCR-2. En el carril 1: patrón de peso molecular 100pb, carril 2: cepa *E. coli* DH5 α control (-), carril 3 control de reactivo, carril 4 ETEC, carril 5 aislamiento negativo, carril 6 EIEC, carriles 7 y 8 aislamientos negativos.

Anexo #6 Tablas de contingencia: Tablas 2x2 simples.

Tipo de estudio : Transversal

Nivel de confianza: 95,0%

Tabla	Enfermos	Sanos	Total
Expuestos	48	79	127
No expuestos	14	37	51
Total	62	116	178

Prevalencia de la enfermedad	Estimación	IC(95,0%)	
En expuestos	0,377953	-	-
En no expuestos	0,274510	-	-
Razón de prevalencias (Katz)	1,376828	0,836050	2,267393

Prevalencia de exposición	Estimación	IC(95,0%)	
En enfermos	0,774194	-	-
En no enfermos	0,681034	-	-
Razón de prevalencias (Katz)	1,136791	0,946444	1,365419

OR	IC(95,0%)		
1,605787	0,787939	3,272524	(Woolf)
	0,793298	3,244415	(Cornfield)

Prueba Ji-cuadrado de asociación	Estadístico	Valor p
Sin corrección	1,7153	0,1903
Corrección de Yates	1,2899	0,2561

Prueba exacta de Fisher	Valor p
Unilateral	0,1275
Bilateral	0,2250