



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS  
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

**UNIDAD ZACATENCO**

**DEPARTAMENTO DE BIOMEDICINA MOLECULAR**

**“Caracterización de los factores asociados a la severidad de la diarrea  
causada por los patogrupos de *Escherichia coli*”**

**TESIS**

Que presenta

**M. en C. Mario Alonso Meza Segura**

Para obtener el grado de

**DOCTOR EN CIENCIAS**

**EN LA ESPECIALIDAD DE BIOMEDICINA MOLECULAR**

**Directora de tesis:**

Dra. María Teresa Estrada García



El presente trabajo se realizó en Departamento de Biomedicina Molecular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV-IPN), bajo la dirección de la Dra. María Teresa Estrada García.

Este trabajo se realizó con el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), mediante la beca 300845.



## **AGRADECIMIENTOS**

A mi padre, porque sus enseñanzas me han guiado hasta el lugar en que me encuentro ahora.

A mi familia, en especial a mi madre y a mis hermanos, porque siempre han estado presentes en mi vida, tanto en la adversidad como en los momentos de mayor alegría. Han sabido guiarme y hacer de mí una mejor persona.

A la Dra. María Teresa Estrada García, por tener confianza en mí y aceptarme como su alumno a pesar de que las circunstancias se encontraban en mi contra. Gracias a su apoyo pude cumplir los sueños que por un momento creí perdidos.

A Mayra Rojas, por acompañarme estos últimos años y mostrarme un mundo nuevo a través de las emociones.

A mis amigos, porque simplemente la vida no sería lo mismo sin ellos.

A mis compañeros de laboratorio, por aceptarme y brindarme su apoyo cada que fue necesario.



## ÍNDICE GENERAL

|   |            |
|---|------------|
| <b>RESUMEN</b> .....  | <b>III</b> |
| <b>ABSTRACT</b> .....   | <b>V</b>   |
| <b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....  | <b>1</b>   |
| 1.1. Triada ecológica de la enfermedad .....  | 1          |
| 1.1.1. Ambiente.....  | 2          |
| 1.1.2. Agente causante.....   | 2          |
| 1.1.2.1. Patogrupos de E. coli Diarreogénicos (PED).....                                | 4          |
| 1.1.2.2. Carga bacteriana de patógenos intestinales .....                               | 10         |
| 1.1.2.3. Factores de virulencia .....   | 12         |
| 1.1.3. Hospedero .....  | 19         |
| 1.1.3.1. Edad.....  | 19         |
| 1.1.3.2. Estatus nutricional.....   | 19         |
| <b>2. HIPÓTESIS</b> .....   | <b>21</b>  |
| <b>3. JUSTIFICACIÓN</b> .....   | <b>23</b>  |
| <b>4. OBJETIVO GENERAL</b> .....  | <b>25</b>  |
| <b>5. OBJETIVOS PARTICULARES</b> .....  | <b>27</b>  |
| <b>6. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....  | <b>29</b>  |
| 6.1. Recolección de muestras.....   | 29         |
| 6.2. Obtención de datos clínicos y determinación de la severidad de la enfermedad ..... | 29         |
| 6.3. Aislamiento e identificación de E. coli por pruebas bioquímicas.....               | 31         |
| 6.4. Identificación de los PED por PCR punto final.....                                 | 32         |
| 6.4.1. PCR multiplex para la detección de ETEC, EPEC, EIEC y EHEC-STEC.....             | 32         |
| 6.4.2. PCR multiplex para la detección de EAEC y DAEC.....                              | 32         |
| 6.4.3. Detección de productos amplificados.....   | 33         |
| 6.5. Detección de genes de virulencia suplementarios.....                               | 33         |
| 6.5.1. Toxinas .....  | 34         |
| 6.5.2. UPEC .....   | 34         |
| 6.5.3. ExPEC.....   | 34         |
| 6.5.4. HlyA-EHEC.....   | 34         |
| 6.5.5. SPATES.....  | 35         |
| 6.5.6. O-122 + EspC .....   | 35         |
| 6.6. Cuantificación de la carga bacteriana de EPEC en muestras de heces .....           | 36         |

|            |  |            |
|------------|--|------------|
| 6.6.1.     | Obtención de DNA a partir de muestras de heces con concentraciones conocidas de EPEC                                 | 36         |
| 6.6.2.     | Estandarización de la Curva tipo de amplificación.....   | 37         |
| 6.6.3.     | Purificación de DNA a partir de heces.....   | 37         |
| 6.6.4.     | Cuantificación de la carga bacteriana en muestras de pacientes.....  | 37         |
| 6.7.       | Secuenciación del genoma completo de aislados de E. coli .....   | 38         |
| 6.7.1.     | Purificación de DNA de las cepas de referencia.....  | 38         |
| 6.7.2.     | Secuenciación y ensamblaje de los genomas.....   | 38         |
| 6.7.3.     | Análisis filogenético de los genomas de EAEC y DAEC.....   | 39         |
| 6.7.4.     | Identificación y análisis filogenético de las fimbrias AAF y de las adhesinas Afa/Dr/F1845 .....                     | 39         |
| 6.7.5.     | Identificación de genes de virulencia.....   | 40         |
| 6.8.       | Análisis estadístico .....   | 40         |
| <b>7.</b>  | <b>RESULTADOS .....</b>  | <b>41</b>  |
| 7.1.       | Prevalencia de los PED en niños menores de 5 años con diarrea aguda.....   | 41         |
| 7.2.       | Caracterización del cuadro clínico de los pacientes donde se identificó a EPEC, EAEC o DAEC como patógeno único..... | 43         |
| 7.3.       | Identificación de los perfiles genéticos de las cepas de EPEC, EAEC y DAEC.....                                      | 49         |
| 7.4.       | Cuantificación de la carga bacteriana de EPEC .....  | 56         |
| 7.5.       | Secuenciación del genoma de las cepas de EAEC y DAEC asociadas a casos severos de diarrea                            | 58         |
| 7.5.1.     | Análisis filogenético de los genomas de EAEC y DAEC.....   | 59         |
| 7.5.2.     | Identificación y análisis filogenético de las fimbrias AAF y de las adhesinas Afa/Dr/F1845 .....                     | 62         |
| 7.5.3.     | Caracterización del perfil genético de EAEC, DAEC y de las cepas comensales de E. coli                               | 66         |
| <b>8.</b>  | <b>DISCUSIÓN.....</b>  | <b>69</b>  |
| <b>9.</b>  | <b>CONCLUSIONES.....</b>   | <b>83</b>  |
| <b>10.</b> | <b>PERSPECTIVAS .....</b>  | <b>85</b>  |
| <b>11.</b> | <b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>  | <b>87</b>  |
| <b>12.</b> | <b>TABLAS SUPLEMENTARIAS .....</b>   | <b>101</b> |



## RESUMEN

La diarrea continua siendo una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en niños <5 años alrededor del mundo. Los Patogrupos de *E. coli* Diarreogénicas (PED) se encuentran entre los principales agentes etiológicos de la diarrea, tanto aguda como persistente. En este trabajo se determinó la prevalencia de diferentes patógenos intestinales en 893 niños <5 años de edad que requirieron hospitalización por diarrea en Yucatán, México, en un periodo de 4.5 años. Los PED resultaron ser los patógenos más prevalentes (31%), incluso por arriba de Rotavirus (22.5%), *Salmonella* (11.3%) y *Shigella* (10.8%). De entre estos, los más frecuentes fueron *E. coli* enterodifusa (DAEC; 36.6%), *E. coli* enteroagregativa (EAEC; 20.3%) y *E. coli* Enteropatógena (EPEC; 17.8%). Se seleccionaron 90 casos donde estos PED se identificaron como los únicos patógenos y se analizó su cuadro clínico. En general, la desnutrición y la edad no se asociaron a la severidad de la diarrea. De forma particular, EPEC se vinculó a la diarrea en niños <5 meses de edad, mientras que DAEC se asoció a vómito y principalmente a casos moderados y graves. Las cepas de EPEC con la isla O-122 se asociaron a casos con mayor carga bacteriana ( $P=0.0241$ ) y de severidad moderada ( $P=0.0498$ ). Además, aquellas que se aislaron de niños  $\geq 2$  años tuvieron más genes para toxinas que las de niños menores ( $P=0.0370$ ). En cambio, las muestras de heces de sujetos  $\geq 2$  años presentaron cargas bacterianas más elevadas ( $P=0.0409$ ). Respecto a EAEC, las cepas con una mayor cantidad de genes para adhesinas (principalmente *fimA*) se aislaron más frecuentemente de los niños <2 años ( $P=0.0309$ ). Asimismo, las que tenían los genes que codifican para las toxinas HlyA o Sat, estuvieron asociadas a casos graves de diarrea en niños <2 años ( $P<0.05$ ). De forma curiosa, los niños con diarrea moderada e infectados con EAEC tuvieron una edad promedio menor que los niños con diarrea leve o grave, además, las cepas aisladas de estos sujetos presentaron menos genes para toxinas ( $P<0.05$ ). Lo que sugiere que los casos moderados se debieron principalmente a una mayor susceptibilidad del hospedero, probablemente debido a que no había sido expuesto previamente al patógeno. También, las cepas de EAEC con más genes para adhesinas (principalmente *fimA*) se aislaron más frecuentemente de niños <2 años (0.0194). Por el contrario, el gen *sepA* fue más prevalente en las cepas de los niños  $\geq 2$  años ( $P=0.0413$ ). Respecto a los niños infectados con DAEC, las cepas que presentaron una mayor cantidad de genes para toxinas se asociaron a casos severos de diarrea ( $P=0.0127$ ), particularmente en niños <2 años ( $P=0.0353$ ). De manera similar a EAEC, las cepas de DAEC aisladas de niños <2 años presentaron una mayor cantidad de genes para adhesinas ( $P=0.0415$ ), especialmente *fimA* ( $P=0.0471$ ). Parte de este trabajo consistió en secuenciar el genoma de 10 aislados de EAEC, 10 de DAEC y una comensal de *E. coli*. El análisis del core-genoma de estas cepas, junto con 76 genomas previamente secuenciados (de bacterias comensales y patógenas), reveló que EAEC y DAEC están estrechamente relacionadas. De forma interesante, en el 50% de los genomas de DAEC se encontraron dos operones para las adhesinas Afa/Dr/F1845. AAF/I y Afa-V correspondieron a las adhesinas más prevalentes en EAEC y DAEC, respectivamente. Los genes que codifican para factores de virulencia asociados a la evasión de la respuesta inmune y a la adquisición de hierro resultaron ser más prevalentes en las cepas de DAEC. En cambio, en EAEC los genes más prevalentes fueron los que codifican para toxinas, la dispersina y el T6SS Aai. Finalmente, se detectó la presencia de sistema ETT2 en el 40 y el 12.5% de los genomas de DAEC y EAEC, respectivamente. Nuestros resultados confirman la importancia de los PED en la diarrea infantil y sugieren la participación de adhesinas y de toxinas en la patogénesis de estas bacterias, lo cual en un futuro ayudará a generar mejores métodos de diagnóstico y facilitará el desarrollo de estudios epidemiológicos.



## ABSTRACT

Diarrhea remains a major cause of morbidity and mortality among children <5 years of age from less developed regions of the world. Diarrheagenic *Escherichia coli* Pathogroups (DEP) are important etiological agents of acute and persistent diarrhea worldwide. We determined the prevalence of bacterial enteropathogens in 893 children <5 years old with acute diarrhea requiring hospitalization, in over a four and a half-year period in Yucatan, Mexico. DEP were the most common bacterial enteropathogens (31%) isolated from these children, surpassing Rotavirus (22.5%), *Salmonella* (11.3%) and *Shigella* (10.8%). Most predominant DEP were diffusely adherent *E. coli* (DAEC; 36.6%), enteroaggregative *E. coli* (EAEC; 20.3%), and enteropathogenic *E. coli* (EPEC; 17.8%). We selected 90 cases where EPEC, EAEC or DAEC were identified as unique pathogens and analyzed their clinical outcome. Analysis of all 90 cases revealed that neither malnutrition nor age were associated to severe diarrhea. Particularly, EPEC infections were linked to diarrhea in children <5 months of age while DAEC infections were associated with vomit and mostly with moderate to severe clinical outcomes. EPEC strains carrying the O-122 pathogenicity island were more likely to exhibit higher bacterial loads ( $P=0.0241$ ) and to be isolated from cases of moderate diarrhea ( $P=0.0498$ ). Moreover, EPEC strains isolated from children  $\geq 2$  years old carried more toxin-encoding genes than isolates from younger children ( $P=0.0370$ ). In contrast, stool samples from children <2 years had higher bacterial loads ( $P=0.0409$ ). Concerning EAEC, strains carrying a higher number of adhesin-encoding genes (mainly *fimA*) had a greater chance to induce moderate to severe diarrhea ( $P=0.0309$ ), mostly on children <2 years of age ( $P=0.0194$ ). Likewise, EAEC strains carrying genes encoding for HlyA or Sat toxins were more likely to be isolated from cases of severe diarrhea on children <2 years old ( $P<0.05$ ). Curiously, EAEC-infected children with moderate diarrhea were younger than children with mild or severe diarrhea, and the strains isolated from these cases carried less toxin-encoding genes ( $P<0.05$ ). Suggesting that moderate cases were due to a higher susceptibility of the host, probably because they had never been exposed to the pathogen before. Furthermore, EAEC strains carried more adhesin-encoding genes (mainly *fimA*) when isolated from children <2 years of age ( $P=0.0194$ ). On the contrary, the SepA-encoding gene was more prevalent in isolates from children  $\geq 2$  years old ( $P=0.0413$ ). About DAEC infections we observed that strains carrying a higher number of toxin-encoding genes were associated with moderate to severe diarrhea outcomes ( $P=0.0127$ ), especially in children <2 years of age ( $P=0.0353$ ). Similarly to EAEC, DAEC strains isolated from children <2 years old had a higher number of genes encoding for adhesins ( $P=0.0415$ ), especially *fimA* ( $P=0.0471$ ). Moreover, we sequenced the genomes of 10 EAEC, 10 DAEC strains and one commensal *E. coli* strain. The core genome analysis of all these strains, together with 76 previously sequenced *E. coli* genomes (pathogenic and commensal strains), revealed that EAEC and DAEC strains are closely related. Notably, we found that 50% of DAEC genomes harbored two operons encoding for Afa/F1845/Dr adhesins. AAF/I and Afa-V were the most prevalent adhesins among EAEC and DAEC genomes, respectively. Genes encoding for virulence factors involved in evasion of the immune system and in iron acquisition were significantly more prevalent among DAEC strains, whereas among EAEC genomes were toxins, dispersin and the Aai T6SS. Finally, the still not very well characterized ETT2 system was found in 40 and 12.5% of DAEC and EAEC strains. Our findings confirmed the importance of EPEC, EAEC and DAEC strains in children's diarrhea, suggested the importance of certain adhesins and toxins in the pathogenesis of these bacteria and will help to generate improved diagnostic methods and to facilitate future epidemiological studies.



## 1. INTRODUCCIÓN

El síndrome diarreico (SD) es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en niños menores de 5 años a nivel mundial (Fischer Walker *et al.* 2012a; Fischer Walker *et al.* 2012b; Liu *et al.* 2016); en México representa la segunda causa general de morbilidad y la segunda causa de mortalidad por enfermedades infecciosas en este grupo etareo (Anuario de Morbilidad 1984-2015; INEGI, 2017). Las enfermedades diarreicas por lo general son consecuencia de la exposición a alimentos o agua contaminados, por lo que se relacionan de manera importante con la falta de acceso a instalaciones básicas de saneamiento y de agua potable. De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), cada año se registran dos mil millones de casos de diarrea en todo el mundo, observándose una mayor incidencia en los países en vías de desarrollo; donde los niños menores de tres años padecen en promedio 3.3 episodios de diarrea al año. Cerca de un 80% de las muertes por diarrea ocurren en los menores de 2 años y se relacionan principalmente con la deshidratación resultante (Bryce *et al.*, 2005).

En México el SD es responsables del 20% de la demanda de consulta en los servicios de salud y del 10% de las hospitalizaciones pediátricas. Para el 2010 se estimó una tasa de morbilidad de 4,590 por cada 100,000 habitantes, donde la población más afectada fueron los niños menores de 5 años (Perfil Epidemiológico de las Enfermedades Infecciosas Intestinales, 2012).

### 1.1. Triada ecológica de la enfermedad

La enfermedad es el resultado de la ruptura del equilibrio en el proceso “salud-enfermedad”. Lo cual es consecuencia de las interacciones entre los tres diferentes elementos que constituyen la triada ecológica de la enfermedad: el ambiente, el agente causante y el hospedero (Armijo-Rojas, 1993). Por lo tanto, la capacidad potencial de un microorganismo de causar enfermedad no puede abordarse estudiando de manera independiente al microorganismo o las características del hospedero. Este análisis debe realizarse de forma integral, puesto que la sintomatología y la severidad de la enfermedad son el resultado tanto del daño causado por el patógeno como del provocado por la respuesta inmunológica del mismo hospedero (Casadevall y Pirofski, 1999). El estudio de cada uno de los elementos de la triada ecológica de la enfermedad es fundamental para conocer mejor su participación en el desarrollo de las enfermedades gastrointestinales y para establecer los sistemas de control más convenientes.

### 1.1.1. Ambiente

Es el conjunto de factores físicos, biológicos y socioculturales que rodean al ser humano y que interactúan con éste, creando una interdependencia que puede ser tanto positiva como negativa; dando lugar a la salud o a la enfermedad (Scholthof, 2007).

La OMS estima que el 24% de los casos reportados de enfermedad y el 23% de todas las muertes (mortalidad prematura) a nivel mundial son atribuibles a factores ambientales. De manera particular, en niños menores de 14 años se estima una proporción de muertes del 36%, dependiendo de la región que se analice. Por ejemplo, a pesar de que en países en vías de desarrollo el 25% de las muertes totales se atribuyen a factores ambientales, en países industrializados sólo el 17% de las defunciones se atribuyen a estos factores (Prüss-Üstün y Corvalán, 2006).

Respecto al SD, el 94% del total de estos padecimientos se atribuye a factores ambientales tales como:

- Contaminación
- Pobreza
- Condiciones de la vivienda
- Hacinamiento
- Manejo de alimentos
- Calidad del agua potable

### 1.1.2. Agente causante

Anteriormente se definía como patógeno a cualquier microorganismo capaz de causar una enfermedad (Hoepflich, 1983; Youmas *et al.*, 1975). Sin embargo, este concepto se ha reestructurado y actualmente se entiende por patógeno a cualquier agente infeccioso que puede provenir del ambiente o del propio individuo y que sea capaz de causar daño en su hospedero, incluyendo tanto a los patógenos clásicos como a los microorganismos oportunistas (Casadevall y Pirofski, 1999).

Reportes recientes han demostrado que los principales agentes etiológicos involucrados en el desarrollo del SD en niños menores de cinco años incluyen a los Patogrupos de *E. coli* Diarreogénicos (PED), así como también a *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*, *Cryptosporidium* spp, Rotavirus, *Vibrio cholerae* y *Shigella* spp (Kotloff *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2014). Los estudios realizados por nuestro grupo de trabajo sobre la búsqueda intencionada de agentes patógenos en niños hospitalizados por diarrea aguda, han demostrado que la incidencia de los PED ha ido aumentando con el paso del tiempo, convirtiéndose en los principales agentes bacterianos causantes de SD; por arriba de *Salmonella* y *Shigella* (Tabla 1) (Cerna-Cortes *et al.*,

2003; Pacheco-Gil, 2007; Patzi-Vargas *et al.*, 2015). Cabe hacer notar que a pesar de que la introducción de la vacuna de Rotavirus en el año 2007 ha conducido a una disminución en la incidencia de este patógeno y un decremento en la tasa de mortalidad por SD, la diarrea sigue siendo una de las principales causas de morbilidad en niños menores de cinco años, afectando principalmente al grupo entre los 1-4 años de edad (Anuario de Morbilidad 1984 -2015; Perfil Epidemiológico de las Enfermedades Infecciosas Intestinales, 2012).

**Tabla 1.** Principales agentes etiológicos causantes del SD en niños menores de 5 años que requieren hospitalización en México.

|                              | <b>CDMX</b><br><b>Mar 1998-Feb 2001</b><br><b>n (%)</b> | <b>Villahermosa, Tab.</b><br><b>Feb 2003-Feb 2006</b><br><b>n (%)</b> | <b>Mérida, Yuc.</b><br><b>Ene 2007-Dic 2011</b><br><b>n (%)</b> |
|------------------------------|---|---|---|
| <b>Patógeno identificado</b> | <b>N=1129</b>   | <b>N=620</b>  | <b>N=831</b>  |
| Rotavirus                    | 461 (41)  | 197 (32)  | -   |
| PED                          | 133 (12)  | 140 (22.5)  | 232 (28)  |
| <i>Shigella</i> spp.         | 145 (13)  | 23 (4)  | 73 (9)  |
| <i>Salmonella enterica</i>   | 52 (5)  | 7 (1)   | 103 (12)  |
| <i>Campylobacter</i> spp.    | 28 (2.5)  | 4 (0.6)   | 39 (5)  |
| Referencia                   | Cerna-Cortes <i>et al.</i> , 2003                       | Pacheco-Gil, 2007   | Patzi-Vargas <i>et al.</i> , 2015                               |

### 1.1.1. *Escherichia coli*

*Escherichia coli* es un bacilo anaerobio facultativo Gram negativo que forma parte de la microbiota intestinal del ser humano (así como también de otros mamíferos) y que comúnmente coloniza su tracto gastrointestinal pocas horas después de su nacimiento. Las cepas comensales de *E. coli* no provocan daños sobre su hospedero, excepto en sujetos inmunocomprometidos o cuando la barrera gastrointestinal presenta un daño mayor (ej. peritonitis). Sin embargo, existen algunas cepas de *E. coli* altamente adaptadas, las cuales han adquirido factores de virulencia (FV) a través de mecanismos de transferencia horizontal (MTH), los cuales les han conferido la habilidad de adaptarse a nuevos nichos y de causar un amplio espectro de enfermedades (Kaper *et al.* 2004).

El nicho natural de *E. coli* es la capa mucosa del colon, siendo el microorganismo anaerobio facultativo más abundante de la microbiota intestinal humana. No obstante, los diversos grupos patógenos de *E. coli* son capaces de residir en diferentes tejidos del cuerpo y pueden causar tres síndromes clínicos diferentes:

1. Enfermedades entéricas/diarreicas: causadas por los PED
2. Infecciones del tracto urinario (ITU): causadas por cepas uropatógenas denominadas UPEC.
3. Sepsis/meningitis

#### 1.1.2.1. Patogrupos de *E. coli* Diarreogénicos (PED)

Las diversas cepas de *E. coli* identificadas como agentes etiológicos de enfermedades diarreicas se han agrupado en seis patogrupos, los cuales se han definido con base en la presencia de FV específicos y con asociaciones clínicas de la enfermedad causada por los mismos (Kaper *et al.* 2004).

***E. coli* enteropatógena típica (EPECt):** las cepas que componen este patogrupo se caracterizan por producir lesiones histopatológicas características, conocidas como de adherencia esfacelamiento (A/E) en las células epiteliales intestinales, así como también por poseer el plásmido de virulencia EAF (“EPEC adherence factor”), el cual codifica para la fimbria BFP (Bundle-Forming Pilus”), encargada de mediar la adherencia interbacterial y que posiblemente participe en la adhesión inicial de la bacteria al enterocito. En la Lesión A/E la bacteria se une de manera íntima a las células epiteliales, promoviendo la reorganización de su citoesqueleto, ocasionando la pérdida de las microvellosidades y alterando la función normal del enterocito (Celli *et al.*, 2000); lo que culmina en la formación de un pedestal sobre el cual se postra la bacteria. La habilidad de inducir esta lesión se encuentra codificada en una isla de patogenicidad de 35 Kb conocida como LEE (“Locus of Enterocyte Effacement”) (McDaniel *et al.*, 1995) .En ésta se encuentran los genes correspondientes al sistema de secreción tipo III encargado de mediar la translocación de la proteína Tir (Translocated intimin receptor) al interior del enterocito, donde es redirigida a la membrana celular y funciona como receptor de la proteína Intimina (codificada por el gen *eaeA*), la cual se encuentra anclada a la membrana externa de EPEC. La interacción Intimina-Tir promueve una adhesión íntima de la bacteria a la célula epitelial e induce la activación de una cascada de señalización que culmina en rearrreglos de actina en el citoesqueleto del enterocito (Jerse *et al.*, 1990; Kaper *et al.* 2004).

Se hipotetiza que los cambios histopatológicos causados por EPEC en el enterocito, producen una disminución en la producción de enzimas involucradas en la absorción de nutrientes en el intestino (Nataro y Kaper, 1998). EPECt causa diarrea de tipo acuoso y de intensidad variable, que es acompañada frecuentemente por vómito y fiebre. Los niños menores de dos años son la población pediátrica con mayor susceptibilidad a la infección, observándose una mayor prevalencia en lactantes de hasta seis meses de edad (Vidal *et al.*, 2007).



Además de la isla LEE, se han identificado diversos efectores adicionales asociados a la patogenicidad de EPEC, denominados NLE por sus siglas en inglés: “non-LEE encoded”. La isla O-122 contiene los genes *pagC*, *espl*, *nleB*, *nleE*, y *lifA*, los cuales en general se han asociado a la inhibición del sistema inmune y a una mayor capacidad de colonización del tracto intestinal, por lo que se ha sugerido que participan de manera importante en el proceso de patogénesis de EPEC (Afset *et al.*, 2006; Kelly *et al.*, 2006; Mercado *et al.*, 2016; Slinger *et al.*, 2017). Esta isla se identificó inicialmente en la cepa de *E. coli* Enterohemorrágica (EHEC) EDL933 y posteriormente se reportó su presencia también en cepas de EPEC, tanto típicas como atípicas (Perna *et al.*, 2001; Vieira *et al.*, 2010).

***E. coli* enteropatógena atípica (EPECa):** son cepas que presentan la isla de patogenicidad LEE y por lo tanto inducen lesiones A/E, pero que carecen del plásmido EAF por lo que no expresan la fimbria BFP. Cabe mencionar que estas cepas tampoco presentan los genes codificantes para las toxinas Shiga (Stx1 y Stx2). Aparentemente este patogrupo emergió recientemente, sin embargo, estudios epidemiológicos sugieren un incremento en la identificación de EPECa tanto en países desarrollados como en vías de desarrollo, representando una de las principales causas de diarrea infantil en diferentes partes del mundo (Trabulsi *et al.*, 2002; Afset *et al.*, 2004; Bueris *et al.*, 2007; Estrada-Garcia *et al.*, 2009; Patzi-Vargas *et al.*, 2015).

Se ha descrito que una cantidad considerable de cepas de EPECa comparte características genotípicas con otros patogrupos, tales como la presencia de genes que codifican para factores de adhesión o toxinas (ej. algunas cepas presentan el gen *astA*, que codifica para la toxina termoestable de *E. coli* enteroagregativa), sugiriendo que EPECa podría tener una base genética que le permita adquirir genes que codifiquen para factores de patogenicidad descritos en cepas pertenecientes a otros patogrupos de *E. coli* (Bando *et al.*, 2009).

***E. coli* productora de toxinas Shiga (STEC):** son cepas de *E. coli* que producen una o más toxinas de la familia de las toxinas Shiga (Stx1 y Stx2). Existe un grupo de STEC que se caracteriza por presentar cepas capaces de causar lesiones A/E en las células epiteliales además de producir toxinas shiga, a éste se le denomina *E. coli* Enterohemorrágica (EHEC). Estas cepas están asociadas con cuadros clínicos severos como la colitis hemorrágica y el Síndrome Hemolítico Urémico (SHU), este último se caracteriza por la presencia de anemia hemolítica, trombocitopenia y falla renal. Aproximadamente el 50% de los pacientes presentan vómito durante la primera fase del cuadro de la enfermedad y después de 1 o 2 días la diarrea se torna sanguinolenta. Este cuadro clínico puede durar de 4 a 10 días y en la mayoría de los pacientes se resuelve sin secuelas. Sin embargo, se estima que del total de los niños menores de 10 años

que desarrollan SHU, el 12 al 30% sufren secuelas severas como daño renal y entre el 3 y 5% fallecen (Nataro y Kaper, 1998).

***E. coli* enterotoxigénica (ETEC):** se caracterizan por la producción de dos toxinas: la toxina termolábil (LT) y la termoestable (ST). ETEC coloniza el epitelio y posteriormente produce una o ambas de sus enterotoxinas, la acción de éstas induce la liberación de iones  $\text{Cl}^-$  e incrementan la secreción de agua al lumen intestinal. ETEC produce una diarrea secretora de inicio súbito, sin moco, fiebre o sangre, pero acompañada generalmente de vómito, lo que conlleva a la deshidratación por pérdida de líquidos y electrolitos (sodio, potasio, cloro y bicarbonato). Se estima que ETEC es causante de 200 millones de episodios de diarrea al año y que el 5% de éstos desarrollan deshidratación severa, provocando aproximadamente 380,000 muertes al año (Lamberti *et al.*, 2014). Es importante destacar que actualmente ETEC es también el principal agente causal de la denominada diarrea del viajero, la cual afecta a personas de países industrializados que viajan a zonas endémicas de países en vías de desarrollo (CDC Yellow Book 2018, 2018).

***E. coli* enteroagregativa (EAEC):** Este patogruppo se caracteriza por su patrón de adherencia agregativa (AA), en forma de ladrillos apilados, sobre las células HEp-2, así como por la producción de una capa densa de moco sobre la mucosa intestinal. El fenotipo de AA se debe a la capacidad de EAEC de adherirse entre si y con los enterocitos por medio de adhesinas conocidas como fimbrias de adherencia agregativa (AAF por sus siglas en ingles), de las cuales se han descrito hasta la fecha cinco variantes diferentes: AAF/I (Nataro *et al.*, 1992), AAF/II (Czeczulin *et al.*, 1997), AAF/III (Bernier *et al.*, 2002), AAF/IV (Boisen *et al.*, 2008) y AAF/V (Jønsson *et al.*, 2015). Sin embargo, los genes que codifican para las mismas presentan una baja prevalencia, indicando que debe existir una gran diversidad de estructuras responsables del proceso de adhesión (Nataro y Kaper, 1998; Jønsson *et al.*, 2015). Por otro lado, se ha reportado la participación de una proteína inmunogénica conocida como dispersina (codificada por el gen *aap* "anti-aggregation protein"), la cual se ha sugerido que forma una cubierta sobre la bacteria y neutraliza su carga, permitiendo que las AAF cargadas positivamente se puedan extender libremente y se facilite su proceso de adhesión a las células epiteliales (Harrington *et al.*, 2006; Nishi *et al.*, 2003).

Las proteínas que participan en el proceso de adhesión agregativa se encuentran codificadas en un plásmido largo único, denominado plásmido de adherencia agregativa (pAA). El pAA contiene una gran cantidad de genes que se encuentran regulados por la proteína AggR, codificada también en el pAA. Al parecer, la estrategia de infección de EAEC comprende

primeramente la colonización de la mucosa intestinal, seguida de la secreción de enterotoxinas y citotoxinas (Nataro *et al.*, 1998); sin embargo, el mecanismo de patogenicidad de este patogrupa no está totalmente definido debido a la heterogeneidad de las cepas. Diversos estudios han permitido identificar diferentes factores de patogenicidad que podrían estar involucrados en la generación de daño en el hospedero, pero estos no se encuentran presentes de manera ubicua (Lima *et al.*, 2013) o se han encontrado también en cepas no patógenas, indicando que no son directamente responsables del daño observado o que requieren de factores adicionales.

EAEC es una de las principales causas de diarrea en niños y en adultos, tanto en países desarrollados como en vías de desarrollo (Estrada-García & Navarro-García 2012; Ruttler *et al.*, 2002). Además, se le ha asociado como causa de diarrea persistente y de malnutrición en niños (Huang *et al.*, 2006). En cuanto al cuadro clínico, se ha reportado la presencia de diarrea acuosa, generalmente con moco, acompañada de dolor abdominal, náuseas y fiebre. (Smith *et al.*, 1997). El episodio diarreico causado por EAEC puede ser agudo o crónico, observándose que aquellos niños con desnutrición son incapaces de reparar el daño causado por estas bacterias en la mucosa intestinal, por lo que son propensos a experimentar cuadros prolongados y/o recurrentes de diarrea (Nataro y Kaper, 1998).

Mediante ensayos de adherencia a células Hep-2 se han identificado cepas de EAEC que carecen del gen que codifica para el regulador AggR (Estrada-García & Navarro-García, 2012), por lo que se han clasificado como EAEC atípicas (EAECa) (Harrington *et al.*, 2006). Hasta la fecha solamente se han registrado dos brotes de diarrea asociados a cepas de EAECa, el primero en niños de primaria y secundaria de Japón en 1993 (Itoh *et al.*, 1997) y el segundo en niños de guardería de Serbia en 1995 (Cobeljić *et al.*, 1996). Actualmente no existen métodos moleculares estandarizados para la detección de este patógeno, por lo que no se incluye su búsqueda en los estudios de epidemiología molecular y se desconocen su prevalencia y asociación a diarrea infantil.

Cabe mencionar que en 2011 se reportaron dos brotes de diarrea acuosa y de SHU en Europa. El más importante tuvo lugar en Alemania, donde se registraron aproximadamente 4,000 casos de diarrea con sangre, 850 casos de SHU y 50 muertes. El segundo brote se reportó en Francia e implicó 15 casos de diarrea con sangre; 9 de los cuales presentaron SHU (Grad *et al.*, 2012). Ambos brotes se asociaron con el consumo de coles contaminadas con la cepa mixta de EAEC-STE C O104:H4, la cual presenta un patrón de AA sobre células Hep-2 y es capaz de producir las toxinas Shiga de STEC. El genoma de esta cepa resultó ser similar al genoma de la cepa O104:H4 55989 de EAEC, la cual fue aislada de un sujeto con VIH en África (Bernier *et al.*,

2002); lo cual pone de manifiesto la importancia de EAEC y su capacidad de adquirir por MTH genes que codifican para FV adicionales y así generar cepas más virulentas.

***E. coli* enteroinvasora (EIEC):** las cepas de EIEC son genética, bioquímica y patogénicamente muy parecidas a *Shigella* spp., a tal grado que son indistinguibles a nivel de especie (Pupo *et al.*, 2000). Los mecanismos de patogenicidad de este patogrupos son muy similares a los de *Shigella* spp. ya que comparten FV esenciales. La fase temprana de la infección comprende la invasión de las células epiteliales del colon, seguido de la lisis de la vacuola endocítica, la multiplicación intracelular y la movilización tanto intracelular como entre células adyacentes. Este movimiento es mediado por la nucleación de filamentos de actina en forma de una cola que se extiende desde uno de los polos de la bacteria (Sansonetti, 2002). Los genes involucrados en el daño causado por EIEC se encuentran codificados en un plásmido de virulencia, los cuales incluyen un sistema de secreción tipo III y varias proteínas efectoras involucradas en: la activación de cascadas de señalización en el enterocito, rearrreglos del citoesqueleto, el proceso de invasión y en la lisis de la vacuola endocítica (Tran Van Nhieu *et al.*, 2000). Clínicamente, EIEC produce una diarrea acuosa que precede a una diarrea sanguinolenta, fiebre, vómitos y dolor abdominal intenso. En los casos graves la infección induce una reacción inflamatoria fuerte que llega a producir úlceras. Asimismo, se ha demostrado que la coinfección de este patogrupos con rotavirus puede producir una gran pérdida de sangre por vía intestinal (Pacheco-Gil *et al.*, 2006).

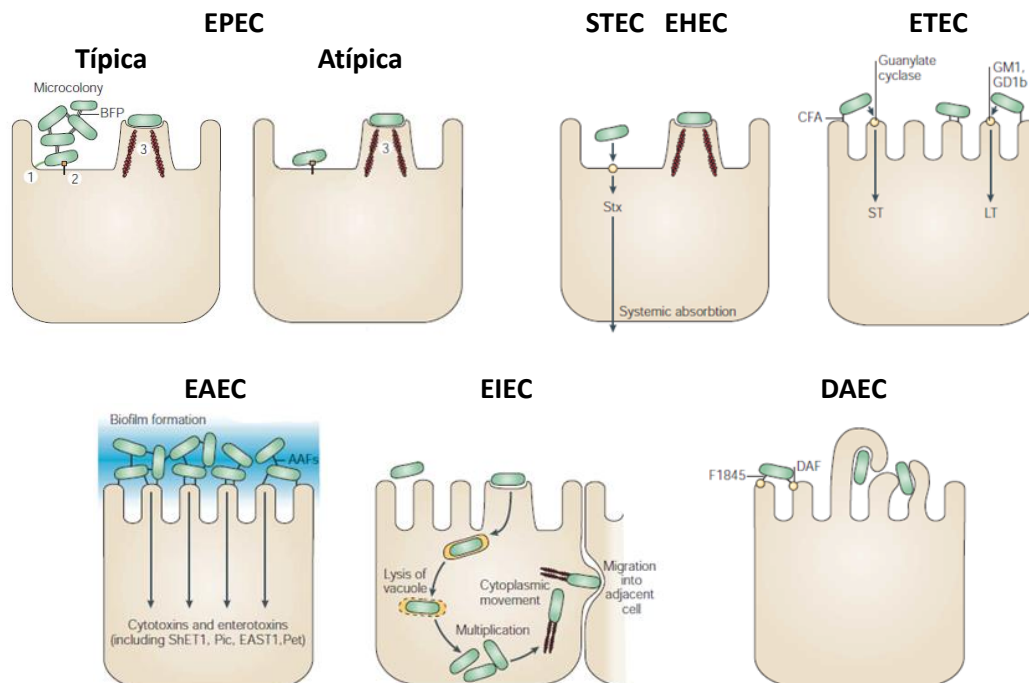
***E. coli* enterodifusa (DAEC):** las cepas pertenecientes a este patogrupos se definieron en un principio por su patrón característico de adherencia difusa sobre células HEp-2 y HeLa, el cual se debe a la expresión de diferentes adhesinas pertenecientes al grupo Dr (Nataro *et al* 1987). Estas adhesinas se dividen en tres subgrupos importantes: las adhesinas afimbriales o Afa (por sus siglas en inglés “afimbrial adhesins”), las fimbrias Dr y la fimbria F1845 (Servin, 2014).

Los operones que codifican para las adhesinas Afa/Dr/F1845 (*afa/dra/daa*) en general están conformados por cinco genes diferentes (A, B, C, D y E), los cuales codifican para un regulador transcripcional (A), una chaperona (B), un usher (C), una invasina (D) y una proteína estructural (E). Los primeros cuatro genes se encuentran altamente conservados pero el gen correspondiente a la unidad estructural presenta variaciones importantes, por lo que cada una de estas adhesinas se ha clasificado en función de la subunidad E (Meza-Segura y Estrada-García, 2016). Hasta la fecha se han reportado nueve diferentes adhesinas Afa/Dr/F1845: Afa-I, Afa-II, Afa-III, Afa-V, Afa-VII, Afa-VIII, Dr, Dr-II y F1845. A excepción de Afa-VII y Afa-VIII, cuyo receptor aún no ha sido caracterizado, todas las adhesinas Afa/Dr/F1845 tienen afinidad por el factor de decaimiento humano (hDAF por sus siglas en inglés “human decay accelerating factor”) de la cascada del complemento, el cual se localiza en la superficie de las células epiteliales del

intestino y ayuda a protegerlas de los efectos nocivos que pudiera causar el complemento (Meza-Segura y Estrada-García, 2016). La unión de la fimbria F1845 con el hDAF del enterocito induce un efecto citopático caracterizado por la extensión de las microvellosidades, que finalmente terminan envolviendo a la bacteria; lo que conlleva a la pérdida de las proteínas encargadas del procesamiento y la captación de algunos nutrientes, alterando los mecanismos de absorción intestinal (Bernet-Camard *et al.*, 1996; Peiffer *et al.*, 2000).

Pocos estudios epidemiológicos han incluido la búsqueda de DAEC, por lo que se desconoce la prevalencia de este patogrupo en la mayor parte del mundo. Algunos grupos han reportado que DAEC es más prevalente en niños con diarrea que en niños asintomáticos (Scaletsky *et al.*, 2002; Ochoa *et al.*, 2011). Sin embargo, esta diferencia sólo resultó ser significativa cuando la población se estratificó por edad, demostrando que DAEC se encuentra particularmente asociado a la presencia de diarrea en niños mayores de 12 meses de edad (Scaletsky *et al.*, 2002).

Hasta la fecha ningún genoma de DAEC se ha secuenciado y la cantidad de estudios enfocados al análisis de FV adicionales en las cepas de DAEC es muy reducido, por lo que aparte de las adhesinas Afa/Dr/F1845 no se cuenta con mucha información sobre los mecanismos de patogenicidad de DAEC. Entre los únicos FV que se han descrito se encuentran la toxina Sat, la colibactina y la fimbria curli (Buc *et al.*, 2013; Meza-Segura y Estrada-García, 2016).



**Figura 1.** Mecanismos de patogenicidad de los seis Patogrupos de *E. coli* Diarreogénicas (Tomado de Kaper *et al.*, 2004).

Recientemente, Patzi-Vargas evaluó la prevalencia de cada uno de los PED en niños menores de cinco años ingresados por diarrea en un hospital de tercer nivel del estado de Yucatán, México (Tabla 2). En este estudio se identificó a DAEC como el patogruppo más prevalente (35%), seguido por EAEC (24%) y EPECa (16%) (Patzi-Vargas *et al.*, 2015). Como puede observarse, en este trabajo también se determinó la presencia de las infecciones mixtas, es decir, por dos o más patogruppos diferentes, encontrándose una incidencia relativamente elevada (11%). En esta clase de infecciones ambos patógenos podrían estar afectando al hospedero, sin embargo, también existe la posibilidad de que la sintomatología se deba solamente al efecto ejercido por uno de los patogruppos y que el otro persista de manera asintomática. De ser éste el caso, es probable que el patogruppo responsable de la enfermedad se encuentre en mayor proporción, por lo que es importante determinar la carga bacteriana de los diferentes patógenos y establecer si existe una relación entre ésta y el desarrollo de la enfermedad.

**Tabla 2.** Prevalencia de los PED en niños menores de 5 años que requieren hospitalización en Mérida, Yucatán.

| <b>Hospital O’Horan, Yuc</b> |                                   |
|------------------------------|-----------------------------------|
| <b>Ene 2007 – Dic 2011</b>   |                                   |
| <b>N (%)</b>                 |                                   |
| <b>PED</b>                   | <b>N=232</b>                      |
| <b>DAEC</b>                  | 81 (35)                           |
| <b>EAEC</b>                  | 56 (24)                           |
| <b>EPECa</b>                 | 37 (16)                           |
| <b>ETEC</b>                  | 21 (9)                            |
| <b>EPECt</b>                 | 9 (4)                             |
| <b>STEC</b>                  | 1 (0.5)                           |
| <b>EIEC</b>                  | 1 (0.5)                           |
| <b>Mixtas</b>                | 23 (10)                           |
| Referencia                   | Patzi-Vargas <i>et al.</i> , 2015 |

#### 1.1.2.2. Carga bacteriana de patógenos intestinales

Diversos estudios han demostrado que la mayoría de los microorganismos considerados patógenos pueden ser aislados también de portadores sanos (Revisado en Casadevall y Pirofski, 2000), lo cual puede estar directamente relacionado con el estado inmunológico del hospedero y/o con la carga del patógeno. En diversas enfermedades infecciosas una gran parte del daño es causado principalmente por la respuesta inmunológica del paciente, por lo que si ésta es débil (sujetos inmunosuprimidos) el daño sobre el tejido será menor, dando como resultado un

portador asintomático del patógeno y un posible foco de infección. Asimismo, existen microorganismos patógenos que no generan un daño importante en su hospedero cuando su carga es baja, sin embargo, la proliferación de los mismos promueve una mayor cantidad de daño y por ende, el desarrollo de una infección sintomática (Casadevall y Pirofski, 2000). Éste es el caso de varios agentes patógenos causantes de enfermedades diarreicas agudas. Poniendo de manifiesto que la simple presencia del microorganismo no es un buen indicador de enfermedad y que existen otros factores importantes. A este respecto, es importante mencionar el trabajo de Kang y colaboradores (2004), quienes demostraron que existe una relación directa entre la carga viral de rotavirus y la presencia de gastroenteritis aguda. De igual manera, en 2009 Phillips y colaboradores reportaron que era posible identificar y distinguir a los portadores asintomáticos de los pacientes con diarrea a partir de la carga viral de norovirus encontrada en las muestras de heces de estos sujetos.

Por otro lado, después de analizar la carga bacteriana de EPEC en 53 muestras de heces de niños con diarrea y en 90 de niños sanos menores de 2 años de edad, Barletta y colaboradores (2011) encontraron que existía una diferencia significativa entre los pacientes con diarrea y los individuos sanos, pero solamente en niños menores de 12 meses de edad y en aquellos niños que presentaban a EPEC como el único patógeno detectado. Sin embargo, la diferencia no fue significativa en aquellos que aún eran amamantados durante la toma de la muestra. En conjunto, la información recabada demuestra que el desarrollo de la enfermedad puede estar directamente relacionado con la carga bacteriana pero también puede deberse a la participación de otros factores, tales como la respuesta inmunológica del hospedero (probablemente expuesto con anterioridad al mismo patógeno), factores de protección (leche materna), el estado nutricional del paciente y/o la presencia de genes de patogenicidad adicionales a los buscados de manera convencional.

Asimismo, en 2013 Chattaway y colaboradores montaron un estudio en el que analizaron la carga bacteriana de EAEC en muestras de heces procedentes de 196 pacientes con diarrea y de 38 sujetos asintomáticos en los que previamente se había determinado la presencia de EAEC. Los autores reportaron que existía una asociación significativa entre la carga bacteriana de EAEC y la presencia de enfermedad, independientemente de la edad de los sujetos del estudio. Sin embargo, también encontraron cargas bacterianas elevadas en algunos sujetos sanos, por lo que sugirieron que no todas las cepas de EAEC son patógenas y que el desarrollo de una infección sintomática se debe principalmente a la presencia de genes que codifican para FV particulares que no están siendo identificados en estudios epidemiológicos.

Si existe una relación directa entre la carga del patógeno y el establecimiento de la infección, la realización de estudios dirigidos a regiones geográficas específicas podría ayudar a determinar

el umbral en la carga bacteriana que permita diferenciar entre portadores asintomáticos y los pacientes con diarrea aguda, lo cual, en el caso de infecciones mixtas podría ayudar a determinar que microorganismos son realmente los responsables de la sintomatología exhibida y cuales simplemente se encuentran colonizando sin ejercer ningún efecto nocivo.

#### 1.1.2.3. Factores de virulencia

Por factor de virulencia (FV) debemos entender a todas aquellas propiedades (producto de genes) que le permiten a un microorganismo establecerse sobre o dentro de un hospedero particular y que favorecen su capacidad de generar una enfermedad. Asimismo, la virulencia hace referencia a una medida de la patogenicidad de un microorganismo, lo que puede estar mediado por la producción de diferentes FV (adaptado de Virulence Factors of Pathogenic Bacteria: <http://www.mgc.ac.cn/VFs/main.htm>).

Tal como se mencionó con anterioridad, los PED se caracterizan por portar genes que codifican para FV característicos de cada patogruppo, mismos que son empleados para su identificación mediante técnicas moleculares (Tabla 3). Además de estos factores, se ha reportado que los PED pueden portar genes que codifican para otros FV muy diversos, entre los cuales se incluyen toxinas (CDT, Cnf-1, EAST1, EspC, HlyA, Pet, Sat, SepA, SigA, Vat, etc.), sideróforos (aerobactina, yersiniabactina y salmoquelina), adhesinas (Agn43, Pap, curly, etc.) y factores asociados a la evasión de la respuesta inmune del hospedero (OmpA, Iss, TraT, Pic y la cápsula), entre otros (como la dispersina).

Debido a esto, se ha sugerido que el daño generado sobre el hospedero resulta de la acción en conjunto de todas estas proteínas, por lo que algunas cepas pueden ser más virulentas que otras en función de la cantidad y del tipo de FV adicionales que porten. Asimismo, debido a que diversas cepas de los diferentes PED también han sido aisladas de sujetos asintomáticos, se ha sugerido que éstas carecen de FV adicionales que les permitan promover el establecimiento de la enfermedad, por lo que diversos grupos de investigación se han empeñado en identificar aquellos factores asociados solamente con cepas aisladas de sujetos con diarrea pero ausentes en las de sujetos asintomáticos.

En un estudio reciente se secuenciaron 70 genomas de EPEC, incluyendo cepas tanto típicas como atípicas: 24 cepas se aislaron de casos letales, 23 de casos no letales y otras 23 de sujetos asintomáticos. Cabe mencionar que solamente EPECt pudo asociarse a los casos letales; ya que en cada uno de estos casos sólo se aislaron cepas de EPECt. Al comparar la presencia/ausencia de genes codificantes para FV en los distintos grupos fue posible identificar una gran cantidad de genes asociados a los casos sintomáticos y de manera exclusiva a los casos letales, sin embargo, la mayoría de estos codifican para proteínas cuya función continúa siendo hipotética.



Entre los hallazgos más importantes de este estudio destaca la asociación de algunos genes del plásmido EAF, de la flagelina y de NleG con los casos letales en comparación con las cepas aisladas de sujetos asintomáticos (Hazen *et al.*, 2016). Por otro lado, un estudio posterior demostró que solamente LfA se encontraba asociada a los casos de diarrea causada por EPEC, principalmente en EPECt (Mercado *et al.*, 2016).

**Tabla 3.** Principales genes empleados para la identificación de los PED.

| PED  | Factor de virulencia              | Descripción  |
|------|-----------------------------------|--|
| EPEC | Intimina<br>( <i>eaeA</i> )       | Permite la adhesión íntima de EPEC a las células epiteliales mediante su unión a Tir   |
|      | BFP<br>( <i>bfpA</i> )            | Participa en la adhesión intercelular en EPEC. No se encuentra en las cepas de EPECa   |
| ETEC | Lt<br>( <i>lt</i> )               | Toxina termolábil, formada por cinco subunidades B que se unen a los gangliósidos GM1 y GD1b, y una subunidad A que activa a la adenilato ciclasa y promueve la secreción de iones Cl <sup>-</sup> |
|      | St<br>( <i>st</i> )               | Toxina termoestable, formada por un solo péptido que activa a la guanilato ciclasa membranal y promueve la secreción de iones Cl <sup>-</sup>  |
| STEC | Stx1<br>( <i>stx1</i> )           | Toxinas shiga, consisten de cinco subunidades B que se unen al glicolípido Gb3 y de una subunidad A que se une al RNA ribosomal e impide la síntesis de proteínas                                  |
|      | Stx2<br>( <i>stx2</i> )           |  |
| EAEC | AggR<br>( <i>aggR</i> )           | Activador transcripcional codificado en el plásmido pAA. Regula varios factores de virulencia  |
|      | AatA<br>( <i>aatA</i> )           | Proteína formadora de poro en la membrana externa para el Sistema de Secreción Tipo 1 de la Dispersina   |
|      | Dispersina<br>( <i>aap</i> )      | Proteína inmunogénica que es secretada y cubre la superficie de la bacteria contrarrestando el efecto de agregación mediado por las AAF  |
| EIEC | IpaH<br>( <i>ipaH</i> )           | Proteína inmunogénica codificada en el plásmido invasividad (pInv) de EIEC y <i>Shigella flexneri</i>  |
|      | <i>Ial</i>                        | Locus característico del pInv  |
| DAEC | AfaC/DraC<br>( <i>afaC/draC</i> ) | Adhesinas capaces de unirse al factor humano de decaimiento del complemento (hDAF o CD55) localizado en la superficie de las células epiteliales   |
|      | F1845<br>( <i>afaD</i> )          |  |

En el caso particular de EAEC se han descrito una amplia variedad de FV en diferentes aislados clínicos, pero no se ha encontrado a ninguna proteína capaz de inducir la enfermedad por sí misma (Estrada-García y Navarro-García, 2012). En un estudio realizado en Malí se trató de identificar aquellos FV de EAEC que pudieran estar asociados a diarrea, observándose que la presencia de los marcadores moleculares comúnmente empleados para detectar a EAEC no presentaba una alta correlación con el desarrollo de una enfermedad sintomática. Por otro lado, se encontró que el gen codificante para la toxina SepA fue el único que pudo correlacionarse de manera significativa con los casos de diarrea, sin embargo, éste sólo se identificó en el 20.7% del total de las cepas (Boisen *et al.*, 2012); poniendo de manifiesto que SepA podría ser suficiente para causar daño pero no estrictamente necesaria para el establecimiento de la enfermedad.

Respecto a DAEC, se ha descrito con anterioridad que la toxina Sat se encuentra significativamente asociada a casos de diarrea en comparación con las cepas aisladas de sujetos asintomáticos (Guignot *et al.*, 2007 ; Mansan-Almeida *et al.*, 2013).

Si bien es importante establecer que FV que podrían estar favoreciendo de manera significativa el establecimiento de la enfermedad, también es necesario identificar los FV que se encuentran principalmente asociados a los casos severos de diarrea, puesto que su caracterización permitiría entender mejor el proceso de patogénesis de cada PED y por ende, ayudaría a generar mejores terapias para los casos más severos o difíciles de tratar. Entre los factores de virulencia más comúnmente relacionados con el SD causado por PED se encuentran: EAST1, Pet, Sat, Pic, SepA y CDT.

**EAST1 (Enteraggative heat-Stable Toxin 1):** La toxina EAST1 es codificada por el gen plasmídico *astA* (Savarino *et al.*, 1993), el cual fue inicialmente descrito en cepas de EAEC pero posteriormente fue identificado también en otros patogrupos de *E. coli* con una elevada prevalencia: EAEC (26-86%), ETEC (21-41%), STEC (88%), EPECa/EPECT (13-22%) y DAEC (13%) (Savarino *et al.*, 1996; Yamamoto *et al.*, 1997; Paiva de Sousa *et al.*, 2001). Es probable que la elevada prevalencia de *astA* en los PED (35%) se deba a que este gen está flanqueado por secuencias de inserción (McVeigh *et al.*, 2000). EAST1 es un péptido de 38 aminoácidos (4.1 kDa) que presenta un 50% de identidad con el dominio enterotóxico de la toxina termoestable (ST) de ETEC (Savarino *et al.*, 1993), siendo tanto estructural como funcionalmente similar a la Guanilina. En estudios realizados con células T84 transfectadas con el gen que codifica para la Guanilato Ciclasa C, se ha demostrado que EAST1 interactúa con esta molécula para inducir un incremento del GMP cíclico intracelular (GMPC) y la posterior activación de la cinasa G (al igual que ST de ETEC), lo que a su vez disminuye la absorción del NaCl e incrementa la secreción de aniones Cl<sup>-</sup> (Savarino *et al.*, 1993, Ménard *et al.*, 2002).

En una gran cantidad de cepas identificadas como PED no se ha podido identificar otro FV además de EAST1. Tal es el caso de la cepa de EAECa asociada al brote de diarrea de 1996 en Japón (Itoh *et al.*, 1997). Lo cual sugiere que EAST1 podría participar de forma importante en el SD, sin embargo, el papel de EAST1 en la patogenicidad de los distintos PED aún no ha sido esclarecido (Zhou *et al.*, 2002).

**Pet (Plasmid-encoded toxin):** Pet es una proteína de aproximadamente 104 kDa producida por EAEC. Se ha reportado que tiene actividad de enterotoxina (Navarro-García & Elias, 2011), ya que es capaz de inducir la contracción del citoesqueleto de células epiteliales intestinales, así como la pérdida de fibras de actina y de las uniones focales en monocapas de células Hep-2 y HT29/C1, lo cual promueve el redondeamiento de la célula y su liberación al medio, culminando con su muerte. La capacidad citotóxica de Pet depende de su actividad de serina proteasa (Navarro *et al.*, 1999), ya que pertenece a la familia de las serina proteasa autotransportadoras (SPATE por sus siglas en inglés “Serine Protease Autotransporter of the *Enterobacteriaceae*”) presentes tanto en los PED como en *Shigella*. Se ha demostrado que Pet es internalizada en la célula y que su paso por el sistema vesicular es necesario para la inducción del efecto citopático. Una vez que se produce la toxina, ésta es secretada mediante un sistema de secreción tipo V (Henderson *et al.*, 2004) y llega a las células epiteliales, donde se une a su receptor e ingresa a la célula por endocitosis mediada por clatrina (Navarro-García *et al.*, 2007a). Dentro de la célula, Pet se dirige al aparato de Golgi y luego al retículo endoplásmico (RE) por tráfico vesicular retrógrado (Navarro-García *et al.*, 2007b), para finalmente pasar intacta al citosol utilizando el translocador Sec61 (Scaglione *et al.*, 2008). Pet tiene una alta afinidad por la  $\alpha$ -fodrina (llamada también  $\alpha$ -espectrina) tanto *in vivo* como *in vitro* y es capaz de producir una ruptura específica en el sitio de unión a calmodulina de esta proteína (entre los aminoácidos M<sub>1198</sub> y V<sub>1199</sub>). La degradación de esta proteína da lugar a su redistribución dentro de las células epiteliales e induce su condensación y la formación de grandes agregados intracelulares en el citoplasma (Canizalez-Roman *et al.*, 2003).

Se ha observado que Pet tiene un efecto citotóxico tanto *in vivo* como *in vitro* (Henderson *et al.*, 1999; Navarro-García *et al.*, 1998; Navarro-García *et al.*, 1999). En el intestino, su actividad afecta la continuidad de la monocapa del epitelio intestinal, lo que podría estar directamente relacionado con la presencia de diarrea (Navarro-García *et al.*, 1998, Henderson *et al.*, 1999).

Es importante recalcar que no todas las EAEC expresan Pet, reportándose una prevalencia máxima de hasta el 23% en aislados clínicos de este patogrupa (Yamazaki *et al.*, 2000). Cabe mencionar que al igual que EAST1, Pet no está restringida al EAEC (Presterl *et al.*, 2003) ya que

anteriormente se ha reportado una mayor prevalencia de esta toxina en cepas de EPECa (Patz-Vargas *et al.*, 2015).

Existen dos homólogos de Pet: Sat (Guyer *et al.*, 2000) y SigA (Shigella IgA-like protease homology), los cuales desempeñan la misma función que Pet y también han sido identificados en otros patogrupos (Rajakumar *et al.*, 1997).

**Sat (Secreted autotransporter toxin):** Sat es una toxina que fue descrita inicialmente en cepas de UPEC, sin embargo, recientemente se ha reportado su presencia en los PED (Abreu *et al.* 2013; Boisen *et al.*, 2009), siendo altamente prevalente en EAEC (74.5%) (Boisen *et al.*, 2009). La actividad citotóxica de Sat se ha demostrado en líneas celulares VERO de riñón, HK-2 de vejiga humana y células Hep-2. Al igual que Pet, Sat promueve el redondeamiento de las células epiteliales y su liberación al medio (Guyer *et al.*, 2000), lo que se debe a su actividad de serina proteasa y depende de su internalización al citoplasma celular (Maroncle *et al.*, 2006). Las toxinas maduras Sat y Pet presentan un 50% de identidad a nivel de aminoácidos y al igual que Pet, Sat es capaz de cortar fodrina *in vitro*; lo que sugiere que ambas toxinas podrían emplear el mismo mecanismo de patogenicidad sobre las células epiteliales (Guyer *et al.*, 2000).

En modelos animales de ratón se ha observado que Sat no proporciona ninguna ventaja en la capacidad de colonización de UPEC, sin embargo, si se observó que era capaz de inducir un mayor daño (Henderson *et al.*, 1999), sugiriendo que su actividad es principalmente la de citotoxina (Maroncle *et al.*, 2006). Sat también se ha encontrado en DAEC con una elevada prevalencia y se ha demostrado que es capaz de promover alteraciones en las uniones estrechas de las células epiteliales, pero se desconoce el mecanismo exacto de este fenómeno (Guignot *et al.*, 2007).

**Pic (Protein involved in intestinal colonization):** Pic es una proteasa de 116 kDa que inicialmente fue descrita en *Shigella flexneri*, pero que también se ha encontrado en cepas de UPEC y de EAEC (con una prevalencia hasta del 63.6%); cabe mencionar que también se ha reportado en otros PED, pero su prevalencia es muy baja (Boisen *et al.*, 2009). A diferencia de Pet, en EAEC Pic se encuentra codificada en el cromosoma de la bacteria (Czczulin *et al.*, 1999; Henderson *et al.*, 1999).

Se ha demostrado que Pic es capaz de cortar fodrina, al igual que Pet y Sat (Parham *et al.*, 2004), pero hasta la fecha no se ha detectado ninguna actividad de Pic como citotoxina (Navarro-García *et al.*, 1999). No obstante, se ha sugerido que Pic participa en la fase temprana de patogénesis y de colonización del intestino (Rajakumar *et al.*, 1997; Henderson *et al.*, 1999). A este respecto, se ha observado que en UPEC la cepa silvestre no presenta ninguna ventaja en su

capacidad de colonización en comparación con la cepa mutante de *pic* (Heimer *et al.*, 2004). Sin embargo, EAEC 042 fue mucho más eficiente en colonizar el tracto gastrointestinal de ratones pre-tratados con estreptomicina, en comparación con una cepa mutante o con una cepa que expresa Pic sin actividad proteolítica (042PicS258A) (Harrington *et al.*, 2009). La diferencia en la colonización no se correlacionó con una variación en la capacidad de adhesión o crecimiento *ex vivo*, pero se observó que el crecimiento *in vitro* de la cepa 042PicS258A se veía afectado en presencia de mucina, por lo que se propuso que Pic podría participar en la captación de nutrientes a partir de la degradación de esta proteína (Harrington *et al.*, 2009). Asimismo, se ha demostrado que Pic se une a mucina y que esta unión se ve bloqueada en ensayos de competencia al usar monosacáridos que forman parte de las cadenas de polisacáridos de la misma, viéndose disminuida su actividad proteolítica al remover el ácido siálico de la mucina. Por lo que se definió a Pic como una mucinasa con actividad tipo lectina, lo que puede estar directamente relacionado con su actividad de hemaglutinación (Gutierrez-Jimenez *et al.*, 2008).

Recientemente se demostró que EAEC induce la hipersecreción de moco, lo cual se encuentra ampliamente relacionado con la formación del biofilm compuesto de una capa mucosa. De manera interesante, se observó que una mutante de Pic no era capaz de inducir esta hipersecreción de moco, pero que la sola presencia de Pic purificada es suficiente para hacerlo (Navarro-García *et al.*, 2010), indicando que esta proteína podría estar jugando un papel importante en la patogénesis mediada por EAEC.

Por otro lado, se han reportado actividades adicionales de Pic, tales como su capacidad de mediar la resistencia al suero (Henderson *et al.*, 1999) y su actividad sobre una gran cantidad de proteínas de unión a leucocitos, teniendo una especificidad restringida contra glicoproteínas ricas en O-glicanos, incluyendo CD43, CD44, CD45, CD93, CD162 (PSGL-1), y a la quimiosina Fractalquina (Ruiz-Perez *et al.*, 2011).

Al analizar la secuencia de *pic*, se observó que en su cadena complementaria se encontraban los genes *setAB*, los cuales codifican para las subunidades SetA y SetB que conforman a la toxina ShET1, por lo que ésta presenta la misma prevalencia que Pic (Henderson *et al.*, 1999). Se considera que la toxina ShET1 está compuesta por una sola subunidad A unida a un pentámero de subunidades B (Fasano *et al.*, 1997) y al parecer, ShEt1 induce la secreción de fluido intestinal vía cAMP y cGMP, pero aún se desconoce su mecanismo de acción.

**SepA (Shigella extracellular protein A):** SepA es una serina proteasa producida por *Shigella flexneri* y por EAEC (con una prevalencia de hasta el 38.2%) (Bosen *et al.*, 2009), la cual presenta una homología del 72% con la enterotoxina EatA producida por ETEC (Dautin, 2010). En el modelo de asa ligada de conejo se demostró que una mutante de SepA en *S. flexneri* exhibía una

disminución en el daño efectuado sobre la mucosa, en la cantidad de fluido acumulado y en la inflamación observada a las ocho horas de infección, en comparación con los efectos observados al emplear una cepa silvestre (Benjelloun, 1995); por lo que es probable que SepA, al igual que EatA, no sea esencial para el establecimiento de la enfermedad, pero sí que participe en la generación de un mayor daño (Dautin, 2010).

Se ha analizado *in vitro* la actividad proteolítica de SepA, demostrándose que es muy similar a la de la Catepsina G, sin embargo, a diferencia de esta última, SepA no fue capaz de activar plaquetas, romper receptores de trombina, fibronectina, colágeno o angiotensina I, indicando que a pesar de sus similitudes, probablemente *in vivo* no tengan el mismo blanco (Benjelloun-Touimi *et al.*, 1998).

Es importante mencionar que en un estudio de caracterización de diferentes cepas de EAEC aisladas de niños con diarrea en Malí, se encontró que solamente SepA guardaba una asociación significativa con los casos de diarrea moderada y severa (Boisen *et al.*, 2012). No obstante, su distribución no fue uniforme en estas cepas y su prevalencia fue solamente del 33.3% en niños con diarrea.

**CDT (Cytolethal Distending Toxin):** La toxina CDT fue identificada por primera vez en una cepa de *Escherichia coli* O128 (Jonhson *et al.*, 1988), sin embargo, se encuentra presente en una gran variedad de bacterias Gram negativas, entre ellas: *Shigella dysenteriae* (Okuda *et al.*, 1995), *Campylobacter* (Pickett *et al.*, 1996), *Helicobacter* (Chien *et al.*, 2000), *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (Mayer *et al.*, 1999) y *Haemophilus ducreyi* (Purven *et al.*, 1995).

Hasta el momento y con base en las variaciones en su estructura primaria, se han descrito 5 tipos de CDT (I-V) (Heywood *et al.*, 2005). De entre éstas, el genotipo CDT-III es el más prevalente en aislados de animales, mientras que CDT-I y II en aislados de humanos (Bouzari *et al.*, 2005, Clark *et al.*, 2002). Esta toxina está codificada por tres genes denominados *cdtA*, *cdtB* y *cdtC*, y se ha demostrado que actúa como un heterotrímero (Lara-Tejero *et al.*, 2001), donde CdtB (27-29 kDa) posee un motivo enzimático con actividad de DNasa (Elwell *et al.*, 2000). La internalización de CdtB se produce vía clatrina, traslocándose primeramente al aparato de Golgi para de ahí pasar al núcleo. CdtB, al igual que las radiaciones ionizantes (Ceelen *et al.*, 2006), produce rupturas de doble cadena del DNA, disminuyendo la velocidad de la replicación celular, produciendo una acumulación de células dañadas en fase G2 y arresto en el ciclo celular (Fedor *et al.* 2013). Aún no se ha establecido si esta toxina es capaz de producir diarrea por sí sola, pero se ha observado que cuando se infectan ratones con una cepa de *E. coli* no diarrogénica a la que se introdujo el operón de *cdt* de *Shigella dysenteriae*, ésta induce daño sobre el epitelio del colon descendente, así como la acumulación de fluidos (Okuda *et al.*, 1997).

Diversos estudios han mostrado que solo un bajo porcentaje de las cepas aislada de pacientes con diarrea son productoras de CDT (0.5-3.1%). Sin embargo, estos porcentajes son mayores que en cepas de *E. coli* aisladas de sujetos sin diarrea (Albert *et al.*, 1996, Da Silva *et al.*, 2002, Marques *et al.*, 2003). Reportandose incluso una posible asociación de las cepas de *E. coli* CDT positivas con la presencia de diarrea con sangre (Hinenoya *et al.*, 2007).

### 1.1.3.Hospedero

Si bien es cierto que los factores intrínsecos de un microorganismo patógeno juegan un papel importante en el desarrollo de la enfermedad, también es fundamental considerar los factores propios del hospedero, ya que estos pueden predisponerlo a desarrollar una enfermedad infecciosa. Entre estos factores destacan la edad y el estatus nutricional del niño.

#### 1.1.3.1. Edad

Tal como se ha mencionado con anterioridad, el SD es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en niños menores de 5 años a nivel mundial, siendo el grupo más afectado el de menores de 2 años (Claeson & Merson, 1990; Bryce *et al.*, 2005). Un estudio reciente demostró que la mayor prevalencia de diarrea en niños menores de 5 años se presenta durante los primeros 12 meses de vida, tendiendo a disminuir con la edad; lo cual puede deberse a que este grupo se ve expuesto por primera vez a los diferentes agentes etiológico de la diarrea y no es capaz de montar una respuesta inmune de memoria (Gupta *et al.*, 2015). No obstante, es importante mencionar que la edad de mayor prevalencia de diarrea también depende del agente etiológico de la misma, por ejemplo, para el caso específico de EPEC se ha descrito que este patógeno afecta principalmente a los niños menores de dos años y de forma particular a los menores de seis meses (Vidal *et al.*, 2007). Caso contrario a DAEC, para el cual se ha reportado una mayor asociación con diarrea en niños mayores de un año de edad (Scaletsky *et al.*, 2002). Las asociaciones entre los diferentes PED y los grupos etareos más afectados por cada uno estos aún no están bien definidas.

#### 1.1.3.2. Estatus nutricional

La principal complicación del SD es la deshidratación que éste trae como consecuencia, ya que puede llevar incluso a la muerte. No obstante, también existen otras repercusiones, tales como la alteración en la captación de nutrientes debida al daño que se presenta sobre el epitelio intestinal, lo que a la larga conlleva a un estado de desnutrición crónica del niño (Guerrant *et al.*, 2008). Por otro lado, se ha reportado que el riesgo de sufrir un cuadro de diarrea incrementa en aquellos niños menores de cinco años que presentan un estado previo de desnutrición aguda;

posiblemente debido a que la desnutrición está asociada con un grado variable de atrofia de las vellosidades intestinales y con defectos severos en el sistema inmune innato y adaptativo (Brown *et al.*, 2003; Gupta *et al.*, 2015). En general, esto desencadena un círculo vicioso donde entre peor es el estatus nutricional del niño mayor es la susceptibilidad que muestra a las infecciones diarreicas (Brown *et al.*, 2003; Guerrant *et al.*, 2008).

Se ha demostrado con anterioridad que la diarrea recurrente o persistente es un factor de riesgo para la alteración del crecimiento y del desarrollo en niños menores de 2 años (Ricci *et al.*, 2006), asociándose con:

- a) Disminución en la talla: en promedio 3.6 cm menos que la altura de referencia internacional a la edad de 7 años, con un promedio de 9.1 episodios de diarrea al año (Moore *et al.*, 2001).
- b) Disminución de la condición física: a la edad de 6 a 9 años, con un promedio de 5 episodios de diarrea al año (Guerrant *et al.*, 1999).
- c) Disminución en la función cognoscitiva: a la edad de 6 a 9 años, con un promedio de 5 episodios de diarrea al año, llegando incluso a observar la pérdida de hasta 10 puntos en el coeficiente intelectual (Guerrant *et al.*, 1999; Petri *et al.*, 2008).
- d) Disminución en el rendimiento escolar: se ha observado que en general estos niños presentan un retraso en la edad de inicio escolar y en la capacidad de lectura (Lorntz *et al.*, 2006).



## 2. HIPÓTESIS

La severidad de la diarrea infantil causada por los patogrupos de *E. coli* está asociada a la edad y al estatus nutricional del hospedero, así como con a la presencia de más factores de virulencia en el patógeno.



### 3. JUSTIFICACIÓN

El síndrome de diarrea es la segunda causa general de morbilidad y la segunda causa de mortalidad por enfermedades infecciosas en niños menores de 5 años en México. Recientemente se identificó a los patogrupos de *E. coli* diarreogénicas como los principales agentes etiológicos del síndrome de diarrea, sin embargo, estos también se han aislado de sujetos sanos, demostrando que para el establecimiento de la enfermedad no basta con la presencia de la bacteria, sino que también intervienen factores propios del hospedero (edad y estatus nutricional) y del patógeno (carga bacteriana y factores de virulencia); mismos que además podrían estar participando en el desarrollo de una enfermedad más severa. Por lo que es importante identificar y caracterizar dichos factores para así poder establecer los grupos de riesgo y diseñar terapias preventivas.



#### **4. OBJETIVO GENERAL**

Identificar los factores propios del hospedero y del patógeno que están asociados a la severidad de la diarrea causada por los patogrupos de *E. coli* en niños menores de 5 años.



## 5. OBJETIVOS PARTICULARES

- 1) Determinar la prevalencia de los patogrupos de *E. coli* en niños menores de 5 años con diarrea aguda que requirieron hospitalización.
- 2) Caracterizar el cuadro clínico de los casos donde se identificó a EPEC, EAEC o DAEC como patógeno único y determinar las diferencias entre estos.
- 3) Determinar el perfil genético de virulencia de las cepas de EPEC, EAEC y DAEC.
- 4) Determinar la carga bacteriana de EPEC en los casos de patógeno único.
- 5) Correlacionar las características de las cepas con la severidad del cuadro clínico de los pacientes.
- 6) Secuenciar los genomas de 10 cepas de EAEC y 10 de DAEC aisladas como patógeno único, y de una cepa de *E. coli* aislada de una niña sana.
- 7) Realizar el análisis filogenéticos de los genomas e identificar los genes de virulencia asociados a cada patogrupos.





## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1. Recolección de muestras

Se trabajó con cepas aisladas de niños menores de 5 años con diarrea aguda que requirieron hospitalización y que forman parte de un estudio piloto de diarreas del Hospital General O'Horán de Mérida en Yucatán y del laboratorio de Epidemiología Molecular de Biomedicina Molecular del CINVESTAV, que se realizó durante el periodo de Enero del 2010 a Julio del 2014, el cual fue financiado por NIH.

Las muestras de heces de los niños se colectaron de la siguiente manera: 1) en niños mayores de 12 meses se recolectaron en una bacinica de plástico limpio y seco en la cual se sentaba el niño, o 2) en niños menores de 12 meses se utilizaron bolsas de recolección, ya sea pegadas directamente al niño o por debajo del portabebés. La muestra se dividió en dos, una parte se colocó en tubos de 5 mL y se guardó directamente en congelación a -70°C, el resto se colocó en medio de transporte Cary Blair y se transportó al Laboratorio de Investigación del Hospital O'Horán en un periodo máximo de 48 horas.

Con el propósito de aislar e identificar enterobacterias, se colocaron 10 ml de la muestra en 90 ml de agua peptonada, se mezcló y se dejó reposar por 30 min. Posteriormente, se inoculó por estría cruzada una placa de MacConkey y se incubó a 37°C por 24 a 48 h. Se seleccionaron cinco colonias con características de *E. coli*, de cada una de éstas se utilizó media colonia para realizar pruebas bioquímicas de identificación y la otra mitad se inoculó en agar peptonado. También se aislaron e identificaron otras bacterias causales de diarrea aguda, tales como *Salmonella*, *Shigella*, *Vibrio* y *Campylobacter*, utilizando medios selectivos. La identificación de rotavirus se hizo por el test de aglutinación Pastorex (Bio-Rad) y a partir de las muestras del 2013 se realizó la detección de Norovirus, Astrovirus y Sapovirus montando una RT-PCR y la posterior amplificación y detección de los productos por PCR en tiempo real empleando un kit comercial.

### 6.2. Obtención de datos clínicos y determinación de la severidad de la enfermedad

Se obtuvieron los datos clínicos de los pacientes a través de encuestas realizadas por el personal de Trabajo Social del hospital O'Horán, la información que se recabó fue:

- Datos demográficos
- Datos al ingreso:
  - Datos antropométricos
  - Antecedentes
  - Padecimiento actual
  - Tratamiento previo

- Evaluación clínica al ingreso
- Toma de muestras
- Resultados de pruebas de laboratorio
- Evaluación 48 a 72 horas posterior al ingreso
- Evolución el día de egreso
- Evolución final
- Resultados de cultivos
- Medicación recibida previo a y durante el ingreso
- Complicaciones

A continuación, se hizo uso de la escala modificada de Ruuska-Vesikari para obtener un valor numérico correspondiente a la severidad en cada caso. En ésta se evaluaron los siguientes puntos:

1. Duración de la diarrea en días (puntos)

- a. <1 (0)
- b. 1–4 (1)
- c. 5 (2)
- d. >6 (3)

2. Evacuaciones en 24 h (puntos)

- a. 1–3 (1)
- b. 4–5 (2)
- c. >6 (3)

3. Días con vómitos (puntos)

- a. No vómitos (0)
- b. 1 (1)
- c. 2 (2)
- d. 3 (3)

4. Máximo número de vómitos/24 h

- a. 0 (0)
- b. 1 (1)
- c. 2–4 (2)
- d. >5 (3)

5. Temperatura en °C (puntos)

- a. 37 °C (0)
- b. 37.1 °C - 38.4 °C (1)
- c. 38.5 °C - 38.9 °C (2)
- d. >39 °C (3)

6. Deshidratación (puntos)

- a. Nada (0)
- b. Leve (2)
- c. Moderada/severa (3)

7. Tratamiento (puntos)

- a. Ninguno u otro (0)
- b. SRO médicamente supervisada (1)
- c. Hospitalizado (2)

De acuerdo con el puntaje acumulado se determinó la severidad del cuadro clínico con base en el siguiente criterio: **Leve** 0-8 puntos; **Moderada** 9-14 puntos; **Severa** >15 puntos. Debido a que la escala de Ruuska-Vesikari fue diseñada para evaluar la severidad de infecciones causadas por Rotavirus (Ruuska & Vesikari, 1990), ésta no incluye complicaciones tales como la presencia de sangre en heces, convulsiones, choques hipovolémicos, alteraciones hidroelectrolíticas o sepsis; por lo que se decidió que ante la presencia de dichas complicaciones se ascendiera en un nivel la severidad reportada del cuadro clínico.

Empleando los datos antropométricos, la edad y el género de cada paciente, se procedió a determinar su estatus nutricional con base en los estándares de crecimiento infantil de la OMS (The WHO Child Growth Standards) (<http://www.who.int/childgrowth/standards/en/>). Se emplearon los índices talla/edad y peso/talla para determinar un estatus de desnutrición crónica o de desnutrición aguda, respectivamente. Se consideró como desnutridos a aquellos niños que mostraron un valor de dos desviaciones estándar por debajo de la media de cada índice.

### 6.3. Aislamiento e identificación de *E. coli* por pruebas bioquímicas

La identificación bioquímica de cada una de las 5 posibles colonias de *E. coli* aisladas por paciente se realizó mediante dos pruebas: TSI (Triple Sugar Iron) y MIO (Motility, Indole, Ornithine). En TSI se analizó la fermentación de glucosa, la fermentación de lactosa y la producción de gas. En MIO se determinó la movilidad, la descarboxilación de la ornitina y la producción de indol a partir del triptófano. Aquellas cepas capaces de fermentar lactosa y producir indol a partir del triptófano se guardaron en viales de agar nutritivo para su envío posterior al CINVESTAV.

#### 6.4. Identificación de los PED por PCR punto final

Cada una de las cepas identificadas bioquímicamente como *E. coli* se sembró en agar MacConkey y se incubó por 24 h a 37°C. Posteriormente se seleccionó una colonia y se resuspendió en 1 mL de agua desionizada estéril contenida en un tubo Eppendorf de 1.5 mL. Se homogenizó perfectamente usando un vórtex, se colocó en un baño María a ebullición por 1 min y posteriormente se mantuvo en hielo por 10 min. Los lisados resultantes se guardaron a –20°C hasta su uso.

Los controles positivos para cada PCR se obtuvieron de la misma manera. Para la primera PCR se incluyeron las cepas de referencia H10407 de ETEC (Fleckenstein *et al.*, 2000), E2348-69 de EPEC (Okeke *et al.*, 2001), EDL933 de EHEC (Schmidt *et al.*, 1995) y E11 de EIEC (Riley *et al.*, 1990). Para la segunda PCR se utilizaron las cepas 042 de EAEC (Nataro *et al.*, 1995) y C1845 de DAEC (Tacket *et al.*, 1990).

Cada una de los lisados obtenidos se genotipificó utilizando dos protocolos de PCR multiplex específicos para identificar los genes de patogenicidad de los diferentes GED:

- a) DEP: PCR multiplex para identificar ETEC, EPEC, EIEC, EHEC-STEC (López-Saucedo *et al.*, 2003)
- b) EAEC/DAEC: PCR multiplex para identificar EAEC y DAEC (modificado de Patzi-Vargas *et al.*, 2013).

##### 6.4.1. PCR multiplex para la detección de ETEC, EPEC, EIEC y EHEC-STEC

Se emplearon los iniciadores y el protocolo previamente reportados en la literatura para identificar los genes de virulencia característicos de cada PED (López-Saucedo *et al.*, 2003): para ETEC los genes que codifican para las toxinas LT (*lt*) y ST (*st*); para EPEC los que codifican para la proteína intimina (*eaeA*) y para la fimbria BFP (*bfpA*); para STEC los que codifican para la intimina (*eaeA*) y para las toxinas Stx1 (*stx1*) y Stx2 (*stx2*); y para EIEC un fragmento del plásmido de invasividad (*ial*). Se utilizó el siguiente programa de amplificación: 50°C durante 2 min, 95°C durante 5 min, 40 ciclos de amplificación (95°C/45 s, 50°C/45 s y 72°C/45 s) y una extensión final a 72°C durante 10 min.

##### 6.4.2. PCR multiplex para la detección de EAEC y DAEC

La identificación de EAEC se realizó mediante la detección de los genes que codifican para el regulador maestro AggR (*aggR*), para la dispersina (*aap*), para la proteína de membrana externa del transportador de la dispersina (*aatA*) y para la subunidad C del sistema de secreción tipo VI (T6SS) de EAEC (*aiiC*). De igual manera, la identificación de DAEC se efectuó mediante la

detección del gen que codifica para el usher de las adhesinas Afa/Dr/F1845 (*afaC*). Para estandarizar el protocolo de amplificación se partió de la PCR multiplex previamente reportada por Patzi-Vargas y colaboradores en el 2013: se emplearon los mismos iniciadores utilizados para detectar *aggR*, *aap*, *aatA* y *afaC*, adicionalmente se incluyó un par de iniciadores específicos para *aaiC* (Tabla 4) (Panchalingam *et al.*, 2012). El volumen total de la reacción fue de 25  $\mu$ L, con una concentración final 2 mM de  $MgCl_2$  (Jena Bioscience), 200  $\mu$ M de cada nucleótido (dATP, dCTP, dGTP y dTTP) (Roche, Boehringer Mannheim), 0.1 U de Taq Pol (Jena Bioscience) y una mezcla de los 5 pares de iniciadores seleccionados con concentraciones finales de 0.3  $\mu$ M para *aggR*, 0.04  $\mu$ M para *aap*, 0.47  $\mu$ M para *aatA*, 0.09  $\mu$ M para *aaiC* y 0.25  $\mu$ M para *afaC*. El programa empleado fue el siguiente: 50°C durante 2 min, 95°C durante 5 min, 40 ciclos de amplificación (95°C/45 s, 55.5°C/45 s y 72°C/45 s) y una extensión final a 72°C durante 10 min. Como control positivo se empleo una mezcla de los lisados de las cepas 042 de EAEC y C1845 de DAEC.

#### 6.4.3. Detección de productos amplificados

Se mezclaron 5  $\mu$ L de cada producto de amplificación con 1  $\mu$ L de regulador de carga. Las mezclas se cargaron en un gel de agarosa al 2% junto con el marcador de peso molecular 1 Kb plus (Invitrogen) y se corrieron en una cámara de electroforesis en regulador TAE 1X, a 80V durante 1 h. Posteriormente, el gel se sumergió durante 10 minutos en una solución de bromuro de etidio al 10% y se reveló en un transiluminador de luz ultravioleta.

#### 6.5. Detección de genes de virulencia suplementarios

Para la detección de 23 genes suplementarios de virulencia se emplearon cuatro protocolos de PCR previamente estandarizados en el laboratorio y adicionalmente se estandarizaron dos protocolos más:

- a) Toxinas: PCR multiplex para identificar los genes que codifican para las toxinas EAST1 (*astA*), Pet (*pet*), CDT (*cdtB*) y Subtilasa (*subA*) (Patzi-Vargas *et al.*, 2015).
- b) UPEC: PCR multiplex para identificar los genes que codifican para la adhesina Antígeno 43 (*agn43*), para la cápsula tipo II (*kpsMT-II*) y para los receptores de los sideróforos Salmoquelina (*iroN*) y Aerobactina (*iutA*) (Guzman-Hernandez *et al.*, 2016).
- c) ExPEC: PCR multiplex para identificar los genes que codifican para la fimbria tipo 1 (*fimA*), para el Pili asociado a pielonefritis (*papC*), para el receptor del sideróforo Yersiniabactina (*fyuA*), para la  $\alpha$ -Hemolisina de UPEC (*hlyA*) y para las toxina Vat (*vat*) y CNF-1 (*cnf-1*) (Guzman-Hernandez *et al.*, 2016).
- d) HlyA-EHEC: PCR para identificar el gen que codifica para la subunidad A de la  $\alpha$ -Hemolisina de EHEC (*hlyA*).

- e) SPATES: Se diseñó un PCR multiplex para detectar la presencia del gen que codifica para la serin proteasa Pic (*pic*) y para las toxinas Sat (*sat*), SepA (*sepA*) y SigA (*sigA*).
- f) O-122 + EspC: Se diseñó un PCR multiplex para detectar los genes que codifican para la toxina EspL2 (*espL/set/sen/set*), la adhesina LifA/Efa-1 (*lifA*) y los efectores NleB (*nleB*) y NleE (*nleE*) de la isla O-122 de EHEC/EPEC. Adicionalmente se incluyó el gen que codifica para la toxina EspC (*espC*).

#### 6.5.1. Toxinas

Se emplearon los iniciadores y el protocolo previamente reportados en la literatura para identificar los genes que codifican para las toxinas EAST1 (*astA*), Pet (*pet*), CDT (*cdtB*) y Subtilasa (*subA*) (Patz-Vargas *et al.*, 2015). El programa empleado fue el siguiente: 50°C durante 2 min, 95°C durante 5 min, 40 ciclos de amplificación (95°C/45 s, 55.5°C/45 s y 72°C/45 s) y una extensión final a 72°C durante 10 min.

#### 6.5.2. UPEC

Se emplearon los iniciadores y el protocolo previamente reportados en la literatura para identificar los genes que codifican para la adhesina Antígeno43 (*agn43*), para el componente M de la cápsula tipo II (*kpsMT-II*) y para los receptores de los sideróforos Salmoquelina (*iroN*) y Aerobactina (*iutA*) (El Guzman-Hernandez *et al.*, 2016). El programa utilizado fue el siguiente: 95°C durante 5 min, 40 ciclos de amplificación (94°C/30 s, 66°C/40 s y 68°C/60 s) y una extensión final a 72°C durante 10 min. Como control positivo se empleó la cepa de campo V7.

#### 6.5.3. ExPEC

Se emplearon los iniciadores y el protocolo previamente reportados en la literatura para identificar los genes que codifican para la unidad estructural de la fimbria tipo 1 (*fimA*), para el usher del Pili asociado a pielonefritis (*papC*), para el receptor del sideróforo Yersiniabactina (*fyuA*), para la subunidad A de la  $\alpha$ -Hemolisina de UPEC (*hlyA*) y para las toxina CNF-1 (*cnf-1*) y Vat (*vat*). El programa utilizado fue el siguiente: 95°C durante 5 min, 40 ciclos de amplificación (94°C/30 s, 63°C/40 s y 68°C/60 s) y una extensión final a 72°C durante 10 min. Como control positivo se empleó la cepa de campo 2H25B.

#### 6.5.4. HlyA-EHEC

Los iniciadores utilizados para detectar el gen que codifica la subunidad A de la  $\alpha$ -Hemolisina de EHEC EDL933 se enlistan en la Tabla 4. Para cada reacción se emplearon 2  $\mu$ L de lisado bacteriano o de agua en el caso de las reacciones blanco. El volumen total de la reacción fue de

25 µL, con una concentración final 2 mM de MgCl<sub>2</sub> (Jena Bioscience), 200 µM de cada nucleótido (dATP, dCTP, dGTP y dTTP) (Roche, Boehringer Mannheim), 0.1 U de Taq Pol (Jena Bioscience) y 0.8 µM de cada iniciador. El programa empleado fue el siguiente: 50°C durante 2 min, 95°C durante 5 min, 40 ciclos de amplificación (95°C/45 s, 55.5°C/45 s y 72°C/45 s) y una extensión final a 72°C durante 10 min. Se utilizó el lisado de la cepa EDL933 de EHEC como control positivo.

#### 6.5.5.SPATES

Se diseñó un protocolo de PCR multiplex con iniciadores específicos (Tabla 4) para amplificar los genes codifican para la serin proteasa Pic (*pic*) y para las toxinas Sat (*sat*), SepA (*sepA*) y SigA (*sigA*). Para cada reacción se emplearon 2 µL de lisado bacteriano o de agua en el caso de las reacciones blanco. El volumen total de la reacción fue de 25 µL, con una concentración final 2 mM de MgCl<sub>2</sub> (Jena Bioscience), 200 µM de cada nucleótido (dATP, dCTP, dGTP y dTTP) (Roche, Boehringer Mannheim), 0.1 U de taq pol (Jena Bioscience) y una mezcla de los 4 pares de iniciadores seleccionados con concentraciones finales de 0.056 µM para *pic*, 0.056 µM para *sat*, 0.035 µM para *sepA* y 0.001 µM para *sigA*. El programa empleado fue el siguiente: 50°C durante 2 min, 95°C durante 5 min, 40 ciclos de amplificación (95°C/45 s, 57.2°C/1.5 min y 72°C/1.5 min) y una extensión final a 72°C durante 10 min. Como control positivo se empleo un lisado de la mezcla de las cepas C1845 de DAEC y las cepas 042 y 12-140 de EAEC.

#### 6.5.6.O-122 + EspC

Se diseñó un protocolo de PCR multiplex con iniciadores específicos (Tabla 4) para amplificar cuatro de los genes que conforman la isla O-122 de EHEC y EPEC, los cuales codifican para la toxina EspL2 (*espL/set/sen/set*), la adhesina LifA/Efa-1 (*lifA*) y los efectores NleB (*nleB*) y NleE (*nleE*). De forma adicional se incluyó también el gen que codifica para la toxina EspC (*espC*). Para cada reacción se emplearon 2 µL de lisado bacteriano o de agua en el caso de las reacciones blanco. El volumen total de la reacción fue de 25 µL, con una concentración final 2 mM de MgCl<sub>2</sub> (Jena Bioscience), 200 µM de cada nucleótido (dATP, dCTP, dGTP y dTTP) (Roche, Boehringer Mannheim), 0.1 U de Taq Pol (Jena Bioscience) y una mezcla de los 4 pares de iniciadores seleccionados con concentraciones finales de 0.079 µM para *espL*, 0.16 µM para *lifA*, 0.12 µM para *nleB*, 0.32 µM para *nleE* y 0.1 µM para *espC*. El programa empleado fue el siguiente: 50°C durante 2 min, 95°C durante 5 min, 40 ciclos de amplificación (95°C/45 s, 51°C/45 s y 72°C/45 s) y una extensión final a 72°C durante 10 min. Como control positivo se empleo el lisado de cepa E2348/69 de EPEC.

**Tabla 4.** Iniciadores empleados para detectar por PCR punto final la presencia de genes de virulencia suplementarios.

| PCR          | Gen         | Secuencia del primer (5' - 3') |                         | Tamaño (pb) | Referencia                        |
|--------------|-------------|--------------------------------|-------------------------|-------------|-----------------------------------|
| EAEC/DAEC    | <i>aaiC</i> | F                              | ATTGTCCTCAGGCATTTCCAC   | 215         | Panchalingam <i>et al.</i> , 2012 |
|              |             | R                              | ACGACACCCCTGATAAACAA    |             |                                   |
| SPATES       | <i>Pic</i>  | F                              | ACTGGATCTTAAGGCTCAGGAT  | 572         | Restieri <i>et al.</i> , 2007     |
|              |             | R                              | GACTTAATGTCCTGTTGAGCG   |             |                                   |
|              | <i>Sat</i>  | F                              | TCAGAAGCTCAGCGAATCATTG  | 932         | Boisen <i>et al.</i> , 2007       |
|              |             | R                              | CCATTATCACCAGTAAACGCACC |             |                                   |
|              | <i>sepA</i> | F                              | TTTACTGACAGGAGTGACGGA   | 430         | Este estudio                      |
|              |             | R                              | CTGTTGTAGAAATTACGGGTGAG |             |                                   |
|              | <i>Siga</i> | F                              | CCGACTTCTCACTTTCTCCCG   | 430         | Boisen <i>et al.</i> , 2007       |
|              |             | R                              | CCATCCAGCTGCATAGTGTGG   |             |                                   |
| O-122 + EspC | <i>espC</i> | F                              | CACCATCTTTAATATCCTGCC   | 122         | Este estudio                      |
|              |             | R                              | TTCTGCCAATAATTCCACTC    |             |                                   |
|              | <i>espL</i> | F                              | ACATTTCAGACATTGCTCAC    | 383         | Este estudio                      |
|              |             | R                              | TCAGGAAAGATAGACTACGA    |             |                                   |
|              | <i>nleB</i> | F                              | GAATACCAAAGAACATCCGT    | 326         | Este estudio                      |
|              |             | R                              | TCAATCAAAGAGTCCTTACC    |             |                                   |
|              | <i>nleE</i> | F                              | TATATCCGGTATAACCAGAG    | 475         | Este estudio                      |
|              |             | R                              | TGTAGCTAAAGATTTCTCCC    |             |                                   |
|              | <i>lijA</i> | F                              | ATTAECTCAACACTTCAGG     | 579         | Este estudio                      |
|              |             | R                              | TTCTCTACAGAAAGATGACG    |             |                                   |

## 6.6. Cuantificación de la carga bacteriana de EPEC en muestras de heces

### 6.6.1. Obtención de DNA a partir de muestras de heces con concentraciones conocidas de EPEC

La cepa de referencia E2348/69 de EPECse sembró en agar MacConkey y se incubó por 24 h a 37°C. Posteriormente se tomó una colonia y se inoculó en 5 mL de caldo LB, dejándolo incubar en agitación a 37°C durante 24 horas. Una vez transcurrido este tiempo se tomó una alícuota del cultivo y se realizaron diluciones seriadas en caldo LB para determinar su concentración por espectrofotometría. El cultivo se llevó a una concentración de  $20 \times 10^7$  bacterias/mL y se procedió a realizar diluciones seriadas 1:10 hasta una concentración de  $20 \times 10^2$  bacterias/mL. De forma simultanea, se tomaron 21 tubos Eppendorf de 2 mL y a cada uno se le colocaron 200 mg de heces de un niño libre de patógenos. Se tomaron 50  $\mu$ L de cada una de las diluciones anteriores y se inocularon los tubos de heces por triplicado. A partir de cada uno de estos tubos se procedió a realizar la extracción de DNA empleando el kit QIAamp DNA Stool mini kit (Qiagen) siguiendo las indicaciones del proveedor. Finalmente, el DNA se recuperó



en un volumen final de 200  $\mu\text{L}$  de Buffer AE (Qiagen). La calidad y la concentración de cada muestra se determinó empleando un NanoDrop 2000 .

#### **6.6.2. Estandarización de la Curva tipo de amplificación**

A partir del DNA purificado en el punto anterior, se procedió a montar una curva tipo de amplificación empleando el par de iniciadores previamente reportados para *eaeA*: F:5'-ATGCTTAGTGCTGGTTTAGG-3' y R:5'- GCCTTCATCATTTTCGCTTTC-3' (Barletta *et al.*, 2011). El volumen total de la reacción fue de 25  $\mu\text{L}$ ; de los cuales 12.5  $\mu\text{L}$  correspondieron a una mezcla de Master Mix (Invitrogen), 9.5  $\mu\text{L}$  de agua desionizada estéril, 1  $\mu\text{L}$  de la mezcla de iniciadores a una concentración 10  $\mu\text{M}$  y 2  $\mu\text{L}$  de la muestra correspondiente de DNA o de agua en caso del blanco. Las mezclas de reacción se colocaron en un termociclador StepOne (Applied Biosystems) con el siguiente programa de amplificación: 50°C durante 2 min, 95°C durante 5 min, 30 ciclos de amplificación (95°C/45 s, 55°C/30 s, 72°C/30 s y 75°C/10 s) y una curva de disociación iniciando a 95°C por 15 s, seguido de un enfriamiento a 70°C y un posterior incremento de temperatura desde 70°C hasta 95°C tomando lecturas cada 0.2°C.

Una vez terminada la reacción, haciendo uso del Software StepOne v2.1. se procedió a establecer la línea de Threshold (umbral) y con base en el Ct correspondiente a cada dilución se obtuvo la curva tipo de *eaeA* con un coeficiente de correlación ( $R^2$ ) de 0.996 y una eficiencia de 95.86%.

#### **6.6.3. Purificación de DNA a partir de heces**

Se tomaron 200 mg de las muestras congeladas de heces de los pacientes seleccionados y al igual que con las muestras de la curva tipo, se procedió a realizar la extracción de DNA empleando el kit QIAamp DNA Stool mini kit (Qiagen) siguiendo las indicaciones del proveedor. El DNA se recuperó en un volumen final de 200  $\mu\text{L}$  de Buffer AE (Qiagen) y se determinó su concentración y pureza con un NanoDrop 2000.

#### **6.6.4. Cuantificación de la carga bacteriana en muestras de pacientes**

Mediante PCR en tiempo real se cuantificó la carga bacteriana de cada una de las muestras previamente purificadas. El volumen total de la reacción fue de 25  $\mu\text{L}$ ; de los cuales 12.5  $\mu\text{L}$  correspondieron a una mezcla de Master Mix (Invitrogen), 9.5  $\mu\text{L}$  de agua desionizada estéril, 1  $\mu\text{L}$  de la mezcla de iniciadores a una concentración 10  $\mu\text{M}$  y 2  $\mu\text{L}$  de cada muestra de DNA. Las mezclas de reacción se colocarán en un termociclador Step One (Applied Biosystems) y se utilizó el mismo ciclo de amplificación empleado para la curva tipo. Una vez terminada la

reacción se procedió a determinar la carga bacteriana total de cada muestra por regresión lineal con la curva tipo.

## **6.7. Secuenciación del genoma completo de aislados de *E. coli***

### **6.7.1. Purificación de DNA de las cepas de referencia**

Se seleccionaron 9 y 10 casos moderados/severos de diarrea aguda donde sólo se identificó a EAEC o a DAEC como patógeno único, respectivamente. Adicionalmente, se incluyeron una cepa comensal aislada de una niña sana de 2 años de edad y una cepa de EAEC aislada de una mujer adulta de 54 años de edad con diarrea aguda de severidad moderada. Es importante destacar que se evitó incluir sujetos desnutridos para descartar el hecho de que la severidad de la enfermedad se debiera al estatus nutricional del hospedero. Cada una de estas cepas se sembró en agar MacConkey y se incubó por 24 h a 37°C. Posteriormente se tomó una colonia de cada una y se inoculó en 5 mL de caldo LB, dejándolo incubar en agitación a 37°C durante 24 horas. Una vez transcurrido este tiempo se centrifugó el cultivo a 20,000 x g durante 5 minutos, se eliminó el sobrenadante y la pastilla se lavó una vez con PBS. Nuevamente se eliminó el sobrenadante y se resuspendió en 400 µL de buffer de lisis (Tris HCl 10 mM, pH 7.4, EDTA 10 mM, NaCl 150 mM, SDS 0.4%), se le agregaron 4 µL de proteinasa K a una concentración de 20 mg/mL, se homogeneizó suavemente y se dejó en incubación durante toda la noche a 42°C. A continuación se agregaron 0.8 µL de una solución de RNasa A (10µg/µL) y se incubó en baño María por una hora a 37°C. En seguida, se agregaron 400 µL de una solución de fenol:coroformo:alcohol isoamílico (25:24:1), se homogeneizó y se centrifugó a 20,000 x g durante 15 minutos. Se recuperó el sobrenadante, se le agregaron 40 µL de acetato de sodio 3 M y dos volúmenes de etanol absoluto frío, se homogeneizó y se incubó por 10 minutos. Posteriormente se centrifugó nuevamente y se lavó la pastilla con 1 mL de etanol al 70%. Finalmente se retiró el exceso de alcohol y cada una de las muestras se resuspendió en 100 µL de agua desionizada estéril. Se determinó la concentración y pureza de cada muestra empleando un NanoDrop 2000, adicionalmente se analizó la integridad del DNA mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1%.

### **6.7.2. Secuenciación y ensamblaje de los genomas**

Se empleó una solución de 50 ng/µL de cada una de las muestras de DNA para preparar librerías de aproximadamente 1000 nt. Los genomas se secuenciaron en la unidad Langebio del CINVESTAV, empleando la plataforma MiSeq de Illumina y una química de reacción de 250 nt. El control de calidad de las lecturas (reads) se realizó con Trim Galore v0.4.1 ([https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/trim\\_galore/](https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/trim_galore/)). Los genomas se

ensamblar *de novo* con SPAdes v3.9.0 (Nurk *et al.*, 2013; Prjibelski *et al.*, 2014; Vasilinetc *et al.*, 2015) y se evaluó su calidad con REAPR 1.0.16 (Hunt *et al.*, 2013). A partir de los contigs pre-ensamblados se obtuvieron scaffolds usando SSPACE\_Standard\_v3.0.pl (Boetzer *et al.*, 2010) y se cerró la mayoría de los gaps generados con GapFiller\_v1-10 (Boetzer & Pirovano, 2012).

### 6.7.3. Análisis filogenético de los genomas de EAEC y DAEC

Para analizar la distribución filogenética de los 21 genomas secuenciados (10 de EAEC, 10 de DAEC y una cepa comensal) se incluyeron 79 genomas adicionales de cepas de *E. coli* patógenas, seis genomas de cepas comensales y el genoma de *E. fergusonii* ATCC35469 como grupo externo para enraizar los árboles (Tabla suplementaria 1). Se identificaron los marcos abiertos de lectura en cada genoma (ORF's por sus siglas en inglés) empleando una combinación de los modelos GeneMarkS y Heurístico de GeneMark (Besemer & Borodovsky, 2005). A continuación, empleando las secuencias traducidas de todos los ORF's de cada uno de los 107 genomas analizados, se construyó un árbol filogenético de Máxima parsimonia del pan-genoma de *E. coli* utilizando los algoritmos orthoMCL y COGS de GetHomologues (Contreras-Moreira & Vinuesa, 2013). A partir de este análisis se identificaron aquellos genes que forman parte del core-genoma de *E. coli* (aquellos que se encuentran presentes en todos los genomas) y se seleccionaron solamente aquellos que se presentaban en una sola copia. Las secuencias traducidas de cada uno de estos genes se alinearon con Clustal-Omega 1.2.0 (Sievers *et al.* 2015) y se concatenaron en BioEdit 7.2.5 (Hall, 1999). Posteriormente se analizaron las secuencias concatenadas con ProtTest 3.4.2 (Abascal *et al.*, 2005) para determinar el mejor modelo de evolución protéica y poder construir un árbol filogenético de Máxima verosimilitud (MV) del core-genoma con PhyML v3.0 (Guindon *et al.*, 2010), empleando un proceso Shimodaira-Hasegawa-like (SH-like) para evaluar la calidad del árbol. Los árboles se visualizaron y editaron con iTOL (Letunic & Bork, 2016).

### 6.7.4. Identificación y análisis filogenético de las fimbrias AAF y de las adhesinas Afa/Dr/F1845

En cada uno de los 107 genomas se buscaron los operones que codifican para las adhesinas AAF y Afa/Dr/F1845. Una vez identificados, se colectaron las secuencias traducidas de los genes que codifican para las unidades estructurales de estas adhesinas y se procedió a obtener un árbol filogenético de MV, para lo cual se incluyeron también 72 secuencias protéicas previamente reportadas de las unidades estructurales de otras adhesinas AAF, Afa/Dr/F1845 o factores de colonización (CS) (Tabla suplementaria 2). De manera simultánea, se construyó un árbol de MV con las secuencias traducidas de los genes que codifican para los usher de las

adhesinas AAF y Afa/Dr/F1845. En este caso se incluyeron además 15 secuencias protéicas previamente reportadas para los usher de otras adhesinas (Tabla suplementaria 3). Al igual que con el core-genoma, en ambos casos se analizaron las secuencias con ProtTest 3.4.2 y se obtuvieron árboles filogenéticos con PhyML v3.0, empleando un proceso SH-like para evaluar su calidad. Los árboles se visualizaron y editaron con iTOL. Las secuencias empleadas para el análisis filogenético de las unidades estructurales y de los usher se muestran en las Tablas suplementarias 2 y 3, respectivamente.

#### 6.7.5. Identificación de genes de virulencia

Para el análisis de genes de virulencia se incluyeron las 21 cepas secuenciadas en este trabajo, además de seis genomas de EAEC y seis genomas de cepas comensales de *E. coli* previamente reportados. Como bacteria comensal debemos entender toda aquella cepa de *E. coli* que fue aislada de un individuo sano y que no contiene ninguno de los genes característicos de los diferentes PED. La detección de genes de virulencia se realizó empleando las secuencias traducidas de todos los ORF's de cada uno de los genomas mencionados con anterioridad, los cuales se analizaron con un ensayo de BLAST de proteína-proteína (BLAST 2.2.28), utilizando como referencia las base de datos Virulence Factors of Pathogenic Bacteria (<http://www.mgc.ac.cn/VFs/main.htm>). Se anotaron como positivas aquellas secuencias que mostraron un porcentaje de identidad y de cobertura mayor o igual al 80%. Posteriormente, se realizó un curado manual de cada uno de los diferentes FV y solamente se incluyeron en el análisis aquellos en los que se pudieron identificar todos los genes involucrados en su producción, secreción o función (por ejemplo, en el caso de la dispersina sólo se consideró este factor cuando se hayó completo el operón que codifica para su transportador, *aat*).

#### 6.8. Análisis estadístico

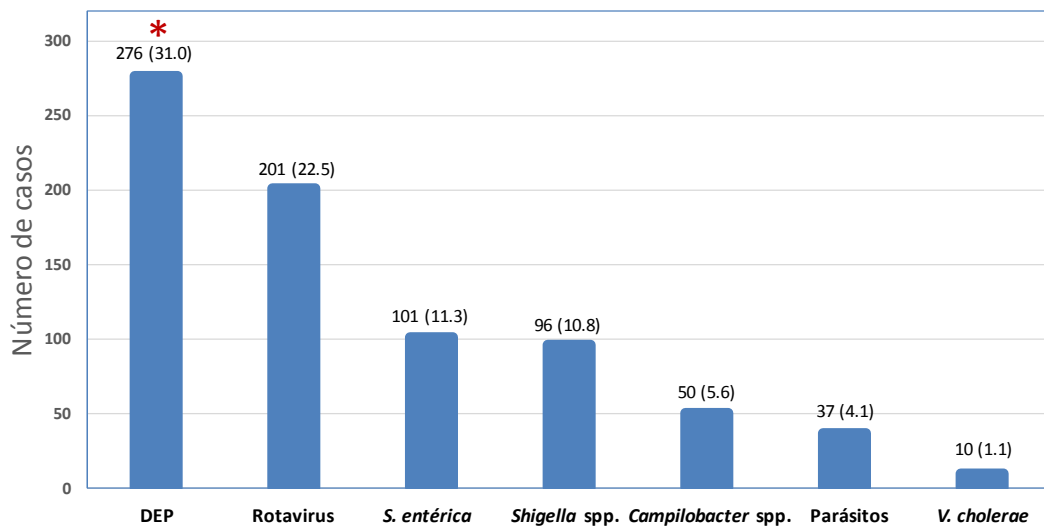
El análisis estadístico de cada uno de los resultados se realizó con el software GraphPad PRISM® 5.0, empleando la prueba U de Mann-Whitney (MWUT) o la prueba exacta de Fisher (FET), según correspondiera.

## 7. RESULTADOS

### 7.1. Prevalencia de los PED en niños menores de 5 años con diarrea aguda

Este trabajo se centró en el estudio de las muestras de heces colectadas de niños menores de 5 años de edad que requirieron atención en un hospital de concentración de Mérida, Yucatán, en el periodo de Enero del 2010 a Julio del 2014. Parte de este estudio fue abordado anteriormente por Patzi-Vargas en el 2015, donde se analizó un total de 421 muestras, correspondientes a los pacientes de los años 2010 y 2011. En el presente trabajo se analizaron 472 muestras correspondientes al periodo 2012-2014; lo que da un total de 893 individuos. La edad promedio de los pacientes fue de 19.4 meses y el 58.23% correspondió a varones ( $P < 0.0001$ , FET).

El análisis epidemiológico del periodo de 5 años demostró que los PED son significativamente más prevalentes (31.0%) que el resto de los patógenos intestinales buscados en este estudio ( $P < 0.0001$ ), encontrándose incluso por arriba de Rotavirus (22.5%), *Salmonella entérica* (11.3%) o *Shigella* spp. (10.8%). También se detectó la presencia de otros patógenos con una menor prevalencia, tales como *Campylobacter* spp. (5.6%), parásitos (4.1%) o *V. cholerae* (1.1%) (Figura 2).

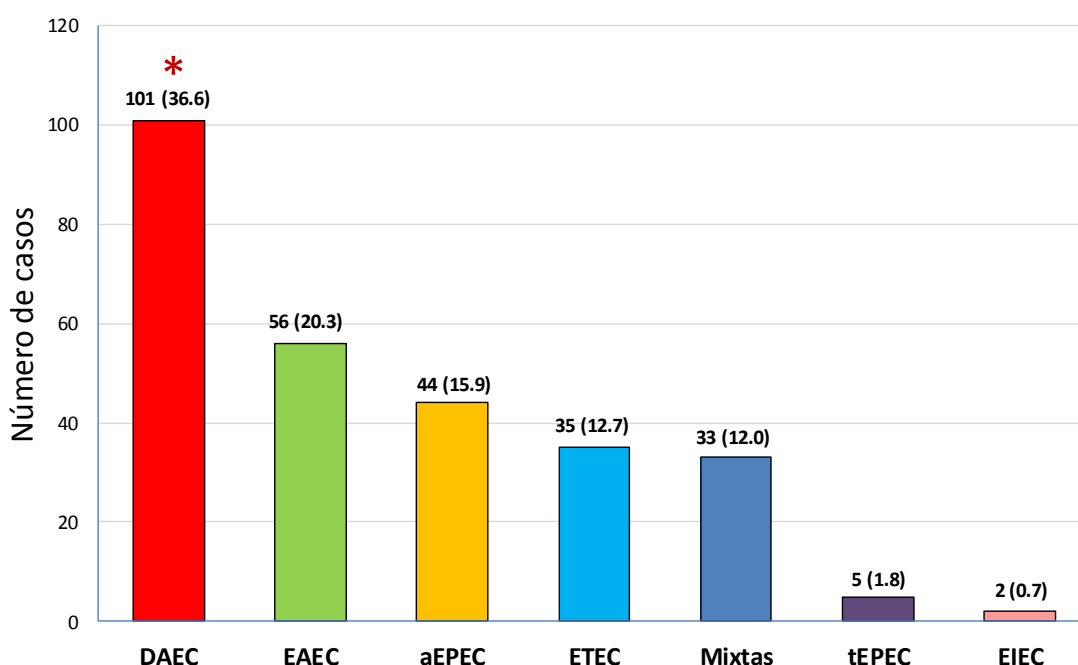


\*  $P < 0.0001$  FET

**Figura 2.** Prevalencia de patógenos intestinales en niños menores de 5 años que requirieron hospitalización en Mérida, Yucatán, en el periodo de Enero del 2010 a Julio del 2014. \*La prevalencia de los DEP fue significativamente mayor que la del resto de los patógenos buscados ( $P < 0.0001$ , FET).

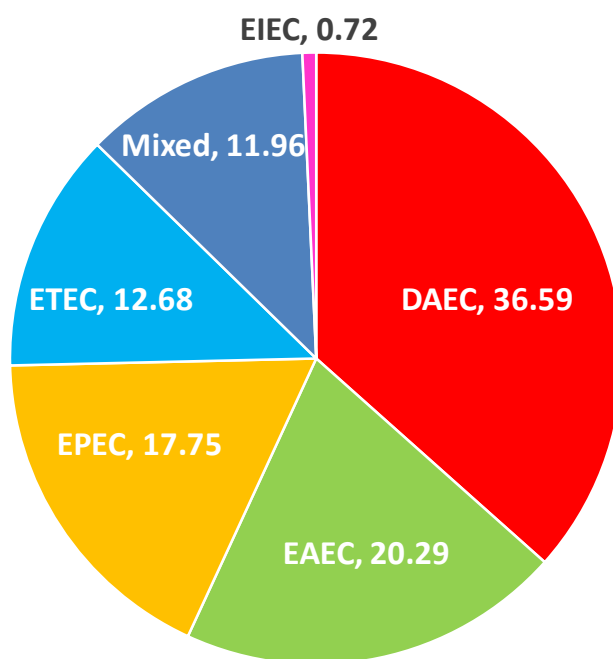
El análisis de distribución de los PED reveló que DAEC fue el patógeno más prevalente (36.6%), seguido de EAEC (20.3%), EPECa (15.9%), ETEC (12.7%), EPECT (1.8%) y EIEC (0.7%). Hubo casos donde se detectó más de un PED por paciente, por lo que se clasificaron como mixtos y se registraron con una prevalencia del 12.0% (Figura 3). No se detectaron cepas de STEC o EHEC en los 5 años del estudio.

La frecuencia con la que se identificaron cepas de DAEC fue idéntica a la de *S. enterica* y en general este patógeno resultó ser significativamente más prevalente que cualquiera de los demás PED ( $P < 0.0001$ , FET). Por su parte, EAEC fue más prevalente que ETEC, las infecciones mixtas, EPECT y EIEC ( $P < 0.05$ , FET). Cabe mencionar que a pesar de que EPECa correspondió el tercer PED más comúnmente identificado, no se encontró diferencia significativa entre la prevalencia de este patógeno con la de ETEC o con la de las infecciones mixtas.



**Figura 3.** Prevalencia de los Patogrupos de *E. coli* Diarreogénicas (PED) en niños menores de 5 años que requirieron hospitalización en Mérida, Yucatán, en el periodo de Enero del 2010 a Julio del 2014. \*La prevalencia de DAEC fue significativamente mayor que la del resto de los PED ( $P < 0.0001$ , FET).

Debido a la baja prevalencia de las cepas típicas de EPEC, se decidió estudiar a este patogrupos incluyendo tanto las cepas típicas como las atípicas, lo que dio un total de 49 casos (17.8%). En conjunto, los pacientes con EPEC, EAEC y DAEC correspondieron al 74.6% de todos los casos donde se aisló alguna cepa de los diferentes PED, por lo que se decidió limitar el estudio al análisis de estos tres patogrupos (Figura 4).



**Figura 4.** Distribución de los Patogrupos de *E. coli* Diarreogénicas (PED). En conjunto, los pacientes con EPEC, EAEC y DAEC representan el 74.6% de todos los casos donde se aisló una depa de los diferentes PED.

#### 7.2. Caracterización del cuadro clínico de los pacientes donde se identificó a EPEC, EAEC o DAEC como patógeno único

Después de seleccionar aquellos pacientes donde sólo se identificó un patógeno, se obtuvo un total de 90 casos: 22 con EPEC (Tabla 5), 30 con EAEC (Tabla 6) y 38 con DAEC (Tabla 7). La edad promedio de estos sujetos fue de 19.4 meses, el 62% correspondió a varones ( $P= 0.0017$ , FET) y el 41% fueron diagnosticados con algún tipo de desnutrición. En general no se encontraron asociaciones significativas de la severidad del cuadro de diarrea con la edad de los pacientes (Tabla 8) o con su estatus nutricional (Tabla 9).

**Tabla 5.** Características de los 22 pacientes dónde se identificó a EPEC como patógeno único.

| Caso | Género | Edad (meses) | Complicaciones | Severidad | Desnutrición crónica | Desnutrición aguda | Pecho materno |
|------|--------|--------------|----------------|-----------|----------------------|--------------------|---------------|
| 1    | M      | 2.1          | Sangre         | Moderado  | No                   | No                 | Continúa      |
| 2    | M      | 2.2          | No             | Moderado  | No                   | Si                 | Continúa      |
| 3    | M      | 2.6          | No             | Leve      | Si                   | No                 | Continúa      |
| 4    | M      | 2.7          | No             | Moderado  | Si                   | No                 | Continúa      |
| 5    | M      | 2.7          | No             | Leve      | No                   | No                 | Continúa      |
| 6    | M      | 3.8          | Hiponatremia   | Grave     | Si                   | Si                 | No            |
| 7    | F      | 7.1          | No             | Leve      | Si                   | No                 | Continúa      |
| 8    | M      | 9.1          | Hiponatremia   | Grave     | Si                   | No                 | No            |
| 9    | F      | 11           | No             | Leve      | No                   | No                 | 9 meses       |
| 10   | M      | 12.7         | No             | Moderado  | No                   | No                 | Continúa      |
| 11   | M      | 14.5         | No             | Moderado  | No                   | No                 | 6 meses       |
| 12   | M      | 17.9         | No             | Leve      | No                   | No                 | 6 meses       |
| 13   | F      | 20           | No             | Moderado  | Si                   | No                 | 2 meses       |
| 14   | M      | 22.4         | No             | Leve      | No                   | No                 | 1 mes         |
| 15   | F      | 23.2         | No             | Leve      | No                   | Si                 | 12 meses      |
| 16   | F      | 24.4         | No             | Moderado  | No                   | No                 | 6 meses       |
| 17   | F      | 28.2         | No             | Leve      | No                   | No                 | 24 meses      |
| 18   | M      | 32.8         | No             | Leve      | No                   | No                 | 6 meses       |
| 19   | M      | 37.2         | No             | Leve      | No                   | No                 | 12 meses      |
| 20   | F      | 38.4         | No             | Moderado  | No                   | Si                 | 12 meses      |
| 21   | F      | 46.8         | No             | Moderado  | No                   | No                 | No            |
| 22   | F      | 55.2         | No             | Leve      | No                   | No                 | 8 meses       |

F: Femenino; M: Masculino.



**Tabla 6.** Características de los 30 pacientes dónde se identificó a EAEC como patógeno único.

| Caso | Género | Edad (meses) | Complicaciones   | Severidad | Desnutrición crónica | Desnutrición aguda | Pecho materno |
|------|--------|--------------|--|-----------|----------------------|--------------------|---------------|
| 1    | M      | 1.3          | No   | Moderado  | No                   | No                 | Continúa      |
| 2    | F      | 5.7          | No   | Moderado  | Si                   | No                 | 1 mes         |
| 3    | F      | 7.3          | No   | Moderado  | No                   | No                 | Continúa      |
| 4    | M      | 7.4          | No   | Leve      | No                   | No                 | 7 meses       |
| 5    | M      | 8.0          | No   | Leve      | No                   | No                 | No            |
| 6    | F      | 10.3         | No   | Moderado  | No                   | No                 | Continúa      |
| 7    | F      | 10.3         | No   | Moderado  | No                   | No                 | 4 meses       |
| 8    | F      | 10.8         | No   | Leve      | Si                   | No                 | Continúa      |
| 9    | M      | 11.6         | No   | Leve      | Si                   | No                 | Continúa      |
| 10   | M      | 13.3         | No   | Moderado  | No                   | No                 | Continúa      |
| 11   | M      | 13.6         | No   | Moderado  | No                   | No                 | Continúa      |
| 12   | M      | 13.7         | No   | Leve      | No                   | No                 | Continúa      |
| 13   | F      | 14.0         | Convulsiones<br>Hiponatremia                           | Grave     | No                   | No                 | Continúa      |
| 14   | M      | 14.7         | No   | Leve      | No                   | No                 | 6 meses       |
| 15   | M      | 15.5         | Sangre   | Grave     | No                   | No                 | Continúa      |
| 16   | F      | 15.5         | No   | Moderado  | No                   | Si                 | 6 meses       |
| 17   | M      | 15.7         | Hiponatremia<br>Hipocalcemia                           | Grave     | No                   | No                 | Continúa      |
| 18   | M      | 15.7         | No   | Leve      | Si                   | Si                 | Continúa      |
| 19   | F      | 16.5         | Hiponatremia<br>Hipocalcemia                           | Grave     | No                   | Si                 | 4 meses       |
| 20   | M      | 18.0         | No   | Leve      | Si                   | No                 | Continúa      |
| 21   | M      | 18.2         | No   | Leve      | No                   | No                 | 10<br>meses   |
| 22   | M      | 18.3         | Convulsiones<br>Hiponatremia                           | Grave     | Si                   | No                 | Continúa      |
| 23   | M      | 18.4         | No   | Leve      | No                   | No                 | Continúa      |
| 24   | M      | 22.8         | Choque<br>hipovolémico<br>Hiponatremia<br>Hipocalcemia | Grave     | Si                   | No                 | Continúa      |
| 25   | M      | 24.3         | No   | Leve      | Si                   | No                 | 12<br>meses   |
| 26   | M      | 24.8         | No   | Leve      | Si                   | No                 | 9 meses       |
| 27   | F      | 27.1         | No   | Leve      | No                   | No                 | 13<br>meses   |
| 28   | M      | 27.3         | No   | Leve      | No                   | No                 | No            |
| 29   | M      | 28.9         | No   | Leve      | No                   | No                 | 12<br>meses   |
| 30   | F      | 33.4         | Sangre   | Grave     | No                   | No                 | Continúa      |

F: Femenino; M: Masculino.

**Tabla 7.** Características de los 38 pacientes dónde se identificó a DAEC como patógeno único.

| Caso | Género | Edad (meses) | Complicaciones                      | Severidad | Desnutrición crónica | Desnutrición aguda | Pecho materno |
|------|--------|--------------|-------------------------------------|-----------|----------------------|--------------------|---------------|
| 1    | M      | 1.2          | Sepsis                              | Grave     | Si                   | -                  | No            |
| 2    | M      | 1.2          | Convulsiones                        | Grave     | No                   | No                 | No            |
| 3    | F      | 5.4          | No                                  | Moderado  | No                   | Si                 | Continúa      |
| 4    | M      | 6.9          | No                                  | Leve      | Si                   | No                 | No            |
| 5    | F      | 8.1          | No                                  | Leve      | No                   | No                 | Continúa      |
| 6    | F      | 8.5          | Sangre                              | Moderado  | No                   | Si                 | Continúa      |
| 7    | M      | 8.6          | No                                  | Moderado  | No                   | No                 | 4 meses       |
| 8    | M      | 10.2         | No                                  | Leve      | Si                   | No                 | Continúa      |
| 9    | F      | 10.7         | No                                  | Moderado  | No                   | Si                 | Continúa      |
| 10   | F      | 10.8         | No                                  | Moderado  | No                   | No                 | 7 meses       |
| 11   | M      | 11.0         | No                                  | Moderado  | No                   | No                 | 2 meses       |
| 12   | F      | 11.0         | No                                  | Leve      | Si                   | No                 | 3 meses       |
| 13   | M      | 11.1         | No                                  | Moderado  | No                   | No                 | Continúa      |
| 14   | M      | 11.2         | No                                  | Moderado  | No                   | Si                 | Continúa      |
| 15   | M      | 11.4         | No                                  | Moderado  | No                   | No                 | Continúa      |
| 16   | M      | 12.1         | No                                  | Grave     | No                   | Si                 | 8 meses       |
| 17   | M      | 12.1         | Sangre                              | Moderado  | Si                   | No                 | 3 meses       |
| 18   | M      | 12.6         | No                                  | Moderado  | Si                   | No                 | Continúa      |
| 19   | F      | 13.6         | No                                  | Moderado  | No                   | No                 | Continúa      |
| 20   | M      | 14.8         | No                                  | Moderado  | No                   | No                 | 8 meses       |
| 21   | F      | 15.5         | No                                  | Moderado  | Si                   | No                 | Continúa      |
| 22   | F      | 15.5         | No                                  | Moderado  | Si                   | Si                 | Continúa      |
| 23   | F      | 16.2         | No                                  | Moderado  | Si                   | Si                 | Continúa      |
| 24   | M      | 16.8         | No                                  | Moderado  | No                   | No                 | 12 meses      |
| 25   | F      | 18.5         | Choque hipovolémico<br>Convulsiones | Grave     | No                   | Si                 | Continúa      |
| 26   | M      | 21.0         | No                                  | Leve      | No                   | Si                 | Continúa      |
| 27   | M      | 21.0         | Sangre<br>Hiponatremia              | Grave     | No                   | No                 | 1 mes         |
| 28   | M      | 25.3         | No                                  | Leve      | Si                   | No                 | Continúa      |
| 29   | M      | 27.6         | No                                  | Moderado  | No                   | No                 | Continúa      |
| 30   | F      | 28.7         | No                                  | Leve      | No                   | No                 | Continúa      |
| 31   | F      | 28.8         | No                                  | Leve      | No                   | No                 | 4 meses       |
| 32   | F      | 29.1         | No                                  | Moderado  | No                   | No                 | 3 meses       |
| 33   | M      | 29.3         | No                                  | Leve      | No                   | No                 | 12 meses      |
| 34   | M      | 30.0         | No                                  | Leve      | No                   | No                 | 8 meses       |
| 35   | M      | 32.4         | Hiponatremia<br>Hipocalemia         | Grave     | No                   | No                 | 17 meses      |
| 36   | M      | 33.2         | No                                  | Moderado  | No                   | No                 | 12 meses      |
| 37   | F      | 47.0         | No                                  | Moderado  | No                   | No                 | 18 meses      |
| 38   | M      | 58.1         | No                                  | Grave     | No                   | No                 | Continúa      |

F: Femenino; M: Masculino.

**Tabla 8.** Análisis de la severidad de la diarrea con respecto a la edad de los pacientes.

| Severidad      | Edad promedio (meses) |
|----------------|-----------------------|
| Leve           | 19.39                 |
| Moderado       | 15.20                 |
| Grave          | 17.80                 |
| Moderado/Grave | 16.12                 |

**Tabla 9.** Análisis de la severidad de la diarrea con respecto al estatus nutricional del paciente.

**Pacientes con desnutrición**

| Severidad (pacientes) | D. general (%) | D. crónica (%) | D. Aguda (%) |
|-----------------------|----------------|----------------|--------------|
| Leve (36)             | 14/36 (39)     | 12/36 (33)     | 3/36 (8)     |
| Moderado (38)         | 15/38 (39)     | 8/38 (21)      | 9/38 (24)    |
| Grave (16)            | 8/16 (50)      | 5/16 (31)      | 4/16 (25)    |
| Moderado/Grave (54)   | 23/54 (43)     | 13/54 (24)     | 13/54 (24)   |

D: Desnutrición.

Al analizar el cuadro clínico de los pacientes con respecto al patogrupa identificado (Tabla 10), se determinó que la diarrea en niños menores de cinco meses está asociada a infecciones con EPEC ( $P < 0.05$ , FET). Asimismo, se halló que el número de pacientes infectados con DAEC que presentaron vómito, fue significativamente mayor que el de los pacientes infectados con EPEC ( $P = 0.009$ , FET) o con EAEC ( $P = 0.0178$ , FET); observándose que la mayoría de estos presentó más de dos episodios de vómito por día (86%), lo que resultó significativamente mayor a lo encontrado en los sujetos con EPEC ( $P = 0.0258$ , FET). En cuanto a las severidad de los episodios de diarrea, se observó que la mitad (50%) de los casos con EPEC y EAEC fueron leves, a diferencia de los casos con DAEC (26%). En cambio, la mayoría de los individuos infectados con DAEC resultaron ser moderados (55%), siendo esta cifra significativamente mayor ( $P = 0.0262$ , FET) que la registrada para EAEC (27%).

**Tabla 10.** Análisis del cuadro clínico con respecto al patogrupa identificado.

|  | <b>EPEC</b><br><b>N=22 (%)</b> | <b>EAEC</b><br><b>N=30 (%)</b> | <b>DAEC</b><br><b>N=38 (%)</b> |
|--|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| <b>Edad promedio (meses)</b>             | 19.0                           | 16.1                           | 18.1                           |
| <b>Diarrea</b>                           |                                |                                |                                |
| <b>Casos &lt;5 meses</b>                 | 6 (27) <sup>a</sup>            | 1 (3)                          | 2 (5)                          |
| <b>Casos con fiebre (T&gt;38°C)</b>      | 11 (50)                        | 14 (47)                        | 12 (32)                        |
| <b>Casos con diarrea por 1-3 días</b>    | 5 (23)                         | 12 (40)                        | 7 (18)                         |
| <b>Casos con diarrea por 4-14</b>        | 17 (77)                        | 18 (60)                        | 31 (82)                        |
| <b>Vómito</b>                            |                                |                                |                                |
| <b>Casos con vómito</b>                  | 15 (68)                        | 22 (73)                        | 36 (95) <sup>b</sup>           |
| <b>Casos con más de 1 día con vómito</b> | 2/15 (13)                      | 6/22 (27)                      | 16/36 (44)                     |
| <b>Casos con más de 2 vómitos/día</b>    | 8/15 (53)                      | 17/22 (77)                     | 31/36 (86) <sup>c</sup>        |
| <b>Severidad</b>                         |                                |                                |                                |
| <b>Leve</b>                              | 11 (50)                        | 15 (50)                        | 10 (26)                        |
| <b>Moderado</b>                          | 9 (41)                         | 8 (27)                         | 21 (55) <sup>d</sup>           |
| <b>Grave</b>                             | 2 (9)                          | 7 (23)                         | 7 (18)                         |
| <b>Moderado/Grave</b>                    | 11 (50)                        | 15 (50)                        | 28 (73)                        |

<sup>a</sup> La diarrea en niños menores de cinco meses está asociados a infecciones con EPEC (EPEC vs EAEC, P=0.0332; EPEC vs DAEC, P=0.0423; FET).

<sup>b</sup> Los casos de infección con DAEC que presentaron vómito fueron significativamente mayores que los de EPEC (P=0.009, FET) o EAEC (P=0.0178, FET).

<sup>c</sup> Los casos de infección con DAEC que presentaron vómito, sufrieron más de dos episodios de vómito por día que los casos infectados con EPEC (P=0.0258, FET).

<sup>d</sup> Hubo más casos moderados de infecciones con DAEC que de infecciones con EAEC (P=0.0262, FET).

El análisis de la edad de lo pacientes con respecto al grupo de severidad (Tabla 11), mostró que los sujetos con diarrea moderada e infectados con EAEC presentaron en promedio una edad significativamente menor que la de los casos leves (P=0.0074) o graves (P=0.0026). No se identificó ninguna asociación significativa con EPEC o DAEC, sin embargo, se observó que los dos únicos casos graves de EPEC correspondieron a niños menores de un año (3.8 y 9.1 meses). Respecto al estatus nutricional, la desnutrición no parece tener relevancia alguna en la severidad de las infecciones causadas por EAEC o DAEC (Tabla 12). Caso contrario para EPEC, donde a pesar de no haberse encontrado asociaciones significativas, se encontró una clara correlación entre la desnutrición del paciente y una mayor severidad de la enfermedad, dado que los dos únicos sujetos con diarrea grave fueron diagnosticados con desnutrición crónica y además, uno de ellos se encontraba también en un estado de desnutrición aguda.

Cabe mencionar que tanto los casos graves de EPEC como los dos primeros casos graves de DAEC, correspondieron a niños menores de un año (con una edad promedio de 6.5 meses para EPEC y de 1.2 meses para DAEC) que no recibieron pecho materno.

**Tabla 11.** Asociación de la severidad de la diarrea por patogrupos con respecto a la edad del paciente.

|                 | Edad promedio (meses) por grupo de severidad |       |       |
|-----------------|--|-------|-------|
|                 | EPEC   | EAEC  | DAEC  |
| <b>Leve</b>     | 21.85  | 17.93 | 19.92 |
| <b>Moderado</b> | 18.20  | 9.66* | 16.32 |
| <b>Grave</b>    | 6.45   | 19.44 | 20.64 |

\*La edad promedio de los casos de diarrea moderada con EAEC es significativamente menor que la de los casos leves (P=0.0074) o graves (P=0.0026).

**Tabla 12.** Análisis de la severidad de la diarrea por patogrupos con respecto al estatus nutricional del paciente.

| S          | Pacientes con desnutrición por patogrupos y severidad de la diarrea |             |           |             |             |            |             |             |           |
|------------|---|-------------|-----------|-------------|-------------|------------|-------------|-------------|-----------|
|            | EPEC  |             |           | EAEC        |             |            | DAEC        |             |           |
|            | General (%)   | Crónica (%) | Aguda (%) | General (%) | Crónica (%) | Aguda (%)  | General (%) | Crónica (%) | Aguda (%) |
| <b>L</b>   | 3/11 (27)   | 2/11 (18)   | 1/11 (9)  | 6/15 (40)   | 6/15 (40)   | 1/15 (7)   | 5/10 (50)   | 4/10 (40)   | 1/10 (10) |
| <b>M</b>   | 4/9 (44)  | 2/9 (22)    | 1/9 (11)  | 2/8 (25)    | 1/8 (12.5)  | 1/8 (12.5) | 9/21 (43)   | 5/21 (24)   | 6/21 (29) |
| <b>G</b>   | 2/2 (100)   | 2/2 (100)   | 1/2 (50)  | 3/7 (43)    | 2/7 (29)    | 1/7 (14)   | 3/7 (43)    | 1/7 (14)    | 2/7 (29)  |
| <b>M/G</b> | 6/11 (55)   | 4/11 (36)   | 3/11 (27) | 5/15 (33)   | 3/15 (20)   | 2/15 (13)  | 12/28 (43)  | 1/7 (14)    | 2/7 (29)  |

S: Severidad; L: Leve; M: Moderada; G: Grave; M/G: Moderados y graves.

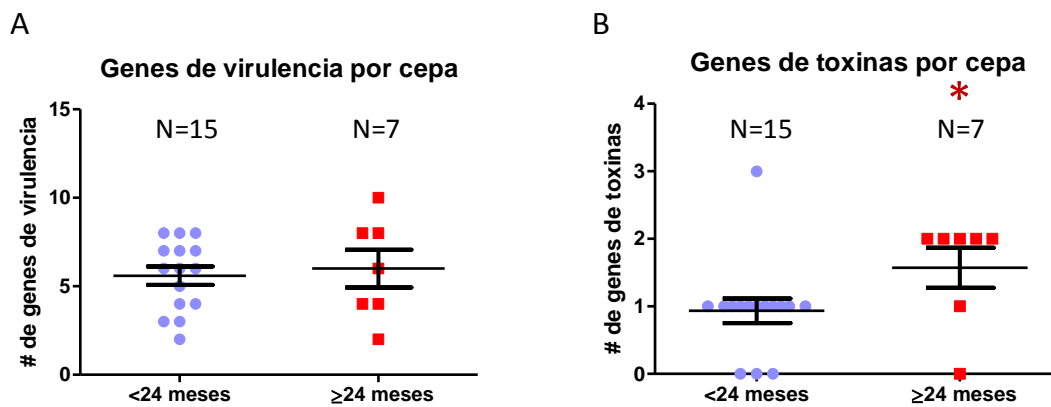
### 7.3. Identificación de los perfiles genéticos de las cepas de EPEC, EAEC y DAEC

Se obtuvieron lisados totales de cada una de las cepas de EPEC, EAEC y DAEC identificadas como patógeno único y se determinó por PCR punto final el perfil genético de cada uno de estos aislados; para lo cual se analizó la presencia de 26 genes de virulencia (*aaiC*, *aap*, *aatA*, *agn43*, *astA*, *cdtB*, *cnf-1*, *espC*, *espL*, *fimA*, *fyuA*, *hlyA*, *iroN*, *iutA*, *kps* MTII, *lifA*, *nleB*, *nleE*, *papC*, *pet*, *pic*, *sat*, *sepA*, *sigA*, *subAB* y *vat*) adicionales a los empleados para identificar a los diferentes PED.

Al analizar los resultados correspondientes a las cepas de EPEC, se observó que la presencia de los cuatro genes de la isla O-122 (*espL*, *lifA*, *nleB* y *nleE*) se encontraba asociada a los casos moderados de diarrea en comparación con los casos leves (P=0.0498, FET). Asimismo, al segmentar los resultados por grupos de edad, se encontró que las cepas aisladas de niños mayores de 24 meses de edad ( $\geq 24$ ) presentaron en promedio una mayor cantidad de genes para toxinas que las cepas aisladas de niños menores (P= 0.0370, MWUT) (Figura 5B); a pesar de

que el número total de genes de virulencia no mostró diferencia entre ambos grupos de edad (Figura 5A).

Respecto a las cepas de EAEC, se encontró que el gen (*fimA*) que codifica para la fimbria tipo 1, se encuentra asociado principalmente a las cepas aisladas de los casos moderados y graves de diarrea (93.8%), en comparación con las cepas aisladas de los pacientes con cuadros leves (57.1%,  $P=0.0309$ , FET). Asimismo, se observó que las cepas aisladas de casos moderados y graves presentaron una mayor cantidad de genes para adhesinas ( $\bar{X}=2.2$ ) que las aisladas de casos leves ( $\bar{X}=1.8$ ,  $P=0.0448$ , MWUT) (Figura 6A). Por el contrario, se encontró que las cepas de los sujetos con cuadros moderados de diarrea presentaron un menor número de genes para toxinas ( $\bar{X}=1.3$ ) que las de los casos leves ( $\bar{X}=2.1$ ) y graves ( $\bar{X}=2.8$ ); siendo esta cantidad significativamente menor que la de los casos graves ( $P=0.0301$ , MWUT) (Figura 6B).



**Figura 5. A.** Análisis del número total de genes totales de virulencia identificados en las cepas de EPEC aisladas de niños menores (<24 meses) y mayores (≥24 meses) de 24 meses de edad. **B.** Análisis del número total de genes de toxinas identificados en las cepas de EPEC aisladas de niños menores (<24 meses) y mayores (≥24 meses) de 24 meses de edad. \*La cantidad de genes de toxinas identificados en las cepas de niños ≥24 meses de edad fue significativamente mayor que la de las cepas de niños menores ( $P=0.0370$ , MWUT).







**Tabla 13.** Genes adicionales de virulencia identificados en las cepas de EPEC.

| Caso | Edad (meses) | Severidad | Genes identificados |              |             |            |             |             |             |             |             |             |             |             |             |             |            |
|------|--------------|-----------|---------------------|--------------|-------------|------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|------------|
|      |              |           | A                   | A            | A           | ERI        | ERI         | ERI         | S           | S           | S           | T           | T           | T           | T           | T           | T          |
|      |              |           | <i>lifA</i>         | <i>agn43</i> | <i>fimA</i> | <i>kps</i> | <i>nleB</i> | <i>nleE</i> | <i>fyuA</i> | <i>iroN</i> | <i>iutA</i> | <i>astA</i> | <i>cdtB</i> | <i>espC</i> | <i>espL</i> | <i>hlyA</i> | <i>pet</i> |
| 1    | 2.1          | M         | 1                   | 1            | 1           | 1          | 1           |             |             | 1           |             |             | 1           |             |             |             |            |
| 2    | 2.2          | M         |                     |              | 1           |            |             |             | 1           |             |             | 1           |             |             | 1           | 1           |            |
| 3    | 2.6          | L         | 1                   | 1            |             | 1          | 1           |             |             |             |             |             | 1           |             |             |             |            |
| 4    | 2.7          | M         | 1                   | 1            | 1           | 1          | 1           |             |             |             |             |             | 1           |             |             |             |            |
| 5    | 2.7          | L         |                     | 1            | 1           |            |             |             |             |             |             |             |             |             |             |             |            |
| 6    | 3.8          | G         |                     | 1            | 1           |            |             |             | 1           | 1           | 1           | 1           |             |             |             |             |            |
| 7    | 7.1          | L         |                     | 1            | 1           | 1          |             |             | 1           | 1           | 1           |             | 1           |             |             |             |            |
| 8    | 9.1          | G         | 1                   | 1            | 1           | 1          | 1           |             |             |             |             |             | 1           |             |             |             |            |
| 9    | 11.0         | L         |                     |              | 1           |            |             |             |             |             |             |             | 1           |             |             |             |            |
| 10   | 12.7         | M         |                     | 1            | 1           |            |             |             |             |             |             |             |             |             |             | 1           |            |
| 11   | 14.5         | M         | 1                   | 1            | 1           | 1          | 1           |             |             |             |             |             | 1           |             |             |             |            |
| 12   | 17.9         | L         |                     | 1            | 1           | 1          | 1           |             |             |             |             |             |             |             |             | 1           |            |
| 13   | 20.0         | M         |                     |              | 1           |            |             |             |             |             |             |             |             |             |             |             |            |
| 14   | 22.4         | L         |                     | 1            | 1           |            |             |             |             | 1           |             |             | 1           |             |             |             |            |
| 15   | 23.2         | L         |                     | 1            | 1           |            |             |             |             |             |             |             |             |             |             |             |            |
| 16   | 24.4         | M         | 1                   | 1            | 1           | 1          | 1           |             |             |             |             | 1           | 1           |             |             |             |            |
| 17   | 28.2         | L         |                     | 1            | 1           | 1          | 1           | 1           |             |             |             |             |             | 1           | 1           |             |            |
| 18   | 33.0         | L         |                     |              | 1           |            |             |             |             |             |             |             |             | 1           | 1           |             |            |
| 19   | 36.7         | L         |                     | 1            | 1           |            |             |             | 1           | 1           | 1           |             |             |             |             |             |            |
| 20*  | 38.0         | M         | 1                   | 1            | 1           | 1          | 1           | 1           |             |             |             | 1           | 1           |             |             |             |            |
| 21   | 46.8         | M         |                     |              | 1           |            |             |             |             |             |             |             |             |             |             |             |            |
| 22   | 55.2         | L         |                     |              | 1           |            |             |             |             |             |             | 1           | 1           |             |             |             |            |

L: Leve; M: Moderado; G: Grave; A: Adhesinas; ERI: Evasión de la respuesta inmune; S: Sideróforos; T: Toxina. \*La cepa aislada del caso número 20 fue identificada como EPECt, por lo que además de los genes enlistados con anterioridad, también cuenta con *bfpA*.

**Tabla 14.** Genes adicionales de virulencia identificados en las cepas de EAEC.

| Caso | Edad (meses) | Severidad | Genes identificados |             |             |            |            |            |             |             |             |             |             |             |            |            |             |             |
|------|--------------|-----------|---------------------|-------------|-------------|------------|------------|------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|------------|------------|-------------|-------------|
|      |              |           | A                   | A           | A           | ERI        | ERI        | O          | O           | S           | S           | T           | T           | T           | T          | T          | T           | T6SS        |
|      |              |           | <i>agn43</i>        | <i>fimA</i> | <i>papC</i> | <i>pic</i> | <i>kps</i> | <i>aap</i> | <i>aatA</i> | <i>fyuA</i> | <i>iutA</i> | <i>astA</i> | <i>cnf1</i> | <i>hlyA</i> | <i>pet</i> | <i>sat</i> | <i>sepA</i> | <i>sigA</i> |
| 1    | 1.3          | M         | 1                   | 1           | 1           | 1          |            | 1          | 1           | 1           | 1           |             | 1           | 1           |            |            |             |             |
| 2    | 5.7          | M         | 1                   | 1           |             | 1          |            | 1          | 1           |             |             |             |             |             |            |            | 1           |             |
| 3    | 7.3          | M         | 1                   | 1           |             | 1          |            | 1          | 1           | 1           |             | 1           |             |             | 1          |            | 1           |             |
| 4    | 7.4          | L         | 1                   | 1           |             | 1          |            | 1          | 1           | 1           |             |             |             |             |            |            |             |             |
| 5    | 8.0          | L         | 1                   | 1           |             | 1          |            | 1          | 1           |             |             |             |             |             |            |            | 1           |             |
| 6    | 10.3         | M         | 1                   | 1           |             | 1          | 1          | 1          | 1           | 1           | 1           |             |             |             |            |            | 1           |             |
| 7    | 10.3         | M         | 1                   | 1           |             | 1          | 1          | 1          | 1           | 1           |             |             |             |             |            |            |             |             |
| 8    | 10.8         | L         | 1                   | 1           |             | 1          | 1          | 1          | 1           | 1           | 1           |             |             |             |            |            | 1           |             |
| 9    | 11.6         | L         | 1                   |             |             | 1          |            | 1          | 1           | 1           |             | 1           |             |             | 1          |            | 1           |             |
| 10   | 13.3         | M         | 1                   | 1           |             | 1          |            | 1          | 1           | 1           |             |             |             |             |            |            |             |             |
| 11   | 13.6         | M         | 1                   | 1           |             |            |            | 1          | 1           | 1           |             |             |             |             |            |            |             |             |
| 12   | 13.7         | M         | 1                   | 1           |             | 1          | 1          | 1          | 1           | 1           | 1           |             |             |             |            |            | 1           |             |
| 13   | 14.0         | G         | 1                   | 1           | 1           | 1          |            | 1          | 1           | 1           |             |             | 1           |             | 1          |            |             |             |
| 14   | 14.7         | L         | 1                   | 1           |             | 1          |            | 1          | 1           | 1           |             | 1           |             |             | 1          |            | 1           |             |
| 15   | 15.5         | G         | 1                   | 1           |             | 1          | 1          | 1          | 1           | 1           | 1           | 1           | 1           |             | 1          |            | 1           |             |
| 16   | 15.5         | M         | 1                   | 1           |             | 1          |            | 1          | 1           | 1           |             | 1           |             |             | 1          |            | 1           |             |
| 17   | 15.7         | G         | 1                   | 1           |             | 1          |            | 1          | 1           | 1           |             | 1           |             |             | 1          | 1          | 1           |             |
| 18   | 15.7         | L         | 1                   | 1           |             | 1          |            | 1          | 1           | 1           |             | 1           |             |             | 1          |            | 1           |             |
| 19   | 16.5         | G         | 1                   | 1           |             | 1          |            | 1          | 1           | 1           |             |             |             |             |            |            | 1           |             |
| 20   | 18.0         | L         | 1                   | 1           |             | 1          |            | 1          | 1           | 1           | 1           | 1           | 1           |             | 1          |            |             |             |
| 21   | 18.2         | L         | 1                   |             |             | 1          |            | 1          | 1           | 1           | 1           |             | 1           |             |            | 1          | 1           |             |
| 22   | 18.3         | G         | 1                   | 1           |             | 1          | 1          | 1          | 1           | 1           | 1           | 1           | 1           |             | 1          |            | 1           |             |
| 23   | 18.4         | L         | 1                   | 1           |             | 1          |            | 1          | 1           | 1           |             |             |             |             |            |            | 1           |             |
| 24   | 22.8         | G         | 1                   | 1           | 1           | 1          |            | 1          | 1           | 1           |             |             | 1           |             | 1          |            |             |             |
| 25   | 24.3         | L         | 1                   |             |             | 1          |            | 1          | 1           | 1           | 1           | 1           |             |             | 1          |            | 1           |             |
| 26   | 24.8         | L         | 1                   |             | 1           |            |            | 1          |             |             |             | 1           |             |             | 1          | 1          | 1           |             |
| 27   | 27.1         | L         | 1                   |             | 1           | 1          |            | 1          | 1           | 1           | 1           | 1           |             | 1           | 1          |            | 1           |             |
| 28   | 27.3         | L         | 1                   | 1           |             | 1          |            | 1          | 1           | 1           |             |             |             |             |            |            |             |             |
| 29   | 28.9         | L         | 1                   |             |             | 1          |            | 1          | 1           | 1           | 1           |             | 1           |             |            | 1          | 1           |             |
| 30   | 33.4         | G         |                     |             |             |            |            | 1          | 1           | 1           |             | 1           |             |             | 1          | 1          |             |             |

L: Leve; M: Moderado; G: Grave; A: Adhesinas; ERI: Evasión de la respuesta inmune; O: otra función, S: Sideróforos; T: Toxina; T6SS: Sistema de secreción tipo seis.

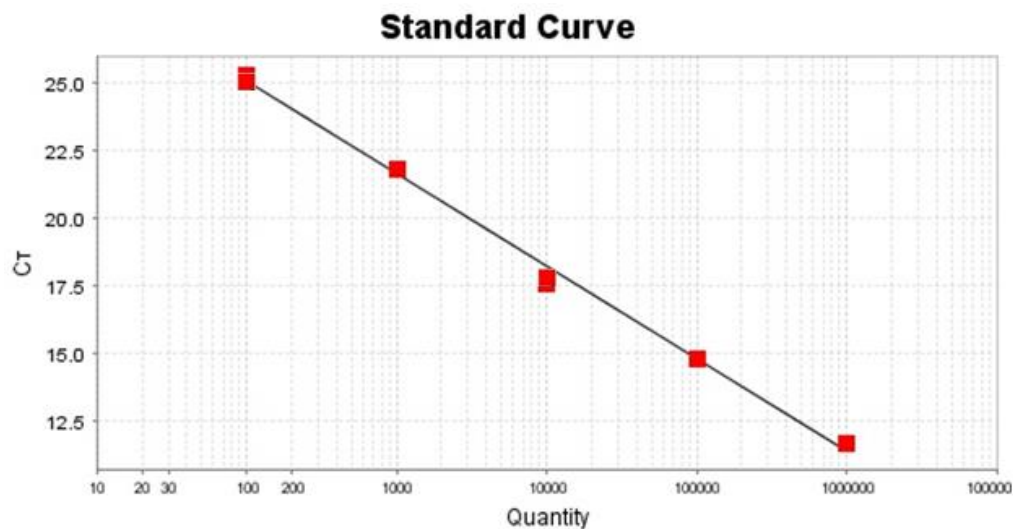
**Tabla 15.** Genes adicionales de virulencia identificados en las cepas de DAEC.

| Caso | Edad (meses) | Severidad | Genes identificados |             |             |            |            |             |             |             |            |            |
|------|--------------|-----------|---------------------|-------------|-------------|------------|------------|-------------|-------------|-------------|------------|------------|
|      |              |           | A                   | A           | A           | ERI        | O          | S           | S           | T           | T          | T          |
|      |              |           | <i>agn43</i>        | <i>fimA</i> | <i>papC</i> | <i>kps</i> | <i>aap</i> | <i>fyuA</i> | <i>iutA</i> | <i>astA</i> | <i>sat</i> | <i>vat</i> |
| 1    | 1.2          | G         | 1                   | 1           |             | 1          |            | 1           | 1           |             | 1          |            |
| 2    | 1.2          | G         | 1                   | 1           |             | 1          |            | 1           |             |             | 1          |            |
| 3    | 5.4          | M         | 1                   |             |             | 1          |            | 1           | 1           |             | 1          |            |
| 4    | 6.9          | L         | 1                   | 1           |             | 1          |            | 1           | 1           |             | 1          |            |
| 5    | 8.1          | L         | 1                   | 1           |             |            |            | 1           | 1           |             |            |            |
| 6    | 8.5          | M         | 1                   | 1           |             | 1          |            | 1           | 1           |             | 1          |            |
| 7    | 8.6          | M         | 1                   | 1           |             | 1          |            | 1           | 1           |             | 1          |            |
| 8    | 10.2         | L         | 1                   | 1           |             | 1          |            | 1           | 1           |             | 1          |            |
| 9    | 10.7         | M         | 1                   | 1           |             |            |            | 1           |             | 1           |            |            |
| 10   | 10.8         | M         |                     | 1           |             |            |            | 1           |             |             |            |            |
| 11   | 11.0         | M         | 1                   | 1           |             | 1          |            | 1           | 1           |             | 1          |            |
| 12   | 11.0         | L         | 1                   |             | 1           | 1          |            | 1           | 1           |             |            |            |
| 13   | 11.1         | M         | 1                   | 1           |             | 1          |            | 1           | 1           | 1           | 1          |            |
| 14   | 11.2         | M         | 1                   | 1           |             | 1          |            | 1           | 1           |             | 1          | 1          |
| 15   | 11.4         | M         | 1                   | 1           |             | 1          |            | 1           | 1           |             | 1          |            |
| 16   | 12.1         | G         | 1                   | 1           |             | 1          |            | 1           | 1           |             | 1          |            |
| 17   | 12.1         | M         | 1                   | 1           |             | 1          |            | 1           | 1           |             | 1          |            |
| 18   | 12.6         | M         | 1                   | 1           |             | 1          |            | 1           | 1           |             | 1          |            |
| 19   | 13.6         | M         | 1                   | 1           |             | 1          |            | 1           | 1           |             | 1          |            |
| 20   | 14.8         | M         | 1                   | 1           |             | 1          |            | 1           | 1           |             | 1          |            |
| 21   | 15.5         | M         |                     |             |             |            | 1          | 1           | 1           | 1           |            |            |
| 22   | 15.5         | M         | 1                   | 1           |             | 1          |            | 1           | 1           |             | 1          |            |
| 23   | 16.2         | M         | 1                   | 1           |             |            |            | 1           |             |             |            |            |
| 24   | 16.8         | M         | 1                   | 1           |             | 1          | 1          | 1           | 1           |             | 1          |            |
| 25   | 18.5         | G         | 1                   |             |             |            |            | 1           | 1           |             |            | 1          |
| 26   | 21.0         | L         | 1                   |             |             |            |            | 1           | 1           |             |            |            |
| 27   | 21.0         | G         | 1                   | 1           |             |            |            | 1           | 1           |             |            |            |
| 28   | 25.3         | L         | 1                   |             |             |            |            | 1           | 1           |             |            |            |
| 29   | 27.6         | M         | 1                   |             |             |            |            | 1           | 1           |             |            |            |
| 30   | 28.7         | L         | 1                   |             |             | 1          |            | 1           | 1           |             |            |            |
| 31   | 28.8         | L         | 1                   |             |             | 1          |            | 1           | 1           |             |            |            |
| 32   | 29.1         | M         | 1                   | 1           |             | 1          |            | 1           | 1           |             | 1          |            |
| 33   | 29.3         | L         | 1                   | 1           |             | 1          |            | 1           | 1           |             | 1          |            |
| 34   | 30.0         | L         | 1                   | 1           |             | 1          |            | 1           | 1           |             | 1          |            |
| 35   | 32.4         | G         | 1                   | 1           |             | 1          |            | 1           |             | 1           |            |            |
| 36   | 33.2         | M         | 1                   |             |             |            |            | 1           | 1           |             |            |            |
| 37   | 47.0         | M         | 1                   |             |             | 1          |            | 1           | 1           |             | 1          |            |
| 38   | 58.1         | G         | 1                   | 1           |             | 1          |            | 1           | 1           |             | 1          |            |

L: Leve; M: Moderado; G: Grave; A: Adhesinas; ERI: Evasión de la respuesta inmune; O: otra función, S: Sideróforos; T: Toxina.

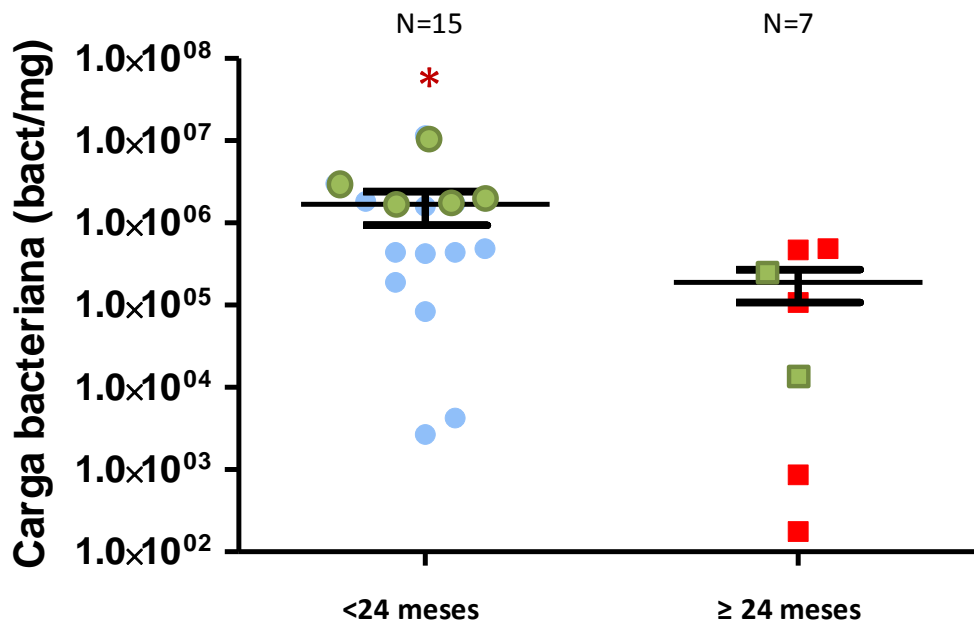
#### 7.4. Cuantificación de la carga bacteriana de EPEC

Se cuantificó la carga bacteriana de EPEC en las muestras de heces colectadas de los pacientes con diarrea donde se identificó a este PED como el único patógeno asociado a la enfermedad. Para ello fue necesario primeramente estandarizar una curva tipo de amplificación por PCR en tiempo real, por lo que se inocularon por triplicado las muestras de heces de un sujeto libre de patógenos con concentraciones conocidas de EPEC. De esta manera se obtuvo la curva tipo de *eaeA* con un coeficiente de correlación ( $R^2$ ) de 0.996 y una eficiencia de 95.86% (Figura 8).

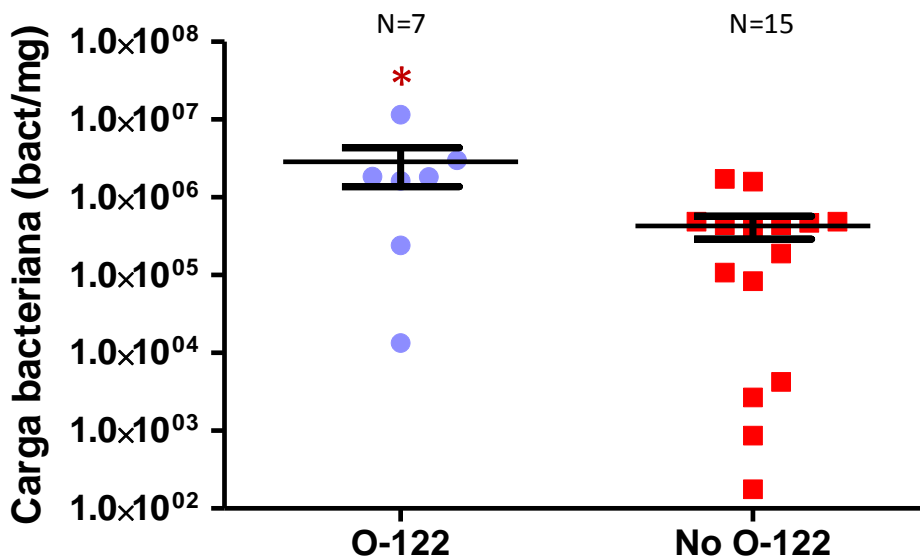


**Figura 8.** Curva tipo de EPEC. La curva se obtuvo amplificando por PCR tiempo real el gen que codifica para la intimina de EPEC (*eaeA*). Las muestras de DNA se purificaron a partir de alícuotas de heces inoculadas con concentraciones conocidas de EPEC. La eficiencia de la curva fue del 95.86% y su coeficiente de correlación ( $R^2$ ) de 0.996.

Posteriormente se purificó el DNA de las muestras de heces de los pacientes con EPEC y se determinó la carga bacteriana de cada una mediante su amplificación por PCR tiempo real y la ulterior interpolación del resultado en la curva tipo. Los resultados mostraron que la carga bacteriana de las muestras obtenidas de niños menores de 24 meses ( $\bar{X}=1.68 \times 10^6$ ) es significativamente mayor ( $P=0.0409$ , MWUT) que la de los pacientes más grandes ( $1.89 \times 10^5$ ) (Figura 9). Al analizar el perfil genético de las cepas de EPEC se observó que aquellas que presentaron los 4 genes de la isla O-122 (*espL*, *lifA*, *nleB* y *nleE*) correspondieron con las muestras de mayor carga bacteriana, principalmente en los niños menores de 24 meses. Por lo que se comparó la carga bacteriana de las muestras que presentaron la isla O-122 contra la de aquellas que carecían de la misma, encontrándose una asociación significativa ( $P= 0.0241$ , MWUT) entre la presencia de la isla y una mayor carga bacteriana de EPEC ( $\bar{X}=2.87 \times 10^7$  vs  $\bar{X}=4.31 \times 10^5$ ) (Figura 10).



**Figura 9.** Análisis por grupo de edad de la carga bacteriana de las muestras de heces de niños infectados con EPEC. Los ● y ■ representan los casos en los cuales las cepas de EPEC presentaron los cuatro genes de la isla O122 (*espL*, *lifA*, *nleB* y *nleE*) en los niños menores y mayores de 24 meses de edad, respectivamente. \*La carga bacteriana de los niños menores de 24 meses fue significativamente mayor que la de los niños mas grandes (P=0.0409, MWUT).



**Figura 10.** Carga bacteriana de las muestras de heces de niños infectados con cepas de EPEC que presentaron la isla O122 en comparación con las muestras de cepas que no presentaron la isla. \*La carga bacteriana de los niños infectado con las cepas que contienen la isla O-122 fue significativamente mayor que la del resto de las muestras (P=0.0241, MWUT).

### 7.5. Secuenciación del genoma de las cepas de EAEC y DAEC asociadas a casos severos de diarrea

Se seleccionaron 9 de las cepas aisladas de los niños infectados con EAEC y 10 de las cepas aisladas de los casos con DAEC (Tabla 16). Adicionalmente, se incluyó una cepa de EAEC aislada de una mujer adulta de 54 años de edad y una cepa comensal de una niña sana de 2 años de edad, ambos sujetos de la ciudad de México. La mayoría de las cepas seleccionadas correspondieron a cuadros de diarrea grave o moderada, a excepción de MEX-14, la cual fue aislada de un sujeto con diarrea leve (caso 21 de EAEC). Es importante destacar que no se incluyeron aislados de sujetos con desnutrición crónica para evitar que la severidad de la diarrea pudiera ser resultado de las características del hospedero.

**Tabla 16.** Cepas seleccionadas para secuenciar su genoma.

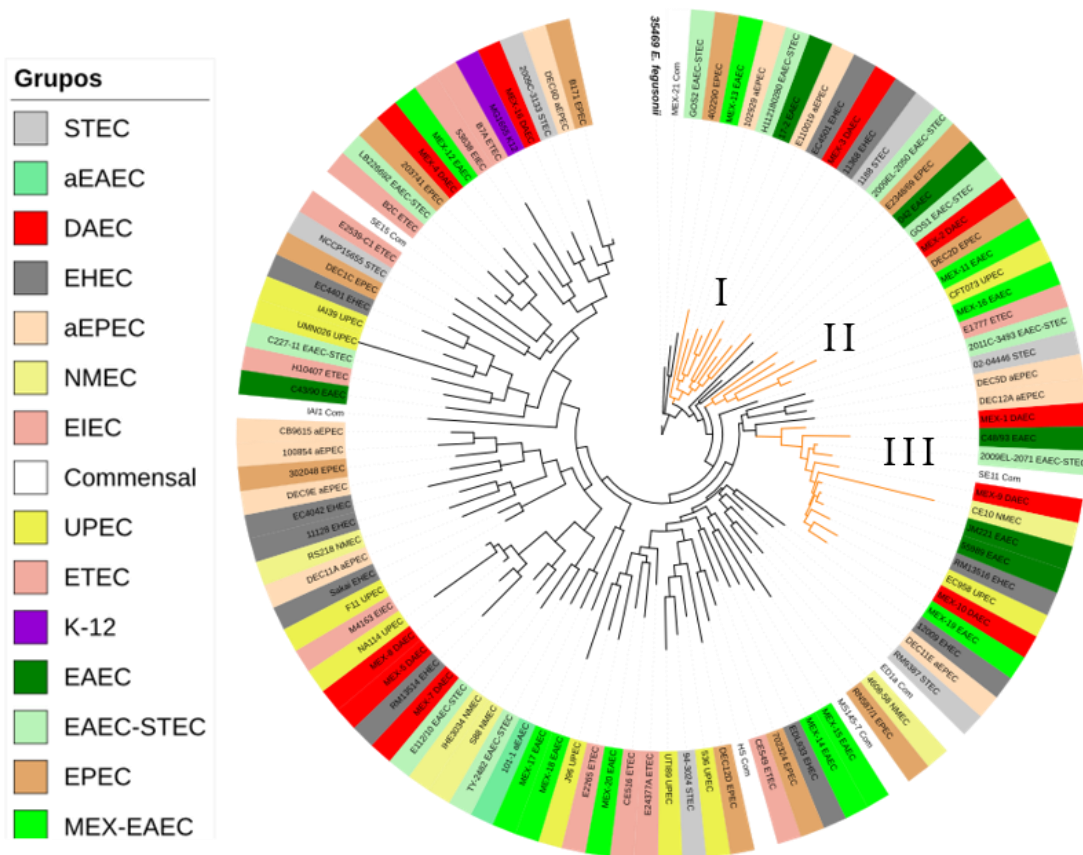
|          | Caso de EAEC/DAEC | Clave  | Género | Edad (meses) | Complicaciones                         | Severidad |
|----------|-------------------|--------|--------|--------------|--|-----------|
| EAEC     | 3                 | MEX-15 | F      | 7.3          | No                                     | Moderado  |
|          | 6                 | MEX-11 | F      | 10.3         | No                                     | Moderado  |
|          | 11                | MEX-18 | M      | 13.6         | No                                     | Moderado  |
|          | 13                | MEX-19 | F      | 14.0         | Convulsiones<br>Hiponatremia           | Grave     |
|          | 15                | MEX-13 | M      | 15.5         | Sangre                                 | Grave     |
|          | 17                | MEX-17 | M      | 15.7         | Hiponatremia<br>Hipocalemia            | Grave     |
|          | 19                | MEX-16 | F      | 16.5         | Hiponatremia<br>Hipocalemia            | Grave     |
|          | 21                | MEX-14 | M      | 18.2         | No                                     | Leve      |
|          | 30                | MEX-12 | F      | 33.4         | Sangre                                 | Grave     |
|          | -                 | MEX-20 | F      | 54 años      | No                                     | Moderado  |
| DAEC     | 2                 | MEX-4  | M      | 1.2          | Convulsiones                           | Grave     |
|          | 15                | MEX-10 | M      | 11.4         | No                                     | Moderado  |
|          | 16                | MEX-8  | M      | 12.1         | No                                     | Grave     |
|          | 19                | MEX-6  | F      | 13.6         | No                                     | Moderado  |
|          | 25                | MEX-5  | F      | 18.5         | Choque<br>hipovolémico<br>Convulsiones | Grave     |
|          | 27                | MEX-7  | M      | 21.0         | Hiponatremia<br>Sangre                 | Grave     |
|          | 29                | MEX-1  | M      | 27.6         | No                                     | Moderado  |
|          | 32                | MEX-3  | F      | 29.1         | No                                     | Moderado  |
|          | 35                | MEX-9  | M      | 32.4         | Hiponatremia<br>Hipocalemia            | Grave     |
|          | 38                | MEX-2  | M      | 58.1         | No                                     | Grave     |
| Comensal | -                 | MEX-21 | F      | 24.0         | -                                      | -         |

### 7.5.1. Análisis filogenético de los genomas de EAEC y DAEC

Para analizar el genoma de estas cepas se incluyeron también 107 genomas previamente reportados en la literatura: 79 de cepas patógenas de *E. coli*, seis de cepas comensales y el genoma de *E. fergusonii* 35469 como grupo externo (Tabla suplementaria 1). El pan-genoma (número total de genes) de esta colección de cepas de *E. coli* constó de 25,706 grupos de genes, mientras que el soft-core (genes presentes en el 95% de los genomas) fue de 2,689 grupos de genes y el core-genoma (genes presentes en el 100% de los genomas) de 1452 grupos de genes. El soft-core y el core-genoma de EAEC, incluyendo las seis cepas previamente secuenciadas (Tabla suplementaria 1), fueron de 3,365 y 3,077 grupos de genes, respectivamente. Mientras que para DAEC, estos fueron de 3,428 y 3,245 grupos de genes, respectivamente. El core-genoma de EAEC con DAEC estuvo constituido por 2,870 grupos de genes.

El árbol filogenético del pan-genoma de *E. coli* reveló que no existen clados definidos para cada patogruppo, por el contrario, todas las cepas se encuentran mezcladas unas con otras formando grupos heterogéneos. Sin embargo, se identificaron tres diferentes clados en los que los genomas de EAEC y DAEC se encontraron juntos (Figura 11).

Con la finalidad de evitar el ruido generado por la transferencia horizontal de genes entre las diferentes cepas de *E. coli*, se procedió a construir un árbol filogenético del core-genoma, para lo cual se emplearon exclusivamente los 1,144 genes que únicamente presentaron una copia (Figura 12). En el árbol se identificaron cuatro y tres clados conteniendo cepas de EAEC y DAEC, respectivamente; cabe mencionar que los tres clados de DAEC incluyeron también genomas de EAEC. El único clado de EAEC que no presentó genomas de DAEC (clado IV), incluyó además los genomas previamente secuenciados de las cepas de EAEC-STEC O104:H4. Asimismo, se encontraron dos genomas de DAEC (MEX-5 y MEX-8) y uno de EAEC (MEX-17) fuera de los clados antes mencionados; MEX-17 se encontró agrupada con genomas de EPECt, STEC y cepas comensales, mientras que los genomas de DAEC se localizaron dentro de un grupo muy grande que incluyó a todas las cepas de ExPEC, en particular MEX-8 se encontró agrupada con dos genomas de UPEC y con una cepa comensal (clado a). Los clados “a” y “b” se resaltaron puesto que están conformados por cepas de ExPEC. Por otro lado, el clado “e” corresponde al origen sugerido de EHEC O157:H7 a partir de EPECa O55:H7. Adicionalmente, se resaltaron los clados “f” y “g” puesto que también incluyen genomas de EPECa y EHEC, así como de EPECt en el caso del clado “g”, por lo que podrían estar asociados a un origen filogenético de EPEC diferente al previamente reportado.

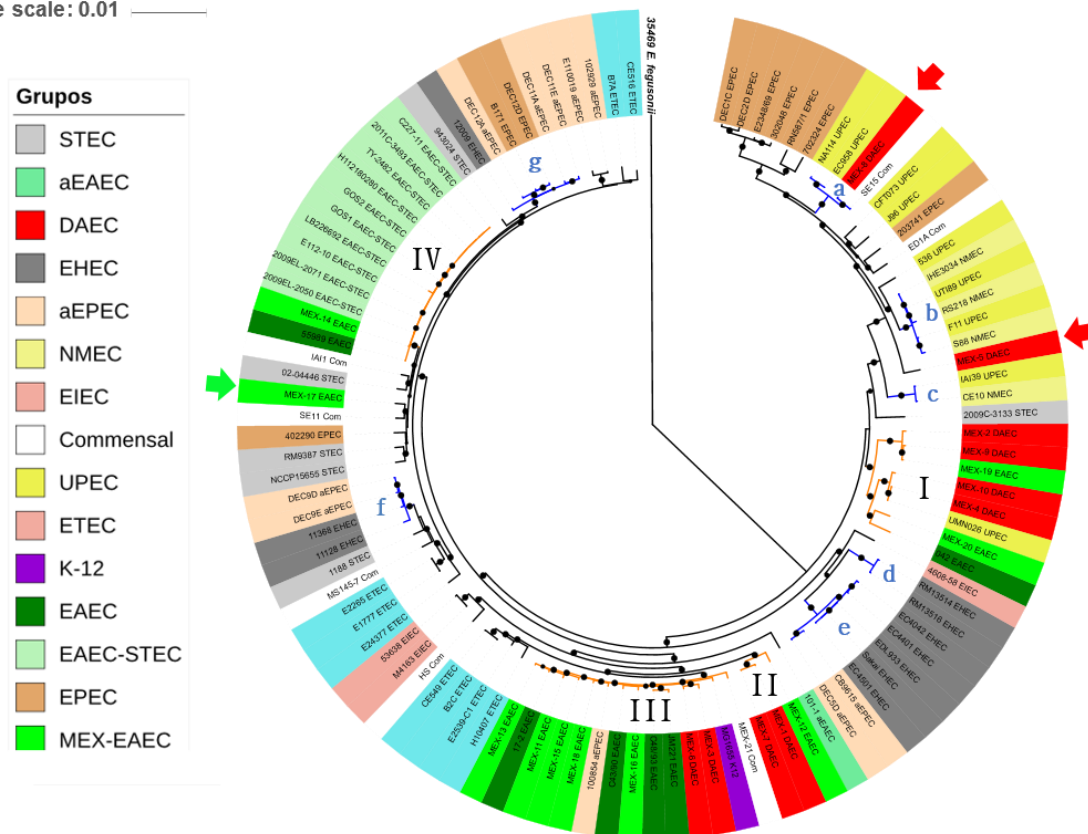


| Clados | Grupos de <i>Escherichia coli</i> (# de genomas)                              |
|--------|---|
| I      | DAEC (1), EAEC (2), EAEC-STEC (2), aEPEC (2), EHEC (2), STEC (1)              |
| II     | DAEC (1), EAEC (2), EPEC (1), UPEC (1)  |
| III    | DAEC (3), EAEC (4), EAEC-STEC (1), EHEC (1), UPEC (1), NMEC (1), Comensal (1) |

**Figura 11.** Árbol filogenético del pan-genoma de *E. coli*. El árbol se contruyó con base en la presencia o ausencia de los 25,726 grupos de genes del pan-genoma de *E. coli* y se enraizó con el genoma de *E. fergusonii* 35469. Los grupos de *E. coli* están indicados con diferentes colores, los cuales se especifican en el recuadro de la izquierda. Los genomas de EAEC se dividieron en tres grupos diferentes: MEX-EAEC, que indica lo genomas secuenciado en este estudio; EAEC, que sólo incluye los genomas previamente secuenciados; y aEAEC, que indica el genoma de la cepa atípica de EAEC, 101-1. Los genomas de EAEC y DAEC se agruparon juntos en 3 diferentes clados, los cuales se indican con números romanos y se especifica su composición de la tabla de la parte inferior. La barra de escala representa el número de diferencias en la presencia o ausencia de genes del pan-genoma.



Tree scale: 0.01



| Clade | <i>Escherichia coli</i> groups (# of genomes)     |
|-------|---|
| I     | DAEC (4), EAEC (3), UPEC (1)                      |
| II    | DAEC (2), EAEC (1)                                |
| III   | DAEC (2), EAEC (9), aEPEC (1), Commensal (1), K12 |
| IV    | EAEC-STEC (10), EAEC (2)                          |

**Figura 12.** Árbol filogenético del core-genoma de *E. coli*. El árbol se contruyó usando las secuencias traducidas de los 1,141 grupos de genes de una sola copia del core-genoma de *E. coli* y se enraizó con el genoma de *E. fergusonii* 35469. Los grupos de *E. coli* están indicados con diferentes colores, los cuales se especifican en el recuadro de la izquierda. Los genomas de EAEC se dividieron en tres grupos diferentes: MEX-EAEC, que indica lo genomas secuenciado en este estudio; EAEC, que sólo incluye los genomas previamente secuenciados; y aEAEC, que indica el genoma de la cepa atípica de EAEC, 101-1. Los clados que incluyeron más de un genoma de EAEC o DAEC se resaltaron en naranja y se indicaron con números romanos. Los genomas MEX-6, MEX-8 y MEX-17 se encontraron fuera de estos clados: MEX-17 (flecha verde) se halló agrupado con genomas de EPECt, STEC y cepas comensales; MEX-6 y MEX-8 (flechas rojas) se encontraron como parte de un grupo que incluyó todos los genomas de ExPEC, de forma particular, MEX-8 se agrupó con dos UPEC y una cepa comensal. Los clados resaltados en azul y con letras minúsculas incluyen cepas de otros patogrupos y que se encuentran asociadas entre si. La barra de escala representa el número de sustituciones de amino ácidos por cada sitio.

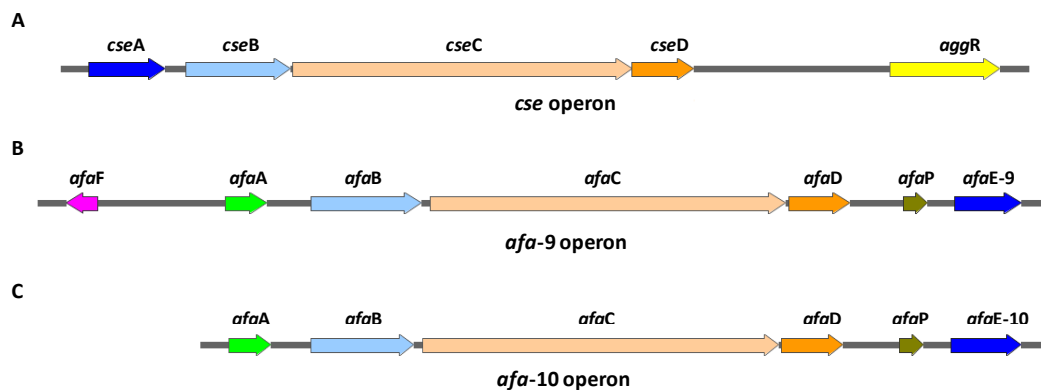
### 7.5.2. Identificación y análisis filogenético de las fimbrias AAF y de las adhesinas Afa/Dr/F1845

Se buscaron los operones que codifican para las fimbrias AAF y para las adhesinas Afa/Dr/F1845 en cada una de las cepas analizadas. De esta manera se observó que las cepas MEX-12 y MEX-20 no presentan ningún operón que codifique para las AAF, sin embargo, en ambos aislados se encontró el gen *cseA*, que codifica para la unidad estructural de la fimbria CS22 de ETEC, posicionado 1410 nt río arriba de *aggR*. El operon de la fimbria CS22 no ha sido descrito en su totalidad, no obstante, se identificó la presencia de tres ORF's hipotéticos que codifican para proteínas homólogas a la chaperona, el usher y la adhesina de la fimbria Sef14 de *Salmonella* Enteritidis, con una homología del 45.5, 55.9 y 29.1%, respectivamente; por lo que se les renombró como *cseB*, *cseC* y *cseD* (Figura 13A). Respecto al resto de las cepas, se encontró que cinco de ellas contenían el operon de la fimbria AAF/I y tres el de AAF/V (Tabla 17).

El análisis de los operones *afa/dra/daa* mostró que cinco de las cepas de DAEC presentaban en su genoma dos operones que codificaban para adhesinas diferentes. Entre estos operones se encontraron dos que no habían sido descritos con anterioridad, por lo que se definieron como *afa-9* y *afa-10* (Figura 13B y 13C). El operón *afa-9* codifica para la adhesina Afa-IX, cuya proteína estructural (AfaE-IX) presenta un 44.6% de identidad con AfaE-I. Por otro lado, la unidad estructural codificada por *afa-10* (AfaE-X) muestra un 36.0% de identidad con la proteína AfaE-V. En general, la adhesina más prevalente fue Afa-V, presente en 5 cepas, seguida de Afa-I, AfaII, Afa-IX y F1845, encontradas en dos genomas cada una. Además, también se identificaron los operones de las adhesinas Afa-X y Dr-II, en una cepa cada uno (Tabla 17).

Posteriormente se analizó la distribución filogenética de las unidades estructurales de las adhesinas AAF y Afa/Dr/F1845, para lo cual se incluyeron 72 secuencias previamente reportadas de las unidades estructurales de otras adhesinas: incluyendo a las fimbrias AAF, a las adhesinas Afa/Dr/F1845 y a los factores de colonización (CS) de ETEC (Figura 14). El árbol mostró que la mayoría de las proteínas se encuentran formando grupos específicos para cada familia de adhesinas, salvo algunas excepciones: Afa-VIII y Afa-X se encontraron asociadas a las fimbrias AAF de EAEC, mientras que CS3 y CS6 se localizaron dentro del grupo de las adhesinas Afa/Dra/F1845. CS22 junto con CS15, formaron el clado más divergente del árbol, mostrando que esta proteína no se encuentra asociada con ninguna otra adhesina de ETEC, EAEC o DAEC. También se incluyó la unidad estructural del pili tipo IV de la cepa C1096 de EAECa, observándose que esta proteína se encuentra muy distante del resto de las adhesinas analizadas. En el árbol pudo apreciarse que tanto Afa-IX como Afa-X forman clados diferentes al resto de las adhesinas Afa/Dr/F1845, corroborando que se trata de nuevas variantes.

Finalmente, se analizó la distribución filogenética de los usher de las adhesinas AAF, Afa/Dr/F1845 y CS (Figura 15). El árbol mostró que los usher de CFA/I y CS1 se encuentran muy distantes del resto de las proteínas analizadas. Además, se observó que las fimbrias AAF están distribuidas en cuatro clados diferentes y estrechamente relacionados. En el caso de las adhesinas Afa/Dr/F1845, se encontró que los usher de la mayoría de éstas son idénticos, a excepción de Afa-VIII, el cual se encuentra localizado en un clado diferente. Por el contrario, se encontró que el usher de la fimbria CS22 no se encuentra asociado a ninguna de las otras proteínas incluídas en el análisis.

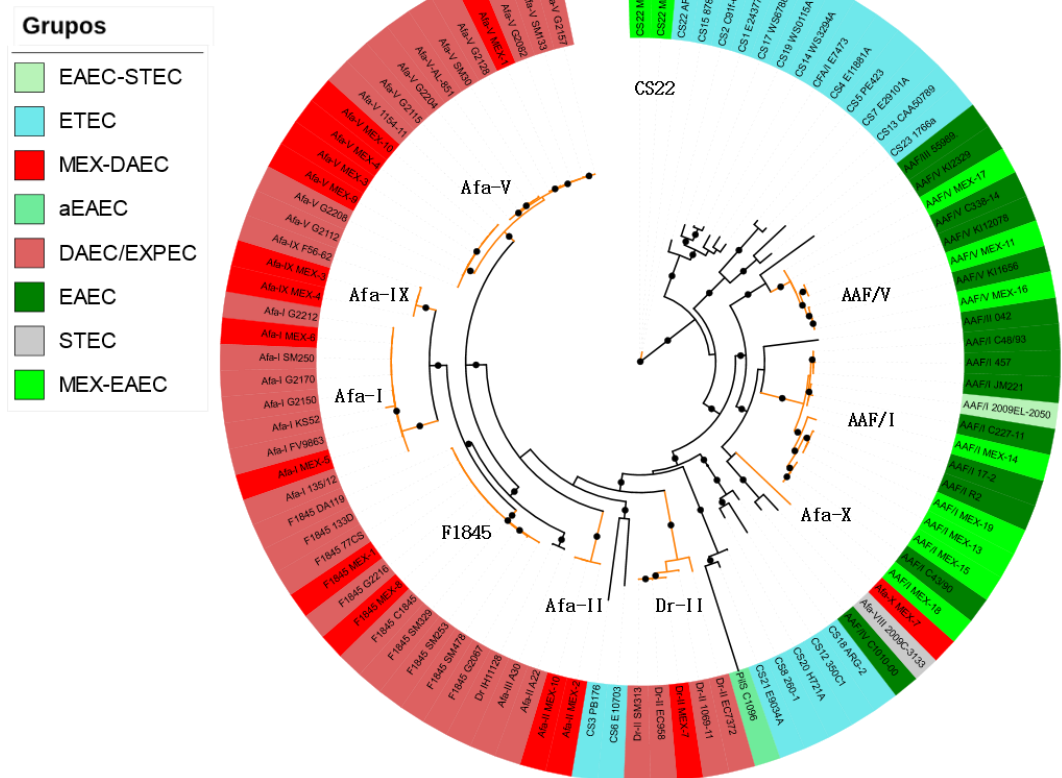


**Figura 13.** Estructura de los operones *cse*, *afa-9* y *afa-10*. **A.** Estructura del operón *cse* que codifica para la fimbria CS22; los genes ABCD codifican para una proteína estructural, una chaperona, un usher y una adhesina, respectivamente. Este operón se encuentra 1,410 nt río arriba de *aggR*. **B.** Estructura del operón *afa-9* que codifica para la adhesina Afa-IX; los genes ABCDE codifican para un regulador transcripcional, una chaperona, un usher, una invasina y una unidad estructural, respectivamente. El gen P es homólogo del gen P del operon *daa* de la fimbria F1845, el cual se ha asociado con el decaimiento del RNA mensajero del operón. Asimismo, se observa la unidad F en sentido opuesto, que codifica para el regulador transcripcional del operón *afa*. **C.** Estructura del operón *afa-10* que codifica para la adhesina Afa-10. La estructura es idéntica a la de *afa-9*, pero en este caso no se identificó el gen de la unidad F.

**Tabla 17.** Prevalencia de las adheinas AAF, CS22 y Afa/Dr/F1845 en las cepas secuenciadas de EAEC y DAEC.

|                   | Genoma | AAF/I | AAF/V | CS22 | Afa-I | Afa-II | Afa-V | Afa-IX | Afa-X | F1845 | Dr-II |
|-------------------|--------|-------|-------|------|-------|--------|-------|--------|-------|-------|-------|
| <b>EAEC</b>       | MEX-11 |       | ■     |      |       |        |       |        |       |       |       |
|                   | MEX-12 |       |       | ■    |       |        |       |        |       |       |       |
|                   | MEX-13 | ■     |       |      |       |        |       |        |       |       |       |
|                   | MEX-14 | ■     |       |      |       |        |       |        |       |       |       |
|                   | MEX-15 | ■     |       |      |       |        |       |        |       |       |       |
|                   | MEX-16 |       | ■     |      |       |        |       |        |       |       |       |
|                   | MEX-17 |       | ■     |      |       |        |       |        |       |       |       |
|                   | MEX-18 | ■     |       |      |       |        |       |        |       |       |       |
|                   | MEX-19 | ■     |       |      |       |        |       |        |       |       |       |
|                   | MEX-20 |       |       | ■    |       |        |       |        |       |       |       |
| <b>DAEC</b>       | MEX-1  |       |       |      |       |        | ■     |        |       | ■     |       |
|                   | MEX-2  |       |       |      |       | ■      |       |        |       |       |       |
|                   | MEX-3  |       |       |      |       |        | ■     | ■      |       |       |       |
|                   | MEX-4  |       |       |      |       |        | ■     | ■      |       |       |       |
|                   | MEX-5  |       |       |      | ■     |        |       |        |       |       |       |
|                   | MEX-6  |       |       |      |       | ■      |       |        |       |       |       |
|                   | MEX-7  |       |       |      |       |        |       |        | ■     |       | ■     |
|                   | MEX-8  |       |       |      |       |        |       |        |       | ■     |       |
|                   | MEX-9  |       |       |      |       |        | ■     | ■      |       |       |       |
|                   | MEX-10 |       |       |      |       |        | ■     | ■      |       |       |       |
| <b>Frecuencia</b> | 9      | 3     | 2     | 2    | 2     | 2      | 5     | 2      | 1     | 2     | 1     |

Tree scale: 1 —



**Figura 14.** Distribución filogenética de las unidades estructurales de las adhesinas AAF, Afa/Dr/F1845 y CS. El árbol se contruyó incluyendo 72 unidades estructurales de otras adhesinas previamente reportadas. Las adhesinas identificadas en este trabajo se etiquetaron como MEX-EAEC y MEX-DAEC, para el caso de los genomas de EAEC y DAEC, respectivamente. La mayoría de las secuencias se encontraron formando grupos específicos para cada familia de adhesinas, con excepción de Afa-VIII/Afa-X (localizadas en el grupo de las fimbrias AAF de EAEC) y de CS3/CS6 (ubicadas dentro del grupo de las adhesinas Afa/Dra/F1845). Aparte de CS15, CS22 no se encontró relacionada con ninguna otra adhesina. La barra de escala representa el número de sustituciones de amino ácidos por cada sitio.



Entre los genes más prevalentes en EAEC se encontraron los que codifican para: la adhesina EhaB (100%), la dispersina y su transportador (94%), el regulador negativo de AggR (Aar; 94%), el T6SS Aai (88%), la proteasa Pic (88%), el sistema toxina-antitoxina CcdA/CcdB (88%), la hemolisina E (HlyE; 81%), el Agn43 (75%), la toxina EAST1 (56%), la bacteriocina Microcina H47 (MccH47; 44%) y el homólogo de *Shigella flexneri* Shf (44%). De los factores antes mencionados, sólo la dispersina, Aar, Pic, el T6SS Aai y la MccH47 se encontraron exclusivamente asociados a EAEC. En cuanto a DAEC, los genes más prevalentes fueron los que codifican para: el sideróforo Yersiniabactina (100%), el precursor de la Arilsulfatasa (AsIA; 100%), la adhesina Cah (90%), el factor de resistencia al complemento TraT (90%), el sideróforo aerobactina (80%), el sistema de transporte de hierro Sit (80%), el factor de resistencia al suero Iss (80%), la cápsula del grupo II (Kps; 80%), la toxina Sat (60%), el sistema de captación de hierro Chu (60%), la toxina TieB (40%), la adhesina EhaG (40%) y el sistema de secreción tipo III dos de *E. coli* (ETT2; 40%).

Los genomas de DAEC contienen en general más sistemas de adquisición de hierro que las cepas comensales ( $P=0.0218$ ) y de EAEC ( $0.0021$ , MWUT), así como también más genes que codifican para factores asociados a la evasión de la respuesta inmune (cápsula, Iss, OmpA, TcpC y TraT) en comparación con las cepas comensales ( $P=0.0172$ , MWUT). Por otro lado, los genomas de EAEC contienen más genes de toxinas que DAEC ( $P=0.0079$ , MWUT) y que las cepas comensales ( $P=0.0006$ , MWUT). Además, el sideróforo Yersiniabactina fue significativamente más prevalente en EAEC ( $P=0.0034$ , FET) o en DAEC ( $P=0.0034$ , FET) que en las cepas comensales. El ETT2 completo sólo se identificó en cepas de EAEC (12.5%) y de DAEC (40%), pero no en los genomas de las cepas comensales.

En general no existen diferencias importantes entre las cepas de EAEC, DAEC o comensales, en cuanto a la cantidad total de genes para adhesinas o bacteriocinas. Sin embargo, el número total de genes de virulencia fue significativamente mayor en EAEC ( $P=0.0042$ , MWUT) o en DAEC ( $P=0.0061$ , MWUT) que en las cepas comensales. Además, cuando se compararon en conjunto los genomas de las cepas aisladas de casos graves de diarrea (tanto de EAEC como de DAEC) contra los genomas de las comensales, se encontró que las cepas patógenas presentaban una mayor prevalencia de Sat ( $P=0.0377$ , FET), así como mayor cantidad de factores asociados a la evasión del sistema inmune ( $P=0.0363$ , MWUT).

Finalmente, se observó que las cepas que presentaron completo el ETT2 se encontraban agrupadas en el Clado I del árbol del core-genoma. Este sistema también se identificó en las cepas de EHEC y EPECa de los clados “d” y “e”, así como en la cepa CE10 de NMEC.

**Tabla 18.** Distribución de los factores de virulencia identificados en las cepas de EAEC, DAEC y comensales de *E. coli*.

|                 | Genoma          | Sev                              | Toxinas                          | ERI                             | SAH                             | ETT2 | Aai T6SS | Total |
|-----------------|-----------------|----------------------------------|----------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|------|----------|-------|
| EAEC            | MEX-11          | M                                | 2: HlyE, ShET1                   | 4: Iss, KPSII, OmpA, Pic        | 3: Aer, Ent, Ybt                | 0    | 1        | 10    |
|                 | MEX-12          | G                                | 3: EAST1, HlyE, ShET1            | 3: OmpA, Pic, TraT              | 2: EntA, Ybt                    | 0    | 1        | 9     |
|                 | MEX-13          | G                                | 5: EAST1, HlyA, HlyE, Sat, ShET1 | 4: Iss, KPSII, OmpA, Pic        | 3: Aer, Ent, Ybt                | 0    | 1        | 13    |
|                 | MEX-14          | L                                | 5: HlyA, Pet, SepA, ShET1, SigA  | 3: OmpA, Pic, TraT              | 3: Aer, Ent, Ybt                | 0    | 1        | 12    |
|                 | MEX-15          | M                                | 4: EAST1, HlyE, Sat, ShET1       | 2: OmpA, Pic                    | 2: Ent, Ybt                     | 0    | 1        | 9     |
|                 | MEX-16          | G                                | 2: HlyE, ShET1                   | 3: OmpA, Pic, TraT              | 1: Ent                          | 0    | 1        | 7     |
|                 | MEX-17          | G                                | 4: EAST1, Sat, SepA, ShET1       | 2: OmpA, Pic                    | 3: Aer, Ent, Ybt                | 0    | 1        | 10    |
|                 | MEX-18          | M                                | 1: HlyE                          | 2: OmpA, Iss                    | 3: Ent, Sit, Ybt                | 0    | 0        | 6     |
|                 | MEX-19          | G                                | 3: HlyA, HlyE, Sat               | 3: KPSII, OmpA, TraT            | 5: Aer, Chu, Ent, Sit, Ybt      | 1    | 0        | 12    |
|                 | MEX-20          | M                                | 4: EAST1, HlyE, SepA, ShET1      | 5: Iss, KPSII, OmpA, Pic, TraT  | 4: Chu, Ent, SitA, Ybt          | 0    | 1        | 14    |
|                 | 042             | -                                | 4: EAST1, HlyE, Pet, ShET1       | 4: KPSII, OmpA, Pic, TraT       | 4: Chu, Ent, Sit, Ybt           | 1    | 1        | 14    |
|                 | 55989           | -                                | 4: EAST1, Pet, ShET1, SigA       | 2: OmpA, Pic                    | 3: Aer, Ent, Ybt                | 0    | 1        | 10    |
|                 | C43/90          | -                                | 4: EAST1, HlyE, Sat, ShET1       | 3: OmpA, Pic, TraT              | 3: Aer, Ent, Ybt                | 0    | 1        | 11    |
|                 | C48/93          | -                                | 3: HlyE, Sat, ShET1              | 2: OmpA, Pic                    | 3: Aer, Ent, Ybt                | 0    | 1        | 9     |
|                 | JM221           | -                                | 3: HlyE, Sat, ShET1              | 2: OmpA, Pic                    | 3: Aer, Ent, Ybt                | 0    | 1        | 9     |
| 17-2            | -               | 5: EAST1, HlyA, HlyE, Sat, ShET1 | 4: Iss, KPSII, OmpA, Pic         | 4: Aer, Ent, Sit, Ybt           | 0                               | 1    | 14       |       |
| <b>Promedio</b> | -               | 3.50                             | 3.00                             | 3.06                            | -                               | -    | 10.56    |       |
| DAEC            | MEX-1           | M                                | 0                                | 2: OmpA, TraT                   | 4: Aer, Ent, Sit, Ybt           | 0    | 0        | 6     |
|                 | MEX-2           | G                                | 3: HlyE, Sat, TieB               | 4: Iss, KPSII, OmpA, TraT       | 5: Aer, Ent, Chu, Ybt, Sit      | 1    | 0        | 13    |
|                 | MEX-3           | M                                | 3: HlyE, Sat, TieB               | 4: Iss, KPSII, OmpA, TraT       | 4: Aer, Ent, Sit, Ybt           | 0    | 0        | 11    |
|                 | MEX-4           | G                                | 2: HlyE, Sat                     | 4: Iss, KPSII, OmpA, TraT       | 6: Aer, Chu, Ent, Sal, Sit, Ybt | 1    | 0        | 13    |
|                 | MEX-5           | G                                | 1: Vat                           | 5: Iss, KPSII, OmpA, TcpC, TraT | 4: Aer, Chu, Ent, Ybt           | 0    | 0        | 10    |
|                 | MEX-6           | M                                | 3: HlyE, Sat, TieB               | 4: Iss, KPSII, OmpA, TraT       | 4: Aer, Ent, Sit, Ybt           | 0    | 0        | 11    |
|                 | MEX-7           | G                                | 0                                | 3: Iss, OmpA, TraT              | 4: Aer, Ent, Sit, Ybt           | 0    | 0        | 7     |
|                 | MEX-8           | G                                | 3: EspC, Sat, TieB               | 3: KPSII, OmpA, TraT            | 6: Aer, Chu, Ent, Hbp, Sit, Ybt | 0    | 0        | 12    |
|                 | MEX-9           | G                                | 3: EAST1, EatA, HlyE             | 3: Iss, KPSII, OmpA             | 3: Chu, Ent, Ybt                | 1    | 0        | 10    |
|                 | MEX-10          | M                                | 2: HlyE, Sat                     | 4: Iss, KPSII, OmpA, TraT       | 4: Chu, Ent, Sit, Ybt           | 1    | 0        | 11    |
| <b>Promedio</b> | -               | 2.00                             | 3.60                             | 4.40                            | -                               | -    | 10.40    |       |
| Comensal        | MEX-21          | -                                | 1: HlyE                          | 3: Iss, OmpA, TraT              | 3: Aer, Ent, Sit                | 0    | 0        | 7     |
|                 | HS              | -                                | 0                                | 1: OmpA                         | 1: Ent                          | 0    | 0        | 2     |
|                 | SE11            | -                                | 0                                | 3: Iss, OmpA, TraT              | 1: Ent                          | 0    | 0        | 4     |
|                 | SE15            | -                                | 2: EspC, TieB                    | 3: KPSII, OmpA, TraT            | 4: Chu, Ent, Sit, Ybt           | 0    | 0        | 9     |
|                 | IAI1            | -                                | 0                                | 2: OmpA, Iss                    | 1: Ent                          | 0    | 0        | 3     |
|                 | ED1A            | -                                | 2: SigA, TieB                    | 3: KPSII, OmpA, TraT            | 5: Aer, Chu, Ent, Sit, Ybt      | 0    | 0        | 10    |
|                 | MS145-7         | -                                | 0                                | 2: OmpA, TraT                   | 1: Ent                          | 0    | 0        | 3     |
|                 | <b>Promedio</b> | -                                | 0.71                             | 2.43                            | 2.29                            | -    | -        | 5.43  |

Sev: severidad; ERI: Evasión de la respuesta inmune; SAH: Sistema de adquisición de hierro; ETT2: Sistema de secreción tipo III dos; T6SS: Sistema de secreción tipo 6; L: Leve; M: Moderado; G: Grave, Ent: Enterobactin; Sal: Salmoquelina; Ybt: Yersiniabactina; Aer: Aerobactina



## 8. DISCUSIÓN

La parte inicial de este proyecto consistió en analizar la distribución epidemiológica de diferentes patógenos intestinales asociados a diarrea infantil. Por lo que se seleccionó como población de estudio a los niños menores de cinco años con diarrea aguda que buscaron atención en un hospital de tercer nivel en Mérida, Yucatán. El estudio contó con una población total de 893 pacientes con diarrea, de los cuales 520 (58%) fueron varones. Anteriormente se ha reportado en diversas partes del mundo que son los varones los que presentan más episodios de diarrea en este grupo etareo (Siziya *et al.*, 2013; George *et al.*, 2014; UNICEF, 2015).

El análisis de la distribución epidemiológica de los patógenos identificados, mostró que en conjunto los PED se mantienen como los principales patógenos asociados a diarrea infantil, como ya se había demostrado previamente para esta población (Patzi-Vargas *et al.*, 2015). Los resultados globales del estudio (4 años y medio) revelaron una prevalencia global del 31% para los PED, lo que los posicionó incluso por arriba de Rotavirus, *Salmonella enterica* o *Shigella spp.*, tres de los patógenos intestinales más importantes a nivel mundial (Kotloff *et al.*, 2013; Platts-Mills *et al.*, 2015). Cabe mencionar que este trabajo incluyó muestras del periodo de Enero del 2010 a Julio del 2014, posterior a la introducción de la vacuna contra Rotavirus en el estado de Yucatán en el 2007; lo cual se ha asociado con una disminución en el número de casos de diarrea causados por este patógeno en México y en otras partes del mundo (Richardson *et al.*, 2011; Assis *et al.*, 2013; Centers for Disease Control and Prevention, 2009). Diversos estudios epidemiológicos han destacado a los PED como los patógenos intestinales más comúnmente identificados en niños con diarrea aguda, reportándose prevalencias totales del 22.5 al 58% (Ochoa *et al.*, 2009; Opintan *et al.*, 2010; Mercado *et al.*, 2011; Taniuchi *et al.*, 2013; Benmessaoud *et al.*, 2015; Nhampossa *et al.*, 2015). De manera particular, un estudio realizado en niños Peruanos con diarrea mostró una prevalencia idéntica a la encontrada por nosotros (31%) (Ochoa *et al.*, 2009). Sin embargo, en dicho trabajo el patogrupa más prevalente identificado fue EAEC, mientras que en nuestro estudio fue DAEC, lo que demuestra que la distribución de los PED varía dependiendo de la región donde se realice el estudio (Ochoa *et al.*, 2009). Cabe mencionar que EAEC resultó ser el segundo patogrupa más frecuentemente identificado, seguido de EPECa, ETEC y de las infecciones mixtas, mientras que las prevalencias de EPECt y de EIEC fueron muy bajas y de ningún paciente se aislaron cepas de STEC. La baja prevalencia de EPECt en comparación con EPECa, es similar a lo que nuestro grupo de trabajo ya ha reportado en diferentes regiones de México (Estrada-García *et al.*, 2005; Estrada-García *et al.*, 2009), así como a lo observado en otros países en vías de desarrollo e industrializados (Revisado en Hu & Torres, 2015). Previamente nuestro grupo de trabajo reportó la prevalencia

de los PED en Villahermosa y la Ciudad de México (Estrada-García *et al.*, 2005), partiendo de este estudio como punto de referencia pudo observarse que los datos correspondientes a ETEC, EPECa, EPECt o EIEC prácticamente no variaron, sin embargo, sí se observó una diferencia importante en la prevalencia de EAEC (56/893 casos en Yucatán vs 16/145 casos en Villahermosa) y de STEC, del cual no se identificó una sola cepa en el presente trabajo. Particularmente, la baja prevalencia de STEC en muestras de niños con diarrea en México esta muy bien documentada (Paniagua *et al.*, 2007; Navarro & Estrada-García, 2010).

Cabe mencionar que hasta la fecha son pocos los grupos de investigación que incluyen a DAEC en estudios epidemiológicos, por lo que la prevalencia de este patógeno se desconoce en la mayor parte del mundo. Al comparar nuestros resultados con los reportados por otros autores, se decidió incluir solamente los estudios donde se emplearon métodos moleculares de detección (PCR o hibridación con sondas), puesto que los resultados recabados con ensayos de adherencia dependen en gran parte del analista, por lo que suelen presentar datos conflictivos. De esta manera se observó que la prevalencia de DAEC (11.3%) en nuestro estudio fue similar a la reportada anteriormente en EUA y en Marruecos (12.7 y 12.3%, respectivamente) (Cohen *et al.*, 2005; Benmessaoud *et al.*, 2015). Sin embargo, otros trabajos han mostrado que la prevalencia de DAEC puede ser muy variada, reportándose desde un 1.9% en Perú hasta un 18.4% en Brasil (Mercado *et al.*, 2011; Lozer *et al.*, 2013; Acosta *et al.*, 2016). En estos estudios se observó también que EAEC (38.5-6.5%) y EPEC (5.0-19.6%) suelen encontrarse entre los PED más prevalentes, incluso por arriba de DAEC (Cohen *et al.*, 2005; Ochoa *et al.*, 2009; Lozer *et al.*, 2013; Benmessaoud *et al.*, 2015; Acosta *et al.*, 2016). Lo que confirma el hecho de que la prevalencia de los diferentes patogrupos depende de la región donde se realice el estudio. Con base en lo anterior, se decidió delimitar este trabajo al análisis de EPEC (incluyendo tanto las cepas típicas como las atípicas), EAEC y DAEC; los cuales en conjunto representaron aproximadamente el 75% de los pacientes donde se identificó algún PED.

El análisis epidemiológico de los pacientes incluidos en este trabajo, mostró que la mayoría de los niños tuvieron infecciones mixtas con diferentes agentes etiológicos de la diarrea, por lo que no es posible atribuir los síntomas y signos del sujeto enfermo a la infección de un patógeno en particular. Por esta razón, para caracterizar el cuadro clínico de los diferentes PED, se decidió trabajar exclusivamente con los casos en los que se identificó la presencia de EPEC, EAEC o DAEC como patógeno único. El análisis general de los 90 pacientes seleccionados de patógeno único, reveló que no existe asociación alguna entre la severidad de la diarrea y la edad o el estatus nutricional de los sujetos.

Al comparar el cuadro clínico de los sujetos infectados con EPEC, EAEC o DAEC, pudo observarse que EPEC se encuentra asociado con diarrea en niños menores de 5 meses, lo que

concuenda con reportes previos donde se demostró que EPEC es más prevalente en niños menores de un año con diarrea (Estrada-Garcia *et al.*, 2009; Hu & Torres, 2015, Nataro y Kaper, 1998). Asimismo, se observó que la característica más particular del cuadro clínico de la diarrea asociada a DAEC es que la mayoría de los sujetos presentan vómito (95%) con una frecuencia superior a dos episodios por día (86% de los pacientes); lo cual se asoció con un incremento en la severidad de la diarrea, ya que el 73% de los pacientes presentaron casos entre moderados y graves, a diferencia de EPEC y EAEC, donde esta cifra fue tan sólo del 50%. Los datos anteriores demuestran que a pesar de tratarse de variantes de una misma especie, los patogrupos de *E. coli* inducen cuadros clínicos diferentes en sus hospederos (Kaper *et al.*, 2004).

A pesar de que el análisis de la severidad con respecto al estatus nutricional de los pacientes no mostró asociaciones significativas para ninguno de los PED estudiados, en el caso particular de EPEC se observó que la mayor parte de los sujetos con diarrea moderada y grave se encontraban desnutridos (55%), a diferencia de los pacientes con un cuadro leve (27%). Además, los dos únicos casos graves que se registraron correspondieron a niños desnutridos, menores de un año y que no recibieron lactancia materna. Anteriormente se propuso que la leche materna además de prevenir que el niño sufra de desnutrición, constituye un factor de protección ante infecciones sintomáticas de EPEC debido a la presencia de anticuerpos sIgA, lactoferrina y oligosacáridos (Manthey *et al.*, 2014; Hu & Torres, 2015). Por lo que sugerimos que la severidad registrada para los casos graves de EPEC fue el resultado de la combinación de los factores antes mencionados.

Por otro lado, al analizar el perfil genético de las cepas de EPEC se encontró una asociación significativa entre la presencia de los cuatro genes de la isla O-122 y el establecimiento de un cuadro moderado de diarrea. Además, se observó que las cepas que tenían completa la isla O-122 se aislaron más frecuentemente de los casos de diarrea donde se registró una mayor carga bacteriana de EPEC; principalmente en los niños menores de 24 meses. Esta isla codifica para tres efectores (EspL, NleB y NleE) que han sido asociados con la inhibición de la respuesta inmune del hospedero, así como para la adhesina LifA, a la cual también se le ha atribuido un papel importante en la evasión de la respuesta inmune (Klapproth *et al.*, 2000; Newton *et al.*, 2010; Gao *et al.*, 2013). En conjunto, estos cuatro factores se han vinculado con infecciones sintomáticas de EPEC y con una mayor capacidad de colonización del tracto intestinal, lo que explica la levada carga bacteriana de los pacientes infectados con estas cepas de EPEC (Badea *et al.*, 2003; Afset *et al.*, 2006; Kelly *et al.*, 2006; Narimatsu *et al.*, 2010; Pearson *et al.*, 2017; Slinger *et al.*, 2017).

Después de dividir los casos de EPEC por grupos de edad, se encontró que las cepas aisladas de los niños mayores de dos años presentaban en promedio una mayor cantidad de genes para

toxinas mientras que en las muestras de heces de los niños menores de dos años se cuantificaron cargas bacterianas más elevadas. En un estudio previo se analizaron las diferencias en la carga bacteriana de EPEC entre pacientes con diarrea y portadores asintomáticos, los resultados mostraron que solamente en el grupo de niños menores de un año la carga bacteriana de EPEC fue significativamente mayor en los sujetos con diarrea que en los asintomáticos. Lo que sugiere que a esa edad el aumento en la carga bacteriana es importante para la patogénesis de EPEC. Sin embargo, al analizar exclusivamente los datos de los sujetos con diarrea, pudo observarse que a diferencia de nuestros resultados, la carga bacteriana registrada por ellos en los niños mayores de un año resultó ser más elevada que la de los niños menores (Barletta *et al.*, 2011). A este respecto, es importante destacar que una parte de las heces analizadas correspondieron a sujetos con infecciones mixtas, aparte de que no se reporta el perfil genético de virulencia de estas cepas, por lo que no es posible inferir si esta mayor carga bacteriana pudo deberse a un efecto sinérgico con otro patógeno o a la participación de factores de virulencia específicos que favorecieran su proliferación. En conjunto, los datos nos permitieron formular la hipótesis de que dependiendo de la edad del hospedero, la cepa de EPEC que lo infecte podrá mostrar una mayor capacidad de colonización (en los niños pequeños) o podrá ser más virulenta por medio de la producción de toxinas (en los niños mayores), lo que propiciaría que lleve a cabo dos mecanismos de patogenicidad diferentes:

- a) En los niños pequeños le sería más fácil a EPEC establecerse y colonizar el tracto intestinal debido a que el hospedero no se ha encontrado expuesto con anterioridad a este patógeno, por lo que no es capaz de montar una respuesta inmune de memoria, a la vez que la bacteria se encarga de inhibir la respuesta inflamatoria mediante la expresión de factores específicos, tales como los codificados en la isla O-122. En un principio la infección no sería sintomática puesto que el patógeno no ha colonizado por completo el tracto intestinal y la respuesta inmune del hospedero se encuentra inhibida, sin embargo, al incrementar la población de EPEC, los daños generados sobre el epitelio terminarían afectando la función normal del tejido; lo que finalmente culminaría en la presencia de diarrea y de un cuadro clínico más severo (moderado).
- b) En los niños mayores, puesto que estos ya se han encontrado previamente en contacto con el patógeno (considerando que se trata de una comunidad endémica para EPEC), es necesario que la bacteria sea más virulenta para poder colonizar el intestino y provocar una infección sintomática, lo cual logra mediante la producción de toxinas que inducen daños sobre el epitelio intestinal, así como la liberación de citosinas y el subsecuente reclutamiento de leucocitos (Savkovic *et al.*, 1997; Dautin, 2010; Mercado *et al.*, 2011). El establecimiento de la respuesta inflamatoria podría influir en la secreción de fluidos

por medio de la acción de la adenosina; generada por la interacción de los neutrófilos con el epitelio intestinal (Hasko *et al.*, 2006). Asimismo, el mantenimiento de un estado inflamatorio continuo podría afectar la composición de la microbiota intestinal del hospedero y la protección que ésta ofrece ante la infección de bacterias patógenas, tal como se ha descrito anteriormente para *Salmonella* (Stecher *et al.*, 2007; Behnsen *et al.*, 2015). Lo que culminaría en un daño severo del tejido intestinal, en el incremento en la secreción de fluidos y en la ulterior presencia de diarrea.

Cabe mencionar que de acuerdo con las hipótesis anterior, en general las infecciones sintomáticas de EPEC en niños pequeños se caracterizarían por presentar cargas bacterianas elevadas de cepas con una cantidad menor de genes para toxinas. Los continuos episodios de diarrea de estos pacientes incrementarían el riesgo de contagio de otros individuos y favorecerían la probabilidad de que los niños pequeños sean infectados por primera vez con estas cepas de EPEC. Sin embargo, no debe dejarse a un lado el hecho de que una cepa portadora de genes de toxinas también podría ser capaz de colonizar de forma eficiente a los niños pequeños. Asimismo, es importante mencionar que en este trabajo, las dos cepas de EPEC aisladas de niños mayores de 24 meses y que portaron completa la isla O-122, no mostraron una carga bacteriana elevada pero sí contenían los genes que codifican para la toxina CDT, por lo que es probable que la estrategia empleada por estas bacterias fuera la de generar un estado inflamatorio sostenido mediante la producción de CDT, lo que terminaría por inducir un proceso apoptótico en los enterocitos; tal como lo demostramos recientemente mediante la infección de células HeLA (Meza-Segura *et al.*, 2017).

El cuadro clínico de los sujetos infectados con EAEC no presenta características particulares que permitan diferenciarlo de las infecciones causadas por EPEC o DAEC. Sin embargo, resulta interesante el hecho de que la mayoría de los casos (24/30) correspondieron a niños menores de 24 meses y de que el niño de mayor edad contara tan sólo con 33.4 meses, puesto que anteriormente se ha reportado que EAEC se aísla de sujetos de diferentes edades con diarrea e incluso de adultos con diarrea del viajero después de visitar México (Nataro *et al.*, 2006; Estrada-García & Navarro-García 2012). Por otro lado, a pesar de que la mitad de los casos se registraron como leves, el 23% de los pacientes presentaron algún tipo de complicación, tales como: desequilibrios hidroelectrolíticos (hiponatremia o hipocalcemia), sangre en heces, convulsiones e incluso uno de los individuos sufrió un choque hipovolémico. Es importante mencionar que anteriormente se había descrito la presencia de sangre en las heces de niños infectados con EAEC (Cravioto *et al.*, 1991; Cennimo *et al.*, 2009), sin embargo, nunca antes se habían reportado complicaciones como las observadas en este trabajo. No se encontró ninguna relación entre la

severidad de la diarrea y el estatus nutricional del niño, tal como se ha sugerido en reportes previos para infecciones con EAEC, no obstante, en todos estos casos la asociación fue con diarrea persistente (mayor a 14 días) y no con diarrea aguda (Bhan *et al.*, 1989a; Bhan *et al.*, 1989b; Opintan *et al.*, 2010). Por otro lado, se observó que la edad promedio de los sujetos con diarrea moderada por EAEC fue significativamente menor que la de aquellos con diarrea leve o grave, sugiriendo que la severidad de los casos moderados se debe principalmente a una mayor susceptibilidad del hospedero, probablemente por no haber estado en contacto previo con el patógeno.

La búsqueda de genes de virulencia en las cepas de EAEC reveló que los factores más prevalentes fueron aquellos que codifican para: la dispersina (*aap*, 100%), el traslocador de dispersina (*aatA*, 96.7%), el receptor de los sideróforos yersiniabactina (*fyuA*, 80%) y aerobactina (*iutA*, 36.7%), la fimbria Antígeno 43 (*agn43*, 96.7%), la fimbria tipo 1 (*fimA*, 76.7%), las toxinas EAST1 (*astA*, 43.3%) y Sat (*sat*, 40%), la serina proteasa Pic (*pic*, 66.7%), la cápsula tipo II (*kps* MTII, 43.3%) y la subunidad C del T6SS Aai (*aaiC* (66.7%). Lo cual resulta muy similar a lo reportado previamente con respecto a cepas típicas de EAEC (Boisen *et al.*, 2008). No obstante, cuando se comparó con estudios donde se incluyen tanto cepas típicas como atípicas, se encontraron diferencias relevantes, tales como una disminución en la prevalencia de *aap*, *aatA* y *pic*, así como un incremento en la prevalencia de *astA* y de *fimA*. Lo que sugiere que los genes que codifican para la dispersina, para su transportador y para la serina proteasa Pic, resultan mejores marcadores de EAECt que los genes que codifican para la toxina EAST1 o para la fimbria tipo 1 (Boisen *et al.*, 2008; Cennimo *et al.*, 2009; Regua-Mangia *et al.*, 2009; Boisen *et al.*, 2012). De forma interesante, el único gen que pudo asociarse a los casos moderados/graves de diarrea es el que codifica para la fimbria tipo 1 (*fimA*); lo cual puede deberse a que ésta participa de forma importante en la adherencia de EAEC, reportándose que en su ausencia la capacidad de adhesión y de formación de biofilm se ven disminuidas hasta en un 80 y un 76% con respecto a una cepa silvestre, respectivamente (Moreira *et al.*, 2003). Asimismo, se encontró una asociación directa entre una mayor cantidad de genes para adhesinas y el establecimiento de cuadros moderados/severos de diarrea, sugiriendo nuevamente que la adhesión juega un papel de suma importancia en la patogénesis de EAEC. Por el contrario, se observó que las cepas aisladas de casos moderados presentaron menos genes de virulencia que las de casos leves o graves, lo que se relaciona directamente con el hecho de que los sujetos con diarrea moderada tuvieron una edad promedio menor que la del resto de los pacientes, reafirmando la idea de que en estos individuos la severidad se debió a que el hospedero se encontraba en un estado de mayor susceptibilidad, ya sea porque no se había enfrentado previamente con el patógeno o porque la barrera protectora que ofrece la microbiota no se encontraba en un estado maduro,

el cual se alcanza normalmente después de los dos años de edad (Kamada *et al.*, 2013). Al igual que con EPEC, los datos sugieren que EAEC recurre a la producción de toxinas para provocar diarrea en los niños mayores de 24 meses, entre las que destaca SepA; que corresponde al único factor que pudo asociarse con la presencia de diarrea en un estudio previo (Boisen *et al.*, 2008). En cambio, en los niños menores, la parte más importante del proceso de patogénesis de EAEC parece ser su capacidad de adhesión, la cual podría verse favorecida en gran medida por la producción de la fimbria tipo 1. Sin embargo, si la cepa que infecta a los niños pequeños cuenta además con genes para toxinas como Sat o la  $\alpha$ -Hemolisina, se induciría un estado inflamatorio en el sujeto y el cuadro clínico resultaría más severo. Cabe mencionar EAEC se ha asociado anteriormente a cuadros inflamatorios de diarrea, lo que se relaciona con la elevada cantidad de genes para toxinas codificados en su genoma (Greenberg *et al.*, 2002; Cennimo *et al.*, 2009; Opintan *et al.*, 2010; Mercado *et al.*, 2012).

Tal como se mencionó con anterioridad, el cuadro clínico de DAEC se caracterizó por su tasa elevada de vómito y por el número de episodios que presentaron los pacientes, lo que se tradujo en una mayor proporción de casos moderados. Además, se encontró que 18% de los pacientes presentaron complicaciones, tales como desequilibrios hidroelectrolíticos, sangre en heces, convulsiones, choque hipovolémico e incluso sepsis. Anteriormente se reportó la presencia de sangre en heces en el 20% de los sujetos con DAEC, sin embargo, no se han reportado complicaciones como las descritas en el presente trabajo (Ochoa *et al.*, 2009). Al igual que con EAEC, no se encontró ninguna asociación entre la severidad y estatus nutricional de los pacientes, sin embargo, sí se observó que los dos únicos pacientes graves menores de un año no recibieron pecho materno y que correspondieron a los dos únicos casos menores de cinco meses. Por lo que puede sugerirse que la leche materna confiere protección ante el establecimiento de un cuadro severo de diarrea, por lo menos durante los primeros cinco meses de vida.

En cuanto a la detección de genes de virulencia, pudo observarse que los más prevalentes fueron los que codifican para el receptor de los sideróforos yersiniabactina (*fyuA*, 100%) y aerobactina (*iutA*, 86.8%), la fimbria Antígeno 43 (*agn43*, 94.7%), la fimbria tipo 1 (*fimA*, 71.0%), la cápsula tipo II (*kps* MTII, 71%) y la toxina Sat (*sat*, 60.5%). Con una menor prevalencia se encontró también a los genes para las toxinas EAST1 (*astA*, 10.5%) y Vat (*vat*, 5.3%). Como puede observarse, en general las cepas de DAEC presentan menos genes para toxinas ( $\bar{X}=0.76$ ) en comparación con otros DEP ( $\bar{X}_{EPEC}=1.14$  y  $\bar{X}_{EAEC}=2.14$ ), sin embargo, con anterioridad se ha descrito que DAEC es capaz de inducir inflamación al interactuar con células epiteliales y se ha reportado que las muestras de heces de niños con diarrea presentan una mayor cantidad de leucocitos que las muestras de portadores asintomáticos (Mercado *et al.*, 2011; Meza-Segura &

Estrada-García, 2016). Pese a que estudios previos han reportado una elevada prevalencia de Sat en DAEC (46%), la cepa de referencia C1845 no la produce y sin embargo, es capaz de inducir una mayor producción de citocinas inflamatorias que una cepa comensal (Guignot *et al.*, 2007; Mansan-Almeida *et al.*, 2013; Patzi-Vargas *et al.*, 2013). Por lo que existen dos posibilidades: DAEC produce toxinas que aún no han sido descritas o es capaz de inducir un estado inflamatorio empleando un mecanismo diferente. Por el contrario, se encontró que las cepas de DAEC presentan en promedio más genes para sideróforos ( $\bar{X}=1.87$ ) que las de EPEC ( $\bar{X}=0.55$ ,  $P<0.0001$ ) o EAEC ( $\bar{X}=1.167$ ,  $P<0.0001$ ). Pese a que el papel de los sideróforos se ha reducido al estudio de las cepas uropatógenas de *E. coli*, es necesario tener en cuenta que el hierro constituye uno de los elementos esenciales para el crecimiento microbiano, razón por la cual ante la presencia de una infección bacteriana uno de los mecanismos de defensa del hospedero consiste en reducir la cantidad de hierro disponible en el ambiente para frenar el crecimiento del agente invasor; esto es llevado a cabo principalmente por los neutrófilos, quienes se encargan de secretar lactoferrina y lipocalina-2, factores encargados de captar hierro y de secuestrar sideróforos, respectivamente (Hood & Skaar, 2012). Entre los factores secuestrados por la lipocalina-2 se encuentra la enterobactina, uno de los sideróforos más comunes en cepas comensales, por lo que ante la presencia de esta proteína el crecimiento de las cepas comensales también se vería afectado, sin embargo, al contar con una cantidad tan amplia de sideróforos, es probable que DAEC obtenga una ventaja sobre la microbiota intestinal para propagarse al inducir un estado de inflamación intestinal (Skaar & Raffatellu, 2015).

A pesar de que el repertorio de toxinas detectadas en DAEC fue muy reducido, se observó que las cepas aisladas de casos moderados/graves presentan una mayor cantidad de genes para toxinas que las cepas de casos leves. Al segmentar los datos por grupos de edad se encontró que esta relación se mantenía para los casos de niños menores de 24 meses. Además, al igual que con EAEC, se observó que las cepas de los niños pequeños presentaban una mayor cantidad de genes para adhesinas, entre los que destacó *fimA*. Por lo que podemos suponer que las adhesinas participan de manera importante en el proceso de patogénesis de DAEC, así como también las toxinas, mediante el establecimiento de un estado inflamatorio.

Hasta la fecha sólo se habían secuenciado seis genomas de EAEC y no se había secuenciado ninguno de DAEC, razón por la cual se decidió secuenciar el genoma de nueve cepas de EAEC y 10 de DAEC aisladas mayormente de los casos moderados y graves de diarrea infantil. Asimismo, se incluyó una cepa de EAEC aislada de una mujer adulta con diarrea moderada y una cepa comensal de una niña sana de dos años de edad. Las cepas seleccionadas no provenían de sujetos con desnutrición crónica para incrementar la posibilidad de que la severidad de la diarrea se debiera a la virulencia intrínseca de las cepas. El objetivo de este último apartado fue conocer



la distribución filogenética de nuestras cepas e identificar aquellos factores de virulencia que pudieran estar participando en el establecimiento de cuadros más severos de diarrea.

El árbol filogenético de máxima parsimonia del pan-genoma total de *E. coli* reveló que a pesar de que los PED se caracterizan por portar un grupo de genes característicos, las diferentes cepas de *E. coli* comparten en general una gran cantidad de genes adicionales por lo que no es posible observar clados definidos para cada patogruppo. En nuestro caso el pan-genoma de *E. coli* constó de 25,726 grupos de genes, similar a lo encontrado por otros autores, quienes reportaron un pan-genoma de entre 13,000-16,373 grupos de genes (Rasko *et al.*, 2008; Lukjancenko *et al.*, 2010; Kaas *et al.*, 2012). Sin embargo, en un estudio previo donde se incluyeron más de 2,000 genomas, se reportó un pan-genoma de *E. coli* de aproximadamente 89,000 diferentes grupos de genes (Land *et al.*, 2015). En el árbol del pan-genoma se identificaron tres clados donde se encontraron más de una cepa de EAEC o de DAEC agrupadas juntas, lo que sugiere que éstas podrían estar relacionadas. Con la finalidad de eliminar el ruido de fondo generado por los mecanismos de transferencia horizontal, se decidió construir un árbol con el core-genoma de *E. coli*. De esta forma se identificaron tres clados con cepas de DAEC y cuatro con cepas de EAEC, tres de estos clados incluyeron aislados de ambos patogrupos, indicando que EAEC y DAEC se encuentran filogenéticamente relacionados, por lo menos a nivel del core-genoma, lo que sugiere que debieron tener un origen en común, similar a lo que se ha descrito para EPEC O55:H7 y EHEC O157:H7 (Zhou *et al.*, 2010). El clado I aparte de contener genomas de EAEC y DAEC, también incluyó el genoma de la cepa UMN026 de UPEC, revelando que no sólo EAEC y DAEC se encuentran relacionadas entre sí, sino que también son filogenéticamente similares a algunas cepas de UPEC. A este respecto, cabe mencionar que anteriormente ya se han aislado cepas de UPEC (de infecciones de vías urinarias) positivas para genes de EAEC y de DAEC (Servin, 2014). Una de las peculiaridades del clado I, es que a excepción del genoma MEX-20, todas las cepas presentan completo el Sistema de Secreción tipo III 2 de *E. coli* (ETT2), inicialmente descrito en EHEC O157:H7 (Zhou *et al.*, 2014). Hasta la fecha no se ha determinado la función de este sistema en ninguno de los PED, sin embargo, previamente se describió que en la cepa EC10 de NMEC participa de manera importante en el proceso de invasión de células endoteliales (Yao *et al.*, 2009). En 2011, Riveros y colaboradores describieron que un grupo de cepas de DAEC fue capaz de inducir la polimerización de actina en células epiteliales de forma similar a lo descrito con EPEC, sin embargo, no se determinó si estas cepas contenían el sistema ETT2 (Riveros *et al.*, 2011). Es necesario evaluar si las cepas de DAEC que contienen el sistema ETT2 (40%) son capaces de inducir la movilización de actina, ya que es posible que éste tenga el mismo papel que el T3SS descrito en EPEC y EHEC. El clado II del árbol del core-genoma incluyó únicamente cepas de DAEC y EAEC, sin embargo, en el Clado-III se

detectó la presencia de una cepa de EPECa y de las comensales MEX-21 y K12. Respecto a las cepas comensales, en general se observó que se encontraban distribuidas a lo largo del árbol e interaccionando con diferentes cepas patógenas, lo cual no es de extrañar puesto que la hipótesis formulada sobre el origen de estas últimas sugiere que provienen de cepas comensales que adquirieron genes de virulencia por mecanismos de transferencia horizontal (Kaper *et al.*, 2004). Por otro lado, con anterioridad se ha descrito que las cepas de EPECa son molecular y filogenéticamente muy diversas, además de que presentan la cualidad de incorporar a su genoma una gran cantidad de genes exógenos (Bando *et al.*, 2009). De hecho, en el árbol del core pueden detectarse al menos tres diferentes clados en los que las cepas de EPECa, EHEC, STEC e incluso EPECt, se encuentran asociadas entre sí (clados e, f y g), los cuales podrían representar los diferentes orígenes filogenéticos de algunos de los linajes de EPECa previamente descritos, tal como es el caso del clado e (Zhou *et al.*, 2014; Hu & Torres, 2015; Hazen *et al.*, 2016). El clado IV fue el único donde no se encontraron agrupadas a las cepas de EAEC y DAEC, sin embargo, en éste se localizaron los genomas de las cepas de EAEC-STEC, aisladas durante el brote de diarrea y SHU de Europa en el 2011 (Grad *et al.*, 2012). De igual manera, en este clado se encontró el genoma de la cepa 55989 y MEX-14, aisladas de un sujeto con VIH en África y de un caso leve de diarrea en nuestro estudio, respectivamente (Bernier *et al.*, 2002). Es probable que a excepción de las cepas de EAEC-STEC, que adquirieron los genes que codifican para las toxinas Shiga, las cepas de este clado generalmente no sean muy virulentas (en comparación por ejemplo con las cepas del clado I, las cuales corresponden en su mayoría a casos graves de diarrea) y por ello solamente se aíslan de casos de diarrea leve o de individuos más susceptibles, como es el caso del paciente con VIH. Asimismo, se encontraron dos genomas de DAEC y uno de EAEC fuera de los clados antes descritos, lo cual puede ser simplemente un efecto del bajo número de genomas incluidos pero no descarta la posibilidad de que correspondan a puntos de origen de estos patogrupos distintos a los antes mencionados. Cabe destacar que estos genomas de DAEC se encontraron asociados a cepas de ExPEC (clado a), indicando que existe un linaje de DAEC que se encuentra más estrechamente ligado a las cepas de ExPEC que a las de EAEC. Aparte de los datos antes mencionados, el árbol del core también permitió observar que las cepas de ExPEC se encuentran estrechamente asociadas entre sí; lo que indica, tal como se había sugerido con anterioridad, que comparten un origen filogenético similar y que no se trata simplemente de microorganismos comensales oportunistas (Flores-Mireles *et al.*, 2015; Lo *et al.*, 2015).

Debido a que los patrones característicos de adherencia de EAEC y DAEC se deben a la producción de adhesinas específicas, decidimos identificar los operones que codifican para dichas adhesinas y analizar su distribución filogenética. Sin embargo, al realizar esto nos encontramos con dos cepas de EAEC que no contienen ningún operon para las fimbrias AAF,

pero que en su lugar presentan el operon *cse* que codifica para el factor de colonización CS22, inicialmente descrito en ETEC (Pichel *et al.*, 2000); lo que sugiere un proceso de transferencia horizontal entre ambos patogrupos. Además, se encontraron dos nuevos operones en DAEC, *afa-9* y *afa-10*, los cuales codifican para proteínas estructurales con una identidad del 44.6% con Afa-I y del 36% con Afa-V, respectivamente. De manera interesante, se observó que cinco (50%) de los genomas de DAEC presentaron dos operones diferentes para las adhesinas Afa/Dr/F1845. La presencia de estos dos operones podría resultar benéfico para DAEC de tres maneras: estas adhesinas podrían expresarse al mismo tiempo y tener un efecto sinérgico sobre la adhesión de DAEC; podrían expresarse de manera diferencial y participar en la colonización de diferentes nichos en su hospedero; o podrían permitir la colonización de un hospedero previamente expuesto a DAEC mediante un cambio de fase en la expresión de las adhesinas y la subsecuente evasión de la respuesta inmune de memoria. En general observamos que las adhesinas más prevalentes fueron AAF/I y Afa-V en EAEC y DAEC, respectivamente. Nuestros resultados corresponden a lo reportado por otros autores en cuanto a que la fimbria AAF/I en general resulta ser la más prevalente, sin embargo, en ninguna de nuestras cepas se identificaron los operones para las fimbrias AAF/II, AAF/III ni AAF/IV (Boisen *et al.*, 2008; Ito *et al.*, 2014; Jønsson *et al.*, 2015). En cuanto a las adhesinas Afa/Dr/F1845, la mayoría de los estudios previos no buscan todas las variantes de éstas y en general se reporta que en más de un 60% de las cepas no es posible determinar el tipo de adhesina codificada en su genoma, por lo que nuestro trabajo brinda las bases para poder realizar una mejor caracterización de estas cepas y analizar la asociación de las mismas con la severidad del cuadro de diarrea (Korotkova *et al.*, 2007; Fujihara *et al.*, 2009; Servin, 2014).

El análisis filogenético de las adhesinas demostró que en efecto las proteínas codificadas por los operones *afa-9* y *afa-10* representan nuevos subgrupos de la familia Afa/Dr/F1845. Además, el árbol mostró que la mayoría de estas proteínas forman parte de clados específicos, a excepción de Afa-VIII y Afa-X, las cuales parecen estar más emparentadas con las fimbrias AAF. Cabe mencionar que el factor de colonización CS22 se encontró muy alejado del resto de las adhesinas (a excepción de CS15, el cual es prácticamente idéntico) de ETEC, EAEC y DAEC, lo que se corroboró nuevamente en el árbol de los usher. Indicando que esta adhesina no se encuentra relacionada con ninguna de las otras proteínas incluidas y que al parecer no se encuentra asociada a ningún patogrupo en particular. Asimismo, el árbol de los usher permitió observar que a excepción de Afa-VIII, la mayoría de las adhesinas Afa/Dr/F1845 se encuentran estrechamente relacionadas. La divergencia observada para Afa-VIII respecto al resto de las adhesinas Afa/Dr/F1845 no es de sorprender, puesto que ésta no presenta afinidad por el hDAF

y solamente se ha identificado en cepas aisladas de sangre o de animales, lo que indica que su función debe ser completamente diferente (Servin, 2014).

Finalmente, se determinó la prevalencia de los factores de virulencia codificados en los diferentes genomas secuenciados. Los resultados correspondientes a EAEC fueron muy similares a lo encontrado mediante la búsqueda con primers, sin embargo, se detectó la presencia de otros factores con una elevada prevalencia, los cuales podrían estar participando de forma importante en la patogénesis de EAEC y podrían ayudar a definir molecularmente a las cepas típicas de este patogrupa. Entre estos factores destacan la hemolisina E (81%), Shf (44%) y la microcina H47 (44%), cabe mencionar que esta última no se identificó en las cepas comensales ni de DAEC, indicando que podría tratarse de un factor asociado específicamente a EAEC. Por otro lado, los resultados correspondientes a las cepas de DAEC corroboraron lo que se describió con anterioridad, que éstas no presentan genes para una gran variedad de toxinas y que por el contrario, contienen genes que codifican para diversos sistemas de captación de hierro. Entre las toxinas que se encontraron destacan HlyE (60%) y TieB (40%), la actividad citotóxica de HlyE ya ha sido demostrada con anterioridad en otras cepas de *E. coli*, en cambio, pese a que TieB se ha asociado con una actividad citotóxica importante en EIEC, su función no ha sido descrita en su totalidad; por lo que es importante analizar el papel de ambas toxinas en la patogénesis de DAEC (Nataro *et al.*, 1995; Mueller *et al.*, 2009). Asimismo, se encontró que además de la cápsula, las cepas de DAEC contienen genes que codifican para una gran cantidad de factores asociados con la evasión del sistema inmune y de forma más particular, para la resistencia al complemento (cápsula, TraT, TcpC, Iss y OmpA). Esta característica particular de DAEC podría ser relevante para la patogénesis de este patogrupa, puesto que al adherirse al hDAF e inducir la respuesta inflamatoria del hospedero, se encontraría muy expuesto a los diferentes componentes del sistema inmune. Sin embargo, existe la posibilidad de que factores tales como la cápsula, TraT, Tcp, Iss u OmpA, le permitan evadir la respuesta inmune y le confieran una ventaja sobre las cepas comensales.

Las cepas de DAEC se caracterizaron en un principio con base en su patrón de adherencia difuso sobre células epiteliales, el cual posteriormente se asoció a la producción de las adhesinas Afa/Dr/F1845. A pesar de que diferentes grupos de trabajo han tratado de caracterizar el mecanismo de patogenicidad de DAEC, hasta la fecha la información con la que se cuenta es escasa. Con base en los resultados antes mencionados nosotros proponemos que el mecanismo de patogenicidad de DAEC involucra la inducción de un proceso inflamatorio en el intestino mediante la producción de toxinas, lo que traería como consecuencia el reclutamiento de neutrófilos, la liberación de lipocalina-2 y la consecuente alteración de la microbiota intestinal, ante lo cual DAEC obtendría una ventaja por la expresión de factores que le permitieran evadir

la respuesta inmune y por la producción de diferentes sistemas de captación de hierro, lo que en conjunto favorecería su crecimiento en comparación con las cepas comensales. A la larga, el daño causado por DAEC y la respuesta inflamatoria sobre el tejido intestinal culminaría en el establecimiento de diarrea.

Tal como se mencionó con anterioridad, son pocos los estudios epidemiológicos que incluyen la búsqueda de DAEC. Algunos autores incluso han llegado a sugerir que este microorganismo no corresponde en realidad a un patógeno intestinal, debido a que en estudios de infección con voluntarios adultos se observó que DAEC era capaz de colonizar el tracto intestinal de estos sujetos pero no de provocar diarrea (Mathewson *et al.*, 1986; Tacket *et al.*, 1990). Sin embargo, en el trabajo de Mathewson se demostró que a pesar de que la cepa 189 no indujo diarrea en la mayoría de los sujetos, uno de los cuatro voluntarios infectados si presentó diarrea y que tres de estos mostraron malestares tales como escalofríos, dolor abdominal y fatiga (Mathewson *et al.*, 1986; Tacket *et al.*, 1990). Al igual que EAEC y ETEC, DAEC también se ha asociado con diarrea en adultos y diarrea del viajero (Adachi *et al.*, 2001; Vargas *et al.*, 1998; Meraz *et al.*, 2008; Mansan-Almeida *et al.*, 2013; Centers for Disease Control and Prevention, 2014), sin embargo, un estudio realizado en 2013 demostró que los perfiles genéticos de las cepas aisladas de niños y de adultos son diferentes, sugiriendo que las cepas asociadas a la diarrea infantil constituyen una población diferente a los aislados de adultos (Mansan-Almeida *et al.*, 2013). Debido a lo anterior, es probable que las cepas provenientes de niños sean menos virulentas y por ende no tengan la capacidad de provocar diarrea en hospederos adultos que se han encontrado expuestos con anterioridad a este patógeno, por lo que serían capaces de montar una respuesta inmune de memoria. Bajo este postulado, los estudios realizados con voluntarios adultos que fueron infectados con cepas aisladas de niños, no proporcionarían información relevante sobre este patógeno. Además, es importante tener en cuenta los resultados del trabajo desarrollado por Nataro y colaboradores en 1995, quienes infectaron a voluntarios adultos con cuatro cepas diferentes de EAEC y observaron que solamente una de las cuatro (la cepa prototipo de EAEC, 042) fue capaz de provocar diarrea en estos sujetos, a pesar de que este patogrupos ha sido asociado previamente con diarrea en adultos (Nataro *et al.*, 1995). Asimismo, es importante destacar que existen diversos estudios que han demostrado que las cepas de DAEC son más frecuentemente aisladas de niños con diarrea aguda que de sujetos asintomáticos de la misma edad (Girón *et al.*, 1991; Baqui *et al.*, 1992; Levine *et al.*, 1993; Germani *et al.*, 1996).

La manera en la que se abordó el estudio de EPEC, EAEC y DAEC en este trabajo, refleja la importancia de estos patogrupos en cuanto a su asociación con diarrea infantil y con la severidad del cuadro clínico resultante. Actualmente no es viable montar estudios de infección con

voluntarios, por lo que no es posible comprobar los postulados de Koch y establecer de forma fehaciente que el microorganismo de estudio corresponde en sí a un patógeno intestinal. Mediante la búsqueda intencionada de diversos agentes etiológicos de la diarrea y la posterior selección de los casos donde sólo se identificó a un patógeno, se incrementa la probabilidad de que el cuadro clínico observado sea resultado de la infección por dicho microorganismo. Lo anterior cobra mayor importancia cuando los resultados revelan que el cuadro clínico de los pacientes infectados con el mismo patógeno muestran características similares. Lo cual corresponde a lo encontrado en este trabajo, permitiéndonos sugerir que estos tres patogrupos representan un riesgo para la salud de los niños menores de cinco años, sobre todo por la severidad de los casos y de las complicaciones observadas en algunos sujetos.

## 9. CONCLUSIONES

- Los patogrupos de *E. coli* diarreogénicas corresponden a los patógenos más prevalentes en niños menores de cinco años que requirieron atención en un hospital de tercer nivel en Mérida, Yucatán.
- En general la severidad del cuadro clínico de la diarrea asociada a EPEC es leve, sin embargo, los niños infectados con cepas que porten la isla O-122 muestran un mayor riesgo a experimentar cuadros de severidad moderada, caracterizados por una mayor carga bacteriana en heces. Asimismo, la combinación de factores propios del hospedero, tales como ser menor de un año de edad, presentar un estatus nutricional deficiente y no haber recibido lactancia materna, pueden volver al niño más propenso de sufrir un cuadro grave de diarrea.
- La mayor parte de los casos de diarrea asociada a infecciones con EAEC muestran una baja severidad del cuadro clínico. Sin embargo, si la cepa asociada a la enfermedad presenta una mayor cantidad de genes para adhesinas (principalmente *fimA*) se incrementa el riesgo de que la enfermedad sea moderada o grave. Asimismo, el que la cepa presente una mayor cantidad de genes para toxinas (especialmente *hlyA* y *sat*) aumenta la probabilidad de que el paciente experimente un cuadro grave de diarrea, sobre todo en los niños menores de dos años.
- La diarrea vinculada a infecciones con DAEC se encuentra asociada a la presencia de vómito, lo que incrementa la posibilidad de experimentar cuadros moderados o graves de diarrea. Este riesgo aumenta cuando la infección es provocada por cepas con una mayor cantidad de genes para toxinas, principalmente en los niños menores de dos años.





## 10. PERSPECTIVAS

- a) Cuantificar la carga bacteriana de EAEC y DAEC en las muestras de heces de los pacientes diagnosticados con estos patogrupos como patógeno único.
- b) Diseñar protocolos de PCR punto final para determinar la prevalencia de los genes que codifican para la hemolisina E (*hlyE*), *Shf* (*shf*) y la microcina H47 (*mchB*) en EAEC, así como para la toxina TieB (*senB*) y para los factores involucrados en la evasión del sistema inmune TraT, Tcp e Iss, en DAEC.
- c) Determinar por PCR punto final la distribución de los genes que codifican para la unidad estructural de las diferentes fimbrias AAF y de las adhesinas Afa/Dr/F1845 en EAEC y DAEC, respectivamente.
- d) Caracterizar por técnicas de biología molecular la participación de los factores de la isla O-122 en la patogénesis de EPEC.
- e) Caracterizar por técnicas de biología molecular la participación de las toxinas HlyE y TieB, así como del Sistema de Secreción tipo III 2 de *E. coli* en la patogénesis de EAEC y DAEC.



## 11. BIBLIOGRAFÍA

**Abascal F, Zardoya R, Posada D (2005).** ProtTest: Selection of best-fit models of protein evolution. *Bioinformatics* 21, 2104–2105.

**Abreu AG, Bueris V, Porangaba TM, Sircili MP, Navarro-Garcia F, Elias WP (2013).** Autotransporter protein-encoding genes of diarrheagenic *Escherichia coli* are found in both typical and atypical enteropathogenic *E. coli* strains. *Appl Environ Microbiol.* 79(1):411-4.

**Acosta GJ, Vigo NI, Durand D, Riveros M, Arango S, Zambruni M, Ochoa TJ (2016).** Diarrheagenic *Escherichia coli*: Prevalence and Pathotype Distribution in Children from Peruvian Rural Communities. *Am J Trop Med Hyg.* 95(3):574-9.

**Adachi JA, Jiang ZD, Mathewson JJ, Verenkar MP, Thompson S, Martinez-Sandoval F, Steffen R, Ericsson CD, DuPont HL (2001).** Enteroaggregative *Escherichia coli* as a major etiologic agent in traveler's diarrhea in 3 regions of the world. *Clin Infect Dis.* 32(12):1706-9.

**Afset JE, Bevanger L, Romundstad P, Bergh K (2004).** Association of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) with prolonged diarrhoea. *J Med Microbiols.* 53(Pt 11):1137-44.

**Afset JE, Bruant G, Brousseau R, Harel J, Anderssen E, Bevanger L, Bergh K (2006).** Identification of virulence genes linked with diarrhea due to atypical enteropathogenic *Escherichia coli* by DNA microarray analysis and PCR. *J Clin Microbiol.* 44:3703–11.

**Albert MJ, Faruque SM, Faruque AS, Bettelheim KA, Neogi PK, Bhuiyan NA, Kaper JB (1996).** Controlled study of cytolethal distending toxin-producing *Escherichia coli* infections in Bangladeshi children. *J Clin Microbiol.* 34(3):717-9.

**Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990).** Basic local alignment search tool. *J Mol Biol.* 215(3):403-410.

**Amann RI, Binder BJ, Olson RJ, Chisholm SW, Devereux R, Stahl DA. (1990).** Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. *Appl Environ Microbiol.* 56(6):1919-1925.

**Anuario de Morbilidad 1984-2015:**  
<http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/anuario/html/anuarios.html>.

**Armijo-Rojas R (1993).** Epidemiología básica en atención primaria de la salud. *Ediciones Días de Santos.* España, pp 91. ISBN: 84-7978-105-X.

**Assis AS, Valle DA, Antunes GR, Tibiriça SH, Assis RM, Leite JP, Carvalho IP, Rosa e Silva ML (2013).** Rotavirus epidemiology before and after vaccine introduction. *J Pediatr (Rio J).* 89(5):470-6.

**Atmar RL, Opekun AR, Gilger MA, Estes MK, Crawford SE, Neill FH, Graham DY (2008).** Norwalk virus shedding after experimental human infection. *Emerg. Infect. Dis.* 14, 1553–1557.

**Badea L, Doughty S, Nicholls L, Sloan J, Robins-Browne RM, Hartland EL (2003).** Contribution of Efa1/LifA to the adherence of enteropathogenic *Escherichia coli* to epithelial cells. *Microb Pathog.* 34(5):205-15.

**Bando SY, Andrade FB, Guth BE, Elias WP, Moreira-Filho CA, Pestana de Castro AF (2009).** Atypical enteropathogenic *Escherichia coli* genomic background allows the acquisition of non-EPEC virulence factors. *FEMS Microbiol Lett.* 299(1):22-30.

**Baqui AH, Sack RB, Black RE, Haider K, Hossain A, Alim AR, Yunus M, Chowdhury HR, Siddique AK (1992).** Enteropathogens associated with acute and persistent diarrhea in Bangladeshi children less than 5 years of age. *J Infect Dis.* 166(4):792-6.

**Barletta F, Ochoa TJ, Mercado E, Ruiz J, Ecker L, Lopez G, Mispireta M, Gil AI, Lanata CF, Cleary TG (2011).** Quantitative real-time polymerase chain reaction for enteropathogenic *Escherichia coli*: a tool for investigation of asymptomatic versus symptomatic infections. *Clin Infect Dis.* 53(12):1223-9.

**Behnsen J, Perez-Lopez A, Nuccio SP, Raffatellu M (2015).** Exploiting host immunity: the *Salmonella* paradigm. *Trends Immunol.* 36(2):112-20.

- Benjelloun-Touimi Z, Sansonetti PJ, Parsot C (1995).** SepA, the major extracellular protein of *Shigella flexneri*: autonomous secretion and involvement in tissue invasion. *Mol. Microbiol.* 17: 123–135.
- Benjelloun-Touimi Z, Si Tahar M, Montecucco C, Sansonetti PJ, Parsot C (1998).** SepA, the 110kDa protein secreted by *Shigella flexneri*: two-domain structure and proteolytic activity. *Microbiology.* 144: 1815–1822.
- Benmessaoud R, Jroundi I, Nezha M, Moraleda C, Tligui H, Seffar M, Alvarez-Martínez MJ, Pons MJ, Chaacho S, Hayes EB, Vila J, Alonso PL, Bassat Q, Ruiz J (2015).** Aetiology, epidemiology and clinical characteristics of acute moderate-to-severe diarrhoea in children under 5 years of age hospitalized in a referral paediatric hospital in Rabat, Morocco. *J Med Microbiol.* 64(Pt 1):84-92.
- Bernet-Camard MF, Coconnier MH, Hudault S, Servin AL (1996).** Pathogenicity of the diffusely adhering strain *Escherichia coli* C1845: F1845 adhesin-decay accelerating factor interaction, brush border microvillus injury, and actin disassembly in cultured human intestinal epithelial cells. *Infect Immun.* 64(6):1918-28.
- Bernier C, Gounon P, Le Bouguéne C (2002).** Identification of an aggregative adhesion fimbria (AAF) type III-encoding operon in enteroaggregative *Escherichia coli* as a sensitive probe for detecting the AAF-encoding operon family. *Infect Immun.* 70(8):4302-11.
- Besemer J, Borodovsky M (2005).** GeneMark: Web software for gene finding in prokaryotes, eukaryotes and viruses. *Nucleic Acids Res.* 33, 451–454.
- Bhan MK, Khoshoo V, Sommerfelt H, Raj P, Sazawal S & Srivastava R (1989a).** Enteroaggregative *Escherichia coli* and *Salmonella* associated with nondysenteric persistent diarrhea. *Pediatr Infect Dis J.* 8: 499–502.
- Bhan MK, Raj P, Levine MM, Kaper JB, Bhandari N, Srivastava R, Kumar R & Sazawal S (1989b).** Enteroaggregative *Escherichia coli* associated with persistent diarrhea in a cohort of rural children in India. *J Infect Dis* 159: 1061–1064.
- Black RE, Cousens S, Johnson HL, Lawn JE, Rudan I, Bassani DG, Jha P, Campbell H, Walker CF, Cibulskis R, Eisele T, Liu L, Mathers C (2010).** Child Health Epidemiology Reference Group of WHO and UNICEF. Global, regional, and national causes of child mortality in 2008: a systematic analysis. *Lancet*, 375(9730):1969-87.
- Boetzer M, Henkel CV, Jansen HJ, Butler D, Pirovano W (2010).** Scaffolding pre-assembled contigs using SSPACE. *Bioinformatics.* 27(4):578-9.
- Boetzer M, Pirovano W (2012).** Toward almost closed genomes with GapFiller. *Genome Biol.* 13, 1–9.
- Boisen N, Ruiz-Perez F, Scheutz F, Krogfelt KA, Nataro JP (2009).** Short report: high prevalence of serine protease autotransporter cytotoxins among strains of enteroaggregative *Escherichia coli*. *Am J Trop Med Hyg.* 80(2):294-301.
- Boisen N, Scheutz F, Rasko DA, Redman JC, Persson S, Simon J, Kotloff KL, Levine MM, Sow S, Tamboura B, Toure A, Malle D, Panchalingam S, Krogfelt KA, Nataro JP (2012).** Genomic characterization of enteroaggregative *Escherichia coli* from children in Mali. *J Infect Dis*, 205(3):431-44.
- Boisen N, Struve C, Scheutz F, Krogfelt KA, Nataro JP (2008).** New adhesin of enteroaggregative *Escherichia coli* related to the Afa/Dr/AAF family. *Infect Immun.* 76(7):3281-92.
- Bouzari S, Oloomi M, Oswald E (2005).** Detection of the cytolethal distending toxin locus *cdtB* among diarrheagenic *Escherichia coli* isolates from humans in Iran. *Res Microbiol.* 156(2):137-44.
- Brown KH (2003).** Diarrhea and malnutrition. *J Nutr.* 133(1):328S-332S.
- Bryce J, Boschi-Pinto C, Shibuya K, Black RE. (2005).** WHO Child Health Epidemiology Reference Group. WHO estimates of the causes of death in children. *Lancet*, 365(9465):1147-52.

**Buc E, Dubois D, Sauvanet P, Raisch J, Delmas J, Darfeuille-Michaud A, Pezet D, Bonnet R (2013).** High prevalence of mucosa-associated *E. coli* producing cyclomodulin and genotoxin in colon cancer. *PLoS One*. 8(2):e56964.

**Bueris V, Sircili MP, Taddei CR, dos Santos MF, Franzolin MR, Martinez MB, Ferrer SR, Barreto ML, Trabulsi LR (2007).** Detection of diarrheagenic *Escherichia coli* from children with and without diarrhea in Salvador, Bahia, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 102(7):839-44.

**Casadevall A, Pirofski LA (1999).** Host-pathogen interactions: redefining the basic concepts of virulence and pathogenicity. *Infect Immun*, 67(8):3703-13.

**Casadevall A, Pirofski LA (2000).** Host-pathogen interactions: basic concepts of microbial commensalism, colonization, infection, and disease. *Infect Immun*, 68(12):6511-8.

**CDC Yellow Book 2018 (2018).** Centers for Disease Control and Prevention: <https://wwwnc.cdc.gov/travel/yellowbook/2018/the-pre-travel-consultation/travelers-diarrhea>

**Ceelen LM, Decostere A, Ducatelle R, Haesebrouck F (2006).** Cytolethal distending toxin generates cell death by inducing a bottleneck in the cell cycle. *Microbiol Res*. 161(2):109-20.

**Cennimo D, Abbas A, Huang DB, Chiang T (2009).** The prevalence and virulence characteristics of enteroaggregative *Escherichia coli* at an urgent-care clinic in the USA: a case-control study. *J Med Microbiol*. 58(Pt 4):403-7.

**Centers for Disease Control and Prevention (2009).** Reduction in rotavirus after vaccine introduction--United States, 2000-2009. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 58(41):1146-9.

**Centers for Disease Control and Prevention (2014).** Enterotoxigenic *E. coli* (ETEC): <https://www.cdc.gov/ecoli/etec.html>.

**Cerna JF, Nataro JP, Estrada-Garcia T (2003).** Multiplex PCR for detection of three plasmid-borne genes of enteroaggregative *Escherichia coli* strains. *J Clin Microbiol*, 41(5):2138-40.

**Chang JY, Antonopoulos DA, Kalra A, Tonelli A, Khalife WT, Schmidt TM, Young VB (2008).** Decreased diversity of the fecal Microbiome in recurrent *Clostridium difficile*-associated diarrhea. *J Infect. Dis*, 197, 435-438.

**Chattaway MA1, Harris R, Jenkins C, Tam C, Coia JE, Gray J, Iturriza-Gomara M, Wain J (2009).** Investigating the link between the presence of enteroaggregative *Escherichia coli* and infectious intestinal disease in the United Kingdom, 1993 to 1996 and 2008 to 2009. *Euro Surveill*, 18(37). pii: 20582.

**Chaudhuri RR, Sebahia M, Hobman JL, Webber MA, Leyton DL, Goldberg MD, Cunningham AF, Scott-Tucker A, Ferguson PR, Thomas CM, Frankel G, Tang CM, Dudley EG, Roberts IS, Rasko DA, Pallen MJ, Parkhill J, Nataro JP, Thomson NR, Henderson IR (2010).** Complete genome sequence and comparative metabolic profiling of the prototypical enteroaggregative *Escherichia coli* strain 042. *PLoS One*, 5(1):e8801.

**Chien CC, Taylor NS, Ge Z, Schauer DB, Young VB, Fox JG (2000).** Identification of cdtB homologues and cytolethal distending toxin activity in enterohepatic *Helicobacter* spp. *J Med Microbiol*. 49(6):525-34.

**Claeson M, Merson MH (1990).** Global progress in the control of diarrheal diseases. *Pediatr Infect Dis J*. 9(5):345-55.

**Clark CG, Johnson ST, Easy RH, Campbell JL, Rodgers FG (2002).** PCR for detection of cdt-III and the relative frequencies of cytolethal distending toxin variant-producing *Escherichia coli* isolates from humans and cattle. *J Clin Microbiol*. 40(7):2671-4.

**Cobeljić M, Miljković-Selimović B, Paunović-Todosijević D, Velicković Z, Lepsanović Z, Zec N, Savić D, Ilić R, Konstantinović S, Jovanović B, Kostić V (1996).** Enteroaggregative *Escherichia coli* associated with an outbreak of diarrhoea in a neonatal nursery ward. *Epidemiol Infect*. 117(1):11-6.

**Cohen MB, Nataro JP, Bernstein DI, Hawkins J, Roberts N, Staat MA (2005).** Prevalence of diarrheagenic *Escherichia coli* in acute childhood enteritis: a prospective controlled study. *J Pediatr*. 146(1):54-61.

- Contreras-Moreira B, Vinuesa P (2013).** GET\_HOMOLOGUES, a versatile software package for scalable and robust microbial pangenome analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 79, 7696–7701.
- Cravioto A, Tello A, Navarro A, Ruiz J, Villafan H, Uribe F, Eslava C (1991).** Association of *Escherichia coli* HEp-2 adherence patterns with type and duration of diarrhoea. *Lancet.* 337: 262–264.
- Croswell A, Amir E, Tegatz P, Barman M, Salzman NH (2009).** Prolonged impact of antibiotics on intestinal microbial ecology and susceptibility to enteric *Salmonella* infection. *Infect Immun.* 77(7):2741-53.
- Czczulin JR, Balepur S, Hicks S, Phillips A, Hall R, Kothary MH, Navarro-Garcia F, Nataro JP (1997).** Aggregative adherence fimbria II, a second fimbrial antigen mediating aggregative adherence in enteroaggregative *Escherichia coli*. *Infect Immun.* 65(10):4135-45.
- Czczulin JR, Whittam TS, Henderson IR, Navarro-Garcia F, Nataro JP (1999).** Phylogenetic analysis of enteroaggregative and diffusely adherent *Escherichia coli*. *Infect Immun.* 67: 2692–2699.
- da Silva AS, da Silva Leite D (2002).** Investigation of putative CDT gene in *Escherichia coli* isolates from pigs with diarrhea. *Vet Microbiol.* 22;89(2-3):195-9.
- Dautin N (2010).** Serine protease autotransporters of enterobacteriaceae (SPATEs): biogenesis and function. *Toxins* (Basel). 2(6):1179-206.
- Dethlefsen L, Huse S, Sogin ML, Relman DA (2008).** The pervasive effects of an antibiotic on the human gut microbiota, as revealed by deep 16S rRNA sequencing. *PLoS Biol.* 6(11):e280.
- D'Orazio SE, Collins CM (1998).** Molecular pathogenesis of urinary tract infections. *Curr Top Microbiol Immunol.* 225:137-64.
- Duncan SH, Louis P, Flint HJ (2007).** Cultivable bacterial diversity from the human colon. *Lett Appl Microbiol.* 44(4):343-50.
- Eden PA, Schmidt TM, Blakemore RP, Pace NR (1991).** Phylogenetic analysis of *Aquaspirillum magnetotacticum* using polymerase chain reaction-amplified 16S rRNA-specific DNA. *Int J Syst Bacteriol.* 41(2):324-325.
- Elwell CA, Dreyfus LA (2000).** DNase I homologous residues in CdtB are critical for cytolethal distending toxin-mediated cell cycle arrest. *Mol Microbiol.* 37(4):952-63.
- Estrada-Garcia T, Cerna JF, Paheco-Gil L, Velázquez RF, Ochoa TJ, Torres J, DuPont HL (2005).** Drug-resistant Diarrheogenic *Escherichia coli*, Mexico. *Emerging Infectious Diseases.* 11(8), 1306–1308.
- Estrada-García T, Cerna JF, Paheco-Gil L, Velázquez RF, Ochoa TJ, Torres J, DuPont HL (2005).** Drug-resistant diarrheogenic *Escherichia coli*, Mexico. *Emerg Infect Dis.* 11(8):1306-1308.
- Estrada-Garcia T, Lopez-Saucedo C, Thompson-Bonilla R, Abonce M, Lopez-Hernandez D, Santos JI, Rosado JL, DuPont HL, Long KZ (2009).** Association of diarrheagenic *Escherichia coli* Pathotypes with infection and diarrhea among Mexican children and association of atypical Enteropathogenic *E. coli* with acute diarrhea. *J Clin Microbiol.* 47(1):93-8.
- Estrada-Garcia, T, Navarro-Garcia, F (2012). Enteroaggregative *Escherichia coli* pathotype: a genetically heterogeneous emerging foodborne enteropathogen. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 66, 281–298.
- Fagundes-Neto U, Scaletsky IC (2000).** The gut at war: the consequences of enteropathogenic *Escherichia coli* infection as a factor of diarrhea and malnutrition. *Sao Paulo Med J.* 118(1):21-9.
- Fasano A, Noriega FR, Liao FM, Wang W, Levine MM (1997).** Effect of *Shigella* enterotoxin 1 (ShET1) on rabbit intestine *in vitro* and *in vivo*. *Gut.* 40: 505–511.
- Fedor Y, Vignard J, Nicolau-Travers ML, Boutet-Robinet E, Watrin C, Salles B, Mirey G (2013).** From single-strand breaks to double-strand breaks during S-phase: a new mode of action of the *Escherichia coli* Cytolethal Distending Toxin. *Cell Microbiol.* 15(1):1-15.
- Flint HJ, Bayer EA, Rincon MT, Lamed R, White BA (2008).** Polysaccharide utilization by gut bacteria: potential for new insights from genomic analysis. *Nat Rev Microbiol.* 6(2):121-31.

- Flores-Mireles AL, Walker JN, Caparon M, Hultgren SJ (2015).** Urinary tract infections: epidemiology, mechanisms of infection and treatment options. *Nat Rev Microbiol.* 13:269-284.
- Freter R, Brickner H, Botney M, Cleven D, Aranki A (1983).** Mechanisms that control bacterial populations in continuous-flow culture models of mouse large intestinal flora. *Infect Immun.* 39(2):676-85.
- Fujihara S, Arikawa K, Aota T, Tanaka H, Nakamura H, Wada T, Hase A, Nishikawa Y (2009).** Prevalence and properties of diarrheagenic *Escherichia coli* among healthy individuals in Osaka City, Japan. *Jpn J Infect Dis.* 62(4):318-23.
- Gao X, Wang X, Pham TH, Feuerbacher LA, Lubos ML, Huang M, Olsen R, Mushegian A, Slawson C, Hardwidge PR (2013).** NleB, a bacterial effector with glycosyltransferase activity, targets GAPDH function to inhibit NF- $\kappa$ B activation. *Cell Host Microbe.* 13(1):87-99.
- George CM, Perin J, Neiswender de Calani KJ, Norman WR, Perry H, Davis TP, Lindquist ED (2014).** Risk Factors for Diarrhea in Children under Five Years of Age Residing in Peri-urban Communities in Cochabamba, Bolivia. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene.* 2014;91(6):1190-1196.
- Germani Y, Bégau E, Duval P, Le Bouguéne C (1996).** Prevalence of enteropathogenic, enteroaggregative, and diffusely adherent *Escherichia coli* among isolates from children with diarrhea in new Caledonia. *J Infect Dis.* 174:1124–1126.
- Girón JA, Jones T, Millán-Velasco F, Castro-Muñoz E, Zárate L, Fry J, Frankel G, Moseley SL, Baudry B, Kaper JB, Schoolnik GK, Riley LW (1991).** Diffuse-adhering *Escherichia coli* (DAEC) as a putative cause of diarrhea in Mayan children in Mexico. *J Infect Dis.* 163(3):507-13.
- Grad YH, Lipsitch M, Feldgarden M, Arachchi HM, Cerqueira GC, Fitzgerald M, Godfrey P, Haas BJ, Murphy CI, Russ C, Sykes S, Walker BJ, Wortman JR, Young S, Zeng Q, Abouelleil A, Bochicchio J, Chauvin S, Desmet T, Gujja S, McCowan C, Montmayeur A, Steelman S, Frimodt-Møller J, Petersen AM, Struve C, Krogfelt KA, Bingen E, Weill FX, Lander ES, Nusbbaum C, Birren BW, Hung DT, Hanage WP (2012).** Genomic epidemiology of the *Escherichia coli* O104:H4 outbreaks in Europe, 2011. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 21;109(8):3065-70.
- Guerrant DI, Moore SR, Lima AA, Patrick PD, Schorling JB, Guerrant RL (1999).** Association of early childhood diarrhea and cryptosporidiosis with impaired physical fitness and cognitive function four-seven years later in a poor urban community in northeast Brazil. *Am J Trop Med Hyg.* 61(5):707-13.
- Guerrant RL, Schorling JB, McAuliffe JF, de Souza MA (1992).** Diarrhea as a cause and an effect of malnutrition: diarrhea prevents catch-up growth and malnutrition increases diarrhea frequency and duration. *Am J Trop Med Hyg.* 47(1 Pt 2):28-35.
- Guerrant RL, Oriá RB, Moore SR, Oriá MO, Lima AA (2008).** Malnutrition as an enteric infectious disease with long-term effects on child development. *Nutr Rev.* 66(9):487-505.
- Guignot J, Chaplais C, Coconnier-Polter MH, Servin AL (2007).** The secreted autotransporter toxin, Sat, functions as a virulence factor in Afa/Dr diffusely adhering *Escherichia coli* by promoting lesions in tight junction of polarized epithelial cells. *Cell Microbiol.* 9:204–221.
- Guindon S, Dufayard JF, Lefort V, Anisimova M, Hordijk W, Gascuel O (2010).** New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. *Syst Biol.* 59(3):307-21.
- Gupta A, Sarker G, Rout AJ, Mondal T, Pal R (2015).** Risk correlates of diarrhea in children under 5 years of age in slums of bankura, west bengal. *J Glob Infect Dis.* 7(1):23-9.
- Gutierrez-Jimenez J, Arciniega I, Navarro-Garcia F (2008).** The serine protease motif of Pic mediates a dose-dependent mucolytic activity after binding to sugar constituents of the mucin substrate. *Microb Pathog* 45: 115–123.
- Guyer DM, Henderson IR, Nataro JP, Mobley HL (2000).** Identification of sat, an autotransporter toxin produced by uropathogenic *Escherichia coli*. *Mol Microbiol.* 38(1):53-66.
- Hall TA (1999).** BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41, 95–98.011.75.

- Hammami R, Fernandez B, Lacroix C, Fliss I (2013).** Anti-infective properties of bacteriocins: an update. *Cell Mol Life Sci.* 70(16):2947-67.
- Harrington SM, Dudley EG, Nataro JP (2006).** Pathogenesis of enteroaggregative *Escherichia coli* infection. *FEMS Microbiol Lett.* 254:12–18.
- Harrington SM, Dudley EG, Nataro JP (2006).** Pathogenesis of enteroaggregative *Escherichia coli* infection. *FEMS Microbiol. Lett.* 254, 12–18.
- Harrington SM, Sheikh J, Henderson IR, Ruiz-Perez F, Cohen PS, Nataro JP (2009).** The Pic protease of enteroaggregative *Escherichia coli* promotes intestinal colonization and growth in the presence of mucin. *Infect. Immun.* 77: 2465–2473.
- Hasko G, Szabo C, Cronstein BN (2006).** Adenosine Receptors: Therapeutic Aspects for Inflammatory and Immune Diseases. *CRC Press.* Pages 131–144. Print ISBN: 978-0-8493-3999-8 eBook ISBN: 978-1-4200-0577-6.
- Hazen TH, Donnenberg MS, Panchalingam S, Antonio M, Hossain A, Mandomando I, Ochieng JB, Ramamurthy T, Tamboura B, Qureshi S, Quadri F, Zaidi A, Kotloff KL, Levine MM, Barry EM, Kaper JB, Rasko DA, Nataro JP (2016).** Genomic diversity of EPEC associated with clinical presentations of differing severity. *Nat Microbiol.* 1:15014.
- Heimer SR, Rasko DA, Lockett CV, Johnson DE, Mobley HL (2004).** Autotransporter genes pic and tsh are associated with *Escherichia coli* strains that cause acute pyelonephritis and are expressed during urinary tract infection. *Infect Immun.* 72(1):593-7.
- Henderson IR, Czczulin J, Eslava C, Noriega F, Nataro JP (1999).** Characterization of pic, a secreted protease of *Shigella flexneri* and enteroaggregative *Escherichia coli*. *Infect Immun.* 67: 5587–5596.
- Heywood W, Henderson B, Nair SP (2005).** Cytolethal distending toxin: creating a gap in the cell cycle. *J Med Microbiol.* 54(Pt 3):207-16.
- Hinenoya A, Nagita A, Asakura M, Tsukamoto T, Ramamurthy T, Nair GB, Takeda Y, Yamasaki S (2007).** Cytolethal distending toxin (Cdt)-producing *Escherichia coli* isolated from a child with bloody diarrhea in Japan. *Microbiol Immunol.* 51(4):435-8.
- Hoeprich PD (1983).** Host Parasite Relationships an the Pathogenesis of Infectious Diseases. P. 45-56. *PD Hoeprich, Infectious diseases. Harper and Row.* Filadelfia.
- Hood MI, Skaar EP (2012).** Nutritional immunity: transition metals at the pathogen-host interface. *Nat Rev Microbiol.* 10(8):525-37.
- Hu J, Torres AG (2015).** Enteropathogenic *Escherichia coli*: foe or innocent bystander? *Clin Microbiol Infect.* 21(8):729-34.
- Human Microbiome Project Consortium (2012).** The structure and function of the healthy human microbiome. *Nature.* 486:207–214.
- Hunt M, Kikuchi T, Sanders M, Newbold C, Berriman M, Otto TD (2013).** REAPR: a universal tool for genome assembly evaluation. *Genome Biol.* 14(5):R47.
- Huson DH, Mitra S, Ruscheweyh HJ, Weber N, Schuster SC (2011).** Integrative analysis of environmental sequences using MEGAN4. *Genome Res,* 21(9):1552-1560.
- INEGI (2017).** Principales causas de mortalidad por residencia habitual, grupos de edad y sexo del fallecido:  
<http://www.inegi.org.mx/est/contenidos/proyectos/registros/vitales/mortalidad/tabulados/ConsultaMortalidad.asp>
- Ito K, Matsushita S, Yamazaki M, Moriya K, Kurazono T, Hiruta N, Narimatsu H, Ueno N, Isobe J, Yatsuyanagi J, Kumagai N, Hashimoto M, Ratchtrachenchai OA (2014).** Association between aggregative adherence fimbriae types including putative new variants and virulence-related genes and clump formation among aggR-positive *Escherichia coli* strains isolated in Thailand and Japan. *Microbiol Immunol.* 58(8):467-73.
- Itoh Y, Nagano I, Kunishima M, Ezaki T (1997).** Laboratory investigation of enteroaggregative *Escherichia coli* O untypeable:H10 associated with a massive outbreak of gastrointestinal illness. *J Clin Microbiol.* 35(10):2546-50.



**J. P. Nataro, T. Steiner, and R. L. Guerrant (1998).** Enteroaggregative *Escherichia coli*. *Emerg Infect Dis.* 4(2): 251–261.

**Jakobsson HE, Jernberg C, Andersson AF, Sjölund-Karlsson M, Jansson JK, Engstrand L (2010).** Short-term antibiotic treatment has differing long-term impacts on the human throat and gut microbiome. *PLoS One.* 5(3):e9836.

**Jerse AE, Yu J, Tall BD, Kaper JB (1990).** A genetic locus of enteropathogenic *Escherichia coli* necessary for the production of attaching and effacing lesions on tissue culture cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 87(20):7839-43.

**Johnson WM, Lior H (1988).** A new heat-labile cytolethal distending toxin (CLDT) produced by *Escherichia coli* isolates from clinical material. *Microb Pathog.* 4(2):103-13.

**Jønsson R, Struve C, Boisen N, Mateiu RV, Santiago AE, Jenssen H, Nataro JP, Krogfelt KA (2015).** Novel aggregative adherence fimbria variant of enteroaggregative *Escherichia coli*. *Infect Immun.* 83(4):1396-405.

**Kaas RS, Friis C, Ussery DW, Aarestrup FM (2012).** Estimating variation within the genes and inferring the phylogeny of 186 sequenced diverse *Escherichia coli* genomes. *BMC Genomics.* 13:577.

**Kamada N, Chen GY, Inohara N, Núñez G (2013).** Control of pathogens and pathobionts by the gut microbiota. *Nat Immunol.* 14(7):685-90.

**Kang G, Iturriza-Gomara M, Wheeler JG, Crystal P, Monica B, Ramani S, Primrose B, Moses PD, Gallimore CI, Brown DW, Gray J (2004).** Quantitation of group A rotavirus by real-time reverse-transcription-polymerase chain reaction: correlation with clinical severity in children in South India. *J. Med. Virol.* 73, 118–122.

**Kaper JB, Nataro JP, Mobley HLT (2004).** Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology.* 2, 123-140.

**Kelly M, Hart E, Mundy R, Marchès O, Wiles S, Badea L, Luck S, Tauschek M, Frankel G, Robins-Browne RM, Hartland EL (2006).** Essential role of the type III secretion system effector NleB in colonization of mice by *Citrobacter rodentium*. *Infect Immun.* 74(4):2328-37.

**Klapproth JM, Scaletsky IC, McNamara BP, Lai LC, Malstrom C, James SP, Donnenberg MS (2000).** A large toxin from pathogenic *Escherichia coli* strains that inhibits lymphocyte activation. *Infect Immun.* 68(4):2148-55.

**Korotkova N, Chattopadhyay S, Tabata TA, Beskhlebnaya V, Vigdorovich V, Kaiser BK, Strong RK, Dykhuizen DE, Sokurenko EV, Moseley SL (2007).** Selection for functional diversity drives accumulation of point mutations in Dr adhesins of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol.* 64(1):180-94.

**Kotloff KL, Nataro JP, Blackwelder WC, Nasrin D, Farag TH, Panchalingam S, Wu Y, Sow SO, Sur D, Breiman RF, Faruque AS, Zaidi AK, Saha D, Alonso PL, Tamboura B, Sanogo D, Onwuchekwa U, Manna B, Ramamurthy T, Kanungo S, Ochieng JB, Omere R, Oundo JO, Hossain A, Das SK, Ahmed S, Qureshi S, Quadri F, Adegbola RA, Antonio M, Hossain MJ, Akinsola A, Mandomando I, Nhampossa T, Acácio S, Biswas K, O'Reilly CE, Mintz ED, Berkeley LY, Muhsen K, Sommerfelt H, Robins-Browne RM, Levine MM (2013).** Burden and aetiology of diarrhoeal disease in infants and young children in developing countries (the Global Enteric Multicenter Study, GEMS): a prospective, case-control study. *Lancet.* 382(9888):209-22.

**Lamberti LM, Bourgeois AL, Fischer Walker CL, Black RE, Sack D (2014).** Estimating diarrheal illness and deaths attributable to Shigellae and enterotoxigenic *Escherichia coli* among older children, adolescents, and adults in South Asia and Africa. *PLoS Negl Trop Dis.* 13;8(2):e2705.

**Land M, Hauser L, Jun SR, Nookaew I, Leuze MR, Ahn TH, Karpinets T, Lund O, Kora G, Wassenaar T, Poudel S, Ussery DW (2015).** Insights from 20 years of bacterial genome sequencing. *Funct Integr Genomics.* 15(2):141-61.

**Lara-Tejero M, Galán JE (2001).** CdtA, CdtB, and CdtC form a tripartite complex that is required for cytolethal distending toxin activity. *Infect Immun.* 69(7):4358-65.

**Lawley TD, Clare S, Walker AW, Stares MD, Connor TR, Raisen C, Goulding D, Rad R, Schreiber F, Brandt C, Deakin LJ, Pickard DJ, Duncan SH, Flint HJ, Clark TG, Parkhill J, Dougan G**

(2012). Targeted restoration of the intestinal microbiota with a simple, defined bacteriotherapy resolves relapsing *Clostridium difficile* disease in mice. *PLoS Pathog*, 8, e1002995.

**Letunic I, Bork P (2016)**. Interactive tree of life (iTOL) v3: an online tool for the display and annotation of phylogenetic and other trees. *Nucleic Acids Res.* 44, W242–W245.

**Levine MM, Ferreccio C, Prado V, Cayazzo M, Abrego P, Martinez J, Maggi L, Baldini MM, Martin W, Maneval D, Kay B, Guers L, Lior H, Wasserman SS, Nataro JP (1993)**. Epidemiologic studies of *Escherichia coli* diarrheal infections in a low socioeconomic level peri-urban community in Santiago, Chile. *Am J Epidemiol.* 15;138(10):849-69.

**Lima IF, Boisen N, Quetz Jda S, Havt A, de Carvalho EB, Soares AM, Lima NL, Mota RM, Nataro JP, Guerrant RL, Lima AÂ (2013)**. Prevalence of enteroaggregative *Escherichia coli* and its virulence-related genes in a case-control study among children from north-eastern Brazil. *J Med Microbiol.* 62(Pt 5):683-93.

**Liu J, Kabir F, Manneh J, Lertsethtakarn P, Begum S, Gratz J, Becker SM, Operario DJ, Taniuchi M, Janaki L, Platts-Mills JA, Haverstick DM, Kabir M, Sobuz SU, Nakjarung K, Sakpaisal P, Silapong S, Bodhidatta L, Qureshi S, Kalam A, Saidi Q, Swai N, Mujaga B, Maro A, Kwambana B, Dione M, Antonio M, Kibiki G, Mason CJ, Haque R, Iqbal N, Zaidi AK, Houpt ER (2014)**. Development and assessment of molecular diagnostic tests for 15 enteropathogens causing childhood diarrhoea: a multicentre study. *Lancet Infect Dis*, 14(8):716-24.

**Lo Y, Zhang L, Foxman B, Zöllner S (2015)**. Whole-genome sequencing of uropathogenic *Escherichia coli* reveals long evolutionary history of diversity and virulence. *Infect Genet Evol.* 34:244-50.

**Lorntz B, Soares AM, Moore SR, Pinkerton R, Gansneder B, Bovbjerg VE, Guyatt H, Lima AM, Guerrant RL (2006)**. Early childhood diarrhea predicts impaired school performance. *Pediatr Infect Dis J.* 25(6):513-20.

**Lozer D, Souza T, Monfardini MV, Vicentini F, Kitagawa SS, Scaletsky ICA, Spano LC (2013)**. Genotypic and phenotypic analysis of diarrheagenic *Escherichia coli* strains isolated from Brazilian children living in low socioeconomic level communities. *BMC Infect Dis* 13:418.

**Lukjancenko O, Wassenaar TM, Ussery DW (2010)**. Comparison of 61 sequenced *Escherichia coli* genomes. *Microb Ecol.* 2060(4):708-20.

**Manichanh C, Rigottier-Gois L, Bonnaud E, Gloux K, Pelletier E, Frangeul L, Nalin R, Jarrin C, Chardon P, Marteau P, Roca J, Dore J (2005)**. Reduced diversity of faecal microbiota in Crohn's disease revealed by a metagenomic approach. *Gut.* 55(2):205-11.

**Mansan-Almeida R, Pereira AL, Giugliano LG (2013)**. Diffusely adherent *Escherichia coli* strains isolated from children and adults constitute two different populations. *BMC Microbiol.* 1;13:22.

**Manthey CF, Aufran CA, Eckmann L, Bode L (2014)**. Human milk oligosaccharides protect against enteropathogenic *Escherichia coli* attachment in vitro and EPEC colonization in suckling mice. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 58:165–8.

**Maroncle NM, Sivick KE, Brady R, Stokes FE, Mobley HL (2006)**. Protease activity, secretion, cell entry, cytotoxicity, and cellular targets of secreted autotransporter toxin of uropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun.* 74(11):6124-34.

**Marques LR, Tavechio AT, Abe CM, Gomes TA (2003)**. Search for cytolethal distending toxin production among fecal *Escherichia coli* isolates from Brazilian children with diarrhea and without diarrhea. *J Clin Microbiol.* 41(5):2206-8.

**Mathewson JJ, Johnson PC, DuPont HL, Satterwhite TK, Winsor DK (1986)**. Pathogenicity of enteroadherent *Escherichia coli* in adult volunteers. *J Infect Dis.* 154(3):524-7.

**Mayer MP, Bueno LC, Hansen EJ, DiRienzo JM (1999)**. Identification of a cytolethal distending toxin gene locus and features of a virulence-associated region in *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Infect Immun.* 67(3):1227-37.

**McDaniel TK, Jarvis KG, Donnenberg MS, Kaper JB (1995)**. A genetic locus of enterocyte effacement conserved among diverse enterobacterial pathogens. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 28;92(5):1664-8.

- Meraz IM, Jiang ZD, Ericsson CD, Bourgeois AL, Steffen R, Taylor DN, Hernandez N, DuPont HL (2008).** Enterotoxigenic *Escherichia coli* and diffusely adherent *E. coli* as likely causes of a proportion of pathogen-negative travelers' diarrhea—a PCR-based study. *J Travel Med.* 15(6):412-8.
- Mercado EH, Ochoa TJ, Ecker L, Cabello M, Durand D, Barletta F, Molina M, Gil AI, Huicho L, Lanata CF, Cleary TG (2011).** Fecal leukocytes in children infected with diarrheagenic *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol.* 49: 1376–1381.
- Mercado EH, Piscoche C, Contreras C, Durand D, Riveros M, Ruiz J, Ochoa TJ (2016).** Pathogenicity Island O-122 in enteropathogenic *Escherichia coli* strains is associated with diarrhea severity in children from Lima Peru. *Int J Med Microbiol.* 306(4):231-6.
- Meza-Segura M, Estrada-Garcia T (2016).** Diffusely Adherent *Escherichia coli*. In *Escherichia coli* in the Americas (ed. Torres AG) 125–147 (Springer International Publishing, 2016).
- Meza-Segura M, Zaidi MB, Maldonado-Puga S, Huerta-Cantillo J, Chavez-Dueñas L, Navarro-Garcia F, Estrada-Garcia T (2017).** Cytotoxic distending toxin-producing *Escherichia coli* strains causing severe diarrhoea in young Mexican children. *JMM Case Rep.* 4(2):e005079.
- Moore SR, Lima AA, Conaway MR, Schorling JB, Soares AM, Guerrant RL (2001).** Early childhood diarrhoea and helminthiasis associate with long-term linear growth faltering. *Int J Epidemiol.* 30(6):1457-64.
- Moreira CG, Carneiro SM, Nataro JP, Trabulsi LR, Elias WP (2003).** Role of type I fimbriae in the aggregative adhesion pattern of enteroaggregative *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett.* 12;226(1):79-85.
- Mueller M, Gauschopf U, Maier T, Glockshuber R, Ban N (2009).** The structure of a cytolytic alpha-helical toxin pore reveals its assembly mechanism. *Nature.* 459(7247):726-30.
- Mulligan ME (1984).** Epidemiology of *Clostridium difficile*-induced intestinal disease. *Rev Infect Dis.* 6 Suppl 1:S222-8.
- Narimatsu H, Ogata K, Makino Y, Ito K (2010).** Distribution of non-locus of enterocyte effacement pathogenic island-related genes in *Escherichia coli* carrying *eae* from patients with diarrhea and healthy individuals in Japan. *J Clin Microbiol.* 48(11):4107-14.
- Nataro JP, Deng Y, Cookson S, Cravioto A, Savarino SJ, Guers LD, Levine MM, Tacket CO (1995).** Heterogeneity of enteroaggregative *Escherichia coli* virulence demonstrated in volunteers. *J Infect Dis.* 171(2):465-8.
- Nataro JP, Deng Y, Maneval DR, German AL, Martin WC, Levine MM (1992).** Aggregative adherence fimbriae I of enteroaggregative *Escherichia coli* mediate adherence to HEp-2 cells and hemagglutination of human erythrocytes. *Infect Immun.* 60(6):2297-304.
- Nataro JP, Kaper JB (1998).** Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol.* 11(1):142-201.
- Nataro JP, Mai V, Johnson J, Blackwelder WC, Heimer R, Tirrell S, Edberg SC, Braden CR, Glenn Morris J Jr, Hirshon JM (2006).** Diarrheagenic *Escherichia coli* infection in Baltimore, Maryland, and New Haven, Connecticut. *Clin Infect Dis.* 43(4):402-7.
- Nataro JP, Seriwatana J, Fasano A, Maneval DR, Guers LD, Noriega F, Dubovsky F, Levine MM, Morris JG Jr (1995).** Identification and cloning of a novel plasmid-encoded enterotoxin of enteroinvasive *Escherichia coli* and *Shigella* strains. *Infect Immun.* 63(12):4721-8.
- Navarro A, Estrada-Garcia T (2010).** Epidemiology of Diarrheagenic *Escherichia coli* Pathotypes in Mexico, Past and Present en Pathogenic. In *Escherichia coli* in Latin America (ed. Torres AG) 191-208 (18) (Bentham Science Publishers, 2010).
- Navarro-García F, Eslava C, Villaseca JM, López-Revilla R, Czczulin JR, Srinivas S, Nataro JP, Cravioto A (1998).** *In vitro* effects of a high-molecular-weight heat-labile enterotoxin from enteroaggregative *Escherichia coli*. *Infect Immun.* 66(7):3149-54.
- Navarro-Garcia F, Gutierrez-Jimenez J, Garcia-Tovar C, Castro LA, Salazar-Gonzalez H, Cordova V (2010).** Pic, an autotransporter protein secreted by different pathogens in the Enterobacteriaceae family, is a potent mucus secretagogue. *Infect Immun.* 78: 4101–4109.
- Nelson AM, Walk ST, Taube S, Taniuchi M, Houpt ER, Wobus CE, Young VB (2012).** Disruption of the human gut microbiota following Norovirus infection. *PLoS One*, 7, e48224.

Newton HJ, Pearson JS, Badea L, Kelly M, Lucas M, Holloway G, Wagstaff KM, Dunstone MA, Sloan J, Whisstock JC, Kaper JB, Robins-Browne RM, Jans DA, Frankel G, Phillips AD, Coulson BS, Hartland EL (2010). The type III effectors NleE and NleB from enteropathogenic *E. coli* and OspZ from *Shigella* block nuclear translocation of NF-kappaB p65. *PLoS Pathog.* 6(5):e1000898.

Nhampossa T, Mandomando I, Acacio S, Quintó L, Vubil D, Ruiz J, Nhalungo D, Sacoor C, Nhabanga A, Nhacolo A, Aide P, Machevo S, Sigauque B, Nhama A, Kotloff K, Farag T, Nasrin D, Bassat Q, Macete E, Levine MM, Alonso P (2015). Diarrheal Disease in Rural Mozambique: Burden, Risk Factors and Etiology of Diarrheal Disease among Children Aged 0-59 Months Seeking Care at Health Facilities. *PLoS One.* 10(5):e0119824.

Nicholson JK, Holmes E, Kinross J, Burcelin R, Gibson G, Jia W, Pettersson S (2012). Host-gut microbiota metabolic interactions. *Science.* 336(6086):1262-7.

Nishi J, Sheikh J, Mizuguchi K, Luisi B, Burland V, Boutin A, Rose DJ, Blattner FR, Nataro JP (2003). The export of coat protein from enteroaggregative *Escherichia coli* by a specific ATP-binding cassette transporter system. *J Biol Chem.* 278:45680-45689.

Nowicki B, Selvarangan R, Nowicki S (2001). Family of *Escherichia coli* Dr adhesins: decay-accelerating factor receptor recognition and invasiveness. *J Infect Dis.* 183 Suppl 1:S24-7.

Nurk S, Bankevich A, Antipov D, Gurevich AA, Korobeynikov A, Lapidus A, Pribelski AD, Pyshkin A, Sirotkin A, Sirotkin Y, Stepanauskas R, Clingenpeel SR, Woyke T, McLean JS, Lasken R, Tesler G, Alekseyev MA, Pevzner PA (2013). Assembling single-cell genomes and mini-metagenomes from chimeric MDA products. *J Comput Biol.* 20(10):714-37.

Ochoa TJ, Ecker L, Barletta F, Mispireta ML, Gil AI, Contreras C, Molina M, Amemiya I, Verastegui H, Hall ER, Cleary TG, Lanata CF (2009). Age-related susceptibility to infection with diarrheagenic *Escherichia coli* among infants from Periurban areas in Lima, Peru. *Clin Infect Dis.* 1;49(11):1694-702.

Ochoa TJ, Mercado EH, Durand D, Rivera FP, Mosquito S, Contreras C, Riveros M, Lluque A, Barletta F, Prada A, Ruiz J (2011). Frecuencia y patotipos de *Escherichia coli* diarrogénica en niños peruanos con y sin diarrea. *Rev Peru Med Exp Salud Publica* 28:13-20

Okuda J, Fukumoto M, Takeda Y, Nishibuchi M (1997). Examination of diarrheagenicity of cytolethal distending toxin: suckling mouse response to the products of the *cdtABC* genes of *Shigella dysenteriae*. *Infect Immun.* 65(2):428-33.

Okuda J, Kurazono H, Takeda Y (1995). Distribution of the cytolethal distending toxin A gene (*cdtA*) among species of *Shigella* and *Vibrio*, and cloning and sequencing of the *cdt* gene from *Shigella dysenteriae*. *Microb Pathog.* 18(3):167-72.

Olesen B, Scheutz F, Andersen RL, Menard M, Boisen N, Johnston B, Hansen DS, Krogfelt KA, Nataro JP, Johnson JR (2012). Enteroaggregative *Escherichia coli* O78:H10, the cause of an outbreak of urinary tract infection. *J Clin Microbiol.* 50(11):3703-11.

Olsen GJ, Lane DJ, Giovannoni SJ, Pace NR, Stahl DA (1986). Microbial ecology and evolution: a ribosomal RNA approach. *Annu Rev Microbiol.* 40:337-65.

Opintan JA, Newman MJ, Ayeh-Kumi PF, Afrim R, Gepi-Attee R, Sevilleja JE, Roche JK, Nataro JP, Warren CA, Guerrant RL (2010). Pediatric diarrhea in southern Ghana: etiology and association with intestinal inflammation and malnutrition. *Am J Trop Med Hyg.* 83(4):936-43.

Pacheco-Gil L, Ochoa TJ, Flores-Romo L, DuPont HL, Estrada-Garcia T (2006). Enteroinvasive *Escherichia coli* severe dysentery complicated by rotavirus gastroenteritis. *J Infect.* 53(5):e211-3.

Paiva de Sousa C, Dubreuil JD (2001). Distribution and expression of the *astA* gene (EAST1 toxin) in *Escherichia coli* and *Salmonella*. *Int J Med Microbiol.* 291(1):15-20.

Panchalingam S, Antonio M, Hossain A, Mandomando I, Ochieng B, Oundo J, Ramamurthy T, Tamboura B, Zaidi AK, Petri W, Haupt E, Murray P, Prado V, Vidal R, Steele D, Strockbine N, Sansonetti P, Glass RI, Robins-Browne RM, Tauschek M, Svennerholm AM, Berkeley LY, Kotloff K, Levine MM, Nataro JP (2012). Diagnostic microbiologic methods in the GEMS-1 case/control study. *Clin Infect Dis.* 55 Suppl 4:S294-302.

**Paniagua GL, Monroy E, García-González O, Alonso J, Negrete E, Vaca S (2007).** Two or more enteropathogens are associated with diarrhoea in Mexican children. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 6:17.

**Parham NJ, Srinivasan U, Desvaux M, Foxman B, Marrs CF, Henderson IR (2004).** PicU, a second serine protease autotransporter of uropathogenic *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett.* 230(1):73-83.

**Patel SK, Dotson J, Allen KP, Fleckenstein JM (2004).** Identification and molecular characterization of EatA, an autotransporter protein of enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Infect Immun.* 72: 1786–1794.

**Patzi-Vargas S, Zaidi M, Bernal-Reynaga R, León-Cen M, Michel A, Estrada-Garcia T (2013).** Persistent bloody diarrhoea without fever associated with diffusely adherent *Escherichia coli* in a young. *J Med Microbiol.* 62(Pt 12):1907-10.

**Patzi-Vargas S, Zaidi MB, Perez-Martinez I, León-Cen M, Michel-Ayala A, Chaussabel D, Estrada-Garcia T (2015).** Diarrheagenic *Escherichia coli* carrying supplementary virulence genes are an important cause of moderate to severe diarrhoeal disease in Mexico. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 9, 1–18.

**Pearson JS, Giogha C, Mühlen S, Nachbur U, Pham CL, Zhang Y, Hildebrand JM, Oates CV, Lung TW, Ingle D, Dagley LF, Bankovacki A, Petrie EJ, Schroeder GN, Crepin VF, Frankel G, Masters SL, Vince J, Murphy JM, Sunde M, Webb AI, Silke J, Hartland EL (2017).** EspL is a bacterial cysteine protease effector that cleaves RHIM proteins to block necroptosis and inflammation. *Nat Microbiol.* 2:16258.

**Peiffer I, Guignot J, Barbat A, Carnoy C, Moseley SL, Nowicki BJ, Servin AL, Bernet-Camard MF (2000).** Structural and functional lesions in brush border of human polarized intestinal Caco-2/TC7 cells infected by members of the Afa/Dr diffusely adhering family of *Escherichia coli*. *Infect Immun.* 68(10):5979-90.

**Perfil Epidemiológico de las Enfermedades Infecciosas Intestinales (2012).** *SINAVE. Secretaría de Salud.* México.

**Perna NT, Plunkett G 3rd, Burland V, Mau B, Glasner JD, Rose DJ, Mayhew GF, Evans PS, Gregor J, Kirkpatrick HA, Pósfai G, Hackett J, Klink S, Boutin A, Shao Y, Miller L, Grotbeck EJ, Davis NW, Lim A, Dimalanta ET, Potamousis KD, Apodaca J, Anantharaman TS, Lin J, Yen G, Schwartz DC, Welch RA, Blattner FR (2001).** Genome sequence of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Nature.* 25;409(6819):529-33.

**Petri WA Jr, Miller M, Binder HJ, Levine MM, Dillingham R, Guerrant RL (2008).** Enteric infections, diarrhea, and their impact on function and development. *J Clin Invest.* 118(4):1277-90.

**Phillips G, Lopman B, Tam CC, Iturriza-Gomara M, Brown D, Gray J (2009).** Diagnosing norovirus-associated infectious intestinal disease using viral load. *BMC Infect. Dis.* 9, 63.

**Pichel M, Binsztejn N, Viboud G (2000).** CS22, a Novel Human Enterotoxigenic *Escherichia coli* Adhesin, Is Related to CS15. *Infection and Immunity.* 68(6):3280-3285.

**Pickett CL, Pesci EC, Cottle DL, Russell G, Erdem AN, Zeytin H (1996).** Prevalence of cytolethal distending toxin production in *Campylobacter jejuni* and relatedness of *Campylobacter* sp. cdtB gene. *Infect Immun.* 64(6):2070-8.

**Platts-Mills JA, Babji S, Bodhidatta L, Gratz J, Haque R, Havt A, McCormick BJ, McGrath M, Olortegui MP, Samie A, Shakoor S, Mondal D, Lima IF, Hariraju D2, Rayamajhi BB, Qureshi S, Kabir F, Yori PP, Mufamadi B, Amour C, Carreon JD, Richard SA, Lang D, Bessong P, Mduma E, Ahmed T, Lima AA, Mason CJ, Zaidi AK, Bhutta ZA, Kosek M, Guerrant RL, Gottlieb M, Miller M, Kang G, Houghton ER1; MAL-ED Network Investigators (2015).** Pathogen-specific burdens of community diarrhoea in developing countries: a multisite birth cohort study (MAL-ED). *Lancet Glob Health.* 3(9):e564-75.

**Platts-Mills JA, Liu J, Houghton ER (2013).** New concepts in diagnostics for infectious diarrhea. *Mucosal Immunol.* 6(5):876-85.

**Prjibelski AD, Vasilinetc I, Bankevich A, Gurevich A, Krivosheeva T, Nurk S, Pham S, Korobeynikov A, Lapidus A, Pevzner PA (2014).** ExSPAnDer: a universal repeat resolver for DNA fragment assembly. *Bioinformatics*. 15;30(12):i293-301.

**Prüss-Üstün A. y Corvalán C (2006).** Preventing disease through healthy environments. Towards an estimate of the environmental burden of disease. *WHO*.

**Pupo GM, Lan R, Reeves PR (2000).** Multiple independent origins of *Shigella* clones of *Escherichia coli* and convergent evolution of many of their characteristics. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 97(19):10567-72.

**Purvén M, Falsen E, Lagergård T (1995).** Cytotoxin production in 100 strains of *Haemophilus ducreyi* from different geographic locations. *FEMS Microbiol Lett*. 129(2-3):221-4.

**Rasko DA, Rosovitz MJ, Myers GS, Mongodin EF, Fricke WF, Gajer P, Crabtree J, Sebahia M, Thomson NR, Chaudhuri R, Henderson IR, Sperandio V, Ravel J (2008).** The pangenome structure of *Escherichia coli*: comparative genomic analysis of *E. coli* commensal and pathogenic isolates. *J Bacteriol*. 190(20):6881-93.

**Regua-Mangia AH, Gomes TA, Vieira MA, Irino K, Teixeira LM (2009).** Molecular typing and virulence of enteroaggregative *Escherichia coli* strains isolated from children with and without diarrhoea in Rio de Janeiro city, Brazil. *J Med Microbiol*. 58(Pt 4):414-22.

**Restieri C, Garriss G, Locas MC, Dozois CM (2007).** Autotransporter encoding sequences are phylogenetically distributed among *Escherichia coli* clinical isolates and reference strains. *Appl Environ Microbiol*. 73:1553–62.

**Ricci KA, Girosi F, Tarr PI, Lim YW, Mason C, Miller M, Hughes J, von Seidlein L, Agosti JM, Guerrant RL (2006).** Reducing stunting among children: the potential contribution of diagnostics. *Nature*. 444 Suppl 1:29-38.

**Richardson V, Parashar U, Patel M (2011).** Childhood diarrhea deaths after rotavirus vaccination in Mexico. *N Engl J Med*. 365(8):772-3.

**Riveros M, Barletta F, Cabello M, Durand D, Mercado EH, Contreras C, Rivera FP, Mosquito S, Lluque A, Ochoa TJ (2011).** Adhesion patterns in diffusely adherent *Escherichia coli* (DAEC) strains isolated from children With and without diarrhea. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*. 28:1.

**Round JL, Mazmanian SK (2009).** The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease. *Nat Rev Immunol*. 9(5):313-23.

**Ruiz-Perez F, Wahid R, Faherty CS, Kolappaswamy K, Rodriguez L, Santiago A, Murphy E, Cross A, Sztein MB, Nataro JP (2011).** Serine protease autotransporters from *Shigella flexneri* and pathogenic *Escherichia coli* target a broad range of leukocyte glycoproteins. *P Natl Acad Sci USA*. 108: 12881–12886.

**Rüttler ME, Renna NF, Balbi L, García B, Guidone L, Fernández R, Puig O, Ortiz A (2002).** Characterization of enteroaggregative *Escherichia coli* strains isolated from children with acute diarrhea, in Mendoza, Argentina. *Rev Argent Microbiol*. 34(3):167-70.

**Ruuska T, Vesikari T (1990).** Rotavirus Disease in Finnish Children: Use of Numerical Scores for Clinical Severity of Diarrhoeal Episodes. *Scand. J. Infect. Dis*. 22, 259–267.

**Sansonetti P (2002).** Host-pathogen interactions: the seduction of molecular cross talk. *Gut*. 50 Suppl 3:III2-8.

**Savarino SJ, Fasano A, Watson J, Martin BM, Levine MM, Guandalini S, Guerry P (1993).** Enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1 represents another subfamily of *E. coli* heat-stable toxin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 90(7):3093-7.

**Savkovic SD, Koutsouris A, Hecht G (1997).** Activation of NF-kappaB in intestinal epithelial cells by enteropathogenic *Escherichia coli*. *Am J Physiol*. 273(4 Pt 1):C1160-7.

**Scaletsky IC, Fabbriotti SH, Carvalho RL, Nunes CR, Maranhão HS, Morais MB, Fagundes-Neto U (2002).** Diffusely adherent *Escherichia coli* as a cause of acute diarrhea in young children in Northeast Brazil: a case-control study. *J Clin Microbiol*. 40(2):645-8.

**Scholthof KB (2007).** The disease triangle: pathogens, the environment and society. *Nat Rev Microbiol*. 5(2):152-6.

**Servin AL (2014).** Pathogenesis of human diffusely adhering *Escherichia coli* expressing Afa/Dr adhesins (Afa/Dr DAEC): current insights and future challenges. *Clin Microbiol Rev.* 27:823–869.

**Sievers F, Wilm A, Dineen D, Gibson TJ, Karplus K, Li W, Lopez R, McWilliam H, Remmert M, Söding J, Thompson JD, Higgins DG (2011).** Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Mol Syst Biol.* 11;7:539.

**Siziya S, Muula AS, Rudatsikira E (2013).** Correlates of diarrhoea among children below the age of 5 years in Sudan. *Afr Health Sci.* 13(2):376-83.

**Skaar EP, Raffatellu M (2015).** Metals in infectious diseases and nutritional immunity. *Metallomics.* 7(6):926-8.

**Slinger R, Lau K, Slinger M, Moldovan I, Chan F (2017).** Higher atypical enteropathogenic *Escherichia coli* (a-EPEC) bacterial loads in children with diarrhea are associated with PCR detection of the EHEC factor for adherence 1/lymphocyte inhibitory factor A (efa1/lifa) gene. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 16(1):16.

**Smith HR, Cheasty T, Rowe B (1997).** Enteroaggregative *Escherichia coli* and outbreaks of gastroenteritis in UK. *Lancet.* 350(9080):814-5.

**Srikanth CV, McCormick BA (2008).** Interactions of the intestinal epithelium with the pathogen and the indigenous microbiota: a three-way crosstalk. *Interdiscip Perspect Infect Dis.* 2008:626827.

**Stecher B, Robbiani R, Walker AW, Westendorf AM, Barthel M, Kremer M, Chaffron S, Macpherson AJ, Buer J, Parkhill J, Dougan G, von Mering C, Hardt WD (2007).** *Salmonella enterica* serovar typhimurium exploits inflammation to compete with the intestinal microbiota. *PLoS Biol.* 5(10):2177-89.

**Tacket CO, Moseley SL, Kay B, Losonsky G, Levine MM (1990).** Challenge studies in volunteers using *Escherichia coli* strains with diffuse adherence to HEp-2 cells. *J Infect Dis.* 162(2):550-2.

**Taniuchi M, Sobuz SU, Begum S, Platts-Mills JA, Liu J, Yang Z, Wang XQ, Petri WA Jr, Haque R, Houpt ER (2013).** Etiology of diarrhea in Bangladeshi infants in the first year of life analyzed using molecular methods. *J Infect Dis.* 208(11):1794-802.

**Trabulsi LR, Keller R, Tardelli Gomes TA (2002).** Typical and atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. *Emerg Infect Dis.* 8(5):508-13.

**Tran Van Nhieu G, Bourdet-Sicard R, Duménil G, Blocker A, Sansonetti PJ (2000).** Bacterial signals and cell responses during *Shigella* entry into epithelial cells. *Cell Microbiol.* 2(3):187-93.

**UNICEF (2015).** Common childhood infections and gender inequalities: a systematic review. [https://www.unicef.org/health/files/Systematic\\_review\\_of\\_childhood\\_infections\\_and\\_gender\\_FINAL.pdf](https://www.unicef.org/health/files/Systematic_review_of_childhood_infections_and_gender_FINAL.pdf).

**van Nood E, Vrieze A, Nieuwdorp M, Fuentes S, Zoetendal EG, de Vos WM, Visser CE, Kuijper EJ, Bartelsman JF, Tijssen JG, Speelman P, Dijkgraaf MG, Keller JJ (2013).** Duodenal infusion of donor feces for recurrent *Clostridium difficile*. *N. Engl. J. Med.* 368, 407–415.

**Vargas M, Gascón J, Gallardo F, Jimenez De Anta MT, Vila J (1998).** Prevalence of diarrheagenic *Escherichia coli* strains detected by PCR in patients with travelers' diarrhea. *Clin Microbiol Infect.* 4(12):682-688.

**Vasilinets I, Prjibelski AD, Gurevich A, Korobeynikov A, Pevzner PA (2015).** Assembling short reads from jumping libraries with large insert sizes. *Bioinformatics* 31, 3262–3268.

**Vidal JE, Canizález-Román A, Gutiérrez-Jiménez J, Navarro-García F (2007).** Molecular pathogenesis, epidemiology and diagnosis of enteropathogenic *Escherichia coli* *Salud Publica Mex.* 49(5):376-86.

**Vieira MA, Salvador FA, Silva RM, Irino K, Vaz TM, Rockstroh AC, Guth BE, Gomes TA (2010).** Prevalence and characteristics of the O122 pathogenicity island in typical and atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strains. *J Clin Microbiol.* 48(4):1452-5.

**Walker CL, Aryee MJ, Boschi-Pinto C, Black RE (2012).** Estimating diarrhea mortality among young children in low and middle income countries. *PLoS One,* 7(1):e29151.

**Weinstock GM (2012).** Genomic approaches to studying the human microbiota. *Nature*. 489(7415):250-6.

**Yao Y, Xie Y, Perace D, Zhong Y, Lu J, Tao J, Guo X, Kim KS (2009).** The type III secretion system is involved in the invasion and intracellular survival of *Escherichia coli* K1 in human brain microvascular endothelial cells. *FEMS Microbiol Lett*. 300(1):18-24.

**Youmans GP, Paterson PY, Sommers (1975).** The Biologic and Clinical Basis of Infectious Diseases (ed.Youmans GP) 12-13 (W. B. Saunders Co. 1980). ISBN: 0721696473, 9780721696478.

**Zhang M, Zhang M, Zhang C, Du H, Wei G, Pang X, Zhou H, Liu B, Zhao L (2009).** Pattern extraction of structural responses of gut microbiota to rotavirus infection via multivariate statistical analysis of clone library data. *FEMS Microbiol. Ecol*, 70, 21–29.

**Zhou M, Guo Z, Duan Q, Hardwidge PR, Zhu G (2014).** *Escherichia coli* type III secretion system 2: a new kind of T3SS? *Vet Res*. 45:32.

**Zhou Z, Li X, Liu B, Beutin L, Xu J, Ren Y, Feng L, Lan R, Reeves PR, Wang L (2010).** Derivation of *Escherichia coli* O157:H7 from its O55:H7 precursor. *PLoS One*. 5(1):e8700.



## 12. TABLAS SUPLEMENTARIAS

**Tabla suplementaria 1.** Genomas bacterianos usados en este estudio.

| #  | Strain      | Pathotype | Accession Number |
|----|-------------|-----------|------------------|
| 1  | MEX-1       | EAEC      | -                |
| 2  | MEX-2       | EAEC      | -                |
| 3  | MEX-3       | EAEC      | -                |
| 4  | MEX-4       | EAEC      | -                |
| 5  | MEX-5       | EAEC      | -                |
| 6  | MEX-6       | EAEC      | -                |
| 7  | MEX-7       | EAEC      | -                |
| 8  | MEX-8       | EAEC      | -                |
| 9  | MEX-9       | EAEC      | -                |
| 10 | MEX-10      | EAEC      | -                |
| 11 | MEX-11      | DAEC      | -                |
| 12 | MEX-12      | DAEC      | -                |
| 13 | MEX-13      | DAEC      | -                |
| 14 | MEX-14      | DAEC      | -                |
| 15 | MEX-15      | DAEC      | -                |
| 16 | MEX-16      | DAEC      | -                |
| 17 | MEX-17      | DAEC      | -                |
| 18 | MEX-18      | DAEC      | -                |
| 19 | MEX-19      | DAEC      | -                |
| 20 | MEX-20      | DAEC      | -                |
| 21 | MEX-21      | Commensal | -                |
| 22 | K12         | K12       | GCA_001566335.1  |
| 23 | HS          | Commensal | GCA_000017765.1  |
| 24 | SE11        | Commensal | GCA_000010385.1  |
| 25 | SE15        | Commensal | GCA_000010485.1  |
| 26 | IA11        | Commensal | GCA_000026265.1  |
| 27 | ED1a        | Commensal | GCA_000026305.1  |
| 28 | MS145-7     | Commensal | GCA_000179115.1  |
| 29 | E2348/69    | EPEC      | GCA_000026545.1  |
| 30 | B171        | EPEC      | GCA_000167895.2  |
| 31 | DEC12D      | EPEC      | GCA_000250275.2  |
| 32 | DEC1C       | EPEC      | GCA_000249095.2  |
| 33 | DEC2D       | EPEC      | GCA_000249215.2  |
| 34 | RN587/1     | EPEC      | GCA_000188875.2  |
| 35 | 302048      | EPEC      | GCA_001265355.1  |
| 36 | 203741      | EPEC      | GCA_001265265.1  |
| 37 | 402290      | EPEC      | GCA_001265545.1  |
| 38 | 702324      | EPEC      | GCA_001265575.1  |
| 39 | E110019     | aEPEC     | GCA_000167875.1  |
| 40 | CB9615      | aEPEC     | GCA_000025165.1  |
| 41 | DEC11A      | aEPEC     | GCA_000250115.2  |
| 42 | DEC12A      | aEPEC     | GCA_000250215.2  |
| 43 | DEC5d       | aEPEC     | GCF_000249555.1  |
| 44 | 100854      | aEPEC     | GCA_001265625.1  |
| 45 | 102929      | aEPEC     | GCA_001265685.1  |
| 46 | DEC9E       | aEPEC     | GCA_000249975.2  |
| 47 | DEC9D       | aEPEC     | GCA_000249955.2  |
| 48 | DEC11E      | aEPEC     | GCA_000250195.2  |
| 49 | EDL933      | EHEC      | GCA_000732965.1  |
| 50 | Sakai       | EHEC      | GCA_000008865.1  |
| 51 | EC4042      | EHEC      | GCA_000181775.1  |
| 52 | EC4501      | EHEC      | GCA_000172015.1  |
| 53 | EC4401      | EHEC      | GCA_000171975.1  |
| 54 | 11368       | EHEC      | GCA_000091005.1  |
| 55 | RM13514     | EHEC      | GCA_000520035.1  |
| 56 | RM13516     | EHEC      | GCA_000520055.1  |
| 57 | 11128       | EHEC      | GCA_000010765.1  |
| 58 | 12009       | EHEC      | GCA_000010745.1  |
| 59 | 2011C-3493  | EAEC-STEC | GCA_000299455.1  |
| 60 | 2009EL-2050 | EAEC-STEC | GCA_000299255.1  |
| 61 | 2009EL-2071 | EAEC-STEC | GCA_000299475.1  |
| 62 | GOS1        | EAEC-STEC | GCA_000223015.2  |

|     |                            |                      |   |
|-----|----------------------------|----------------------|---|
| 63  | GOS2                       | EAEC-STEC            | GCA_000223035.2   |
| 64  | C227-11                    | EAEC-STEC            | GCA_000986765.1   |
| 65  | TY-2482                    | EAEC-STEC            | GCA_000221885.1   |
| 66  | H112180280                 | EAEC-STEC            | GCA_000217975.2   |
| 67  | LB226692                   | EAEC-STEC            | GCA_000215685.3   |
| 68  | E112-10                    | EAEC-STEC            | GCA_000350005.1   |
| 69  | H10407                     | ETEC                 | GCA_000210475.1   |
| 70  | E24377A                    | ETEC                 | GCA_000017745.1   |
| 71  | B7A                        | ETEC                 | GCA_000725265.1   |
| 72  | B2C                        | ETEC                 | GCA_000517245.1   |
| 73  | CE516                      | ETEC                 | GCA_000806275.1   |
| 74  | CE549                      | ETEC                 | GCA_000806245.1   |
| 75  | E1777                      | ETEC                 | GCA_000806265.1   |
| 76  | E2265                      | ETEC                 | GCA_000806255.1   |
| 77  | E2539-C1                   | ETEC                 | GCA_000618405.2   |
| 78  | 042                        | EAEC                 | GCA_000027125.1   |
| 79  | 55989                      | EAEC                 | GCA_000026245.1   |
| 80  | C43/90                     | EAEC                 | GCA_000350045.2   |
| 81  | C48/93                     | EAEC                 | GCA_000350025.2   |
| 82  | 101-1                      | aEAEC                | GCA_000168095.1   |
| 83  | M4163                      | EIEC                 | GCA_000805815.1   |
| 84  | 4608-58                    | EIEC                 | GCA_000805835.1   |
| 85  | 53638                      | EIEC                 | GCA_000167915.2   |
| 86  | CFT073                     | UPEC                 | GCA_000007445.1   |
| 87  | 536                        | UPEC                 | GCA_000013305.1   |
| 88  | IAI39                      | UPEC                 | GCA_000026345.1   |
| 89  | UTI89                      | UPEC                 | GCA_000013265.1   |
| 90  | UMN026                     | UPEC                 | GCA_000026325.1   |
| 91  | F11                        | UPEC                 | GCA_001561835.1   |
| 92  | NA114                      | UPEC                 | GCA_000214765.2   |
| 93  | J96                        | UPEC                 | GCA_000295775.2   |
| 94  | EC958                      | UPEC                 | GCA_000285655.3   |
| 95  | RS218                      | NMEC                 | GCA_000800845.2   |
| 96  | IHE3034                    | NMEC                 | GCA_000025745.1   |
| 97  | S88                        | NMEC                 | GCA_000026285.1   |
| 98  | CE10                       | NMEC                 | GCA_000227625.1   |
| 99  | 2009C-3133                 | STEC                 | GCA_001420955.1   |
| 100 | 94-3024                    | STEC                 | GCA_000801185.2   |
| 101 | NCCP15655                  | STEC                 | GCA_001467005.1   |
| 102 | RM9387                     | STEC                 | GCA_000801165.1   |
| 103 | 02-04446                   | STEC                 | GCA_000647455.1   |
| 104 | 1188                       | STEC                 | GCA_001608185.1   |
| 105 | EAEC JM221                 | EAEC                 | <a href="ftp://ftp.cbcb.umd.edu/pub/data/PBcR/asms/ecoliJM221.pac454.ctg.fasta">ftp://ftp.cbcb.umd.edu/pub/data/PBcR/asms/ecoliJM221.pac454.ctg.fasta</a> |
| 106 | EAEC 17-2                  | EAEC                 | <a href="ftp://ftp.cbcb.umd.edu/pub/data/PBcR/asms/ecoli17.pac111.ctg.fasta">ftp://ftp.cbcb.umd.edu/pub/data/PBcR/asms/ecoli17.pac111.ctg.fasta</a>       |
| 107 | <i>E. fergusonii</i> 35469 | <i>E. fergusonii</i> | GCA_000026225.1   |

**Tabla suplementaria 2.** Secuencias estructurales de adhesinas.

| #  | Proteína | Cepa   | PED  | N° de acceso |
|----|----------|--------|------|--------------|
| 1  | AAF/V    | MEX-1  | EAEC | -            |
| 2  | CS22     | MEX-2  | EAEC | -            |
| 3  | AAF/I    | MEX-3  | EAEC | -            |
| 4  | AAF/I    | MEX-4  | EAEC | -            |
| 5  | AAF/I    | MEX-5  | EAEC | -            |
| 6  | AAF/V    | MEX-6  | EAEC | -            |
| 7  | AAF/V    | MEX-7  | EAEC | -            |
| 8  | AAF/I    | MEX-8  | EAEC | -            |
| 9  | AAF/I    | MEX-9  | EAEC | -            |
| 10 | CS22     | MEX-10 | EAEC | -            |
| 11 | DaaE     | MEX-11 | DAEC | -            |
| 12 | AfaE-V   | MEX-11 | DAEC | -            |
| 13 | AfaE-II  | MEX-12 | DAEC | -            |
| 14 | AfaE-IX  | MEX-13 | DAEC | -            |
| 15 | AfaE-V   | MEX-13 | DAEC | -            |
| 16 | AfaE-IX  | MEX-14 | DAEC | -            |
| 17 | AfaE-V   | MEX-14 | DAEC | -            |
| 18 | AfaE-I   | MEX-15 | DAEC | -            |
| 19 | AfaE-I   | MEX-16 | DAEC | -            |

|    |           |             |           |              |
|----|-----------|-------------|-----------|--------------|
| 20 | DraE-II   | MEX-17      | DAEC      | -            |
| 21 | AfaE-X    | MEX-17      | DAEC      | -            |
| 22 | DaaE      | MEX-18      | DAEC      | -            |
| 23 | AfaE-V    | MEX-19      | DAEC      | -            |
| 24 | AfaE-V    | MEX-20      | DAEC      | -            |
| 25 | AfaE-II   | MEX-20      | DAEC      | -            |
| 26 | AAF/I     | 17-2        | EAEC      | P46007       |
| 27 | AAF/II    | 042         | EAEC      | CBG27800     |
| 28 | AAF/III   | 55989       | EAEC      | EHF28942     |
| 29 | AAF/IV    | C1010       | EAEC      | ACF05260     |
| 30 | AAF/V     | C338-14     | EAEC      | AJM13646     |
| 31 | PIIS      | C1096       | aEAEC     | AAT94194     |
| 32 | AAF/I     | 457         | EAEC      | CAA77068     |
| 33 | AAF/I     | R2          | EAEC      | AAR02190     |
| 34 | AAF/I     | C227-11     | EAEC      | 4PH8_A       |
| 35 | AAF/I     | 2009EL-2050 | EAEC-STEC | AFS59833     |
| 36 | AAF/V     | KI2329      | EAEC      | BAI44131     |
| 37 | AAF/V     | KI1656      | EAEC      | BAI44131     |
| 38 | AAF/V     | KI12078     | EAEC      | BAJ79300     |
| 39 | AfaE-I    | FV9863      | UPEC      | CAW30801     |
| 40 | AfaE-II   | A22         | UPEC      | CAA59767     |
| 41 | AfaE-III  | A30         | UPEC      | Q57254       |
| 42 | AfaE-V    | AL 851      | DAEC      | CAA62863     |
| 43 | AfaE-VIII | 2009C-3133  | STEC      | ALL87608     |
| 44 | DaaE      | C1845       | DAEC      | P13719       |
| 45 | DraE      | IH11128     | UPEC      | AAK16480     |
| 46 | DraE-II   | EC7372      | UPEC      | AAB65153     |
| 47 | AfaE-I    | 135/12      | EPEC      | AAK17183     |
| 48 | AfaE-I    | KS52        | UPEC      | AAA23981     |
| 49 | AfaE-V    | SM133       | DAEC/UPEC | ABD93445     |
| 50 | AfaE-V    | G2128       | DAEC/UPEC | ABD93358     |
| 51 | AfaE-V    | G2157       | DAEC/UPEC | ABD93357     |
| 52 | AfaE-V    | G2082       | DAEC/UPEC | ABD93369     |
| 53 | AfaE-V    | G2115       | DAEC/UPEC | ABD93361     |
| 54 | AfaE-V    | G2204       | DAEC/UPEC | ABD93373     |
| 55 | AfaE-V    | SM30        | DAEC/UPEC | ABD93443     |
| 56 | AfaE-V    | G2112       | DAEC/UPEC | ABD93368     |
| 57 | AfaE-IX   | F56-62      | DAEC/UPEC | AAB96839     |
| 58 | AfaE-V    | 1154-11     | DAEC/UPEC | AAB47759     |
| 59 | AfaE-V    | G2208       | DAEC/UPEC | ABD93364     |
| 60 | AfaE-I    | G2170       | DAEC/UPEC | ABD93379     |
| 61 | AfaE-I    | G2212       | DAEC/UPEC | ABD93385     |
| 62 | AfaE-I    | G2150       | DAEC/UPEC | ABD93403     |
| 63 | AfaE-I    | SM250       | DAEC/UPEC | ABD93393     |
| 64 | DraE-II   | SM313       | DAEC/UPEC | ABD93441     |
| 65 | DraE-II   | EC958       | DAEC/UPEC | WP_000696050 |
| 66 | DraE-II   | 1069-11     | DAEC/UPEC | AAB96841     |
| 67 | DaaE      | SM253       | DAEC/UPEC | ABD93447     |
| 68 | DaaE      | G2216       | DAEC/UPEC | ABD93377     |
| 69 | DaaE      | G2067       | DAEC/UPEC | ABD93378     |
| 70 | DaaE      | SM329       | DAEC/UPEC | ABD93442     |
| 71 | DaaE      | SM478       | DAEC/UPEC | ABD93444     |
| 72 | DaaE      | 133D        | DAEC      | AFJ79746     |
| 73 | DaaE      | 77CS        | DAEC      | AFJ79745     |
| 74 | DaaE      | DA119       | DAEC      | AKN63257     |
| 75 | CFA/I     | E7473       | EPEC      | AAC41415     |
| 76 | CS1       | E24377A     | EPEC      | CAA44673     |
| 77 | CS2       | C91f-6      | EPEC      | Z47800       |
| 78 | CS3       | PB176       | EPEC      | CAA34820     |
| 79 | CS4       | E11881A     | EPEC      | AAK97135     |
| 80 | CS5       | PE423       | EPEC      | CAA11820     |
| 81 | CS6       | E10703      | EPEC      | AAC45093     |
| 82 | CS7       | E29101A     | EPEC      | AAK09045     |
| 83 | CS8       | 260-1       | EPEC      | BAA07174     |
| 84 | CS12      | 350C1       | EPEC      | AAK09047     |
| 85 | CS13      | PE          | EPEC      | CAA50789     |
| 86 | CS14      | WS3294A     | EPEC      | AAQ20105     |
| 87 | CS15      | 8786        | EPEC      | CAA45906     |

|    |      |         |      |   |
|----|------|---------|------|---|
| 88 | CS17 | WS6788A | ETEC | AAS89777  |
| 89 | CS18 | ARG-2   | ETEC | AAB41914  |
| 90 | CS19 | WS0115A | ETEC | AAQ19775  |
| 91 | CS20 | H721A   | ETEC | AAL31637  |
| 92 | CS21 | E9034A  | ETEC | AAC33154  |
| 93 | CS22 | ARG-3   | ETEC | AAD30557  |
| 94 | CS23 | 1766a   | ETEC | AFD29291  |
| 95 | AggA | C43/90  | EAEC | EMS03085  |
| 96 | AggA | C48/93  | EAEC | EMR92002  |
| 97 | AggA | JM221   | EAEC | <a href="ftp://ftp.cccb.umd.edu/pub/data/PBcR/asms/ecoliJM221.pac454.ctg.fasta">ftp://ftp.cccb.umd.edu/pub/data/PBcR/asms/ecoliJM221.pac454.ctg.fasta</a> |

**Tabla suplementaria 3.** Secuencias de usher de adhesinas.

| #  | Proteína  | Cepa    | PED       | N° de acceso  |
|----|-----------|---------|-----------|---|
| 1  | Agg3C     | MEX-1   | EAEC      | -   |
| 2  | SefC      | MEX-2   | EAEC      | -   |
| 3  | AggC      | MEX-3   | EAEC      | -   |
| 4  | AggC      | MEX-4   | EAEC      | -   |
| 5  | AggC      | MEX-5   | EAEC      | -   |
| 6  | Agg3C     | MEX-6   | EAEC      | -   |
| 7  | Agg3C     | MEX-7   | EAEC      | -   |
| 8  | AggC      | MEX-8   | EAEC      | -   |
| 9  | AggC      | MEX-9   | EAEC      | -   |
| 10 | SefC      | MEX-10  | EAEC      | -   |
| 11 | AfaC      | MEX-11  | DAEC      | -   |
| 12 | AfaC      | MEX-12  | DAEC      | -   |
| 13 | AfaC      | MEX-13  | DAEC      | -   |
| 14 | AfaC      | MEX-14  | DAEC      | -   |
| 15 | AfaC      | MEX-15  | DAEC      | -   |
| 16 | AfaC      | MEX-16  | DAEC      | -   |
| 17 | AfaC      | MEX-17  | DAEC      | -   |
| 18 | AfaC      | MEX-18  | DAEC      | -   |
| 19 | AfaC      | MEX-19  | DAEC      | -   |
| 20 | AfaC      | MEX-20  | DAEC      | -   |
| 21 | AggC      | 17-2    | EAEC      | AAA57452  |
| 22 | AafC      | 042     | EAEC      | BG27785   |
| 23 | Agg3C     | 55989   | EAEC      | YP_002415690  |
| 24 | HdaC      | C1010   | EAEC      | ACF05258  |
| 25 | AggC      | C227-11 | EAEC-STEC | EHF16296  |
| 26 | AfaC-I    | FV9863  | UPEC      | CAW30799  |
| 27 | AfaC-III  | A30     | UPEC      | CAA54117  |
| 28 | AfaC-VIII | AL862   | STEC      | ALL90880  |
| 29 | DraC      | IH11128 | UPEC      | AAK16477  |
| 30 | DaaC      | C1845   | DAEC      | ABU51870  |
| 31 | CFA/I     | E7473   | ETEC      | AAC41416  |
| 32 | CS1       | E24377A | ETEC      | ABV16308  |
| 33 | AggC      | C43/90  | EAEC      | EMS03083  |
| 34 | AggC      | C48/93  | EAEC      | ABV16308  |
| 35 | AggC      | JM221   | EAEC      | <a href="ftp://ftp.cccb.umd.edu/pub/data/PBcR/asms/ecoliJM221.pac454.ctg.fasta">ftp://ftp.cccb.umd.edu/pub/data/PBcR/asms/ecoliJM221.pac454.ctg.fasta</a> |