



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

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE BIOMEDICINA MOLECULAR

Caracterización fenotípica y genotípica de los aislados de *Escherichia coli* enteropatógena obtenidos de casos de diarrea aguda y su asociación con el cuadro clínico

Tesis que presenta

M.C. Samantha Maldonado Puga

Para obtener el grado de

Doctora en Ciencias

En la especialidad de

Biomedicina Molecular

Directora de tesis: **Dra. María Teresa Estrada García**

Ciudad de México.

Febrero, 2019

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. María Teresa Estrada García por haberme permitido formar parte de su equipo de trabajo de laboratorio, por constante apoyo y confianza para realizar este proyecto.

A los Doctores. Vianney Ortiz Navarrete, Nicolás Villegas Sepúlveda, Michael Schnoor, y Jorge Cerna Cortés por el apoyo y el tiempo que me brindaron y por todas las sugerencias que ayudaron a mejorar este proyecto.

A Catalina López Saucedo, por su invaluable apoyo, sin ella estamos fritos.

A Nadia, Rosita, Mario, Elena, Adriana, Melissa y Sandra por su amistad que nos permitió ser equipo solidario y fuerte.

A todos los amigos que hice en Cinvestav, pero sobre todo a Josse y Dora, que estuvieron en los buenos y en los malos momentos, con amor y palabras alentadoras.

A mi familia, mi mamá, mi papá que siempre han estado conmigo apoyándome para lograr nuevas metas, especialmente a mi hermana, compañera de viaje, amiga, roomie, colega y mucho mucho más (mi agradecimiento es polo).

A la banda "hindú", que en realidad es india, los quiero hartos.

A "Gauravito", por el amor, el apoyo y la comida.

A CONACYT (Número de beca : 261205) que me brindó la oportunidad de lograr esta meta mediante una beca de tiempo completo.

Al Departamento de Biomedicina Molecular y al CINVESTAV-IPN, por su compromiso para mantener la calidad que caracteriza a los posgrados de esta institución.

RESUMEN

Escherichia coli enteropatógena (EPEC) es un importante agente etiológico causante de diarrea en niños ≤ 5 años y uno de los principales patotipos de *E. coli* diarreogénicos (PED) asociados con diarrea infantil en México. EPEC pertenece a la familia de bacterias que inducen en el intestino del hospedero la lesión de Adherencia y Esfacelamiento (A/E). Esta familia incluye varios patógenos intestinales como *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) otro PED y *Escherichia albertii* considerado un patógeno emergente de humanos. La lesión A/E es el resultado de la unión de íntima una molécula en la superficie de EPEC a su receptor tir (translocated intimin receptor) sobre el enterocito, translocado al citoplasma de éste a través del sistema de secreción tipo III (T3SS) de EPEC, lo que conlleva a la movilización de actina hacia el sitio de unión formándose un pedestal por debajo del sitio de unión de EPEC, lo que induce la desaparición (esfacelamiento) de las microvellosidades intestinales. Todos los genes necesarios para inducir esta lesión se encuentran en la isla de patogenicidad (PAI) LEE (locus of enterocyte effacement). El PED EPEC se define con base en la presencia de LEE y la ausencia de los genes para las toxinas Shiga. También hay varios otros efectores no codificados en LEE (Nle) translocados por el T3SS. Las cepas de EPEC pueden pertenecer a dos grupos EPEC típica (EPECt) y EPEC atípica (EPECa). Ambos grupos se identifican por la presencia del gen de íntima codificado en LEE, pero solo las EPECt además contienen el gen que codifica para la fimbria "bundle forming pili" (*bfpA*). EPECt se describió por primera vez en los 40s; es un patógeno asociado a casos de diarrea principalmente en niños ≤ 6 meses. Sin embargo, actualmente EPECa es más prevalente mas en México y en el mundo. EPECa se ha asociado con casos de diarrea en infantes, pero algunos estudios de casos y controles han mostrado prevalencias similares entre ambos grupos EPECt es un patotipo muy conservado mientras que las cepas de EPECa son muy heterogéneas, por lo que se agrupan en linajes diferentes. Por lo que el objetivo de este trabajo fue identificar clones virulentos de EPECa, así como identificar que genes asociados a estas cepas para utilizarlos como marcadores genéticos e identificar los linajes a los que pertenecen. Se secuenciaron masivamente 24 cepas de EPEC aisladas como único patógeno de heces de niños con diarrea (20 cepas) y asintomáticos (4 cepas) casi todos ≤ 5 años, 23 se confirmaron como EPECs y una se identificó como *Escherichia albertii*. Se analizaron estos genomas ensamblados para identificación de LEE y de otros genes de patogenicidad ya descritos en *E. coli* (fimbrias, toxinas, efectores y al sistema de secreción tipo 6 (T6SS). En el análisis filogenético basado en LEE mostró que teníamos 4 clados; el clado I contenía 8 cepas, todas pertenecían al linaje 2, la única cepa de EPECt se agrupó en el clado I,a pertenece al subgrupo 6 y las 7 restantes todas EPECa formaron el clado I,b pertenecen al subgrupo 8. El clado 1,b mostró estar altamente conservado, todas las cepas fueron aisladas de niños con diarrea, 6 de cuadro moderados y 1 agudo, casi todas tuvieron las mismas tres PAI, incluyendo una que describimos por primera vez en este trabajo, así como la proteína Iss. Las cepas de este clado asociaron con una mayor carga de EPEC en las heces de estos niños. Todas las cepas del clado II y III fueron aisladas de niños con diarrea y ,pertenecieron al mismo linaje y subgrupo, respectivamente. El clado IV contiene cepas muy diversas y las 4 cepas de niños asintomáticos. Se identificó un T6SS en 13 cepas, con una alta homología (95-98%) con los descritos en las cepas de EHEC O26 y O103; estas cepas mostraron asociaciones significativa: con la severidad del cuadro clínico del niño, con un mayor número de evacuaciones por día y una mayor duración del episodio de diarrea. Se realizó la búsqueda de genes de virulencia en una colección de cepas de EPEC aisladas de 28 niños con diarrea y 38 asintomáticos, observando en las cepas de los casos una prevalencia significativa de los genes *nleA* y *nleH1*, efectores involucrados en la inhibición de la respuesta inmune innata. Al infectar células Caco-2 con estas cepas y las secuenciadas, las células infectadas con cepas de casos expresaron menos IL-6 que las cepas de controles, mostrando que *in vitro* inhiben la respuesta inmune innata. Estandarizamos las condiciones para inducir la formación de pedestales, mostrando que todas las cepas secuenciadas que contenían la PAI LEE formaron pedestales estas EPEC habían sido identificadas solo por el gen de íntima corroborando que los métodos moleculares correlacionan con el fenotipo.

ABSTRACT

Enteropathogenic Escherichia coli (EPEC) is an important etiological agent of diarrhoea in children ≤ 5 years of age as well as one of the main diarrheagenic *E. coli* pathotypes (DEC) associated with infant diarrhoea in México. EPEC belongs to the family of bacteria that induce the Adherence and Effacement lesion (A/E) on the host intestine. This family includes several intestinal pathogens as enterohaemorrhagic *E. coli* (EHEC) another DEC and *Escherichia albertii* considered an emerging human pathogen. The A/E lesion results from the union of intimin, a molecule on the EPEC surface to its receptor Tir (translocated intimin receptor) on the enterocyte, translocated to the cytoplasm through the EPEC type III secretion system (T3SS), resulting in the mobilization of actin towards the binding site and the formation of a pedestal underneath the attached EPEC, inducing the intestinal microvilli effacement. All the necessary genes for the induction of this lesion are harboured in the pathogenicity island (PAI) LEE (locus of enterocyte effacement). EPEC is defined based on the presence of LEE and the absence of the Shiga toxin genes. There are several non-LEE encoded (Nle) effectors also translocated by the T3SS. EPEC strains may belong to two groups typical EPEC (tEPEC) and atypical EPEC (aEPEC). Both groups are identified by the presence of intimin, LEE-encoded, but only tEPEC strains will harbour the *bfpA* gene encoding for the bundle forming pilus. tEPEC was first described in the 40's; is a pathogen associated with diarrheal cases mainly in children ≤ 6 months of age. However, nowadays aEPECa is more prevalent in México and worldwide. aEPEC has been associated with diarrheal cases among infants, but some studies of cases and controls have shown similar prevalence between both groups. tEPEC is a highly conserved pathotype while aEPECa is very heterogeneous, therefore they are grouped in different lineages. Therefore, the objective of this work was the identification of virulence aEPEC clones, as well as to identify genes associated with these strains to be used as genetic markers and identify to which lineage they belong. Twenty-four EPEC strains isolated as unique pathogens from the faeces of children, almost all ≤ 5 years of age, with diarrhoea (20 strains) and asymptomatic (4 strains) were subjected to whole genome sequence, 23 were confirmed to be EPEC and one as *Escherichia albertii*. The assembled genomes were analysed for the identification of LEE and other virulence genes described in *E. coli* (fimbria, toxins, effectors and type VI secretion system (T6SS)). Based on the phylogenetic analysis of LEE revealed 4 clades; clade I contained 8 strains, all belonging to lineage 2, the only tEPEC strain grouped in clade I,a belonging to subgroup 6, the remaining 7 strains, all aEPEC, grouped in clade I,b belonging to subgroup 8. Clade I,b was highly conserved, all the strains were isolated from children with diarrhoea 6 mild cases and 1 from an acute case, almost all strains harboured the same three PAI, including one described for the first time in this study, as well as the protein Iss. The strains belonging to this clade were associated with a higher EPEC load in the children faeces. All strains from clade II y III were isolated from children with diarrhoea belonging to the same lineage and subgroup, respectively. Clade IV contained very diverse strains and the 4 strains from asymptomatic children. A T6SS was identified in 13 strains, with a high homology (95-98%) with those described in EHEC O26 and O103 strains; a significant association was shown of these strains: with the severity of the child clinical case, with a greater number of depositions per day and a longer duration of the diarrheal episode. In a collection of EPEC strains isolated from 28 children with diarrhoea and 38 asymptomatic children we sought out virulence genes we observed that the strains from cases had a significantly higher prevalence of *nleA* and *nleH1* genes, effectors involved in the inhibition of the innate immune response. After infecting Caco-2 cells with these strains and the ones we sequenced the cells infected with strains from cases expressed less IL-6 than the ones infected with strains from controls, showing the inhibition of the innate immune response *in vitro*. Standardization of the conditions to induce pedestal formation revealed that all the sequenced strains containing PAI LEE produced pedestals, these EPEC strains were identified just by the intimin gene, corroborating that molecular methods correlate with phenotype.

ÍNDICE

1. Introducción.....	1
1.1. La epidemiología de la diarrea en el mundo.....	1
1.2. La epidemiología de la diarrea en México.....	3
1.3. Los patotipos de <i>E. coli</i> diarreogénicos (PED).	3
1.3.1. <i>Escherichia coli</i>	3
1.3.2. Clasificación de los patotipos de <i>E. coli</i> diarreogénicos.....	4
1.3.3. Prevalencia de los patotipos de <i>E. coli</i> diarreogénicos en México.....	4
1.4. Epidemiología de las EPEC en el mundo.....	6
1.5. Descripción de EPEC.....	9
1.6. Lesión de Adherencia y Esfacelamiento (A/E).....	10
1.6.1. Otros patógenos que forman la lesión A/E.....	10
1.6.2. Mecanismo molecular de la formación de la lesión A/E.....	11
1.7. Sistema de Secreción Tipo III.....	12
1.8. La isla de patogenicidad LEE.....	13
1.9. Efectores asociados al sistema de secreción tipo III.....	15
1.9.1. Efectores codificados en LEE.....	15
1.9.2. Efectores no codificados en LEE.....	16
1.10. Toxinas asociadas a las cepas patógenas de <i>E. coli</i> diarreogénicas.....	19
2. Justificación.....	21
3. Hipótesis.....	22
4. Objetivo general.....	23
5. Objetivos específicos.....	23
6. Material y métodos.....	24
6.1. Selección de cepas de EPEC para secuenciación masiva.....	24
6.2. Extracción de DNA bacteriano.....	24
6.3. Secuenciación y ensamble de genomas.....	25
6.4. Análisis Bioinformático.....	25
6.4.1. Análisis filogenético.....	25
6.4.2. Búsqueda <i>in silico</i> de factores de patogenicidad.....	26
6.4.2.1. Anotación de genomas de EPEC con la base de datos VFDB (Virulence Factor DataBase).....	26
6.4.2.2. Búsqueda de genes de patogenicidad.....	27
6.4.2.3. Predicción de Islas de Patogenicidad.....	27
6.4.2.4. Identificación de Sistemas de Secreción tipo VI (T6SS).....	27
6.4.2.5. Predicción de Resistencia a antibióticos.....	28
6.5. Determinación de la susceptibilidad antimicrobiana.....	28
6.5.1. Metodología para determinar el perfil de antibióticos.....	28
6.5.2. Inoculación.....	29
6.5.3. Sellado e incubación de las tarjetas.....	29

6.5.4. Lectura de las reacciones.....	29
6.6. Identificación de genes de patogenicidad en cepas de EPEC de niños con diarrea y asintomáticos por medio de PCR.....	30
6.6.1. Selección de cepas de EPEC para búsqueda de genes de patogenicidad	31
6.6.2. Iniciadores utilizados para la búsqueda de genes de patogenicidad por PCR....	31
6.6.3. Preparación de lisados de cepas de EPEC para PCR.....	33
6.7. Cultivo de líneas celulares.....	33
6.7.1. Características de las líneas celulares utilizadas en este estudio.....	33
6.7.1.1. Manejo de las líneas celulares	34
6.8. FAS (Fluorescent-actin staining).....	34
6.8.1. Infección de células HEp-2 con las cepas de EPEC.....	34
6.8.2. Infecciones de células Caco-2 con cepas de EPEC.....	35
6.8.3. Tinción de células para microscopía confocal.....	35
6.9. Determinación de producción de citocinas.....	36
7. Resultados.	38
7.1. Selección de cepas de <i>Escherichia coli</i> para secuenciación masiva.....	38
7.2. Características del cuadro clínico de los niños de los cuales se aislaron las cepas de EPEC y <i>E. albertii</i>	38
7.3. Análisis filogenético de las cepas de EPEC.....	40
7.4. Distribución de los genes que codifican diferentes factores de patogenicidad en las cepas secuenciadas.....	42
7.4.1. Genes que codifican para adhesinas.....	42
7.4.2. Prevalencia de los genes que codifican para toxinas de <i>Escherichia</i>	44
7.4.3. Prevalencia de genes de sistemas de competencia interbacteriana.....	46
7.4.4. Prevalencia de los genes que codifican para proteínas que afectan la respuesta por complemento.....	49
7.4.5. Prevalencia de los genes que codifican para efectores translocados por el Sistema de Secreción tipo III, que se encuentran codificados fuera de LEE.....	51
7.4.6. Genes que codifican para proteínas translocadas por el T3SS con función desconocida.....	52
7.5. Identificación de islas de patogenicidad previamente identificadas en cepas de <i>E. coli</i> que producen la lesión A/E.	57
7.5.1. Identificación de islas de patogenicidad no reportadas previamente.....	57
7.6. Asociación de las características filogenéticas de las cepas de EPEC y los factores de patogenicidad.....	60
7.7. Correlación entre las características genéticas de los clados y la carga de EPEC en las heces de los niños.....	61
7.8. Asociación de la presencia del locus T6SS con el cuadro clínico.....	62

7.9. Identificación de genes de patogenicidad de EPEC en cepas de niños con diarrea y asintomáticos por PCR punto final.....	63
7.10. Resistencia a antibióticos.....	65
7.10.1. Pruebas de sensibilidad a antibióticos a las cepas secuenciadas de EPEC.....	65
7.10.2. Búsqueda de marcadores genéticos de resistencia antimicrobiana.....	
7.11. Estandarización de las condiciones de la técnica de FAS para formación de pedestales.....	66
7.11.1. Formación de pedestales utilizando las técnicas descrita en células HEp-2.....	66
7.11.2. Modificación de la técnica de FAS incrementando la MOI y el tiempo de incubación.....	67
7.11.3. Ensayo de FAS utilizando DMEM Advanced.....	67
7.11.4. Ensayo de FAS utilizando DMEM Advanced y células Caco-2 y determinación de citocinas producidas por estas células.....	68
7.12. Correlación entre las concentraciones de citocinas y el número de pedestales, células con pedestales y cuadro clínico.....	69
7.13. Producción de citocinas de cepas de EPEC de casos y niños asintomáticos.	70
8. Discusión.....	71
9. Conclusiones.....	77
10. Perspectivas.....	78
11. Referencias.....	79

Índice de Figuras

Figura 1. Prevalencia de los PESs en un estudio realizado previamente.....	2
Figura 2. Prevalencia de los PEDs en un estudio realizado recientemente.....	3
Figura 3. Distribución de los PED y prevalencia.....	6
Figura 4. Esquema del T3SS.....	13
Figura 5. Organización de la Isla LEE.....	14
Figura 6. Escala de Ruuska-Versikari.....	40
Figura 7. Clasificación de las cepas de EPEC en linajes y subgrupos.....	41
Figura 8. Distribución de los factores de patogenicidad.....	60
Figura 9. Carga de EPEC y factores de patogenicidad.....	62

Índice de Tablas y Gráficos

Tabla 1. Prevalencia de EPEC en México.....	5
Tabla 2. Prevalencia de EPECt y EPECa en el mundo en los años 90s.....	8
Tabla 3. Prevalencia de EPECt y EPECa en el mundo en los años 2000.....	9
Tabla 4. Características de los efectores no codificados en LEE.....	18
Tabla 5. Toxinas asociadas a los patotipos de <i>E.coli</i>	20
Tabla 6. Cepas seleccionadas para la búsqueda de genes de patogenicidad por PCR.....	31
Tabla 7. Iniciadores previamente utilizados en otros proyectos por nuestro grupo de trabajo.....	32
Tabla 8. Iniciadores diseñados para este proyecto.....	34
Tabla 9 Características del cuadro clínico y antropométricas de los niños de donde se seleccionaron las cepas secuenciadas.....	39
Tabla 10. Prevalencia de los genes de adherencia.....	43
Tabla 11. Prevalencia de los genes de toxinas.....	45
Tabla 12. Prevalencia de los genes de competencia interbacteriana.....	48
Tabla 13. Prevalencia de los genes asociados a complemento.....	50
Tabla 14. Prevalencia de los genes de efectores no codificados en LEE asociados a respuesta inmune y muerte celular.	53
Tabla 15. Prevalencia de los genes de efectores no codificados en LEE asociados a citoesqueleto.....	55
Tabla 16. Islas de patogenicidad previamente reportadas identificadas en este estudio.....	56
Tabla 17. Islas de patogenicidad que no han sido previamente reportadas identificadas en este estudio.....	58
Tabla 18. Genes contenidos en las islas de patogenicidad descritas previamente.....	59
Tabla 19. Asociación de la presencia del T6SS y la severidad del caso clínico.....	62
Tabla 20. Prevalencia de los genes asociados a la patogenicidad, buscados por PCR en cepas de niños asintomáticos y con diarrea.....	64
Tabla 21. Susceptibilidad a antibióticos.....	65
Tabla 22. Estandarización de la técnica de FAS para nuestras cepas.....	68
Tabla 23 Formación de pedestales en las cepas secuenciadas.	69
Gráfico 1. Producción de citocinas en células Caco-2 infectadas con las cepas de EPEC de niños con diarrea y asintomáticos.....	70

ABREVIATURAS

<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>E. albertii</i>	<i>Escherichia albertii</i>
EPEC	<i>Escherichia coli</i> enteropatógena
EPECt	<i>Escherichia coli</i> enteropatógena típica
EPECa	<i>Escherichia coli</i> enteropatógena atípica.
PED	Patogrupos diarreogénicos de <i>E. coli</i>
Esp(*)	EPEC secreted protein
Nle(*)	Non LEE-encoded effector
T3SS	Sistema de Secreción tipo 3
T6SS	Sistema de secreción tipo 6
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's medium
DMEM HG	Dulbecco's Modified Eagle's medium de alta glucosa.
DMEM Advanced	Dulbecco's Modified Eagle's medium de alta glucose Advanced.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. La epidemiología de la diarrea en el mundo

La diarrea se define como un cambio en el patrón de las deposiciones, tres o más veces al día (o con una frecuencia mayor que la normal al patrón de la persona) de heces líquidas o semilíquidas. La OMS estima que anualmente las enfermedades gastrointestinales causan la muerte de alrededor de 525 000 niños menores de 5 años (<https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/diarrhoeal-disease>). Los agentes etiológicos más frecuentemente identificados en niños con diarrea incluyen virus: rotavirus, norovirus, enterovirus; bacterias: *Salmonella enterica* sp., *Shigella* sp., *Vibrio cholerae*, *Campylobacter jejuni* y los patotipos de *Escherichia coli* diarreogénicos (PED); parásitos: *Entamoeba histolytica*, *Ascaris lumbricoides*, *Cryptosporidium* sp., *Giardia* (Walker, Sack y Black, 2010).

1.2. La epidemiología de la diarrea en México

Las enfermedades gastrointestinales en México son la 2da causa de mortalidad debido a enfermedades infecciosas en niños de 1 a 4 años, con una tasa de mortalidad para el 2017 de 0.4 por cada 1000 niños nacidos vivos. Por otro lado, para el año 2016 se estimó que el 2.9% de los niños de 1 a 4 años que presentaron cuadros de diarrea fallecieron (<https://www.inegi.org.mx/>, https://www.who.int/gho/child_health/mortality/causes/). Las diarreas en México siguen presentando altas morbilidades, la encuesta nacional de Salud y Nutrición del 2012 reportó una incidencia de diarrea del 11% en niños menores a 5 años. Los estudios de búsqueda intencionada de patógenos causantes de diarrea realizados antes de la introducción de la vacuna Rotavirus, revelaron que este virus era principal agente etiológico asociado a diarrea aguda, tanto de casos que requerían hospitalización como de comunidad, como a muertes (Richardson *et al.*, 2010).

En México los patotipos de *E. coli* diarreogénicos, han sido frecuentemente identificados como agentes patógenos causantes de diarrea en la población infantil tanto de casos que requirieron hospitalización como de comunidad, (Estrada-García *et al.*, 2005; Estrada-García *et al.*, 2009; Navarro y Estrada-García, 2010; Patzi-Vargas *et al.*, 2015; Canizalez-Roman *et al.*, 2016).

Como se muestra en la Figura 1, en un estudio de búsqueda intencionada de patógenos causantes de diarrea, que se realizó en un Hospital de tercer nivel en Mérida Yucatán del 2007-2011, los PED fueron los patógenos bacterianos más frecuentemente identificados en las heces de niños menores de 5 años que requirieron hospitalización por diarrea aguda, (Patzí-Vargas *et al.*, 2015). Cabe mencionar que como la vacuna de rotavirus se introdujo a nivel nacional entre el 2007-2008 no se buscó este patógeno en estas muestras. Además, en un estudio realizado después de la introducción de la vacuna de rotavirus al estado de Yucatán, también en niños menores a 5 años que requirieron hospitalización, se observó que los PED fueron los agentes etiológicos de diarrea aguda más prevalentes (Figura 2), significativamente por arriba de Rotavirus y bacterias como *Salmonella* spp y *Shigella* spp (Meza-Segura, 2017).

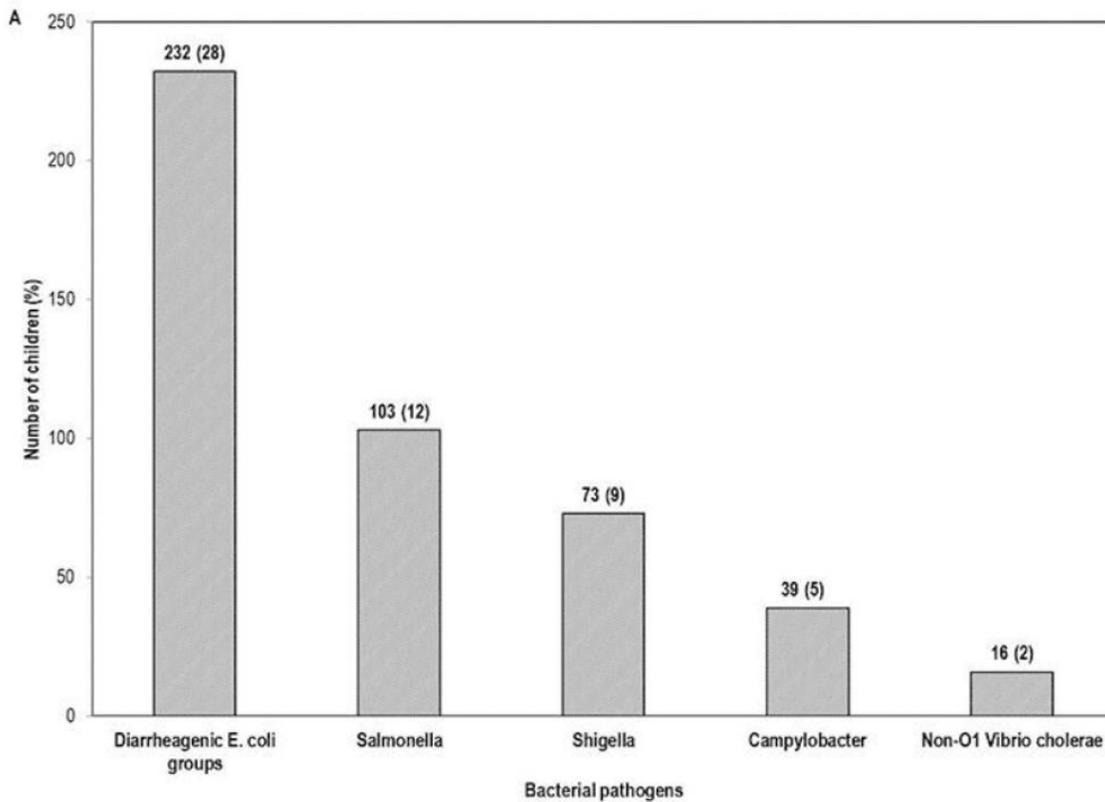
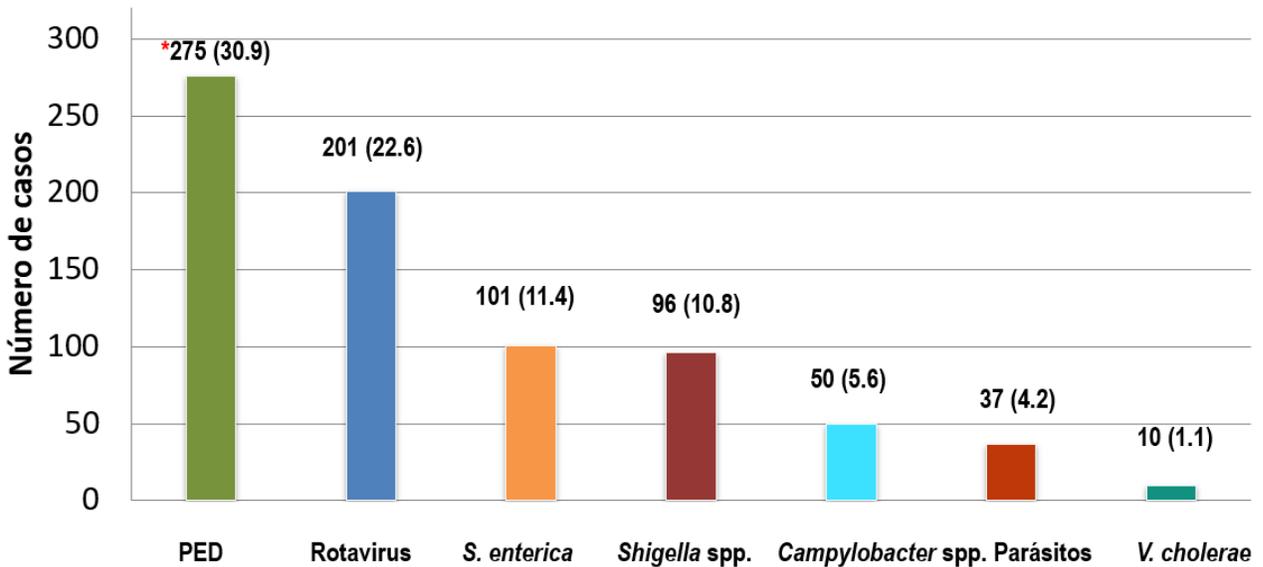


Figura 1. Prevalencia de los PEDs. se muestra la prevalencia de los patógenos bacterianos identificados en las heces de niños con diarrea aguda que requirieron hospitalización (Patzí-Vargas *et al.*, 2015).



*P < 0.0001 FET

Figura 2. . Prevalencia de los PED en el estudio más recientes. .Se muestra la prevalencia de los patógenos virales, bacterianos y parasitarios identificados en las heces de niños que requirieron hospitalización por diarrea aguda, observándose que de manera significativa los PEDS fueron el grupo más prevalente ($p < 0.0001$).

1.3. Los patotipos de *E. coli* diarreogénicos (PED).

1.3.1. *Escherichia coli*

Escherichia coli es una bacteria gram-negativa que es parte de la microbiota intestinal de animales de sangre caliente y es la bacteria anaerobia facultativa predominante del intestino grueso. *E. coli* coloniza el tracto intestinal de los recién nacidos desde las primeras horas de vida, estableciendo una relación mutualista con el hospedero (Kaper, Nataro y Mobley, 2004). Sin embargo, algunas cepas de *E. coli* han adquirido diferentes factores de patogenicidad, a través de mecanismos de transferencia horizontal de genes, por lo que pueden causar enfermedades gastrointestinales, a estos grupos de cepas se les conoce como patotipos de *E. coli* diarreogénicos.

1.3.2. Clasificación de los patotipos de *E. coli* diarreogénicos.

Los patotipos de *E. coli* diarreogénicos se han clasificado con base en sus mecanismos de patogenicidad y patrones de adherencia sobre células epiteliales. Hasta el momento se han descrito 6 patotipos: *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* enterodifusa (DAEC), *E. coli* enteropatógena (EPEC), *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* enteroinvasora (EIEC), *E. coli* productora de toxinas Shiga (STEC) dentro de este grupo se encuentran las cepas de *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), que además de producir la toxina Shiga, tienen una isla de patogenicidad similar a las cepas de EPEC (Kaper, Nataro y Mobley, 2004). Actualmente la identificación de los patotipos se hace por medio de la búsqueda de genes asociados a los mecanismos específicos de patogenicidad o de adherencia.

Todas las cepas de EPEC contienen un gen (*eaeA*) que codifica para una proteína denominada intimina asociado con su patogénesis, no presentan los genes de las toxinas Shiga, y con base en la presencia o ausencia de un gen que codifica para la fimbria BFP (bundling forming pilus) estas cepas se han clasificado en EPEC típica y EPEC atípica, respectivamente (Nataro y Kaper, 1998).

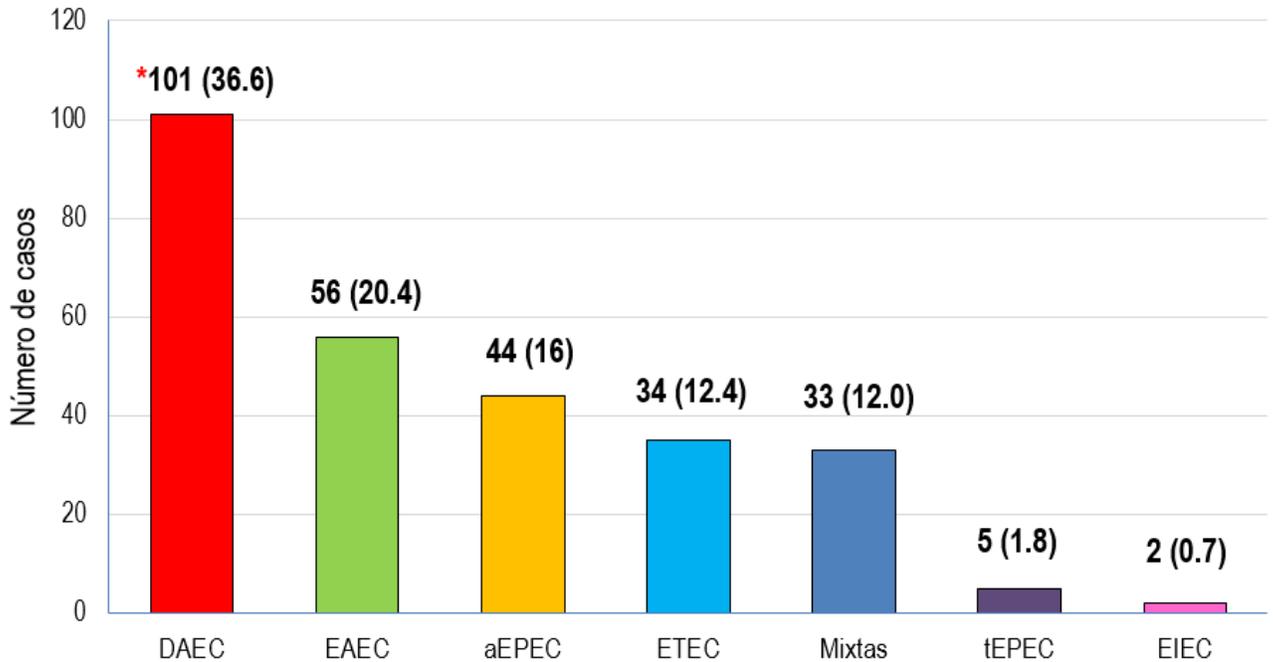
1.3.3. Prevalencia de los patotipos de *E. coli* diarreogénicos en México

Los estudios moleculares de los patotipos en México se iniciaron desde hace aproximadamente dos décadas, pero estos no han incluido a todos los patotipos ni a todas las regiones del país. En un estudio realizado de la prevalencia de los PEDs en niños hospitalizados por diarrea aguda en la Ciudad de México y Villahermosa Tabasco donde se buscaron todos los patotipos menos DAEC se observó que el patotipo más prevalente fue EAEC seguida de EPEC atípica (Estrada-García *et al.*, 2005). Como se muestra en la Tabla 1 la distribución de los patotipos es diferente dependiendo de la región de estudio y años en que se realizó. Además este estudio mostró con base en el patrón de drogorresistencia que EPEC atípica (EPECa) era un patógeno emergente causante de diarrea en México. Como se muestra en la figura 3, en el estudio donde se realizó la búsqueda de rotavirus y varias bacterias patógenas en las heces de niños que requirieron hospitalización por diarrea aguda, los PED fueron los principales patógenos identificados siendo el patotipo más prevalente DAEC, seguido de EAEC y EPEC atípica (Figura 3) (Meza-Segura, 2017) . También los patotipos se han aislado de niños menores de 5 años de comunidad con diarrea. La búsqueda de 4 patotipos ETEC, EPEC, EIEC y STEC en niños con diarrea mostro que EPECa era el patotipo más prevalente en niños menores de 12 meses (Estrada-García *et al.*, 2009).

En niños con diarrea de diferentes comunidades en Sinaloa se mostró que el patotipo más prevalente fue EAEC seguido de EPECa y este patotipo se asoció significativamente con diarrea en el grupo de niños menores de 2 años (Canizalez-Roman *et al.*, 2016).

Tabla 1. Prevalencia de los PED asociados a diarrea aguda que requirió hospitalización en niños mexicanos menores de 5 años.

PED	Ciudad de México.	Tabasco
	Tres hospitales del IMSS Mar 1998-Feb 2001 133/1129(11.7) N(%)	Hospital del niño en Villahermosa Feb 2004- Feb 2007 140/620(22.5) N(%)
DAEC	-	-
EAEC	55 (41.4)	73 (52)
EPEC	26 (14)	33(24)
EPECt	6(23)	8(24)
EPECa	20 (77)	25(76)
ETEC	27(20.4)	24(17)
STEC	18(13.5)	9(6)
EIEC	7(5.3)	1(1)
TOTAL	133	140



*P < 0.0001 FET

Figura 3. Distribución de patotipos. muestra la distribución de los patotipos de *E. coli* diarregénicos, en niños menores de 5 años hospitalizados por diarrea aguda en un hospital de tercer nivel en Mérida, Yucatán, donde se muestra que DAEC es el principal patotipo asociado a diarrea seguido de EAEC y EPEC.

1.4. Epidemiología de las EPEC en el mundo

EPEC no es solo un patógeno importante causante de diarrea en México sino también en el mundo. Se ha asociado tanto a de casos de diarrea aguda de comunidad y que requirieron hospitalización como a casos de diarrea persistente (cuya duración es de 14 días o más) (Ochoa J. y Contreras A., 2011; Hu y Torres, 2015). Desde los años 40 hasta los 80 los estudios mostraron que EPEC típica (EPECT) era más prevalente, pero desde los años 90, se observó un cambio en la epidemiología en donde EPECa, se aislaron con mayor frecuencia de casos de diarrea infantil (Tabla 2). Este cambio epidemiológico se observó en un inicio en los países industrializados en donde EPECa inicio el desplazamiento de EPECT (Bokete *et al.*, 1997; Afset, Bergh y Bevanger, 2003).

Además, EPECt dejó de ser un patógeno de países industrializados, como lo fue en los años 60s y 70s, para convertirse en uno de los principales patógenos intestinales en los países en vías de desarrollo (Estrada-García *et al.*, 2005; Ochoa *et al.*, 2008; Estrada-García *et al.*, 2009). Sin embargo, en países subdesarrollados de Asia y África se mostró que EPECt sigue estando asociado a mortalidad infantil (Hazen *et al.*, 2016). A pesar de EPEC atípica se ha asociado a la presencia de diarrea, en algunos estudios la prevalencia de EPEC atípica en niños con diarrea es similar en los niños asintomáticos (Hu y Torres, 2015) (Tabla 3), por lo que el papel de EPECa como patógeno sigue siendo controversial (Hu y Torres, 2015; Ingle *et al.*, 2016). Por lo que es indispensable encontrar marcadores que nos permitan distinguir entre las cepas de EPECa que producen diarrea de las cepas menos patógenas.

Tabla 2. Prevalencia de EPEC típica vs. EPEC atípica Tabla modificada de (Ochoa *et al.*, 2008). Se muestra la prevalencia en los años finales de los 90s y los primeros años 2000.

País	Periodo de recolección	Edad de los niños (años)	Total de muestras	EPEC Típica	EPEC Atípica	Referencia
Tanzania	1996-1997	<5	451	9(37.5)	14(62.5)	(Vargas <i>et al.</i> , 2004)
Tailandia	1996-2000	<12	2629	24(20.2)	61(71.8)	(Ratchtrachenchai <i>et al.</i> , 2004)
Mozambique	1998-1999	<7	548	41(30)	9(70)	(Rappelli <i>et al.</i> , 2005)
Brasil	1998-1999	<2	237	21(63)	13(37)	(Scaletsky <i>et al.</i> , 2002)
México	2000-2004	<5	430	16 (84)	3 (16)	(Estrada-García <i>et al.</i> , 2005)
Mongolia	2001-2002	<16	238	5(55)	5(45)	(Sarantuya <i>et al.</i> , 2004)
Brasil	2001-2002	<5	175	0(0)	39(100)	(Franzolin <i>et al.</i> , 2005)
Vietnam	2001-2002	<5	507	3(11)	13(89)	(Nguyen <i>et al.</i> , 2005)
Túnez	2001-2004	<15	115	2(34)	4(67)	(Al-Gallas <i>et al.</i> , 2007)
Chile	2002-2003	<9	446	14 (26)	40(74)	(Vidal <i>et al.</i> , 2005)
Brasil	2002-2003	<5	461	2(8)	23(92)	(Araujo <i>et al.</i> , 2007)
Perú	2004-2005	<1	509	2(11)	16(89)	Ochoa <i>et al.</i> , 2008)

Tabla 3. Prevalencia de EPEC típica vs EPEC atípica en diferentes estudios epidemiológicos llevados a cabo en años recientes.

País	Años del estudio	Edad	Con diarrea			Asintomáticos			Referencia
			Total n(%)	EPECt n(%)	EPECa n(%)	Total (%)	EPECt n(%)	EPECa n(%)	
Brasil	2004-2007	< 5 años	46(19.2)	9(3.8%)	37(15.4%)	30(20%)	4(2.7%)	26(17.3%)	Nunes <i>et al.</i> 2012
Brasil	2007-2008	<10 años	17(12)	1(0.7%)	16(11.3%)	35(8.35%)	2(0.48%)	33(7.87%)	Lozer <i>et al.</i> , 2013
Brasil	2013-2014	< 5 años	15(7.5)	0(0%)	15(7.5%)	17(8.5%)	1(0.5%)	16(8%)	Dias <i>et al.</i> , 2016
México	2007-2011	< 5 años	46(5.53)	9(1.08%)	37(4.45%)	N/A	N/A	N/A	Patzi-Vargas <i>et al.</i> , 2015
Perú	2006-2007	2 a 12 meses	74(8)	20(2.2%)	54(5.8%)	46(11%)	6(1.41%)	40(9.43%)	Contreras <i>et al.</i> , 2011
	2011-2013	15 días a 11 años	8(3.88)	0(0%)	8(3.88%)	N/A	N/A	N/A	Foster <i>et al.</i> , 2015
China	2009	< 5 años	58(3.53)	51(3.1%)	7(0.43%)	N/A	N/A	N/A	Huang <i>et al.</i> , 2015

1.5. Descripción de EPEC

EPEC fue el primero de los patotipos que se asoció con cuadros de diarrea aguda en niños del Reino Unido y Estados Unidos, en la década de los 40 y los 50, respectivamente (Deborah Chen y Frankel, 2005). Aunque fue identificado como patógeno, los mecanismos de patogenicidad por los cuales causaba diarrea no se dilucidaron hasta los ochentas. Una de las primeras características asociadas a este patotipo fue descrita por Cravioto (Cravioto *et al.*, 1979), en donde mostró que las cepas de EPEC tienen un patrón característico de adherencia a células epiteliales humanas de carcinoma de laringe (HEp-2) comparado con cepas de *E. coli* comensales.

EPEC se adherían formando microcolonias sobre las células HEp-2, al cual se le llamó patrón de adherencia localizada (Deborah Chen y Frankel, 2005). Utilizando la cepa de referencia de EPEC E2348/69 se demostró que este patrón de adherencia se debía a la presencia del plásmido pMAR2, conocido en la actualidad como plásmido EAF (EPEC Adherence Factor) (Baldini, Nataro y Kaper, 1986; Mcconnell *et al.*, 1989). Finalmente en 1991, se describió que este plásmido codificaba para una fimbria que permite tanto la adherencia de las bacterias a la célula como entre ellas, dando como resultado el patrón característico de adherencia localizada, esta fimbria fue llamada BFP (Bundle-forming pilus) (Giron, Ho y Schoolnik, 1991).

En 1983 se describió por primera vez la presencia de una lesión característica en el intestino de animales infectados con EPEC, esta lesión histológica se denominó: Lesión de Adherencia y Esfacelamiento (A/E) (Moon *et al.*, 1983). La capacidad de formar la lesión A/E, se debe a la presencia de un sistema de secreción tipo III y otras proteínas capaces de promover la unión íntima al enterocito y la movilización de actina, que se encuentran codificadas en una isla de patogenicidad llamada LEE (Locus of Enterocyte Effacement) (Caron *et al.*, 2006).

1.6. Lesión de Adherencia y Esfacelamiento (A/E).

La lesión es el resultado de una unión estrecha o "íntima" de la bacteria a los enterocitos cuyas consecuencias son el Esfacelamiento o desaparición de las microvellosidades y la formación de una estructura en forma de pedestal debajo del sitio donde se encuentran adheridas las bacterias.

El esfacelamiento de las microvellosidades y la formación del pedestal se deben a la movilización del citoesqueleto de actina al sitio de infección de las bacterias. Por lo que la formación de este tipo de estructuras *in vitro* ha sido importante en la identificación de las cepas de EPEC. La técnica por la cual se evidencian la formación de los pedestales *in vitro* se llama FAS (Flourescence actin staining), la cual consiste en la infección de células HEp-2 con las cepas de EPEC, y posteriormente la tinción con faloidina acoplada a un fluoróforo (Knutton, Lloyd y McNEISH, 1987).

1.6.1. Otros patógenos que forman la lesión A/E.

En la actualidad se han descrito otras patógenos intestinales capaces de producir la lesión A/E además de EPEC, los cuales contienen homólogos de la isla LEE (Jores, Rumer y Wieler, 2004), como EHEC que además de la capacidad de producir esta lesión, produce toxinas tipo Shiga, esta bacteria puede infectar humanos y bovinos. REPEC (Rabbit enteropathogenic *E. coli*) y *Citrobacter rodentium* son

bacterias capaces de producir la lesión A/E que infectan conejos y ratones respectivamente y producen la lesión de A/E (Jores, Rumer y Wieler, 2004). Además, recientemente se ha descrito nueva especie que la puede formar, se ha denominado *Escherichia albertii*, la cual se ha aislado de muestras tanto de aves y de seres humanos (Nimri, 2013; Grillova *et al.*, 2017) y son generalmente lactosa negativas, al contrario de *Escherichia coli* que son en su mayoría lactosa positivas (Abbott *et al.*, 2003). Debido a que *E. albertii* se definió como una nueva especie recientemente, se han reanalizado algunas cepas lactosa negativas, previamente identificadas como EPECa, y se han reclasificado como *E. albertii* (Ooka *et al.*, 2013).

1.6.2. Mecanismo molecular de la formación de la lesión A/E

La primer fase del mecanismo de patogenicidad de EPEC es la adherencia primaria, la cual se lleva a cabo a través de la fimbria BFP en las cepas de EPEC típica y por diversas fimbrias en las cepas de EPEC atípica (Hernandes *et al.*, 2009). En una segunda fase se expresan los genes contenidos en la isla de patogenicidad LEE, los cuales codifican para un sistema de secreción tipo III (T3SS), proteínas que pueden ser translocadas mediante este sistema de secreción y una molécula de superficie llamada intimina, la cual está codificada por el gen *eaeA*, el cual es utilizado, como se mencionó antes para la identificación de las cepas de EPEC.

Una vez que se forma el T3SS, el primer efector translocado es Tir, (Translocated intimin receptor), el cual, una vez dentro de la célula se ancla a la membrana del enterocito, que es el receptor de la intimina, la cual se encuentra expresada en la superficie de la bacteria.

Dilucidar este mecanismo no fue fácil ya que no se había reportado previamente que una bacteria translocase su propio receptor a una célula hospedera para que una molécula bacteriana se uniese.

La inserción de Tir en la membrana genera un cambio conformacional en esta molécula, exponiendo el carboxilo terminal el cual es fosforilado en el residuo 474 de tirosina (Y₄₇₄). La fosforilación de este residuo permite que se una la proteína Nck, (Non-catalytic tyrosine kinase) y esta recluta a N-WASP (neural Wiskott-Aldrich-syndrome protein), que a su vez recluta y activa al complejo Ap2/3, que es una maquinaria molecular que induce la formación de filamentos actina. Por medio de este mecanismo se forman polímeros de actina por debajo del sitio de infección, dando lugar a la formación de un pedestal y la desorganización de las vellosidades (Campellone y Leong, 2003; Lai *et al.*, 2013).

1.7. Sistema de Secreción Tipo III

La formación de la lesión de A/E se debe a la expresión de un Sistema de Secreción Tipo III (T3SS) y la translocación de proteínas a las células eucariontes, a través de éste, las cuales se denominan efectores y actúan sobre diferentes vías de señalización de la célula, como por ejemplo del citoesqueleto, de la respuesta inmune innata y de muerte celular (Santos y Finlay, 2015).

El T3SS, también llamado inyectisoma, es producido por diversas bacterias patógenas, es un complejo tipo aguja, por el cual se translocan proteínas desde el interior de la bacteria hasta el interior de la célula eucarionte (Figura 4). El T3SS está constituido por tres regiones principales, 1) el cuerpo basal, formado por tres anillos que conectan la membrana interna y la membrana externa, 2) el filamento, una estructura extracelular que funciona como adaptador entre el cuerpo basal y la estructura tipo aguja y 3) la estructura tipo aguja un filamento hueco que permite el paso de las proteínas a través de éste, el cual en su punta tiene proteínas que se embeben en la membrana de la células eucariontes (Burkinshaw y Strynadka, 2014). Las proteínas que conforman la estructura basal del inyectosoma son denominadas Esc (EPEC secretion-system components), mientras que las proteínas que componen el filamento son denominadas Esp (EPEC secreted proteins) (Kaper, 1998).

En el cuerpo basal, que es una estructura en forma de anillo que se encuentra en la membrana interna de la célula eucarionte, está constituida por varias proteínas (EscR, EscS, EscT, EscU y EscV), mientras que el anillo que se encuentra anclado a la membrana externa está constituido exclusivamente por la proteína EscC. Estos dos anillos están conectados por otros dos anillos concéntricos conformados por las proteínas EscJ y EscI. Una vez que se ha formado el cuerpo basal, la proteína EscF se transloca a través de estos anillos formandose un primer filamento hueco, al cual se une posteriormente EspA lo que alarga el primer filamento. Por último se translocan a través de este filamento las proteínas EspB y EspD, las cuales constituyen el ápice de esta estructura, ambas proteínas tienen dominios transmembranales que les permite anclarse a la membrana (Figura 4). Todas las proteínas que constituyen este sistema así como los efectores se translocan debido a la acción de una ATPasa que se encuentra en la base del inyectisoma (Gaytán *et al.*, 2016).

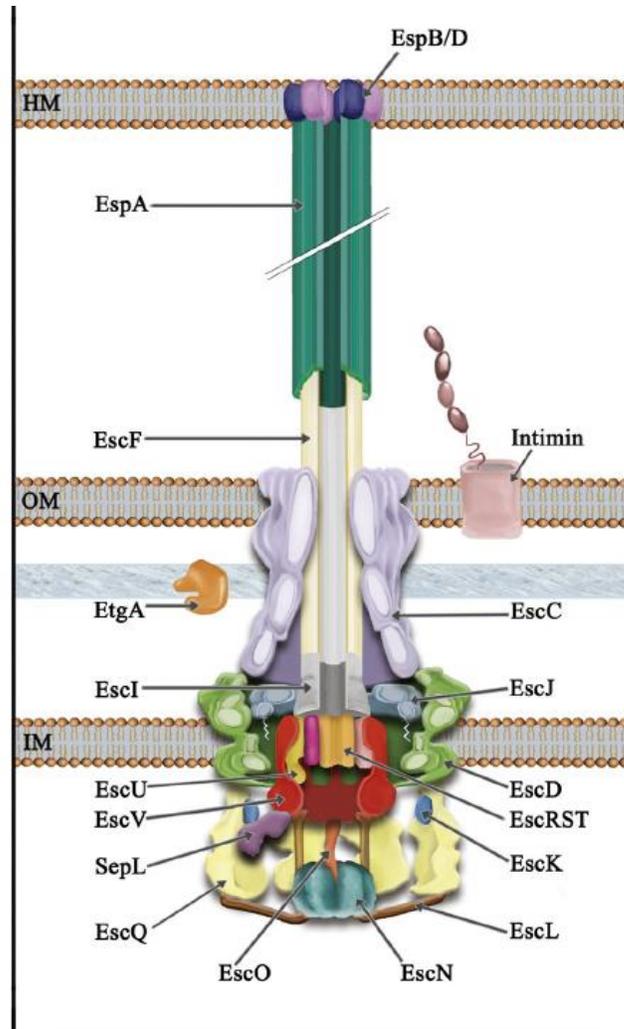


Figura 4. Esquema del T3SS de EPEC (Gaytán *et al.*, 2016). El T3SS es un complejo macromolecular con forma de aguja compuesto proteínas que atraviesan la membrana interna y externa mediante una estructura que atraviesa el espacio periplásmico. Además de un filamento o aguja que contiene en su punta proteínas capaces de unirse a la membrana de la célula eucarionte.

1.8. La isla de patogenicidad LEE

En todas las bacterias capaces de producir la lesión A/E, el T3SS se encuentra codificado en una isla de patogenicidad denominada LEE (Locus of Enterocyte Effacement). Las islas de patogenicidad son grupos de genes que codifican para factores de patogenicidad, que se han incorporado al genoma de una bacteria y cuyo contenido de GC (Guanina-Citosina) difiere del resto del genoma, estas islas son adquiridas por las bacterias por medio de mecanismos de transferencia horizontal (Hacker y Kaper,

2000). La isla LEE tiene un tamaño de 35.6 kb y está constituida de 41 genes, los cuales están organizados en 7 operones (LEE1-LEE7) (Jarvis *et al.*, 1995; Gaytán *et al.*, 2016) (Figura 5).

Además del T3SS, en esta isla también se encuentra codificada la proteína intimina, que participa en la unión íntima entre la bacteria y el enterocito, así como su receptor Tir el cual es translocado a la célula eucariota. Además en LEE también se encuentran otros 7 genes que codifican para proteínas efectoras, las cuales tienen diferentes funciones sobre el enterocito (Gaytán *et al.*, 2016).

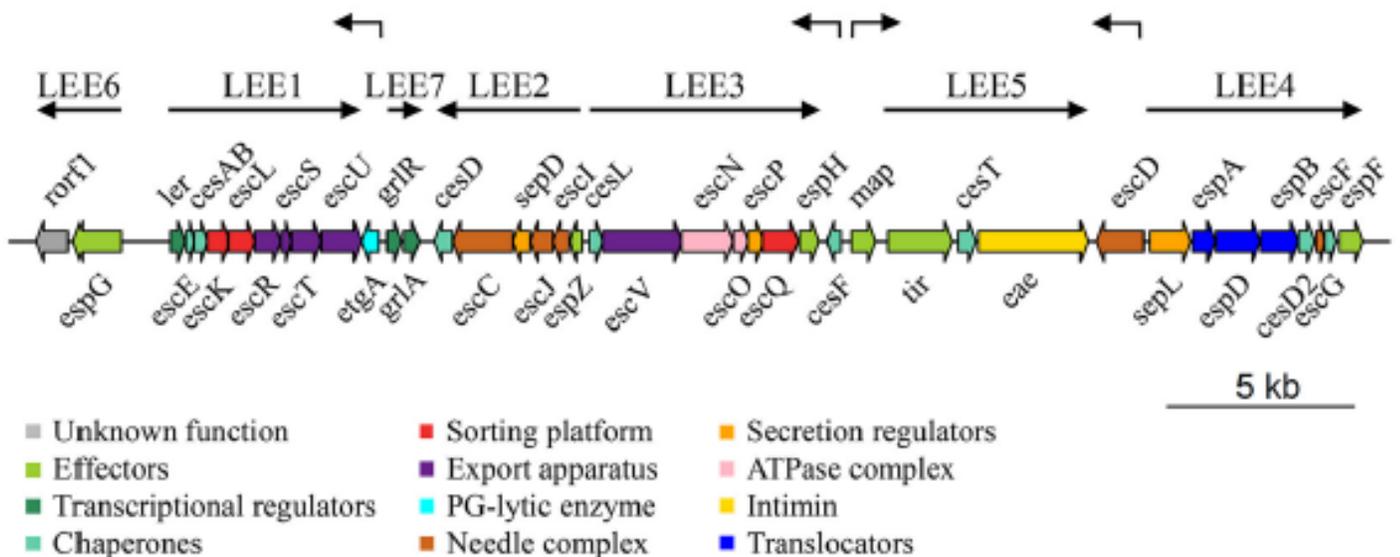


Figura 5. Organización de la Isla LEE (Gaytán *et al.*, 2016). La isla LEE contiene los genes necesarios para la formación del T3SS así como los genes que codifican 6 efectores y 3 reguladores transcripcionales. Esta isla está compuesta por 41 genes organizados en 7 operones.

1.9. Efectores asociados al sistema de secreción tipo III

1.9.1. Efectores codificados en LEE

Tir (Translocated intimin receptor)

La proteína Tir promueve el reclutamiento de actina e inhibe las vías de señalización involucradas en la translocación del factor de transcripción NFκB, el cual tiene funciones importantes sobre la respuesta inmune innata, puesto que regula la transcripción de varias citocinas, quimiocinas y péptidos antimicrobianos del hospedero (Zhang *et al.*, 2017).

Map (mitochondrial-associated protein)

Es un efector cuyo extremo amino terminal se une a la membrana mitocondrial lo cual resulta en su desestabilización ya que disminuye el potencial de membrana provocando la salida del citocromo C y activando la vía de las caspasas, lo que lleva a la célula a apoptosis (Santos y Finlay, 2015). Además contiene un motivo WxxxE, que es un GEF (Guanine Nucleotide xchange factor), que activa tanto a la Rho GTPasa como al Cdc42 el cual recluta a la proteína N-WASP hacia la membrana celular, lo que resulta en la formación de filopodios; esta actividad de Map solo se observa en las etapas tempranas de la infección por las bacterias A/E (Kenny *et al.*, 2002; Alto *et al.*, 2006; Huang *et al.*, 2009). Además Map también participa en la desestabilización de las uniones estrechas mediante su interacción con la miosina II (Singh *et al.*, 2018).

EspF (EPEC secreted protein F)

EspF es un efector que puede estar sobre la membrana mitocondrial como en el citoplasma de las células eucariontes. La unión de EspF a la membrana mitocondrial induce su permeabilización, causando la salida del citocromo C y activando las vías de apoptosis (Kenny y Jepson, 2000; Nougayrède y Sonnenberg, 2004). EspF también participa en la desestabilización de las uniones estrechas mediante la interacción con ZO-1 (Zhang *et al.*, 2010).

EspG (EPEC secreted protein G)

EspG es una proteína que despolimeriza sobre los microtúbulos, desestabilizando la estructura del citoesqueleto (Elliott *et al.*, 2001) y la homeóstasis de las uniones estrechas (Glutfelty *et al.*, 2014).

En EPEC se ha descrito un homólogo de EspG, denominado EspG2, cuyo gen no está codificado en LEE, que tiene la misma función que EspG (Elliott *et al.*, 2001).

EspH (EPEC secreted protein H)

EspH es tal vez el efector de LEE menos estudiado. Se ha descrito que la EPEC mutante en EspH produce pedestales más pequeños comparados con células infectadas con la cepa silvestre y por lo que se ha sugerido que EspH participa en la estabilidad del pedestal (Wong *et al.*, 2012). Por otro lado la sobreexpresión de EspH en células eucariotas induce la formación de filopodios (Wong *et al.*, 2012).

EspZ (EPEC secreted protein Z)

Se ha descrito que cuando EspZ interacciona con la proteína transmembranal CD98 estimula la vía de señalización de β 1-integrina/FAK, la cual regula la homeostasis de las uniones intracelulares implicada en la supervivencia de la célula (Zhang *et al.*, 2017). EspZ también estabiliza el potencial de la membrana mitocondrial, a través Tim17b, evitando la salida del citocromo C (Ramamurthy *et al.*, 2018). Por otro lado se ha sugerido que el complejo constituido por EspZ y EspD regula la translocación de efectores de la bacteria a la célula.

EspB (EPEC secreted protein B)

EspB, es un componente del T3SS, también se une al dominio motor de las miosinas, lo que impide la movilización del citoesqueleto afectando principalmente la fagocitosis celular (Iizumi *et al.*, 2007).

1.9.2. Efectores no codificados en LEE

Existen varios efectores que no están codificados en LEE, por lo que a la mayoría de estas proteínas se les ha dado la nomenclatura 'Nle' (non-LEE encoded effector), pero también a algunos de estos efectores se les ha dado con la nomenclatura de 'Esp' (EPEC secreted protein), como a los efectores codificados en LEE. La mayoría de estas proteínas tienen como blanco principalmente dos vías de señalización celular: la inhibición de la respuesta inmune innata y la muerte celular (Santos y Finlay, 2015). Se ha observado en diferentes bacterias A/E, que éstos efectores se encuentran codificados generalmente en islas de patogenicidad. Sin embargo, se ha reportado que son pocas las islas comunes entre EPEC E2348/69, EHEC EDL933 y EHEC Sakai, lo que concuerda con la gran variabilidad de efectores entre cepas de EPEC (Hayashi *et al.*, 2001; Tobe *et al.*, 2006; Iguchi *et al.*, 2009; Ooka *et al.*, 2015; Ingle *et al.*, 2016).

Hasta el momento una de las pocas islas de patogenicidad asociadas con cepas de EPECa aisladas de niños con diarrea es la isla O122 PAI de EHEC EDL933 denominada IE6 en EPEC E2348/69, la cual contiene los genes para los efectores LifA/Efa1, NleB, NleE, EspL2, también llamado SenB o Set, (Afset *et al.*, 2006; Vieira *et al.*, 2010). En particular el gen en *lifA/efa1* se ha identificado más frecuentemente en aislados de EPEC de niños con diarrea (Mercado *et al.*, 2016), así como también la presencia de este gen se ha asociado con cargas bacterianas altas de EPEC en pacientes con diarrea (Slinger *et al.*, 2017).

Las funciones de los efectores no codificados en LEE que se conocen hasta el momento, se describen en la Tabla 4, pero aún falta por caracterizar la función de varias de estas moléculas.

Tabla 4. Características de los efectores no codificados en LEE. Se ha demostrado que los efectores no codificados en LEE tienen diferentes blancos dentro de la célula hospedera.

Efectores		Función	Mecanismo		Referencias	
Cif	Cycle inhibiting factor	Desaminasa	Arresta el ciclo celular	Desamina el residuo Gln40 de la molécula NEDD8, la cual participa en la activación del ciclo celular	Morikawa <i>et al.</i> , 2010, Samba-Louka 2009, Samba-Louka 2008, Marchés <i>et al.</i> , 2003	
			Inhibe la actividad de la perforina-2 (formadora de poros en bacterias)			McCormack <i>et al.</i> , 2015.
EspJ	EPEC secreted protein J	Adenosín-difosfato (ADP) ribosiltransferasa	Inhibe la opsonofagocitosis vía FcγRIIa	Ribosila y añade un grupo amino a la cinasa Scr	Young <i>et al.</i> , 2014	
			FcR and C3			
NleH1	Non-LEE encoded effector H1	Contiene un dominio de cinasa	Inhibe la expresión dependiente de NFκB	Inhibe la expresión dependiente de NFκB	Won <i>et al.</i> , 2011	
			Inhibe la activación de las vías de apoptosis.			Se une a las proteínas ERK 1/2 y p38.
NleH2	Non-LEE encoded effector H2	Contiene un dominio de cinasa	Inhibe la expresión dependiente de NFκB	Inhibe la expresión dependiente de NFκB	Won <i>et al.</i> , 2011	
			Inhibe la activación de las vías de apoptosis.			Se une a las proteínas caspasa 3 y p38.
NleA	Non-LEE encoded effector A	Sin un dominio particular descrito	Inhibición de proteínas del Retículo endoplásmico al aparato de Golgi	Se unen a las proteínas Sec24 que conforman el complejo de proteínas vesiculares, a cargo del transporte		
			Inhibición de la activación del inflammasoma tipo NLRP3	Se une a la proteína NLRP3 e impide la interacción con la proteína ASC.		Yen <i>et al.</i> , 2015
			Inhibe la activación de las vías de la apoptosis.	Inhibe las caspasas 4, 8 y 9		Blasche <i>et al.</i> 2013

Efectores		Función	Mecanismo	Referencias	
NleB	Non-LEE encoded effector B	Glicosiltransferasa	Inhíbe la activación de NFκB en respuesta a un estímulo de TNF	Glicosila un residuo de arginina de la proteína FADD, que activa vías de inflamación y muerte celular	Pearson <i>et al.</i> , 2013
			Inhíbe la activación de las vías de la apoptosis.		Pollack <i>et al.</i> , 2017
EspL	EPEC secreted protein L	Cisteína-proteasa	Inhíbe la activación de la necroptosis y vías de inflamación	Corta los motivos RHIM, que participan en las vías de activación de necroptosis y vías de inflamación	Pearson <i>et al.</i> , 2017
NleC	Non-LEE encoded effector C	Zinc metaloproteasa	Inhíben la activación de la vía de translocación de NFκB	Inactiva la subunidad p65 de NFκB	Hodgson <i>et al.</i> , 2015
NleD	Non-LEE encoded effector D	Zinc metaloproteasa	Inhíbe la activación de las vías de la apoptosis.	Se une a las proteínas ERK 1/2 y p38.	Creuzburg <i>et al.</i> 2016
LifA/Efa1	(lymphocyte inhibitory factor A/ EHEC factor	Linfotastina	Inhíbe la proliferación de los linfocitos.	No se conoce el mecanismo	Klapproth <i>et al.</i> , 2000
	Adherence		Contribuye a la adherencia a las células epiteliales	No se conoce el mecanismo	Badea <i>et al.</i> , 2003
EspM	EPEC secreted protein M	Dominio WxxxE	Formación de fibras de estrés y desprendimiento celular	Activa las RhoA GTPasas	Orchard <i>et al.</i> , 2011
EspW	EPEC secreted protein M	sin un dominio particular descrito	Remodelación de actina	Aunque no se conoce el mecanismo, se sabe que es dependiente de Rac-1	Sandu <i>et al.</i> , 2017

1.10. Toxinas asociadas a las cepas patógenas de *E. coli* diarreogénicas.

Se describen en la tabla 5 varias de las toxinas que se han identificado hasta el momento en cepas de PED. Una familia de las toxinas ampliamente distribuidas en los PEDs son las proteínas conocidas como SPATES (Serine Protease Autotransporters of Enterobacteriaceae) y se ha propuesto que varias de estas toxinas pueden contribuir al desarrollo y persistencia de la infección. Hasta el momento se

han descrito varias toxinas en EPEC incluyendo SPATES (Tabla 5) sin embargo, parecen no ser más prevalentes estas toxinas su en cepas aisladas de niños con diarrea que en asintomáticos y tampoco se han asociado con la severidad del cuadro clínico. Pet que es una SPATES que degrada fodrina, una proteína del citoesqueleto, es una de las toxinas más prevalentes en EPEC (Dautin, 2010), así como CDT(Citolethal Distending Toxin), la cual tiene función de DNasa, induce arresto del ciclo celular y por ende la muerte de las células (Marques *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2009; Patzi-Vargas *et al.*, 2015; Fa??s *et al.*, 2016; Meza-Segura, 2017).

Tabla 5. Toxinas asociadas a las cepas patógenas de *E. coli* diarreogénicas. A continuación se muestran una serie de toxinas que han sido identificadas previamente en distintos patotipos de *E. coli*.(Dautin, 2010; Fa??s *et al.*, 2016; Hews *et al.*, 2017).

Toxina	Gen	Función
Pet. Plasmid encoded toxin	<i>pet</i>	Induce la contracción del citoesqueleto, pérdida de actina.
Pic. Protein Involved in Colonization	<i>pic</i>	Actividad de mucinasa. Hipersecreción de moco.
Sat. Secreted Autotransporter Toxin	<i>satA</i>	Tiene actividad enterotoxigénica. Puede degradar mucina y hemoglobina.
EAST-1 Escherichia coli (EAEC) heat-stable toxin 1	<i>astA</i>	Es similar a la toxina ST de ETEC y puede actuar en forma sinérgica con ésta.
SepA. Shigella extracellular proteinA sepA	<i>sepA</i>	Se ha demostrado que las cepas mutadas en sepa reduce la acumulación de fluidos, la inflamación del tejido y la atrofia de la mucosa en un modelo de conejo.
SigA. Situated on the she pathogenicity island of Shigella flexneri2a	<i>sigA</i>	Degrada fodrina, efecto citopático en células HEp-2
Hemolisinas	<i>hlyA</i> , <i>hlyE</i>	Forman poros en la membrana de las células eucariontes.
Cdt. Cytolethal Distending Toxin	<i>cdt</i>	Tiene actividad de DNasa que lleva a la distensión del núcleo, al arresto celular irreversible y a apoptosis.
Vat. Vacuolating Autotransporter Protein	<i>vat</i>	Toxina vacuolizante.
StcE	<i>stcE</i>	Metaloproteasa que puede degradar MUC2 y complemento en Intestino

2. JUSTIFICACIÓN

EPEC continúa siendo un agente patógeno causante de diarrea en niños menores de 5 años, en el mundo como en México. La principal característica de patogenicidad de EPEC es su capacidad de inducir la lesión de A/E en el intestino de humanos y animales. La identificación de cepas de EPECa en años recientes en casos de diarrea como en sujetos sanos sugiere que la identificación de efectores codificados en LEE no es suficiente para distinguir entre cepas patógenas de EPEC capaces de producir diarrea y de cepas de EPECa no patógenas. Por lo que la reciente identificación y caracterización de varios de los efectores no codificados en la Isla LEE, los cuales tienen diversas funciones como la evasión de la respuesta inmune innata así como inhibir apoptosis, puedan tal vez ayudarnos a identificar cepas patógenas de EPECa. También será importante ver si estos factores no codificados en LEE están asociados con características de los cuadros clínicos de los pacientes con diarrea producida por EPECa. Por lo que es necesario realizar análisis genómicos de cepas de EPEC aisladas tanto de niños con diarrea como de niños asintomáticos, para identificar genotipos asociados con cepas patógenas.

3. HIPÓTESIS

Las cepas de EPEC aisladas de niños con diarrea tienen genotipos diferentes a los de las cepas de EPEC aisladas de niños asintomáticos, y la severidad del cuadro clínico se asocia con factores de patogenicidad específicos.

4. OBJETIVO GENERAL

Caracterizar el fenotipo y genotipo de los aislados de EPEC de casos de diarrea aguda y de sujetos asintomáticos y correlacionarlos con el cuadro clínico.

5. OBJETIVOS PARTICULARES

- Secuenciación masiva y análisis bioinformático de los genomas de cepas de EPEC provenientes de niños con diarrea y asintomáticos.
- Caracterización genotípica de las cepas de EPEC aisladas de niños con diarrea y sin diarrea, utilizando PCR de punto final.
- Caracterización fenotípica de las cepas obtenidas de niños con diarrea y sin diarrea.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1. Selección de cepas de EPEC para secuenciación masiva

Se seleccionaron cepas de EPEC de niños con diarrea y asintomáticos, que requirieron hospitalización de un estudio de búsqueda intencional de patógenos asociados a diarrea y biomarcadores, previamente realizado en el laboratorio en un hospital de tercer nivel en Mérida, Yucatán, (DeBerg *et al.*, 2018). La búsqueda de patógenos intestinales en el estudio mencionado, incluyó bacterias: *Salmonella*, *Shigella*, *Campylobacter jejuni*, *Vibrio cholerae* y patotipos de *Escherichia coli*, así como parásitos y virus. Cuando fue identificado solo uno de los patógenos buscados, se definió que la infección fue por patógeno único.

6.2. Extracción de DNA bacteriano.

Las cepas fueron sembradas en agar McConkey, después de 18 horas se tomó media colonia y se creció en caldo Luria-Bertani (LB) a 37°C durante toda la noche. Estos cultivos se vaciaron en tubos cónicos de 15mL y se centrifugaron. Se desechó el sobrenadante y cada una de las pastillas bacterianas que se formaron en el fondo del tubo se resuspendieron en 5 mL de solución PBS (Solución de amortiguador de fosfatos), y se hicieron dos lavados más con PBS. Posteriormente, se retiró con una pipeta el PBS y la pastilla celular se resuspendió en 400 µL de amortiguador de lisis, esta suspensión se transfirió a un tubo de 1.5 mL, se agregaron 4 µL de proteinasa K (200mg/mL) y se incubó toda la noche a 42°C. Se adicionaron 8 µL de RNAsa (20µ/mL) y se incubó a 37°C por 1 hora. A continuación, se agregó un volumen igual (400 µL) de una solución de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (en las siguientes proporciones 25:25:1) y se agitó manualmente. Se centrifugaron los tubos (14,000 rpm/10 min), se obtuvo la fase acuosa, a la cual se le añadieron dos volúmenes de una solución de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1). Las muestras se centrifugaron nuevamente (14,000 rpm/10 min), y nuevamente se obtuvo la fase acuosa, a la que se le agregó acetato de sodio, a la concentración final de 0.3M, después se añadieron dos volúmenes de etanol absoluto frío (grado biología molecular). Las muestras se incubaron por 15 minutos a temperatura ambiente y se centrifugaron a 2000 rpm durante 10 minutos. Finalmente se retiró el sobrenadante, y lavamos la pastilla que se forma al fondo del tubo con alcohol al 70% dos veces, la cual se dejó secar y se resuspendió en 200µL de agua inyectable.

6.3. Secuenciación y ensamble de genomas.

La calidad y la concentración del DNA fue determinada por espectrometría utilizando un NanoDrop™ 2000/c. Además, se corrió un gel de agarosa al 1% para observar la integridad del DNA. Las librerías y la secuenciación genómica del DNA de las cepas de EPEC, se realizó en la Unidad de Secuenciación Masiva y Bioinformática, del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México (IBT-UNAM), utilizando la plataforma de Illumina, y se generaron lecturas pareadas (end-paired reads) de 250 pb. Las lecturas se limpiaron(trimming) utilizando el software TrimGalore v0.4.1. Los genomas fueron ensamblados “de novo”, utilizando tres ensambladores: SPAdes, ABBYS y VELVET. La calidad de los ensambles se evaluó utilizando FASTQC. Los contigs pre-ensamblados fueron llevados a “scaffolds” utilizando SSPACE_Standard_v3.0.pl y los espacios (gaps) fueron cerrados con GapFiller_v1-10.

6.4. Análisis Bioinformático

Una vez que se obtuvieron ensambles de calidad para cada uno de los genomas, se llevaron a cabo diferentes análisis bioinformáticos con un enfoque de búsqueda de factores y características asociadas a la patogenicidad.

6.4.1. Análisis filogenético

El análisis filogenético se realizó en colaboración con el Dr. Alfonso Méndez Tenorio del Laboratorio Biotecnología y Bioinformática Genómica en el Departamento de Bioquímica de la ENCB del IPN. Utilizamos

el software VAMPhyRE (Virtual Analysis Method for Phylogenomic fingeRprint Estimation), el cual fue desarrollado en el laboratorio del Dr. Méndez Tenorio, y es una herramienta que nos permite hacer comparaciones filogenéticas basadas en huellas genómicas que son calculadas mediante la hibridación *in silico* de pequeñas sondas en las secuencias genómicas, al patrón de sitios de hibridación en el genoma blanco es llamado Virtual Genomic Fingerprint (VGF). Los VGF de los genomas sirven para estimar la similitud entre pares de genomas, calculando la distancia entre los genomas, con esta información se genera una tabla de distancias que es utilizada para crear un árbol filogenético (Jaimes-Díaz *et al.*, 2011; Muñoz-Ramírez *et al.*, 2017a).

Dos conjuntos de sondas fueron utilizados para este trabajo, el primero es un grupo de sondas diseñadas para genomas completos de bacterias, mientras que el segundo grupo de sondas es utilizado para secuencias más cortas, por ejemplo, Islas de patogenicidad, y que nosotros utilizamos para generar un árbol filogenético basado en la Isla de patogenicidad LEE.

6.4.2. Búsqueda *in silico* de factores de patogenicidad

La búsqueda de genes asociados a la patogenicidad de las cepas secuencias de EPEC, se hizo utilizando dos métodos diferentes. El primero, la anotación de genomas contra una base de datos específica de factores de virulencia, para el cual se traducen los genes a proteínas, para después hacer un alineamiento contra las secuencias contenidas en esta base de datos. El segundo método, fue utilizar un buscador de genes de patogenicidad en línea, VirulenceFinder, el cual hace un alineamiento, utilizando las secuencias de genes sin traducir, contra una base de datos propia.

6.4.2.1. Anotación de genomas de EPEC con la base de datos VFDB (Virulence Factor DataBase)

Los genomas fueron anotados utilizando la base de datos VFDB. Esta base está integrada por factores de virulencia de 24 géneros de diferentes bacterias patógenas que incluyen tanto factores de virulencia que han sido validados experimentalmente, como algunos que han sido predichos con base en su homología e identidad con los de otras bacterias. Los diferentes factores de virulencia incluidos en esta base de datos están organizados en las siguientes categorías:

- Moléculas de Adhesión e invasión
- Estructuras bacterianas: Pili y Fimbrias
- Proteínas monoméricas
- Sistemas de secreción y efectores
- Toxinas
- Sistemas de adquisición de hierro

6.4.2.2. Búsqueda de genes de patogenicidad

Se utilizó la herramienta VirulenceFinder (www.genomicepidemiology.org), para la detección de genes asociados a la patogenicidad de *Escherichia coli* específicamente, la cual cuenta con una base de datos de 927 genes asociados con su patogenicidad, incluyendo homólogos del mismo gene. Esta búsqueda fue realizada desde un servidor en línea (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/VirulenceFinder/>).

6.4.2.3. Predicción de Islas de Patogenicidad

Con el fin de identificar posibles islas de patogenicidad que estuvieran integradas por efectores translocados por el Sistema de Secreción Tipo III (T3SS), se utilizó el programa IslandViewer4 (Dhillon *et al.*, 2015), el cual utiliza tres métodos diferentes para predecir Islas Genómicas, que son grupos de genes que tienen un CG% diferente al resto del genoma. Los métodos SIGI-HMM e IslandPath-DIMOB se basan en la predicción de Islas mediante la composición de secuencias, mientras que el método de Islander hace la predicción mediante la comparación con un genoma de referencia. Los resultados se obtienen en un formato compatible con Excel. Se seleccionaron las posibles islas de patogenicidad que contuvieran al menos una secuencia anotada como un efector translocado por el T3SS. Este programa requiere que las secuencias estén en el formato GenBank, el cual fue obtenido anotando los genomas con el software PROKKA (Seemann, 2014).

6.4.2.4. Identificación de Sistemas de Secreción tipo VI (T6SS)

Para identificar grupos de genes que estuvieran probablemente codificando algún T6SS funcional se utilizó el software TXSSCAN (Abby y Rocha, 2017). El T6SS específico se identificó haciendo diferentes alineamientos en BLAST contra la base de datos SecreT6 (<http://db-mml.sjtu.edu.cn/SecReT6/>).

Esta base de datos está integrada por grupos de genes que codifican para diferentes T6SS incluyendo aquellos que han sido comprobados experimentalmente como los que han sido predichos con base en la identidad de sus proteínas y los arreglos genómicos que se han previamente descrito.

6.4.2.5. Predicción de Resistencia a antibióticos

Para identificar de los genes asociados a la resistencia a antibióticos en estas cepas de EPEC se utilizó el programa, KmerResistance, el cual se encuentra disponible en un servidor en línea (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/KmerResistance>). Este método parece ser bastante robusto ya que se obtienen pocos falsos positivos y negativos (Clausen *et al.*, 2016).

6.5. Determinación de la susceptibilidad antimicrobiana.

Se determinó utilizando un equipo basado en espectrometría de masas MALDI-TOF (VITEK MS MALDI-TOF, Biomeriux), con la tarjeta para determinar la susceptibilidad para bacterias gram-negativas AST-GN70.

6.5.1. Metodología para determinar el perfil de antibióticos

Se sembraron las cepas de EPEC por estría cruzada en agar MacConkey y se incubaron a 37°C durante 18 a 24 h, para corroborar pureza del cultivo. 2.- Una vez que observamos una sola morfología colonial, se seleccionó una colonia aislada y se sembró en 1 mL de caldo Luria, los tubos se incubarán a 37°C durante 18 a 24 h. Del cultivo se tomaron 50 µL para hacer PCR y corroborar que las cepas seguían conservando los genes de patogenicidad que las caracterizaban como EPEC. Después del corroborar la presencia de los genes de patogenicidad de EPEC en las bacterias crecidas en el cultivo; se tomó una asada de este y se resembró por estría cruzada en agar soya tripticaseina, de donde se seleccionaron colonias aisladas para preparar la suspensión bacteriana que se usó para llenar las tarjetas AST-GN70 de bioMérieux^{MR}.

La suspensión bacteriana se preparó transfiriendo con asa estéril, a partir del cultivo puro de 24 h en agar soya tripticaseina, una cantidad suficiente de colonias aisladas a un tubo de ensayo de poliestireno claro de 12x75 mm que contenía 3 mL de solución salina estéril al 0.45%- 0.5%, pH 4.5-7.0; hasta ajustar la turbidez a 0.50-0.63 unidades de la escala de McFarland con el densitómetro DensiChekTM (el cual viene incluido con el equipo VITEK[®] 2 Compact), previamente calibrado con el set de calibradores incluidos en el equipo. Los tubos de ensayo que contienen la suspensión bacteriana se colocaron dentro de la gradilla especial (cassette), y la tarjeta de identificación se colocó en la ranura cercana, insertando el tubo de transferencia dentro del tubo con la suspensión correspondiente. El

cassette con las muestras se colocó en el sistema VITEK® 2 Compact. Una vez dentro del equipo, las muestras se sometieron a los siguientes procesos de forma automática:

6.5.2. Inoculación

Las muestras son transportadas a una cámara en la que se aplica vacío y en seguida se reintroduce nuevamente el aire, esta acción hace que la suspensión bacteriana pase a través del tubo de transferencia hacia los microcanales que llenan todos los pozos.

6.5.3. Sellado e incubación de las tarjetas.

Las tarjetas inoculadas pasan por un mecanismo que corta los tubos de transferencia y las sella, previo a la carga dentro del carrusel-incubador. Todos los tipos de tarjetas se incuban en línea a $35.5 \pm 1.0^\circ \text{C}$.

6.5.4. Lectura de las reacciones.

Cada tarjeta es removida del carrusel-incubador cada 15 min, transportada al sistema óptico de transmitancia el cual usa diferentes longitudes de onda del espectro visible para interpretar la turbidez o el color de los productos metabólicos, y es devuelta a su sitio en el carrusel hasta el siguiente tiempo de lectura. Los datos son registrados a intervalos de 15 min durante el periodo de incubación total.

6.6. Identificación de genes de patogenicidad en cepas de EPEC de niños con diarrea y asintomáticos por medio de PCR.

6.6.1. Selección de cepas de EPEC para búsqueda de genes de patogenicidad

Para este análisis se seleccionaron las cepas de EPEC de niños con diarrea que requirieron hospitalización, de dos estudios realizados en el laboratorio previamente, uno en la ciudad de México (Cerna-Cortés, 2001) así como del estudio de biomarcadores . Las cepas de niños asintomáticos fueron seleccionadas del estudio de biomarcadores , y de un estudio previo de búsqueda intencionada de patógenos en diarrea de comunidad , llevado a cabo en el Estado de México (Moran-García, 2013) (Tabla 6) .

La identificación de las cepas de EPEC se realizó utilizando las condiciones de la PCR multiplex previamente reportados por López-Saucedo (López-Saucedo *et al.*, 2003), y utilizando solo los pares de iniciadores que son relevantes para la identificación de EPEC.

Tabla 6. Cepas seleccionadas para la búsqueda de genes de patogenicidad de por PCR. Las cepas fueron seleccionadas de tres diferentes estudios llevados a cabo previamente por nuestro grupo de trabajo. Se seleccionaron 27 cepas de niños con diarrea y 38 de niños asintomáticos.

	D.F.	YUCATÁN	LA MAGDALENA ATLICPAC	TOTAL
	IMSS	HOSPITAL O'HORAN	Comunidad	
	1998-2001	2007 – 2011	2001	
	(N=5)	(N=29)	(N=33)	
Niños con diarrea	5	22	0	27
Niños con infección asintomática	0	6	32	38

6.6.2. Iniciadores utilizados para la búsqueda de genes de patogenicidad por PCR.

Los genes de patogenicidad de las cepas de EPEC se detectaron utilizando diferentes reacciones de PCR. La PCR a la que corresponden los genes, las secuencias de los iniciadores y el tamaño del amplicón se describen en las tablas 7 y 8.

Tabla 7. Iniciadores previamente utilizados en otros estudios en nuestro grupo de trabajo.

Multiplex	Gene	Secuencias de los iniciadores (5' a 3')	Tamaño del Amplicón (bp)	Referencia
EPEC	<i>eaeA</i>	F: GAC CCG GCA CAA GCA TAA GC R: CCA CCT GCA ACA AGA GG	384	Paton AW <i>et al.</i> , 1998
	<i>bfpA</i>	F: AAT GGT GCT TGC GCT TGC R: GCC GCT TTA TCC AAC CTG GTA	324	Gunzburg ST <i>et al.</i> , 1995
Toxinas	<i>subAB</i>	F: ATT AAC TCC AAC ATT CAG G R: TTC TCA CAG AAA GAT GAC G	556	Paton AW <i>et al.</i> , 2005
	<i>pet</i>	F: AGA CCT GAT TTA CCT G R: GGA TTC ATT CTA ATA CCA AC	300	Restieri C <i>et al.</i> , 2007
	<i>cdt</i>	F: GAA TTT CCG TCA CTA ACA GC R: CAC GAT GAA CCT GAA TGT	467	Tóth I <i>et al.</i> , 2003
	<i>astA</i>	F: AAT AGT GTG TCT GGC TTT AAT R: CGA TCT GGT AAA TAT GGT GTC	106	Moon JY <i>et al.</i> , 2005
SPATES	<i>pic</i>	F: ACT GGA TCT TAA GGC TCA GGA T R: GAC TTA ATG TCA CTG TTC AGC G	556	Paton AW <i>et al.</i> , 2005
	<i>sat</i>	F: TCA GAA GCT CAG CGA ATC ATT G R: CCA TTA TCA CCA GTA AAA CGC ACC	300	Restieri C <i>et al.</i> , 2007
	<i>sepA</i>	F: TTT ACT GAC AGG AGT GAC GGA R: CTG TTG TAG AAA TTA CGG GTG AG	467	Tóth I <i>et al.</i> , 2003
	<i>sigA</i>	F: CCG ACT TCT CAC TTT CTC CCG R: CCAT CCA GCT GCA TAG TGT TTG	106	Moon JY <i>et al.</i> , 2005
ISLA O122/IE6	<i>nleB</i>	F: GAA TAC CAA GAA CAT CCG T R: TCA ATC AAA GAA CAT CCG T	326	Meza-Segura M, 2017
	<i>nleE</i>	F: TAT ATC CGG TAA CCA GAG R: TGT AGC TAA GAT TTC TCC C	475	Meza-Segura M, 2017
	<i>espL2</i>	F: ACA TTT CAG ACA TTG TCA C R: TCA GGA AAG ATA GAC TAC GA	386	Meza-Segura M, 2017
	<i>lifA/efa1</i>	F: ATT AAC TCC AAC ATT CAG G	579	Meza-Segura M, 2017

Tabla 8. Iniciadores diseñados en este trabajo. Se muestran las secuencias de los iniciadores que se diseñaron en este trabajo para la búsqueda de genes de efectores asociados a la patogenicidad de EPEC.

	Gene	Secuencias de los iniciadores (5' a 3')	Tamaño del Amplicón (bp)	Referencia
Efectores	<i>nleH1/nleH2</i>	F: AGA CCT GAT TTA CCT G R: GGA TTC ATT CTA ATA CCA AC	278/303	Este trabajo
	<i>espG</i>	F: GAA TTT CCG TCA CTA ACA GC R: CAC GAT GAA CCT GAA TGT	153	Este trabajo
	<i>nleA</i>	F: AAT AGT GTG TCT GGC TTT AAT R: CGA TCT GGT AAA TAT GGT GTC	593/ 677	Este trabajo

6.6.3. Preparación de lisados de cepas de EPEC para PCR

Cada una de las cepas se sembraron por estría cruzada en agar Mac Conkey, se incubaron a 37°C durante 18 h. Se seleccionó una colonia, de la cual se tomó la mitad y se resuspendió en 1 ml de agua Mili Q (desionizada), se homogenizó usando un vórtex y se colocó en agua hirviendo durante 1 minuto y después en hielo. Estos lisados fueron almacenados a -20°C hasta su uso.

6.7. Cultivo de líneas celulares

6.7.1. Características de las líneas celulares utilizadas en este estudio

Se utilizaron dos líneas celulares epiteliales para este trabajo, la primera, HEP-2 fue obtenida originalmente de un paciente con carcinoma epidermoide de laringe, sin embargo, después de varios análisis se determinó que no es posible distinguirla de la línea celular HeLa, la cual proviene de un carcinoma cervical. Por lo que se cree que en algún momento hubo alguna contaminación (<https://www.atcc.org/products/all/CCL-23.aspx#documentation>). También fue utilizada la línea celular Caco-2 C2BBE1, la cual es una clona obtenida por el método de dilución limitante en 1988 de la línea celular Caco-2 HTB-37 proveniente de un carcinoma de colón.

La clona C2BBE1 fue seleccionada por sus características morfológicas, como mayor homogeneidad y que la expresión de la proteína vilina se encuentra exclusivamente localizada en la zona apical. (<https://www.atcc.org/Products/All/CRL-2102.aspx#characteristics>).

6.7.1.1. Manejo de las líneas celulares

Las células Caco-2 fueron crecidas en medio DMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) y 1% de antibiótico-antimicótico (Sigma Cat. A5955) y holotransferrina a una concentración final de 0.01 mg/ml (Sigma Cat. T0665). Y fueron mantenidas a una temperatura de 37°C y 5% de CO₂, hasta alcanzar una confluencia del 90-95%, fueron utilizadas entre los pases 25-39. Para dividir las células se utilizó acutasa (Sigma Cat. A6964) o tripsina (Sigma Cat. 59427C) a una concentración final de 0.25%.

Las células HEp-2 se manejaron de manera similar excepto que fueron crecidas en DMEM suplementado con SFB y antibiótico-antimicótico sin holotransferrina. Estas células fueron utilizadas entre los pases 15-21 y a una confluencia entre el 80-90%.

6.8. FAS (Fluorescent-actin staining)

La técnica de FAS nos permite observar la formación de pedestales, los cuales son característicos de las bacterias que hacen la lesión de A/E. Originalmente estos ensayos se realizan en células HEp-2, sin embargo también se han realizado en células Caco-2, nosotros usamos ambas líneas celulares.

6.8.1. Infección de células HEp-2 con las cepas de EPEC

Las cepas de EPEC se sembraron por estría cruzada en placas de agar MacConkey (BD-Bioxon), las cuales se incubaron a 37°C durante 18-24 horas. Después se seleccionó de la placa media colonia, (la otra mitad se guardó para comprobar la presencia de los genes característicos de EPEC), y se resuspendió en 1 ml de caldo LB. Los cultivos se incubaron por 14 horas (Overnight), sin agitación.

De este cultivo se tomó el volumen necesario para preparar una dilución 1:20 en medio DMEM de alta glucosa (Sigma) y se incubó durante 2.5 horas. Pasado ese tiempo, se tomó la lectura de la Densidad Óptica a 600nm (D.O.₆₀₀) y se calculó el número de bacterias necesarias infectar a las células con una multiplicidad de infección (MOI) de 10 inicialmente. La MOI se ajustó resuspendiendo el volumen necesario de bacterias en DMEM de alta glucosa inicialmente.

Las células HEP-2 se crecieron como se mencionó anteriormente, el medio DMEM suplementado con SFB y antibiótico-antimicótico se reemplazó 3.5 h antes de la infección con DMEM sin suplementar. Una vez que la MOI fue ajustada, este medio fue reemplazado nuevamente con la suspensión de bacterias. Las células infectadas fueron incubadas por 3 horas inicialmente.

Sin embargo, hicimos diversas modificaciones a este protocolo durante este trabajo, las cuales se muestran en la sección de resultados.

6.8.2. Infecciones de células Caco-2 con cepas de EPEC

Las cepas de EPEC se sembraron por estría cruzada en placas de agar MacConkey (BD-Bioxon), las cuales se incubaron a 37°C durante 18-24 horas. Después se seleccionó de la placa media colonia, (la otra mitad se guardó para comprobar la presencia de los genes característicos de EPEC), y se resuspendió en 1 ml de caldo LB. Los cultivos se incubaron por 14 horas (Overnight), sin agitación.

De este cultivo se tomó el volumen necesario para preparar una dilución 1:20 en medio DMEM de alta glucosa (Sigma) y se incubó durante 2.5 horas. Pasado ese tiempo, se tomó la lectura de la Densidad Óptica a 600nm (D.O.₆₀₀) y se calculó el número de bacterias necesarias infectar a las células con una multiplicidad de infección (MOI) de 25. La MOI se ajustó resuspendiendo el volumen necesario de bacterias en DMEM Advanced.

Las células Caco-2 se crecieron como se mencionó anteriormente, el medio DMEM suplementado con SFB y antibiótico-antimicótico se reemplazó 3.5 h antes de la infección con DMEM Advanced sin suplementar.

Una vez que la MOI fue ajustada, este medio fue reemplazado nuevamente con la suspensión de bacterias. Las células infectadas fueron incubadas por 6 horas.

Las condiciones para infecciones en las células Caco-2, fueron determinadas después de una serie de modificaciones necesarias para poder inducir la formación de pedestales que se probaron en las células HEP-2.

6.8.3. Tinción de células para microscopía confocal

Una vez que finalizó el tiempo de infección de las células HEP-2, se eliminaron los sobrenadantes de las células se fijaron con Paraformaldehído (PFA) al 3%, se incubaron durante 3 horas a 37°C.

Las muestras se lavaron 5 veces con Solución amortiguadora de fosfatos (PBS: NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Na₂HPO₄ 8 mM, and KH₂PO₄ 2 mM), las células se permeabilizaron con 0.5 % de Tritón 100x por 45 minutos a 37°C y nuevamente se lavaron tres veces con PBS. Las células fijadas y permeabilizadas se tiñeron con una solución 1:250 de faloidina acoplada a Alexa 488 en PBS, se incubó por 45 minutos a 37°C y se realizan tres lavados con PBS y finalmente con una solución 1:1500 de DAPI en agua desionizada por 10 minutos a temperatura ambiente. Los portaobjetos con las células se lavaron con agua desionizada 5 veces y se dejaron secar a temperatura ambiente para después montarlos sobre portaobjetos utilizando el medio de montaje VECTASHIELD® de Vectorlabs.

Finalmente las muestras se lavaron con agua desionizada 5 veces y se dejaron secar a temperatura ambiente para después montarlas sobre portaobjetos utilizando el medio de montaje VECTASHIELD® de Vectorlabs.

La evaluación de pedestales se evaluó utilizando un microscopio confocal de Leica modelo SP8, y las imágenes obtenidas se analizaron en el software LAS X Life Science de Leica.

6.9. Determinación de producción de citocinas

Las cepas de EPEC se sembraron por estría cruzada en placas de agar MacConkey (BD-Bioxon), las cuales se incubaron a 37°C durante 18-24 horas. Después se seleccionó de la placa media colonia, (la otra mitad se guardó para comprobar la presencia de los genes característicos de EPEC), y se resuspendió en 1 ml de caldo LB. Los cultivos se incubaron por 14 horas (Overnight), sin agitación.

De este cultivo se tomó el volumen necesario para preparar una dilución 1:20 en medio DMEM de alta glucosa (Sigma) y se incubó durante 2.5 horas. Pasado ese tiempo, se tomó la lectura de la Densidad Óptica a 600nm (D.O.₆₀₀) y se calculó el número de bacterias necesarias infectar a las células con una multiplicidad de infección (MOI) de 25. La MOI se ajustó resuspendiendo el volumen necesario de bacterias en DMEM Advanced.

Las células Caco-2 se crecieron como se mencionó anteriormente, el medio DMEM suplementado con SFB y antibiótico-antimicótico se reemplazó 3.5 h antes de la infección con DMEM Advanced sin suplementar.

Una vez que la MOI fue ajustada, este medio fue reemplazado nuevamente con la suspensión de bacterias. Las células infectadas fueron incubadas por 6 horas.

Las condiciones para infecciones en las células Caco-2, fueron determinadas después de una serie de modificaciones necesarias para poder inducir la formación de pedestales que se probaron en las células HEP-2.

Una vez que finalizó el tiempo de infección se obtuvo el sobrenadante de cada pozo, sin tocar las células y se colectaron en tubos de 1.5 ml, los cuales se mantuvieron en hielo. Las muestras se centrifugaron a 5000 rpm x 10 min a 4°C. Se retiraron los sobrenadantes con cuidado de no tocar la pastilla celular que se forma al fondo de tubo, y se hicieron alícuotas de 210 µL, las cuales se mantuvieron congeladas a -70°C hasta el momento de su uso.

Para la determinación de las citocinas se utilizó el kit BD Cytometric Bead Array (CBA) Human Inflammatory Cytokines, el cual identifica seis citocinas: interleucina 8 (IL-8), IL-1β, IL-6, IL-10, IL-12p70e y TNF (Tumor Necrosis Factor).

Se prepara una solución añadiendo volúmenes iguales de las perlas de detección para cada una de las citocinas. En tubos de citometría de flujo se añadieron 12.5 µL de la mezcla de perlas de detección y 200µL del sobrenadante de las células incubadas con las bacterias, por último se añadieron 250µL de la solución de ficoeritrina, esta mezcla se agita suavemente con la mano sin usar vortex. Los tubos se incubaron por 3 horas en la obscuridad, transcurrido ese tiempo, se agregaron 200µL de solución de lavado y se centrifugaron a 200 g x 5 min. Finalmente, se desechó el sobrenadante y las perlas se resuspendieron en 350 µL de la solución de lavado. Las perlas fueron leídas en el citómetro de flujo BD FACSCalibur™ y lo resultado fueron analizados con el software FCAP Array™ Software Version 3.0 de BD Science. Solo se reportaron como positivos aquellas lecturas que estuvieron dentro de los límites de detección del sistema.

7. RESULTADOS

7.1. Selección de cepas de *Escherichia coli* para secuenciación masiva

En total se secuenciaron 20 cepas de EPEC de patógeno único, correspondientes a 20 pacientes así como cuatro cepas de EPEC aisladas de cuatro niños asintomáticos. De las 20 cepas clasificadas como EPEC con base en el gen de intimina corroboramos por análisis genómico que en efecto 19 eran EPEC, mientras que una cepa fue identificada como *E. albertii*; con base en las características genéticas descritas para esta bacteria por Lindsey en 2015 y 2016.

7.2. Características del cuadro clínico de los niños de los cuales se aislaron las cepas de EPEC y *E. albertii*

Como se muestra en la tabla 9, de los 19 niños EPEC positivos se observó que 8 (42%) presentaron un episodio de diarrea cuya duración fue de siete o más días, 11 (57.9%) niños tuvieron más de siete evacuaciones por día, 15 (78.9%) pacientes presentaron y 6 (31.6%) de estos pacientes presentaron deshidratación (Tabla 9).

La cepa de *Escherichia albertii* se aisló de una niña de 2 años, la cual presentó un cuadro de diarrea clasificado como moderado, el episodio de diarrea duró cuatro días, con un máximo de 4 evacuaciones por día, 12 vómitos en 24 horas y presentó deshidratación.

La severidad de los casos se calculó utilizando la escala de Ruuska-Vesikari modificada por nuestro grupo de trabajo para infecciones bacterianas (Fig. 6), 12 (63.5%) casos fueron clasificados como moderados, 6 (31.57%) como leves y 1 como grave (Tabla 9).

Tabla 9. Características de los niños de los cuales se obtuvieron las cepas de EPEC y *E. albertii*

Clave de la cepa	Tipo de EPEC	Clave del paciente	Género	Días totales del episodio	No. máx. evacuaciones en 24hr	Días de evolución c/vómito	No. máx. vómitos en 24hr	Temperatura	Deshidratación	Muestra de heces	Puntaje escala Ruska-Vesikari	Clasificación de severidad	Edad años	bacl/mg heces
14-16b	EPECa	MXU01/CA1011/1	M	7	15	3	5	36.5	SI	Líquida	15	Grave	0.76	1.89E+05
13-141a	EPECa	MXU01/CA665/1	M	9	6	1	1	36.7	No	Semilíquida	8	Leve	0.22	3.00E+06
10-80c	EPECa	MXU01-CA056/1	F	1	1	1	10	37.2	No	Semilíquida	7	Leve	0.92	8.40E+04
11-336b	EPECa	MXU01/CA464/1	M	3	4	0	0	36.1	No	Semilíquida/moco	3	Leve	1.87	4.39E+05
12-51a	EPECa	MXU01/CA528/1	F	7	4	1	1	38	No	Líquida/moco	8	Leve	2.35	1.73E+06
11-129a	EPECa	MXU01/CA287/1	M	4	3	0	0	39	No	Líquida/moco	5	Leve	3.10	1.84E+06
13-113a	EPECa	MXU01/CA846/1	F	1	5	0	0	38.2	No	Líquida con grasa	5	Leve	4.60	1.63E+06
11-182a	EPECa	MXU01/CA340/1	M	4	6	0	0	36.5	No	Líquida, moco, Sangre	4	Moderado	0.18	4.37E+05
11-313b	EPECa	MXU01/CA450/1	M	4	10	1	2	36	SI	Semilíquida	10	Moderado	0.18	1.08E+05
11-53a	EPECa	MXU01/CA193/1	M	4	15	1	5	38.4	SI	Líquida	14	Moderado	0.23	1.34E+04
12-61b	EPECa	MXU01/CA537/1	M	7	10	1	2	37.4	No	Líquida	10	Moderado	0.23	1.86E+06
12255a	EPECa	MXU01/CA683/1	M	10	12	2	8	39	No	Líquida/moco	12	Moderado	1.06	1.15E+07
11-215a	EPECa	MXU01/CA370/1	M	5	12	0	0	38	SI	Semilíquida/moco	10	Moderado	1.21	4.73E+05
12-306d	EPECa	MXU01/CA739/1	M	5	22	1	6	36.3	No	Líquida/moco	9	Moderado	1.49	8.62E+02
13-188c	EPECa	MXU01/CA901/1	F	9	7	1	2	38.5	No	Líquida/moco	9	Moderado	1.67	4.87E+05
13-202d	EPECa	MXU01/CA913/1	M	7	7	0	0	39.6	No	Líquida	9	Moderado	2.73	4.87E+05
11-198a	EPECi	MXU01/CA356/1	F	5	7	1	8	38	No	Semilíquida	10	Moderado	3.20	4.23E+03
12-56b	EPECa	MXU01/CA535/1	F	5	11	1	8	38.5	SI	Semilíquida	14	Moderado	3.90	1.76E+02
12-148c	EPECa	MXU01/CA615/1	M	10	5	1	19	36.9	SI	Semilíquida/moco	10	Moderado	6.00	2.42E+05
12-320a	<i>E. albertii</i>	MXU01/CA744/1	F	4	4	1	12	37.5	SI	Líquida/moco	11	Moderado	2.03	1.59E+06
Clave de la cepa	Tipo de EPEC	Clave del sujeto	Género	Temperatura	Meses	Años	Edad años	bacl/mg heces						
11-305a	EPECi	MXU01-CO114	F	36.5	21		1.75	3.71E+03						
10-141a	EPECi	MXU01-CO045	M	36.6	35.4		2.95	1.24E+05						
13-17c	EPECa	MX-U01-CO210/1	M	36.3		4.1	4.10	1.65E+06						
10-77b	EPECa	MXU01-CO022	M	36	16.8		1.40	2.29E+06						

(Escala de Ruuska-Vesikari)

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 (puntos)
 - 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)

SEVERIDAD:

- a) Leve: 0-8 puntos
 - b) Moderada: 9-14 puntos
 - c) Grave: >15 puntos
- *Presencia de sangre y complicaciones (Moderada)

Ruuska y Vesikari, 1990

Figura 6. Escala de Ruuska-Vesikari modificada para establecer la severidad del cuadro de diarrea bacteriana. En caso de que la severidad del episodio de diarrea sea leve.

7.3. Análisis filogenético de las cepas de EPEC

Para clasificar a las cepas de EPEC en linajes y subgrupos utilizamos la clasificación propuesta por (Ingle *et al.*, 2016) que se basa en siete genes de la isla LEE (*espZ*, *eeA*, *tir*, *espA*, *espB*, *espD*, *espH*).

Como se observa en la Figura 7, con excepción de la cepa 12148c y la cepa 12255a, todas las cepas se clasificaron en algún linaje y subgrupo, respectivamente.

Utilizando el software VAMPhyRE realizamos un árbol filogenético con base en la secuencia completa de las islas LEE de las diferentes cepas de EPEC.

Este software tiene la ventaja que permite analizar las secuencias fragmentadas en "scaffolds", como es el caso de seis genomas de EPEC, cuatro de cepas de pacientes y dos de niños asintomáticos.

Como se muestra en la Figura 7, el árbol filogenético contiene cuatro clados: el clado I está constituido por un grupo cuyas cepas pertenecen todas al linaje 2, este clado a su vez se divide en dos grupos, a y b, el primero contiene solo una cepa el cual pertenece al subgrupo 6 y el grupo b es un cluster de siete cepas de las cuales seis pertenecen al subgrupo 8. Los clados II y III pertenecen al linaje 3 y al subgrupo 11a y 10, respectivamente. Finalmente el clado IV, el cual es el más diverso, es donde se agrupan las cuatro cepas de los niños asintómicos. El clado IV está constituido por nueve cepas todas pertenecen al linaje 3, una al subgrupo 28, dos al subgrupo 29, cuatro al 22 y dos al 30.

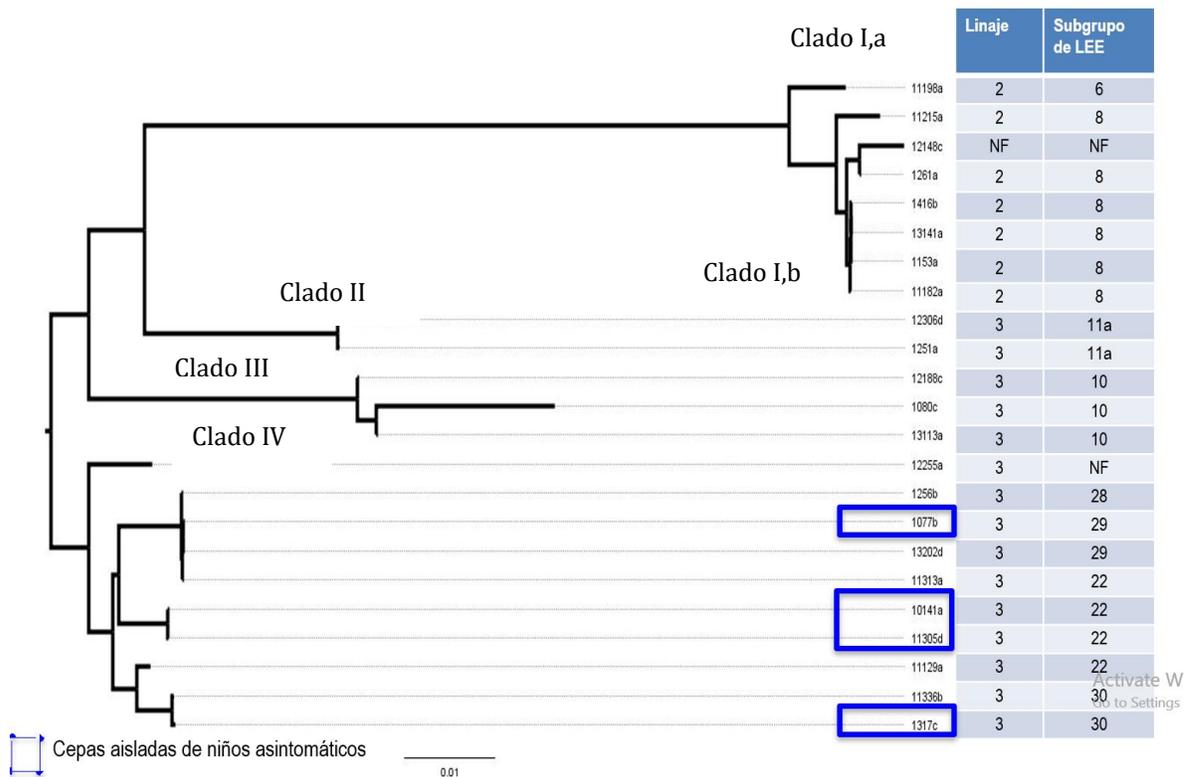


Figura 7. Clasificación de las cepas EPEC en linajes y subgrupos, con base en 7 genes de LEE, (Ingle *et al.*, 2016) y en un árbol filogenético, con base en isla completa de LEE de cada cepa, utilizando el programa VAMPhyRE (Muñoz-Ramírez *et al.*, 2017b) y comparación de los dos métodos de clasificación.

7.4. Distribución de los genes que codifican diferentes factores de patogenicidad en las cepas secuenciadas

Los genes de patogenicidad que se buscaron incluyen los siguientes grupos:

- Adhesinas
- Toxinas
- Efectores
- Competencia interbacteriana.

7.4.1. Genes que codifican para adhesinas

En todas las cepas de EPEC, de casos y asintomáticos, encontramos el operón para el pili HCP (Hemorrhagic coli pilus). En 17 (89.5%) de las 19 cepas de EPEC de niños con diarrea y en 3 (75%) de las 4 cepas de niños asintomáticos el operón para la Fimbria 9 y en 14 (73%) cepas de niños con diarrea y en 2 (50%) cepas de niños asintomáticos el operón de la fimbria LPF (Tabla 10). Los genes que codifican para la fimbria *paa* y *agn43* solo se encontraron en las cepas de niños con diarrea. Por otro lado en la cepa de *Escherichia albertii* no se encontraron los operones para la fimbria HCP y la fimbria 9, pero si el operón de la fimbria LPF y el gen *ehaA* (Enterohemorrhagic *E. coli* autotransporter A) (Tabla 10).

Tabla 10. Prevalencia de los genes asociados a adhesinas en las cepas secuenciadas de *Escherichia* spp. *ehaA* (Enterohemorrhagic *E. coli* autotransporter A), *iha* (IrgA homologue adhesin), *lpfA* (Long polar fimbriae), *stgA* (subunidad de una fimbria de *Salmonella* Typhi), fimbria F9 (operón completo que codifica para la fimbria F9), *cah* (calcium-binding antigen 43 homologue) *bfpA* (Bundle-forming pilus), *paa* (Porcine A/E-associated adhesin), *agn43* (Antigen 43).

CEPAS DE EPEC DE NIÑOS CON DIARREA

Clave de la cepa	<i>ehaA</i>	<i>iha</i>	<i>lpfA</i>	<i>stgA</i>	F9 fimbria operón	<i>cah</i>	BFP operón	<i>paa</i>	<i>agn43</i>
10-80c	+		+		+			+	
11-129a		+				+			
11-182a			+	+	+	+			
11-198a					+		+		+
11-215a			+	+	+				+
11-313b			+	+	+				
11-336b		+			+	+			+
11-53a	+		+	+	+				+
12- 51a	+		+	+	+	+			
12- 56b	+		+	+					
12-148c	+		+		+	+		+	
12-255a	+		+	+	+				+
12-306d	+		+	+	+			+	
12-61b	+		+		+	+		+	+
13-113a	+				+			+	
13-141a	+		+		+				+
13-188c	+				+			+	
13-202d	+		+	+	+				
14-16b	+		+		+				+
TOTAL,	13								8(42.1)
n (%)	(68.4)	2(10.5)	14(73.7)	9(47.3)	17(89.5)	6(31.6)	1(5.26)	6(31.6)	

CEPAS DE EPEC DE NIÑOS ASINTOMÁTICOS

Clave de la cepa	<i>ehaA</i>	<i>iha</i>	<i>lpfA</i>	<i>stgA</i>	F9 fimbria operón	<i>cah</i>	BFP operón	<i>paa</i>	<i>agn43</i>
1077b	+		+	+	+				
10141 ^a	+		+	+	+				
11305d					+		+		
1317c		+				+			
TOTAL,	2(50)	1(25)	2(50)	2(50)	3(75)	1(25)	1(25)	0(0)	0(0)
n (%)									
<i>Escherichia albertii</i>									
Clave de la cepa	<i>ehaA</i>	<i>iha</i>	<i>lpfA</i>	<i>stgA</i>	F9 fimbria operón	<i>cah</i>	BFP operón	<i>paa</i>	<i>agn43</i>
12-320 ^a	+		+					+	

7.4.2. Prevalencia de los genes que codifican para toxinas de *Escherichia*.

De las 19 cepas de EPEC aisladas de niños con diarrea, en 7 (36.8%) no se identificó ninguna toxina, mientras que todas las cepas de niños asintomáticos tuvieron algunas toxinas (Tabla 11). Los genes de las toxinas más prevalentes en las cepas de EPEC aisladas de pacientes fueron los que codifican para las dos diferentes hemolisinas HlyA (26.3%) y HlyE (31.6%), éste último no se identificó en las cepas de niños asintomáticos. Los genes que codifican para las toxinas *astA* (EAST1 toxin) y *sctE* (metalloprotease of EHEC), se encontraron en baja prevalencia en las cepas de niños con diarrea y en ninguna de las cepas de los niños asintomáticos. Por otro lado en la cepa de *Escherichia albertii* se identificaron dos genes que codifican para toxinas, *cdt* (cytolethal distending toxin) y *vat* (vacuolating autotransporter protein), los que fueron también identificados en dos de las cepas de niños asintomáticos (Tabla 11).

Tabla 11. Prevalencia y distribución de genes que codifican para toxinas. *hlyA* (Hemolysin A), *hlyE* (Hemolysin E), *senB* (Shigella enterotoxin B), *astA* (EAST1 toxin), *cdt* (cytolethal distending toxin), *vat* (Vacuolating Autotransporter Protein), *sctE* (metalloprotease of EHEC, *sat* (secreted autotransporter toxin), *espl* (EHEC serin protease I), *pet* (plasmid encoded toxin), *espC* (EPEC secreted protein C).

CEPAS DE EPEC DE NIÑOS CON DIARREA

Clave de la cepa	<i>hlyA</i>	<i>hlyE</i>	<i>senB</i>	<i>astA</i>	<i>cdt</i>	<i>vat</i>	<i>stcE</i>	<i>sat</i>	<i>espl</i>	<i>pet</i>	<i>espC</i>
11182a											
13141a											
1153a											
1261a											
1416b											
11215a											
12148c											
13188c		+									
11198a					+						
1256b							+				
13113a		+									
12255a		+						+			
1080c	+	+					+				
11336b							+		+		+
1251a	+	+								+	
13202d	+		+							+	
11129a				+		+	+				
12306d	+	+							+	+	
11313b	+		+	+		+				+	
TOTAL, n											
(%)	5(26.3)	6(31.6)	2(10.5)	2(10.5)	1(5.26)	2(10.5)	4(21.05)	1(5.26)	2(10.5)	4(21.05)	1(5.26)

CEPAS DE EPEC DE NIÑOS ASINTOMÁTICOS

Clave de la cepa	<i>hlyA</i>	<i>hlyE</i>	<i>senB</i>	<i>astA</i>	<i>cdt</i>	<i>vat</i>	<i>stcE</i>	<i>sat</i>	<i>espI</i>	<i>pet</i>	<i>espC</i>
1077b	+		+							+	
10141a					+	+					
11305d					+	+					
1317c									+		+
TOTAL, n											
(%)	1(25)	0(0)	1(25)	0(0)	2(50)	2(50)	0(0)		1(25)		1(25)

Escherichia albertii

Clave de la cepa	<i>hlyA</i>	<i>hlyE</i>	<i>senB</i>	<i>astA</i>	<i>cdt</i>	<i>vat</i>	<i>stcE</i>	<i>sat</i>	<i>espI</i>	<i>pet</i>	<i>espC</i>
12320 ^a					+	+					

7.4.3. Prevalencia de genes que codifican para sistemas de competencia interbacteriana.

Los sistemas de competencia interbacteriana que se identificaron fueron la presencia de colicinas y el sistema de secreción tipo 6 (T6SS). En 5 cepas (26.5%) de niños con diarrea se identificó al menos un gen que codifica para alguna colicina mientras que no se encontró ninguno en las cepas de niños asintomáticos. El sistema de secreción tipo VI (T6SS) se encontró en 13 (68.4%) cepas de niños con diarrea y en una de las cepas de niños asintomáticos (Tabla 12).

Hasta el momento se han descrito al menos 72 locus que codifican para T6SS en *E. coli*, por lo que utilizando la base de datos Secret6 que clasifica los locus con IDs (identification codes), identificamos cual era el locus específico en nuestras cepas. Identificamos el T6SS locus ID 365, con homología del 98-99% con el locus T6SS de la cepa de EHEC 12009 (O103:H2), en 13 cepas de niños con diarrea y en la única cepa positiva de un niño asintomático para el locus T6SS; además dos de las 13 cepas tuvieron el locus T6SS ID366, con una homología del 98%, el cual también fue identificado por primera vez en la cepa de EHEC 12009 (Tabla12).

La cepa de *E. albertii*, tiene un locus de T6SS que es característico de esta especie, este locus no se encuentra en la base de datos SecreT6, por lo que se identificó utilizando un análisis por BLAST, con el que obtuvimos una homología del 100% con el T6SS descrito en otros genomas de *E. albertii* depositados en la base de datos geneBank.

Tabla 12. Prevalencia de factores asociados con la competencia interbacteriana. *cfa* (colicin 5), *cib* (colicin IB), *cea* (colicin E1), *cia* (colicin-Ia). T6SS (Sistema de Secreción tipo VI).

CEPAS DE EPEC DE NIÑOS CON DIARREA					
	<i>cfa</i>	<i>cib</i>	<i>cea</i>	<i>cia</i>	T6SS
1080c	+				
11129a					
11182a					1
11198a		+		+	
11215a					1
11313b					1
11336b			+		
1153a					1
12148c					2
12255a					1
12306d					1
1251a					1
1256b					1
1261a					2
13113a		+	+		
13141a					1
13188c	+				
13202d					1
1416b					1
TOTAL (%)	2(10.5)	2(10.5)	2(10.5)	1(5.2)	13(68.4)
CEPAS DE EPEC DE NIÑOS ASINTOMÁTICOS					
1077b					1
10141a					
11305d					
1317c					
TOTAL (%)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	1(25)
<i>Escherichia albertii</i>					
	<i>cfa</i>	<i>cib</i>	<i>cea</i>	<i>cia</i>	T6SS
12320a				+	1

7.4.4. Prevalencia de los genes que codifican para proteínas que afectan la respuesta por complemento

En la tabla 13, se ilustran los genes que están asociados a la inhibición de la activación de las vías del complemento que se encontraron en las cepas de EPEC; observándose que solo se identificaron estos genes en las cepas de EPEC aisladas de pacientes. En total 13 (68.4%) cepas de las 19 de niños con diarrea presentaron al menos un gen y 6 cepas tuvieron dos genes. Los genes más prevalentes fueron los que codifican para la proteína “Increased serum survival” (Iss) y para el “serum resistance factor” (TraT) ambos identificados en 7 (36.8%) cepas.

Tabla 13. Prevalencia de factores asociados a la resistencia a complemento.

iss (increased serum survival), *stcE* (metalloprotease of EHEC), *kpsMIII* (cápsula tipo III), *traT* (serum resistance factor).

CEPAS DE EPEC DE NIÑOS CON DIARREA				
	<i>iss</i>	<i>stcE</i>	<i>kpsMIII</i>	<i>traT</i>
1080c		+		+
11129a		+		+
11182a	+			+
11198a			+	+
11215a	+			+
11313b				
11336b		+		
1153a	+			
12148c	+			
12255a				
12306d	+			
1251a				
1256b		+		+
1261a	+			
13113a				
13141a	+			
13188c				+
13202d				
1416b				
TOTAL (%)	7(36.8)	4(21.05)	1(5.2)	7(36.8)
CEPAS DE EPEC DE NIÑOS ASINTOMÁTICOS				
1077b				
10141a				
11305d				
1317c				
TOTAL (%)	0(0)	0(0)	0(0)	
<i>Escherichia albertii</i>				
	<i>iss</i>	<i>stcE</i>	<i>kpsMIII</i>	<i>traT</i>
12320 ^a	+			+

7.4.5. Prevalencia de los genes que codifican para efectores translocados por el Sistema de Secreción tipo III, que se encuentran codificados fuera de LEE.

Estos efectores dependientes del T3SS pueden afectar diversas vías de señalización dentro de las células eucariontes, principalmente las involucradas en la evasión de la respuesta inmune innata, las que regulan la muerte celular y el citoesqueleto. En la tabla 14, se muestran las prevalencias de los genes en las cepas de *Escherichia*, que tienen que ver con la evasión de la respuesta inmune y/o la muerte celular.

Al comparar las cepas de los niños con diarrea y asintomáticos observamos que los genes que codifican para los efectores *nleA* (non-LEE encoded A), *nleE* (non-LEE encoded E), *nleH1-1* (non-LEE encoded H1-1) y *cif* (cycle inhibiting factor) no se encontraron presentes en ninguna de las cepas de niños asintomáticos (Tabla 14). El gen de *nleA* estuvo presente en el 74% de las cepas de niños con diarrea, este efector está involucrado en la inhibición del inflammasoma. Por otro lado el gen para el efector NLEF (non-LEE encoded F) se encontró en 16 (84%) de las cepas de niños con diarrea, mientras que solo se encontró en una cepa (25%) de los niños asintomáticos. Como se observa en la tabla 14, 73% de las cepas de EPEC de niños con diarrea tienen 4 o más de estos efectores, mientras que las de los niños asintomáticos no tienen más de tres. Además 6 de las cepas de niños con diarrea tienen los genes que componen una isla de patogenicidad asociada a la virulencia de EPEC, PAI O122/IE6, la cual no se encontró en ninguna de las cepas de niños asintomáticos.

La cepa de *Escherichia albertii* fue positiva al gen *nleA* (inflammasoma) y a los genes *nleB1*, *lifA*, *espL*, y *nleE1*, que forman parte de la isla de patogenicidad O122/IE6. La presencia de esta isla no se ha reportado previamente en cepas de *E. albertii*. Además, se encontraron proteínas que tienen homología con otros efectores reportados para otras cepas formadoras de la lesión A/E, como EspJ (EPEC secreted protein J) que mostró una identidad del 72% con respecto a la secuencia de EPEC E2348/69, NleH2 una identidad del 74%, con la proteína de EHEC EDL933, NleH1 y NleF mostraron una identidad del 76% y 52% respectivamente con las proteínas de *Citrobacter rodentium*.

Como se puede observar en la Tabla 15, los genes *espM2* y *espW* que codifican para efectores que modifican al citoesqueleto, se encontraron en 7 (36.8%) y 5 (26.3%) cepas de niños con diarrea, respectivamente; sin embargo, estos genes no se encontraron en ninguna de las cepas de los niños asintomáticos.

En la cepa de *Escherichia albertii* se encontraron los genes que codifican para *espM1* y *espW*, además de un homólogo de *espM2* que tiene el 52% de identidad con la secuencia de *espM2* de *C. rodentium*.

7.4.6. Genes que codifican para proteínas translocadas por el T3SS con función desconocida.

Se han descrito otras proteínas que son translocadas por T3SS, sin embargo, no se conoce su función. Dentro de estas proteínas se encuentran los efectores de la familia NleG, los cuales se caracterizan por tener un dominio de Ubiquitin-Ligasa, pero se desconoce su papel dentro de la célula. Además de otras proteínas como EspK, y proteínas de la familia EspX. Al menos una de estas proteínas con función desconocida fue identificada en nuestras cepas, en muchos casos formando parte de las islas de patogenicidad donde se encuentran los efectores mencionados anteriormente cuya función ya se conoce, estos resultados se muestran con más detalle en la siguiente sección.

Clave de la cepa	<i>nleA</i>	<i>nleB2</i>	<i>nleC</i>	<i>espJ</i>	<i>nleB1</i>	<i>nleE</i>	<i>lifa</i>	<i>espL</i>	<i>nleD</i>	<i>nleH1</i>	<i>nleH1-1</i>	<i>nleH2</i>	<i>nleF</i>	<i>cif</i>
11182a	+	+		+	+	+	+	+			+	+	+	+
11313b	+	+									+	+	+	+
13141a	+	+		+			+	+			+	+	+	+
1261a	+		+	+			+		+		+	+		+
1153a	+		+	+			+	+			+	+	+	+
1416b	+			+			+	+			+	+	+	+
1080c	+		+	+						+			+	+
12255a														
11215a	+	+	+	+	+	+	+	+			+	+	+	+
12306d					+	+					+	+	+	+
13188c		+							+	+	+	+	+	+
11336b					+					+	+	+	+	+
1251a	+				+	+			+			+	+	+
13202d		+									+	+	+	+
11129a	+			+			+				+	+	+	+
11198a	+			+			+				+	+	+	+
1256b		+									+	+	+	+
13113a	+		+	+							+	+	+	+
12148c	+	+		+				+	+	+	+		+	+
TOTAL, n(%)	14(73.7)	14(73.7)		11(57.9)	8(42.1)	8(42.1)	6(31.6)	6(31.6)	6(31.6)	3(15.8)	9(47.3)	13(68.42)	16(84.2)	8(42.1)

Tabla 14. Prevalencia de efectores que actúan sobre las vías de señalización de la respuesta inmune innata y/o muerte celular.

 Efectores que actúan sobre las vías de señalización de respuesta inmune innata. * *nleA*, *nleB2*, *nleC*, *nleB1*, *nleE* (non LEE-encoded effector A, B2, C, B1, E), *espJ* (EPEC secreted protein J), *lifa* (Lymphocyte inhibitory factor).

 Efectores que actúan sobre las vías de señalización de respuesta inmune innata como en las de muerte celular. * *espL* (EPEC secreted protein L), *nleD*, *nleH1*, *nleH1-1*, *nleH2*, *nleF* (non LEE-encoded effector D, H1, H1-1, H2, E).

 Efectores que activan señales de apoptosis en las células eucariontes. * *nleF* (non LEE-encoded effector F) y *cif* (Cycle inhibiting factor).

CEPAS DE EPEC DE NIÑOS ASINTOMÁTICOS

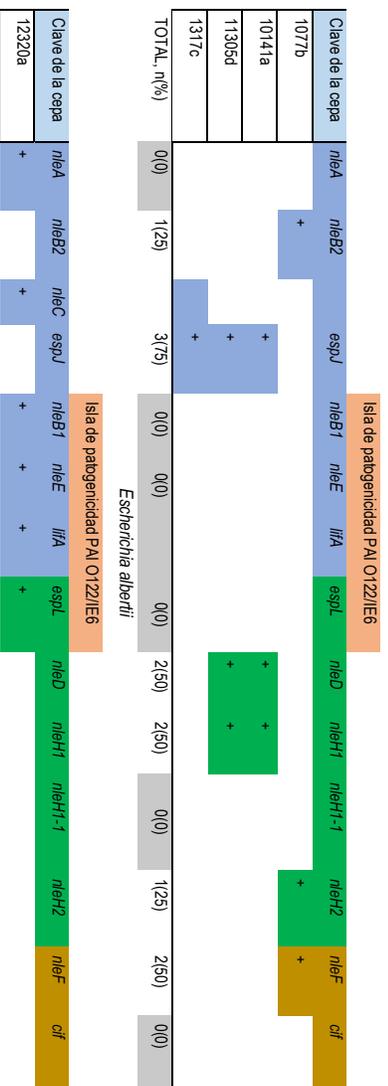


Tabla 14. Prevalencia de efectores que actúan sobre las vías de señalización de la respuesta inmune innata y/o muerte celular.

■ Efectores que actúan sobre las vías de señalización de respuesta inmune innata. * *nleA*, *nleB2*, *nleC*, *nleB1*, *nleE* (non LEE-encoded effector A, B2, C, B1, E), *espJ* (EPEC secreted protein J), *iflA* (Lymphocyte inhibitory factor).

■ Efectores que actúan sobre las vías de señalización de respuesta inmune innata como en las de muerte celular. *

espL (EPEC secreted protein L), *nleD*, *nleH1*, *nleH1-1*, *nleH2*, *nleF* (non LEE-encoded effector D, H1, H1-1, H2, E).

■ Efectores que activan señales de apoptosis en las células eucariontas. **nleF* (non LEE-encoded effector F) y *cif* (Cycle inhibiting factor).

Tabla 15 . Prevalencia de genes no codificados en LEE que afectan el citoesqueleto. *espM1* (EPEC secreted protein M1), *espM2* (EPEC secreted protein M2), *espW* (EPEC secreted protein W), *espG2* (EPEC secreted G2).

CEPAS DE EPEC DE NIÑOS ASINTOMÁTICOS

Clave de la cepa	<i>espM1</i>	<i>espM2</i>	<i>espW</i>	<i>espG2</i>
11182a		+	+	
11313b		+		
13141a		+	+	
1261a				
1153a				
1416b		+	+	
1080c	+			
12255a				
11215a		+	+	
12306d	+			
13188c	+			
11336b		+		+
1251a	+			
13202d		+	+	
11129a				
11198a				
1256b				
13113a	+			
12148c				
TOTAL	5(26.3)	7(36.8)	5(26.3)	1(5.26)

CEPAS DE NIÑOS ASINTOMÁTICOS

Clave de la cepa	<i>espM1</i>	<i>espM2</i>	<i>espW</i>	<i>espG2</i>
1077b	+			
10141a	+			
11305d	+			
1317c				+
TOTAL	3(75)	0(0)	0(0)	1(25)

Escherichia albertii

Clave de la cepa	<i>espM1</i>	<i>espM2</i>	<i>espW</i>	<i>espG2</i>
12320a	+		+	

7.5. Identificación de islas de patogenicidad previamente identificadas en cepas de *E. coli* que producen la lesión A/E.

La mayoría de los efectores que son translocados por el T3SS y que no se encuentran codificados en LEE, están organizados en islas de patogenicidad, esto se ha demostrado en las cepas de referencia EHEC EDL933, EHEC Sakai y EPEC E2348/69.

Tabla 16 .Prevalencia de islas de patogenicidad previamente reportadas en las cepas de referencia EHEC EDL933, EHEC SAKAI, EPEC E23448/69

CEPAS DE NIÑOS CON DIARREA						
Clave de la cepa	PAI O122	PP2	SP9 incom	Sp3/OI-36	Sp6/OI-48	OI-57
10-80c					*+	
11-129a					+	
11-182a			+	+	*+	
11-198a	+	*+				
11-215a						
11-313b		+				
11-336b						
11-53a			+	+	*+	
12- 51a						
12- 56b	*+		+		*+	+
12-148c						
12-255a			+	+	*+	
12-306d	*+		+		*+	+
12-61b	+	+				
13-113a						
13-141a	+	+				
13-188c	+	+				
13-202d	+	+				
14-16b	+	+				
TOTAL						
Isla Completa, n(%)	6(31.6)	6(31.6)	5(26.31)	3(15.8)	1(10.52)	2(10.52)
*Isla Truncada n(%)	2(10.52)	1(10.52)	0	0	6(31.6)	0

CEPAS DE NIÑOS ASINTOMÁTICOS						
Clave de la cepa	PAI O122	PP2	SP9 incom	Sp3/OI-36	Sp6/OI-48	OI-57
1077b					*+	
10141a						
12305d						
1317c						
Isla Completa, n(%)	0	0	0	0		0
*Isla Truncada n(%)	0	0	0	0	1(25)	0

Como se muestra en la tabla 16 , el 79% de las 19 cepas aisladas de pacientes presentan al menos una de estas islas de patogenicidad, de estas 15 cepas, 11 tienen dos o más islas. Mientras que solo una cepa, de las 4 cepas aisladas de pacientes asintomáticos, presentó una isla (Tabla 16).

Con respecto a *E. albertii*, de estas islas se encontró la isla O122/IE6, la cual se ha asociado con la patogenicidad de EPEC.

7.5.1. Identificación de islas de patogenicidad no reportadas previamente.

La identificación de islas de patogenicidad se hizo utilizando el programa IslandViewer, y se identificaron en total 11 islas que no se han reportado previamente en ninguna cepa de la familia A/E. De las 19 cepas de niños con diarrea todas presentaron al menos una isla. La isla denominada nleF-nleB2 completa o truncada se encontró en 15 (79%) de las cepas de niños con diarrea y en 1 (25%) de los niños asintomáticos (Tabla 17).

Tabla 17 . Prevalencia de Islas no reportada previamente en las cepas de EPEC y *E. albertii*.

Clave de la cepa	nleF-nleB2	nleG7-espS/ospB	nleG2-4-espM2	espV-nleG2-3	espM2-espS	nleA-nleG2-2	nleG-espM2	nleC-nleG	cif-nleA	nleG2-2-espN2-2	espM2-nleD
10-80c	+		*+								
11-129a	+	+									
11-182a	*+	+		+							
11-198a	+					+	+				
11-215a	*+				+						
11-313b	+	+		*+							
11-336b	+										
11-53a	*+	*+		+							
12- 51a		+									
12- 56b		+									
12-148c		+							+		
12-255a	*+	+		+							
12-306d		+								+	
12-61b	+		+			+					
13-113a	+	+					+				
13-141a	+		+			+					
13-188c	+		+			+		+			
13-202d	+		+			+					
14-16b	+					+		+			
Isla Completa n(%)	11(57.9)	9(47.3)	4(21.05)	3(15.8)	1(10.52)	6(31.6)	2(10.52)	2(10.52)	1(10.52)	1(10.52)	0
*Isla Truncada n(%)	4(21.05)	1(10.52)	1(10.52)	1(10.52)	0	0	0	0	0	0	0
Clave de la cepa	nleF-nleB2	nleG7-espS/ospB	nleG2-4-espM2	espV-nleA-nleG2-3 inc	espM2-espS/ospB	nleA-nleG2-2	nleG-espM2	nleC-nleG	cif-nleA	nleG2-2-espN2-2	espM2-nleD
1077b	+		*+								
10141a											+
12305d											+
1317c		+						+			
Isla Completa n(%)	1(25)	1(25)	0	0	0	0	0	1(25)	0	0	2(50)
*Isla Truncada n(%)	0	0	1(25)	0	0	0	0	0	0	0	0

Estas islas están compuestas por diversos genes, los cuales se muestran en la tabla 18.

Tabla 18. Genes contenidos en las islas de patogenicidad. Genes que se encuentran en cada una de las islas identificadas en las cepas de EPEC.

Nombre de la Isla	Genes que la conforman
O122/IE6	lifA, nleB1, nleE, espL
O122/IE6 truncada	nleB1, nleE
PP2	espJ, nleG2-2, cif, nleH1-1
SP9 truncada	nleG, espM1, nleG9
O1-48/Sp6	espK, pseudogen nleB2, espN, espX7/nleL
O1-48/Sp6 truncada	espK, pseudogen nleB2
Sp3/O1-36	nleH1, nleC, nleB2, nleD
IE5	espG2, espC
O1-57/Sp11	nleG-3, nleG6-2, nleG5-1
nleF-nleB2	nleF, nleH2, pseudogen nleC, nleB2
nleF-nleB2 truncada	nleF, nleH2
nleG7-espS/ospB	nleG7, espS/ospB
nleG2-4-espM2	nleG2-4, nleG-3, nleG6-1, espW, nleG8-2, espM2
espV-nleG	espV, nleA, variante de nleG2-3
nleA-nleG2	proteína hipotética, nleA, nleG2-2
cif-nleA	cif, nleA
nleG2-2 espN2-2	nleG2-2, espN2-2
nleC-nleG	nleC, nleG
espM2-espS/ospB	homólogo de espM2, epS/ospB

7.6. Asociación de las características filogenéticas de las cepas de EPEC y los factores de patogenicidad

Comparando los genes de patogenicidad de los diferentes clados del árbol filogenético obtenido por VAMPhyRE (Figura 8), observamos que las cepas del clado I cuando las comparamos con las cepas del clado IV contienen más genes de efectores asociados a la respuesta inmune innata y prácticamente no tienen genes que codifican para toxinas (solo una cepa fue positiva).

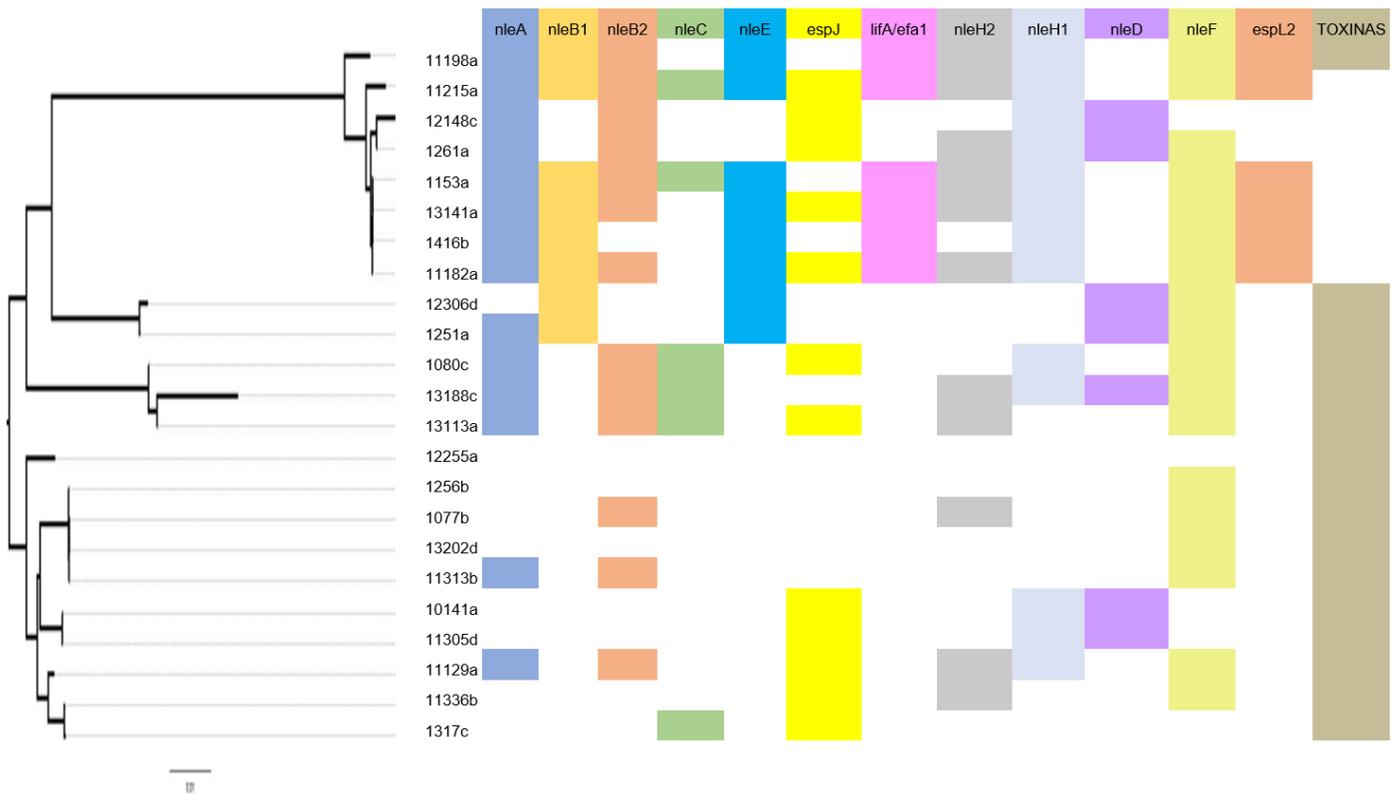


Figura 8 . Distribución de los factores de patogenicidad por clados. Se muestran los efectores asociados a la respuesta inmune innata y la presencia o ausencia de genes que codifican para toxinas.

7.7. Correlación entre las características genéticas de los clados y la carga de EPEC en las heces de los niños

Como se ilustra en la Figura 9, al buscar asociaciones entre las características genéticas de las cepas de los clados con la carga bacteriana en las heces de los niños, observamos que las cepas del clado I, linaje 2 asocian con heces con una mayor carga bacteriana ($p=0.0028$, Mann Whitney test). También observamos que las cepas del clado I son las únicas que contiene dos islas de patogenicidad, la PAI O122 (72% de las cepas) y la isla que nosotros describimos por primera vez en este trabajo que denominamos nleA-nleG2-2 (62.5% de las cepas) y con excepción de una cepa del clado IV la PAI solo se identificó en 6 (72%) de las 8 cepas de este clado I. Observamos que las tres PAI y el gen *iss* (increased serum survival) están asociados significativamente con cepas de EPEC aisladas de niños cuyas heces tuvieron una mayor carga de EPEC. (Figura 9).

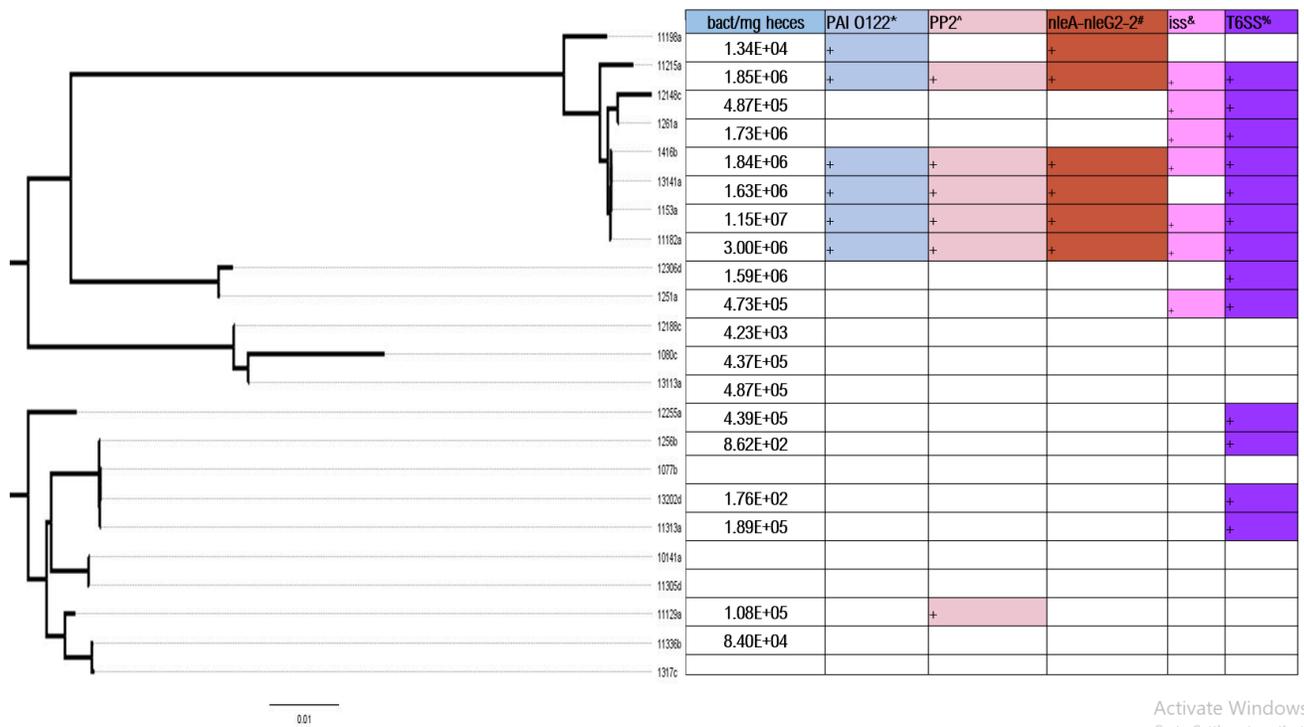


Figura 9. Carga de EPEC y factores de patogenicidad. Se observó que el clado I,b está asociado a cepas obtenidas de niños con mayor carga de EPEC en las heces de los niños con diarrea. Y también se observó la asociación entre diferentes factores de patogenicidad que se encuentran asociados a este clado . PAI O122 vs Carga bacteriana* $p= 0.0117$, PP2 vs Carga Bacteriana ^ $p=0.0426$, Isla nleAnleG2-2 VS Carga bacteriana # $p=0.0117$, iss vs Carga bacteriana & $p=0.0002$, T6SS vs carga bacteriana, % $p=0.048$ (Mann Whitney test)

7.8. Asociación de la presencia del locus T6SS con el cuadro clínico.

Como se muestra en Tabla 19, la presencia del locus del T6SS en las cepas de EPEC correlaciona significativamente con los niños que presentaron tanto un número mayor de evacuaciones al día ($p=0.0151$ Mann Whitney Test), como con los que presentaron cuadros de diarrea moderados a graves (0.044 Mann Whitney Test); estas cepas también se asociaron con niños cuyos episodios de diarrea tuvieron una mayor duración (días) (0.044 Mann Whitney Test).

Tabla 19. Asociación de la presencia del T6SS en las cepas de EPEC con las características del cuadro clínico del niño del que se aislaron estas cepas.

	Edad en meses	&Duración del episodio de diarrea en días	*Evacuaciones por día	^Severidad	T6ss
1	2.1	4	6	Moderado	+
2	2.6	9	6	Leve	+
3	2.7	4	15	Moderado	+
4	9.1	7	15	severo	+
5	14.5	5	12	Moderado	+
6	2.2	4	10	Moderado	+
7	2.7	7	10	Moderado	+
8	12.7	10	12	Moderado	+
9	17.9	5	22	Moderado	+
10	28.2	7	4	Leve	+
11	32.8	7	7	Moderado	+
12	46.8	5	11	Moderado	+
13	72	10	5	Moderado	+
14	38.4	5	7	Moderado	-
15	11	1	1	Leve	-
16	20	9	7	Moderado	-
17	22.4	3	4	Leve	-
18	37.2	4	3	Leve	-
19	55.2	1	5	Leve	-

Correlación entre las cepas de EPEC que contienen el T6SS y número de evacuaciones por día del niño del que se aislaron estas cepas $p=0.0151$ Mann Whitney Test. & Correlación entre las cepas de EPEC que contienen el T6SS y días de duración del episodio de diarrea del niño $p= 0.044$ Mann Whitney Test. ^ Correlación entre las cepas de EPEC que contienen el T6SS y su asociación con los casos moderados y severos $p= 0.044$ Mann Whitney Test.

7.9. Identificación de genes de patogenicidad de EPEC en cepas de niños con diarrea y asintomáticos por PCR punto final.

Estas cepas de referencia del laboratorio, y corresponden a tres estudios llevados a cabo anteriormente. Se seleccionaron 27 cepas aisladas de niños que requirieron hospitalización de un estudio en la Ciudad de México y de un estudio en Yucatán. Dos de las 27 cepas (7.14%) fueron identificadas como EPECt y el resto como EPECa (Tabla 19).

Las cepas fueron aisladas de niños menores de 5 años, excepto por una cepa que fue aislada de un niño de 6 años del estudio de Yucatán.

Las cepas de EPEC de niños asintomáticos provenientes del Hospital O'Horan de Yucatán, fueron aisladas de niños que llegaron por alguna otra razón al hospital, por ejemplo, alguna lesión. La mayoría de las cepas de niños asintomáticos se seleccionaron de una cohorte de un estudio de diarrea realizado en la comunidad La Magdalena Atlicpac del Estado de México. Las cepas seleccionadas fueron de niños que no habían tenido diarrea, en los meses previos y a las cuales no se les había identificado otro patógeno. De las 38 cepas seleccionadas, 2 fueron clasificadas como EPEC típicas (5.2%).

Una vez que se seleccionaron las cepas, se realizó una búsqueda de genes de patogenicidad por PCR punto final, incluyendo los que codifican para diferentes efectores asociados con la respuesta inmune: *nleA* (inflammasoma), *nleE*, *nleB*, *nleH1*, *nleH2*, involucrados en vías de translocación de NFkB, *espL* involucrado en necroptosis e inflamación), *lifA/efa1* asociado con proliferación de linfocitos. También se buscaron genes que codifican para toxinas de la familia de las SPATEs, *pic*, *sat*, *pet*, *sepA*, *sigA* así como otras toxinas, CDT, subtilasa AB (*subAB*), EAST-1 (*astA*) (Tabla 20).

De los 12 genes que se buscaron, los genes más prevalentes en las cepas de EPEC aisladas de niños con diarrea fueron los genes *nleA* y *nleH1* (Tabla 20), los cuales están involucrados en la inhibición de la respuesta inmune innata.

Además se observó que hay un mayor número de cepas que tienen genes que codifican para ambos grupos de genes de toxinas y de efectores, en las cepas de niños con diarrea comparado con las cepas de los niños asintomáticos ($p=0.0041$, $OD=6.129$, $95\% CI= 1.869$ a 18.47).

Tabla 20. Prevalencia de genes de patogenicidad en las cepas de EPEC aisladas de niños con diarrea y asintomáticos.

FUNCIÓN	GENE	Con diarrea n=27 (%)	Sin diarrea (n=38)
TOXINAS	<i>pet</i>	6(22%)	4(10.5%)
	<i>sat</i>	2(0.74%)	0(0)
	<i>sigA</i>	0 (0)	1(2.63%)
	<i>cdt</i>	2(0.74%)	2(5.26%)
	<i>astA</i>	4(14.8%)	2(5.26%)
INHIBICIÓN DE LA ACTIVIDAD DE NFκB	<i>lifA/efa1</i>	7(25%)	7(18.4%)
	<i>nleE</i>	9(33%)	10(26.3%)
	<i>espL</i>	7(25%)	10 (25.6)
	<i>nleB</i>	9(33%)	10(26.3%)
	<i>nleH1**</i>	16(59%)	12(31.5%)
	<i>nleH2</i>	16(59%)	16(42%)
INHIBICIÓN DE LA ACTIVACIÓN DEL INFLAMASOMA	<i>nleA*</i>	18(66%)	14(36%)

nleA p=0.0242, OD= 3. 429, 95% CI =1.194 a 10.03 (Fisher's exact test). ***nleH1* p=0.042, OD= 6.75, 95% CI = 1.176 to 30.7 (Fisher's exact test).

7.10. Resistencia a antibióticos.

7.10.1. Pruebas de sensibilidad a 16 antibióticos a las cepas secuenciadas de EPEC.

Para este ensayo se utilizó el sistema de identificación de VITEK® 2 Compact y la tarjeta AST-GN70 para Gram-negativas.

De las 19 cepas de EPEC aisladas de casos de diarrea 13 (68.4%) fueron resistentes a ampicilina y 9 (47.3%) de las cepas fueron resistentes ampicilina/sulbactam, dos cepas mostraron una susceptibilidad intermedia 2 (10.52%), 8 (42%) de las 19 cepas no mostraron resistencia a ningún antibiótico. De las cepas de EPEC aisladas de niños asintomáticos solo una cepa mostró resistencia antimicrobiana y las 3 cepas restantes fueron sensibles a todos los antibióticos probados. De las 19 cepas de niños con diarrea 8 (42%) fueron resistentes a Trimetoprim/Sulfametoxazol (TMX), así como 1 cepa de los niños asintomáticos. Todas las cepas resistentes a TMX fueron también resistentes a Ampicilina (Tabla 21).

La cepa de *Escherichia albertii* solo presentó resistencia intermedia a Nitrofurantoina (Tabla 21).

Tabla 21. Susceptibilidad a diferentes antibióticos de las cepas de *Escherichia*. En color verde indica las cepas que provienen de niños asintomáticos y en color anaranjado la cepa de *Escherichia albertii*.

	Aminoglucósidos			b-lactamasas								sulfonamidas		Quinolones	Nitrofurantoina
	Amikacina	Tobramicina	Gentamicina	Piperacilin/Tazobactam	Aztreonam	Cefepima	Ceftriaxona	Ampicilina	Cefazolina	Ertapenem	Meropenem	Ampicilina/Sulbactam	Trimetoprima/Sulfametoxazol	Ciprofloxacino	
1080c															
1153a				R				R				R			
11129a			R	R				R	R			R		R	
11182a	I		R					R				R		R	
11198a															
11336b				R				R	R			R		R	
1251a								R				R		R	
12148c															
12306d															
13113a				I				R	R			R			
13141a															
13188c	I		R					R				R		R	
11215a															
11313a															
12255a					R	R	R	R	R			I			
1256b								R				I		R	
13202d	I		R					R				R		R	
1416b															
1261a								R				R		R	
1077b				I	R	R	R	R	R			R		R	
1041a															
11305d															
1317c															
12320a															I

7.10.2. Búsqueda de marcadores genéticos de resistencia antimicrobiana.

En las cepas de niños con diarrea los genes más prevalentes fueron los que confieren resistencia a beta-lactamasas (ampicilina y cefalosporinas), los cuales se encontraron en 15 (78.9%) cepas y los que están relacionados con la resistencia a los inhibidores de la enzima folato reductasa (trimetoprim/sulfametoxazol) identificados en 14 (73.7%) cepas. Además, 4 (21.05%) cepas no tuvieron ningún gen asociado a genes de resistencia antimicrobiana de los que están en la base de datos de KmerResistance 2.2 . Al comparar el fenotipo con el genotipo de las cepas, observamos que hay un gran número de cepas que tienen genes de resistencia a TMX pero que no presentan el fenotipo asociado. Mientras que de las 13 cepas que presentaron genes de resistencia a ampicilina 11 fueron en efecto resistentes a este antibiótico mientras que dos cepas fueron susceptibles al este antibiótico. Además una cepa fue resistente a todas las penicilinas que no están acompañadas de un inhibidor de las β -lactamasas, como sulbactam o tazobactam y esta cepa fue la única en la que se identificó el gen blaCTX-M-15_23, el cual se encuentra asociado a las β -lactamasas de espectro extendido (BLEE).

La cepa de *Escherichia albertii* presentó genes de resistencia a estreptomina, trimetoprim, sulfametoxazol y ampicilina, sin embargo no se observó fenotípicamente resistencia a estos dos últimos antibióticos ya que las cepas fueron sensibles.

7.11. Estandarización de las condiciones de la técnica de FAS para formación de pedestales.

Como se ha venido mencionando la característica fenotípica propia de las cepas que producen lesión A/E es su capacidad de formar pedestales, lo que nos permite evaluar si las cepas que estamos identificando por la presencia de un gen que codifica a intimina, contienen un T3SS funcional y produce los efectores necesarios para la formación de la lesión A/E.

7.11.1. Formación de pedestales utilizando las técnicas descrita en células HEp-2

Se evaluar las 19 cepas de EPEC aisladas de niños con diarrea y la de *E. albertii* utilizando la técnica de FAS descrita por Knutton et al 1987 (Knutton, Lloyd y McNEISH, 1987) para cepas de EPECt. Nosotros utilizamos las MOI (MOI 5-10) y el medio de activación de LEE (DMEM con alta concentración de Glucosa "High Glucose = HG") como estaba descrito solo variamos el tiempo de

incubación de 3 horas por 4 horas. Como se ilustra en la Tabla 22 utilizando estas condiciones observamos que ninguna de las 18 cepas de EPECa formó pedestales, solo formaron pedestales dos cepas (10%), la única cepa de EPECt y la cepa de *E. albertii*.

7.11.2. Modificación de la técnica de FAS incrementando la MOI y el tiempo de incubación.

Al analizar las muestras del experimento anterior nos dimos cuenta de que no se observaban prácticamente bacterias de EPECa adheridas a las células HEp-2, como habíamos determinado con base en las secuencias de las islas LEE que en efecto contenían todos los genes necesarios para la formación del pedestal, concluimos que no habíamos encontrado las condiciones óptimas para la formación de pedestales *in vitro*. Por lo que en este nuevo ensayo se decidió incrementar la MOI a 50 en vez de utilizar la MOI de 5-10 así como el tiempo de incubación a 6 horas. De las 18 EPECa analizadas en este ensayo 13 (72%) cepas formaron pedestales bajo estas condiciones.

7.11.3. Ensayo de FAS utilizando DMEM Advanced

Tal parecía que seguíamos sin encontrar las condiciones óptimas para que todas las cepas formaran pedestal a pesar de tener el LEE altamente conservado. En 2012 se reportó que la etanolamina, una molécula que está presente en el intestino, activa la expresión de la Isla LEE de la cepa de EHEC C 86-24, por lo que decidimos cambiar el medio de activación de LEE de DMEM HG a DMEM "Advanced" que contiene etanolamina y muchos otros nutrientes que no contiene DMEM HG. Al probar las 5 cepas de EPECa utilizando DMEM Advanced para la activación de LEE y las mismas MOI y tiempo de incubación del experimento anterior las 5 cepas formaron pedestales (Tabla 22).

Tabla 22. Estandarización de los ensayos de FAS. Se probaron diferentes condiciones de infección como tiempo, MOI, y cambios de medio de inducción de la expresión de LEE, hasta que observamos la formación de pedestales en todas las cepas probadas.

Numero de cepas	MOI	Tiempo de Infección (h)	DMEM	Numero de cepas que formaron pedestales
20	5	4.5	HG	2 (EPECt y <i>E. albertii</i>)
18	50	6	HG	13
5	50	6	HG- Advanced	5

Cabe mencionar, que a pesar de que pudimos ver la formación de pedestales al exponer a las células a una MOI alta de 50, la monocapa de células estaba muy frágil y dañada, de tal manera que decidimos evaluar, con las condiciones previamente estandarizadas, de FAS desarrollado utilizando células Caco-2.

7.11.4. Ensayo de FAS utilizando DMEM Advanced y células Caco-2 y determinación de citocinas producidas por estas células.

Por diversas razones nosotros estábamos muy interesados en desarrollar el ensayo de FAS con células Caco-2, puesto que son células epiteliales de intestino de un adenocarcinoma de colon y EPEC es un patógeno intestinal. Para determinar la MOI óptima para observar pedestales y menos daño en la monocapa las células Caco-2 Cbbe1 se incubaron con tres cepas diferentes de EPECa con una MOI de 25 y una MOI de 10, durante 6 horas de incubación. Observamos que la MOI de 10 permitía tanto la formación de pedestales los cuales se pudieron cuantificar y la monocapa no estaba dañada. Por lo que se probaron las 19 cepas de EPEC y la de *E. albertii* aisladas de pacientes utilizando la MOI de 10 y el una incubación de 6 horas (Tabla 22).

Una vez que retiramos el sobrenadante, teñimos las células, observamos que la distribución de los pedestales en las células no es uniforme, por lo que se tomaron en cuenta tres parámetros, el número de células con pedestal por cada 100 células, los pedestales por célula, y el promedio de pedestales por célula por cada 100 células (Tabla23).

Tabla 23. Formación y conteo de pedestales. Se contaron las células donde se observaron pedestales por 100 células en total, y cuantos pedestales se encontraron en promedio en estas células.

	Células con pedestal (100)	Pedestales por célula
11-336b	5	15
13-113a	6	20
11-129a	10	7
10-80c	12	26
13-141a	16	14
12- 51a	25	11
11-182a	100	7
11-313b	10	12
11-215a	18	12
12-306d	20	11
12-148c	28	3
13-202d	65	10
12-61b	94	25
12-255a	96	7
11-198a	100	Incontables
12- 56b	100	4
13-188c	100	Incontables
11-53a	100	Incontables
14-16b	42	3

7.12. Correlación entre las concentraciones de citocinas y el número de pedestales, células con pedestales y cuadro clínico.

Realizamos varias correlaciones entre la formación de los pedestales, la producción de citocinas con el cuadro clínico de los niños de dónde venían las cepas utilizadas en los ensayos. Con respecto al número de células y pedestales, se observó que las cepas que tuvieron más de 90 células con pedestales expresaron concentraciones más altas de IL-8 (0.04, Mann Whitney test). De manera interesante, las cepas provenientes de niños de casos moderados y graves presentaron concentraciones por arriba de 100 pg/mL ($p=0.0365$) comparada con las de los niños de casos leves.

8. DISCUSIÓN

Es importante resaltar que todas las cepas fueron previamente identificadas como EPEC, utilizando el gen *eaeA* (intimina) como marcador genético de la isla LEE, una vez que se tuvieron las secuencias, se validó que esta isla estaba completa. Además se demostró que todas las cepas son capaces de inducir la formación de pedestales lo que indica que todos los genes contenidos en esta isla se expresan y son funcionales. Resaltando la confiabilidad de los métodos moleculares basados en la búsqueda de genes específicos como marcadores genéticos (López-Saucedo *et al.*, 2003; Estrada-García *et al.*, 2005; Ochoa *et al.*, 2011; Kotloff *et al.*, 2013; Patzi-Vargas *et al.*, 2015), los cuales nos permiten identificar de manera rápida y económica patógenos en estudios epidemiológicos con un gran número de muestras.

EPEC típica (EPECt) está considerado un patógeno causante de diarrea desde los años 40 principalmente en niños ≤ 6 meses; mientras que EPEC atípica (EPECa) es un patógeno emergente causante de diarrea, sin embargo, en algunos estudios de casos y controles se han reportado prevalencias similares de EPECa en las heces de ambos grupos (Hu y Torres, 2015). Esta diferencias entre esto dos grupos de EPEC tal vez se deba a que las cepas de EPECt tienen un origen filogenético similar (Ingle *et al.*, 2016), mientras que las cepas de EPECa tienen orígenes filogenéticos diferentes, ya que se observan varios linajes y tal vez algunos de estos no sean virulentos (Ingle *et al.*, 2016). Las cepas de EPECa pueden haber surgido de varias maneras, ya sea cepas de *E. coli* que adquiriendo la isla LEE en diversas ocasiones a lo largo del tiempo así como provenir de cepas de EPECt o de EHEC que hayan perdido el plásmido BFP, o los bacteriófagos que codifican para las toxinas Shiga, respectivamente (Ingle *et al.*, 2016). El análisis que realizamos en este trabajo mostró, de que a pesar de que se han descrito al menos 72 sistemas de secreción tipo VI (T6SS) en *E. coli*, que todas las 14 cepas de EPECa que tuvieron un T6SS presentaban homologías del 95 al 98% solo con los T6SS de las cepas de referencia de EHEC O26:H11 11368 y EHEC O103:H2 12009 reportadas en la base de datos Secret6. Además 13 de las 14 cepas de EPECa T6SS positivas se aislaron de niños con diarrea y siete de estas cepas son las que constituyen el Clado I,b que tienen el mismo linaje y subgrupo de LEE (linaje 2, subgrupo 8) y todas tuvieron una similitud del 98% con el T6SS de EHEC O26:H11 11368. Estos datos sugieren estas cepas provienen de cepas de EHEC. Ambos serogrupos de EHEC O26 y O103 están asociados con diarrea y síndrome urémico hemolítico (Varela *et al.*, 2015).

Además 5 de las 7 cepas de este clado se aislaron de casos moderados así como la única cepa aislada (1419b) de un caso grave y también pertenecen a este clado 4 de las 5 cepas aisladas de niños ≤ 6 meses incluidas en el estudio. Sugiriendo que las cepas de EPECa del Clado I,b son cepas con genotipos virulentos y que infectan principalmente a niños de ≤ 6 meses como las cepas de EPECt.

Al analizar las 24 cepas utilizando la clasificación de linajes y grupos para EPEC descritos (Ingle *et al.*, 2016), con base en la secuencia de siete genes contenidos en la isla LEE, dos cepas de EPECa no pertenecieron a ningún linaje o subgrupo, sin embargo, las pudimos clasificar cuando se realizó el árbol filogenético utilizando la secuencia completa de la isla LEE utilizando el programa VAMPhyRE, el cual como se muestra en la Figura 7 permitió agrupar a las cepas en cinco clados y clasificar a las 2 cepas de EPECa. Por lo que sugerimos utilizar los dos métodos para clasificar a las cepas de EPEC.

Los clados II y III contienen 2 y 3 cepas, respectivamente, las 5 cepas pertenecen al linaje 3, las del clado II al subgrupo 11a y las del clado III subgrupo 10. Con respecto a los genes de patogenicidad identificados en estos dos clados encontramos que el 100% de las cepas contiene al menos un gen que codifica para alguna toxina el 80% de las cepas fueron positivas para el gen *nleA* (80%). Mientras que Ingle *et al.*, 2016, identificaron el gen *nleA* solo en el 35% de las cepas de las cepas del linaje 3, pero en este trabajo agruparon sin distinción tanto cepas de EPEC de casos como de niños asintomáticos. Las dos cepas del clado II tuvieron los genes *nleE*, *nleB1* y *nleD* y las tres cepas del clado III los genes *nleB2* y *nleC*; todos estos genes codifican para factores involucrados en la inhibición de la respuesta inmune y la muerte celular, tal vez esto les confiera virulencia a estas cepas ya que todas estas cepas fueron aisladas de niños con diarrea. Sin embargo, ningún estudio previo ha realizado búsqueda de estos genes en cepas de EPEC o EHEC aisladas de niños con diarrea por lo que desconocemos su prevalencia en otras cepas.

El clado IV fue el más heterogéneo, aunque todas las cepas forman parte del linaje 3, pertenecen a diferentes subgrupos, en este linaje se encuentran las cuatro cepas de los niños asintomáticos, de manera similar esto se observó al clasificar las cepas EPEC del estudio de GEMS (Ingle *et al.* 2016). Todas estas cepas tienen menos efectores asociados con la inhibición de la respuesta inmune y la muerte celular (Santos y Finlay, 2015) Ninguna de las cepas de asintomáticos contiene al gen *nleA* el cual fue muy prevalente en las cepas de EPEC que aislamos de casos de diarrea. Cabe mencionar que en este estudio describimos por primera vez la presencia del gen *iss* en cepas de EPEC, el cual

codifica para un inhibidor de complemento y este gen solo se identificó en cepas aisladas de niños con diarrea. Varios de los genes asociados con las cepas virulentas de EPEC son efectores que inhiben la casca del complemento el cual como se sabe juega un papel muy importante en la eliminación de bacterias patógenos no invasivas del lumen intestinal (Belzer *et al.*, 2011). Esto se ha demostrado en el modelo de infección de *C. rodentium*, otra bacteria de la familia A/E, en ratones ya que en la resolución de la infección se observó que la molécula del complemento C3b e IgG, la cual fija complemento, son indispensables para la resolución de la infección (Belzer *et al.*, 2011).

Con el fin de determinar la prevalencia de los genes identificados en las cepas de EPEC asociadas a diarrea decidimos evaluar una batería de genes de patogenicidad (toxinas, efectores asociados a la inhibición de la respuesta inmune y la muerte celular) en la colección de cepas de EPEC del laboratorio incluimos en total 28 cepas de casos y 38 de niños asintomáticos. Observamos nuevamente que gen *nleA*, al igual que en las cepas secuenciadas de diarrea, fue el más prevalente en las cepas de EPEC de niños con diarrea. Además identificamos otro gen también significativamente presente en niños con diarrea *nleH1*, el cual no mostro una asociación significativa con las cepas secuenciadas aisladas de caso de diarrea, tal vez porque el número de cepas de niños asintomáticos es muy pequeño. Esta es la primera vez que se reporta la asocian el gen *nleA* y *nleH1* con cepas de EPECa aislados de niños con diarrea. En un estudio donde se buscó la prevalencia del gen *nleA* en una colección de cepas de EHEC y EPEC de casos y controles, se reportó que éste fue más prevalente en cepas de EHEC aisladas de casos de síndrome urémico hemolítico, mientras que no se observó ninguna asociación con cepas de EPEC (Mundy *et al* 2004) y en otro estudio donde comparan los genes de efectores entre cepas de EPECt y EPECa se encontró que *nleA* estaba asociado a las cepas de niños con diarrea de EPECt (Salvador *et al.*, 2014). Tanto *NleA* como *NleH1* son efectores que están asociados con la inhibición de la respuesta inmune: *NleA* inhibe la formación del inflammasoma tipo NLRP3 y *NleH1* se une a la proteína RPS3 que está asociada al complejo de transcripción de NFkB inhibiendo la producción de citocinas (Santos y Finlay, 2015) y también actúa sobre la vía de las cinasas ERK 1/2 y p38 por un mecanismo no bien dilucidado (Pham *et al.*, 2013) Nuestro ensayo de producción de citocinas por células Caco-2 infectadas con todas estas cepas corroboró que en efecto las células infectadas con cepas aisladas de niños con diarrea producen significativamente menos IL6 que las células Caco-2 infectadas con las cepas de los niños asintomáticos. Estudios en donde se muta el gen de *nleH* en las cepas referencia de EPECt E2348/69 y *C. rodentium*, muestran que estas cepas

incrementan la producción de citocinas, comparado con las cepas infectadas con las cepas silvestres (Hemrajani *et al.*, 2008)

Al realizar las comparaciones entre la carga de EPEC encontrada en las heces de los niños, de donde se aislaron estas cepas, se observó que los niños de donde provienen las cepas del clado I presentaban cargas de EPEC significativamente más altas que los niños de los otros clados. Esta elevada carga de EPEC en las heces de estos niños asocia de manera significativa también con la presencia en estas cepas de islas de patogenicidad (PAI O122, PP2: *espJ*, *nleG2-2*, *cif*, *nleH1-1* y la isla *nleA-nleG2-2* descrita por primera vez en este trabajo: proteína hipotética, *nleA*, *nleG2-2*), que albergan genes asociados a la inhibición de la respuesta inmune y muerte celular, así como con el gen *iss* involucrado en inhibir la cascada de complemento. Como mencionamos anteriormente en las cepas de este clado I,b es donde encontramos una prevalencia significativamente mayor del T6SS con respecto a las cepas de los otros clados

Se ha demostrado que *lifA/efa1*, que se encuentra en la isla PAI O122, se ha asociado a altas cargas bacterianas de EPEC en pacientes con diarrea (Slinger *et al.*, 2017). Además, se ha demostrado que la proteína LifA de EHEC y de *C. rodentium* está involucrada en la colonización bacteriana del intestino de bovinos y de ratones, respectivamente (Stevens *et al.*, 2002; Klapproth *et al.*, 2005). Otro efector codificado en la isla PAI O122, que se ha asociado a la carga bacteriana ha sido NleE, al infectar ratones con mutantes de *C. rodentium* de *nleE*, se observó que estos ratones tenían cargas bacterianas intestinales significativamente menores que las de los ratones infectados con *C. rodentium* silvestre (Wickham *et al.*, 2007). Se ha demostrado que NleE inhibe la translocación de NFκB, metilando las proteínas TAB2 y TAB3 inactivando la vía la ubiquitinación del *ikbB*, por ende inhibiendo la síntesis de citocinas involucradas en la respuesta inmune innata (Wickham *et al.*, 2007; Pham *et al.*, 2013). Además experimentos independientes han mostrado que la expresión de las proteínas NleA y NleB incrementan la capacidad de colonización intestinal de *C. rodentium* (Kelly *et al.*, 2006; Gruenheid *et al.*, 2004) y nosotros encontramos que el gen *nleA* está en la nueva isla *nleA-nleG2-2*, y el gen *nleB* en la PAI O122, por lo que es posible que en nuestras cepas los productos de estos genes estén participando en el incremento de la carga bacteriana. Hasta el momento se ha descrito que NleA inhibe la formación del inflamasoma y NleB la translocación de NFκB cuya consecuencia es la inhibición de la producción de citocinas involucradas en la respuesta inmune innata (Santos y Finlay, 2015). Además, se ha hipotetizado que las ciclomodulinas, familia a la que pertenece el efector Cif,

codificado en isla PP2, modulan la muerte celular para disminuir el recambio celular y que se establezca mejor la infección (Samba-Louaka *et al.*, 2009) y se ha demostrado que estas moléculas también afectan la relocalización a la zona apical de la perforina-2, la cual es una molécula importante en la resolución de infecciones de bacterias no invasivas, ya que producen poros en la pared de las bacterias (McCormack *et al.*, 2015).

El sistema T6SS es un sistema que transloca moléculas tanto a célula eucariontes como a bacterias (Sana, Lugo y Monack, 2017) y se ha demostrado que los efectores que transloca este sistema eliminan a las bacterias que no contienen un T6SS. El papel de este sistema en la colonización bacteriana se basa en las observaciones de que mutantes de T6SS de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium y de *Shigella* muestran una colonización menor del intestino de ratones con microbiota integra, mientras que no se observó una disminución en la colonización de estos patógenos mutados en animales sin microbiota (Sana *et al.*, 2016; Anderson *et al.*, 2017). Por otro lado se ha sugerido que el T6SS participa en la conformación de la microbiota intestinal ya que los T6SS también se han descrito en bacterias comensales (Verster *et al.*, 2017).

En nuestro trabajo se asoció significativamente la presencia del T6SS en las cepas de EPEC aisladas de pacientes con un mayor número de evacuaciones por día, con una duración mayor del episodio de diarrea (días) y con una mayor severidad del caso. Se ha reportado la asociación de cepas de *Campylobacter jejuni* que contienen un T6SS con cuadros de diarrea con sangre (Lertpiriyapong *et al.*, 2012). Al realizar un estudio de transcriptómica de cepas de STEC aisladas de niños con varios cuadros clínicos, se observó que las cepas que expresaron a la alta las proteínas del T6SS, habían sido más frecuentemente aisladas de niños con Síndrome Urémico Hemolítico (Ås *et al.*, 2018).

Los resultados de la secuenciación nos mostraron que una de las cepas obtenidas de un caso de una niña con diarrea, identificada originalmente como EPEC era en realidad una cepa de *Escherichia albertii*, hasta donde tenemos conocimiento este es el primer reporte de una cepa de *E. albertii* obtenida de un caso de diarrea en México. La baja prevalencia de *E. albertii* en casos de diarrea tal vez se deba a que es imposible distinguirla por pruebas bioquímicas de *E. coli* y hasta muy recientemente no se habían identificado marcadores genéticos específicos (Hyma *et al.*, 2005; Lindsey *et al.*, 2015; Ooka *et al.*, 2015). También tradicionalmente seleccionamos a *E. coli* de cultivos de heces con base en que son fermentadoras de lactosa y se ha observado que las cepas de *E. albertii* en su mayoría son lactosa negativas. Además estudios en donde se ha realizado la búsqueda de *E. albertii*

en ceparios de *E. coli* se ha mostrado que su prevalencia es muy baja, pero esto se debe en gran parte a que estos ceparios contienen en su mayoría cepas de *E. coli* (lactosa positiva) y solo algunas cepas de *E. albertii* son fermentadoras de lactosa (Ooka *et al.*, 2012). La importancia de seleccionar cepas lactosa negativas quedo claro al describir un brote en Japón debido a una “EPEC” lactosa negativa y la identificación de casos de diarrea debidos a “EPEC” lactosa negativas (Asoshima *et al.*, 2014). Por lo que decidieron analizar nuevamente a estas cepas por secuenciación masiva determinando que la cepa del brote y otras en realidad eran *E. albertii* (Asoshima *et al.*, 2014). Sin embargo, no fue hasta 2017 que Lindsay *et al.*, desarrollaron una PCR multiplex que permite diferenciar entre *E. coli*, *E. albertii* y *E. fergusonii* el cual es un método barato y rápido. Los análisis también han mostrado la alta homología entre los genes que componen la isla LEE de EPEC y EHEC con los de *E. albertii* por lo que es fácil confundirlas con cepas de EPECa. La cepa que nosotros identificamos como una *E. albertii* es lactosa negativa y fue seleccionada porque en este estudio de biomarcadores nosotros queríamos identificar cepas de *E. coli* enteroinvasora que el 40% son cepas lactosa negativas. Nosotros confirmamos que esta era una cepa de *E. albertii* por secuenciación y PCR *in silico* utilizando los iniciadores descritos para *eaeA*, como marcador de la presencia de las Isla LEE, con la que presenta una homología del 95% con el gen *eaeA* de EPEC. Además se encontraron genes de patogenicidad no codificados por LEE y de manera importante la PAI 0122 la cual se ha asociado a la patogenicidad de EPEC y EHEC (Afset *et al.*, 2006; Vieira *et al.*, 2010; Mercado *et al.*, 2016).

9. CONCLUSIONES

Los métodos de detección molecular de patógenos basados en la búsqueda de genes específicos como marcadores genéticos son altamente confiables.

Las cepas de EPEC tienen una gran variabilidad genética, sin embargo, parece haber clados claramente asociados a los cuadros con diarrea y su severidad.

Encontramos genes que potencialmente pueden utilizarse como marcadores genéticos de cepas virulentas, principalmente asociados a la inhibición de la respuesta inmune innata.

La competencia con las bacterias residentes del intestino por medio del T6SS parece tener un impacto en la colonización de EPEC, en la duración del episodio de diarrea y en la severidad del cuadro clínico.

Las condiciones nutricionales que permiten la inducción de pedestales en todas las cepas de EPEC son diferentes a las reportadas para las cepas de referencia de EPECt y EPECa.

10. PERSPECTIVAS

Determinar la distribución de los genes que encontramos asociados a la inhibición de las vías del complemento, por PCR de punto final.

Diseñar protocolos de PCR de punto final para determinar la prevalencia en un mayor número de cepas, de otros genes de efectores como *cif* y *nleF*, que se encontraron con mayor prevalencia en las cepas secuenciadas de niños con diarrea.

Diseñar protocolos de PCR de punto final que nos permitan identificar particularmente el locus de T6SS que encontramos asociado al cuadro clínico, para determinar la prevalencia de este sistema en un mayor número de cepas.

Diseñar protocolos de biología molecular que nos permitan discriminar entre los diferentes linajes y subgrupos sin necesidad de obtener las secuencias completas de la isla LEE.

Realizar la búsqueda intencionada de cepas de *Escherichia albertii*, en la colección de cepas del laboratorio, sobre todo en *E. coli* lactosa negativas.

11. REFERENCIAS

- Abbott, S. L. *et al.* (2003) "Biochemical properties of a newly described *Escherichia* species, *Escherichia albertii*", *Journal of clinical microbiology*. Am Soc Microbiol, 41(10), pp. 4852–4854.
- Abby, S. S. y Rocha, E. P. C. (2017) "Identification of protein secretion systems in bacterial genomes using MacSyFinder", *Bacterial Protein Secretion Systems: Methods and Protocols*. Springer, pp. 1–21.
- Afset, J. E. *et al.* (2006) "Identification of virulence genes linked with diarrhea due to atypical enteropathogenic *Escherichia coli* by DNA microarray analysis and PCR", *Journal of Clinical Microbiology*. doi: 10.1128/JCM.00429-06.
- Afset, J. E., Bergh, K. y Bevanger, L. (2003) "High prevalence of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) in Norwegian children with diarrhoea", *Journal of medical microbiology*. Microbiology Society, 52(11), pp. 1015–1019.
- Al-Gallas, N. *et al.* (2007) "Etiology of acute diarrhea in children and adults in Tunis, Tunisia, with emphasis on diarrheagenic *Escherichia coli*: prevalence, phenotyping, and molecular epidemiology", *The American journal of tropical medicine and hygiene*. ASTMH, 77(3), pp. 571–582.
- Alto, N. M. *et al.* (2006) "Identification of a bacterial type III effector family with G protein mimicry functions", *Cell*. Elsevier, 124(1), pp. 133–145.
- Anderson, M. C. *et al.* (2017) "*Shigella sonnei* encodes a functional T6SS used for interbacterial competition and niche occupancy", *Cell host & microbe*. Elsevier, 21(6), pp. 769–776.
- Araujo, J. M. *et al.* (2007) "Typical enteroaggregative and atypical enteropathogenic types of *Escherichia coli* are the most prevalent diarrhea-associated pathotypes among Brazilian children", *Journal of Clinical Microbiology*. doi: 10.1128/JCM.00084-07.
- Ås, C. G. *et al.* (2018) "Comparative Transcriptome Profiling Reveals a Potential Role of Type VI Secretion System and Fimbriae in Virulence of Non-O157 Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli*", *Frontiers in microbiology*. Frontiers, 9, p. 1416.

- Asoshima, N. *et al.* (2014) "Identification of *Escherichia albertii* as a causative agent of a food-borne outbreak occurred in 2003", *Japanese journal of infectious diseases*. National Institute of Infectious Diseases, Japanese Journal of Infectious ..., 67(2), pp. 139–140.
- Baldini, M. M., Nataro, J. P. y Kaper, J. B. (1986) "Localization of a determinant for HEp-2 adherence by enteropathogenic *Escherichia coli*.", *Infection and immunity*. Am Soc Microbiol, 52(1), pp. 334–336.
- Belzer, C. *et al.* (2011) "The role of specific IgG and complement in combating a primary mucosal infection of the gut epithelium", *European Journal of Microbiology and Immunology*. Akadémiai Kiadó, co-published with Springer Science+ Business Media BV ..., 1(4), pp. 311–318.
- Bokete, T. N. *et al.* (1997) "Genetic and phenotypic analysis of *Escherichia coli* with enteropathogenic characteristics isolated from Seattle children", *The Journal of infectious diseases*. Infectious Diseases Society of America, 175(6), pp. 1382–1389.
- Burkinshaw, B. J. y Strynadka, N. C. J. (2014) "Assembly and structure of the T3SS", *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*. Elsevier, 1843(8), pp. 1649–1663.
- Campellone, K. G. y Leong, J. M. (2003) "Tails of two Tirs: actin pedestal formation by enteropathogenic *E. coli* and enterohemorrhagic *E. coli* O157: H7", *Current opinion in microbiology*. Elsevier, 6(1), pp. 82–90.
- Canizalez-Roman, A. *et al.* (2016) "Surveillance of Diarrheagenic *Escherichia Coli* strains isolated from diarrhea cases from children, adults and elderly at northwest of Mexico", *Frontiers in microbiology*. Frontiers, 7, p. 1924.
- Caron, E. *et al.* (2006) "Subversion of actin dynamics by EPEC and EHEC", *Current opinion in microbiology*. Elsevier, 9(1), pp. 40–45.
- Clausen, P. T. L. C. *et al.* (2016) "Benchmarking of methods for identification of antimicrobial resistance genes in bacterial whole genome data", *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. Oxford University Press, 71(9), pp. 2484–2488.
- Cravioto, A. *et al.* (1979) "An adhesive factor found in strains of *Escherichia coli* belonging to the traditional infantile enteropathogenic serotypes", *Current Microbiology*. Springer, 3(2), pp. 95–99.

Dautin, N. (2010) "Serine protease autotransporters of *Enterobacteriaceae* (SPATEs): Biogenesis and function", *Toxins*. doi: 10.3390/toxins2061179.

DeBerg, H. A. *et al.* (2018) "Shared and organism-specific host responses to childhood diarrheal diseases revealed by whole blood transcript profiling", *PLoS one*. Public Library of Science, 13(1), p. e0192082.

Deborah Chen, H. y Frankel, G. (2005) "Enteropathogenic *Escherichia coli*: unravelling pathogenesis", *FEMS microbiology reviews*. Blackwell Publishing Ltd Oxford, UK, 29(1), pp. 83–98.

Dhillon, B. K. *et al.* (2015) "IslandViewer 3: more flexible, interactive genomic island discovery, visualization and analysis", *Nucleic acids research*. Oxford University Press, 43(W1), pp. W104–W108.

Elliott, S. J. *et al.* (2001) "EspG, a novel type III system-secreted protein from enteropathogenic *Escherichia coli* with similarities to VirA of *Shigella flexneri*", *Infection and immunity*. Am Soc Microbiol, 69(6), pp. 4027–4033.

Estrada-Garcia, T. *et al.* (2009) "Association of diarrheagenic *Escherichia coli* pathotypes with infection and diarrhea among Mexican children and association of atypical enteropathogenic *E. coli* with acute diarrhea", *Journal of clinical microbiology*. Am Soc Microbiol, 47(1), pp. 93–98.

Estrada-García, T. *et al.* (2005) "Drug-resistant diarrheagenic *Escherichia coli*, Mexico", *Emerging infectious diseases*. Centers for Disease Control and Prevention, 11(8), p. 1306.

Fa??s, T. *et al.* (2016) "Impact of CDT toxin on human diseases", *Toxins*. doi: 10.3390/toxins8070220.

Franzolin, M. R. *et al.* (2005) "Prevalence of diarrheagenic *Escherichia coli* in children with diarrhea in Salvador, Bahia, Brazil", *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. SciELO Brasil, 100(4), pp. 359–363.

Gaytán, M. O. *et al.* (2016) "Type three secretion system in attaching and effacing pathogens", *Frontiers in cellular and infection microbiology*. Frontiers, 6, p. 129.

Giron, J. A., Ho, A. S. y Schoolnik, G. K. (1991) "An inducible bundle-forming pilus of enteropathogenic *Escherichia coli*", *Science*. American Association for the Advancement of Science, 254(5032), pp. 710–713.

- Glotfelty, L. G. *et al.* (2014) "Enteropathogenic *E. coli* effectors EspG1/G2 disrupt microtubules, contribute to tight junction perturbation and inhibit restoration", *Cellular microbiology*. Wiley Online Library, 16(12), pp. 1767–1783.
- Grillova, L. *et al.* (2017) "Characterization of four *Escherichia albertii* isolates collected from animals living in Antarctica and Patagonia", *Journal of Veterinary Medical Science*. Japanese Society of Veterinary Science, pp. 17–492.
- Hacker, J. y Kaper, J. B. (2000) "Pathogenicity islands and the evolution of microbes", *Annual Reviews in Microbiology*. Annual Reviews 4139 El Camino Way, PO Box 10139, Palo Alto, CA 94303-0139, USA, 54(1), pp. 641–679.
- Hayashi, T. *et al.* (2001) "Complete genome sequence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157: H7 and genomic comparison with a laboratory strain K-12", *DNA research*. Oxford University Press, 8(1), pp. 11–22.
- Hazen, T. H. *et al.* (2016) "Genomic diversity of EPEC associated with clinical presentations of differing severity", *Nature microbiology*. Nature Publishing Group, 1(2), p. 15014.
- Hemrajani, C. *et al.* (2008) "Role of NleH, a type III secreted effector from attaching and effacing pathogens, in colonization of the bovine, ovine, and murine gut", *Infection and immunity*. Am Soc Microbiol, 76(11), pp. 4804–4813.
- Hernandes, R. T. *et al.* (2009) "An overview of atypical enteropathogenic *Escherichia coli*", *FEMS Microbiology Letters*. doi: 10.1111/j.1574-6968.2009.01664.x.
- Hews, C. L. *et al.* (2017) "The StcE metalloprotease of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* reduces the inner mucus layer and promotes adherence to human colonic epithelium *ex vivo*", *Cellular microbiology*. Wiley Online Library, 19(6), p. e12717.
- Hu, J. y Torres, A. G. (2015) "Enteropathogenic *Escherichia coli*: foe or innocent bystander?", *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. doi: 10.1016/j.cmi.2015.01.015.
- Huang, Z. *et al.* (2009) "Structural insights into host GTPase isoform selection by a family of bacterial GEF mimics", *Nature structural & molecular biology*. Nature Publishing Group, 16(8), p. 853.

- Hyma, K. E. *et al.* (2005) "Evolutionary genetics of a new pathogenic *Escherichia* species: *Escherichia albertii* and related *Shigella boydii* strains", *Journal of bacteriology*. Am Soc Microbiol, 187(2), pp. 619–628.
- Iguchi, A. *et al.* (2009) "Complete genome sequence and comparative genome analysis of enteropathogenic *Escherichia coli* O127: H6 strain E2348/69", *Journal of Bacteriology*. Am Soc Microbiol, 191(1), pp. 347–354.
- Iizumi, Y. *et al.* (2007) "The enteropathogenic *E. coli* effector EspB facilitates microvillus effacing and antiphagocytosis by inhibiting myosin function", *Cell host & microbe*. Elsevier, 2(6), pp. 383–392.
- Ingle, D. J. *et al.* (2016) "Evolution of atypical enteropathogenic *E. coli* by repeated acquisition of LEE pathogenicity island variants", *Nature microbiology*. Nature Publishing Group, 1(2), p. 15010.
- Jaimes-Díaz, H. *et al.* (2011) "Bacterial classification using genomic fingerprints obtained by virtual hybridization", *Journal of microbiological methods*. Elsevier, 87(3), pp. 286–294.
- Jarvis, K. G. *et al.* (1995) "Enteropathogenic *Escherichia coli* contains a putative type III secretion system necessary for the export of proteins involved in attaching and effacing lesion formation.", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. doi: 10.1073/pnas.92.17.7996.
- Jores, J., Rumer, L. y Wieler, L. H. (2004) "Impact of the locus of enterocyte effacement pathogenicity island on the evolution of pathogenic *Escherichia coli*", *International Journal of Medical Microbiology*. Elsevier, 294(2–3), pp. 103–113.
- Kaper, J. B. (1998) "EPEC delivers the goods", *Trends in microbiology*. Elsevier, 6(5), pp. 169–172.
- Kaper, J. B., Nataro, J. P. y Mobley, H. L. T. (2004) "Pathogenic *escherichia coli*", *Nature reviews microbiology*. Nature Publishing Group, 2(2), p. 123.
- Kenny, B. *et al.* (2002) "Co-ordinate regulation of distinct host cell signalling pathways by multifunctional enteropathogenic *Escherichia coli* effector molecules", *Molecular microbiology*. Wiley Online Library, 44(4), pp. 1095–1107.
- Kenny, B. y Jepson, M. (2000) "Targeting of an enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) effector protein to host mitochondria", *Cellular microbiology*. Wiley Online Library, 2(6), pp. 579–590.

- Kim, J. H. *et al.* (2009) "Detection of cytolethal distending toxin and other virulence characteristics of enteropathogenic *Escherichia coli* isolates from diarrheal patients in republic of Korea", *Journal of Microbiology and Biotechnology*. doi: 10.4014/jmb.0801.033.
- Klapproth, J.-M. A. *et al.* (2005) "*Citrobacter rodentium* *lifA/efa1* is essential for colonic colonization and crypt cell hyperplasia in vivo", *Infection and immunity*. Am Soc Microbiol, 73(3), pp. 1441–1451.
- Knutton, S., Lloyd, D. R. y McNEISH, A. S. (1987) "Adhesion of enteropathogenic *Escherichia coli* to human intestinal enterocytes and cultured human intestinal mucosa.", *Infection and immunity*. Am Soc Microbiol, 55(1), pp. 69–77.
- Kotloff, K. L. *et al.* (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", *www.thelancet.com*.
- Lai, Y. *et al.* (2013) "Intimate host attachment: enteropathogenic and enterohaemorrhagic *E scherichia coli*", *Cellular microbiology*. Wiley Online Library, 15(11), pp. 1796–1808.
- Lertpiriyapong, K. *et al.* (2012) "Campylobacter jejuni type VI secretion system: roles in adaptation to deoxycholic acid, host cell adherence, invasion, and in vivo colonization", *PLoS One*. Public Library of Science, 7(8), p. e42842.
- Lindsey, R. L. *et al.* (2015) "Evaluating the occurrence of *Escherichia albertii* in chicken carcass rinses by PCR, Vitek analysis, and sequencing of the *rpoB* gene", *Applied and environmental microbiology*. Am Soc Microbiol, 81(5), pp. 1727–1734.
- López-Saucedo, C. *et al.* (2003) "Single multiplex polymerase chain reaction to detect diverse loci associated with diarrheagenic *Escherichia coli*", *Emerging infectious diseases*. Centers for Disease Control and Prevention, 9(1), p. 127.
- Marques, L. R. M. *et al.* (2003) "Search for cytolethal distending toxin production among fecal *Escherichia coli* isolates from Brazilian children with diarrhea and without diarrhea", *Journal of Clinical Microbiology*.
- McConnell, M. M. *et al.* (1989) "Properties of adherence factor plasmids of enteropathogenic *Escherichia coli* and the effect of host strain on expression of adherence to HEp-2 cells", *Microbiology*. Microbiology Society, 135(5), pp. 1123–1134.

- McCormack, R. M. *et al.* (2015) "Enteric pathogens deploy cell cycle inhibiting factors to block the bactericidal activity of Perforin-2", *Elife*. eLife Sciences Publications Limited, 4, p. e06505.
- Mercado, E. H. *et al.* (2016) "Pathogenicity island O-122 in enteropathogenic *Escherichia coli* strains is associated with diarrhea severity in children from Lima Peru", *International Journal of Medical Microbiology*. Elsevier, 306(4), pp. 231–236.
- Meza-Segura, M. (2017) *No Title*.
- Moon, H. W. *et al.* (1983) "Attaching and effacing activities of rabbit and human enteropathogenic *Escherichia coli* in pig and rabbit intestines", *Infection and Immunity*.
- Moran-García, N. (2013) *No Title*.
- Muñoz-Ramírez, Z. Y. *et al.* (2017a) "Whole Genome Sequence and Phylogenetic Analysis Show *Helicobacter pylori* Strains from Latin America Have Followed a Unique Evolution Pathway", *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. Frontiers, 7, p. 50. doi: 10.3389/fcimb.2017.00050.
- Muñoz-Ramírez, Z. Y. *et al.* (2017b) "Whole Genome Sequence and Phylogenetic Analysis Show *Helicobacter pylori* Strains from Latin America Have Followed a Unique Evolution Pathway", *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 7. doi: 10.3389/fcimb.2017.00050.
- Nataro, J. y Kaper, J. (1998) "Diarrheagenic *Escherichia coli*.", *Clinical microbiology reviews*.
- Navarro, A. y Estrada-Garcia, T. (2010) "Epidemiology of diarrheagenic *Escherichia coli* pathotypes in Mexico, past and present", *Pathogenic Escherichia coli, Latin America*, pp. 191–208.
- Nguyen, T. V. *et al.* (2005) "Detection and characterization of diarrheagenic *Escherichia coli* from young children in Hanoi, Vietnam", *Journal of clinical microbiology*. Am Soc Microbiol, 43(2), pp. 755–760.
- Nimri, L. F. (2013) "*Escherichia albertii*, a newly emerging enteric pathogen with poorly defined properties", *Diagnostic microbiology and infectious disease*. Elsevier, 77(2), pp. 91–95.
- Nougayrède, J. y Donnenberg, M. S. (2004) "Enteropathogenic *Escherichia coli* EspF is targeted to mitochondria and is required to initiate the mitochondrial death pathway", *Cellular microbiology*. Wiley Online Library, 6(11), pp. 1097–1111.
- Ochoa J., T. y Contreras A., C. (2011) "Enteropathogenic *Escherichia coli* infection in children",

Current opinion in infectious diseases. doi: 10.1097/QCO.0b013e32834a8b8b.

Ochoa, T. J. *et al.* (2008) "New insights into the epidemiology of enteropathogenic *Escherichia coli* infection", *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. doi: 10.1016/j.trstmh.2008.03.017.

Ochoa, T. J. *et al.* (2011) "[Frequency and pathotypes of diarrheagenic *Escherichia coli* in Peruvian children with and without diarrhea].", *Frecuencia y patotipos de Escherichia coli diarrogenicas en ninos peruanos con y sin diarrea*.

Ooka, T. *et al.* (2012) "Clinical significance of *Escherichia albertii*", *Emerging infectious diseases*. Centers for Disease Control and Prevention, 18(3), p. 488.

Ooka, T. *et al.* (2013) "Human gastroenteritis outbreak associated with *Escherichia albertii*, Japan", *Emerging infectious diseases*. Centers for Disease Control and Prevention, 19(1), p. 144.

Ooka, T. *et al.* (2015) "Defining the genome features of *Escherichia albertii*, an emerging enteropathogen closely related to *Escherichia coli*", *Genome biology and evolution*. Oxford University Press, 7(12), pp. 3170–3179.

Patzi-Vargas, S. *et al.* (2015) "Diarrheagenic *Escherichia coli* Carrying Supplementary Virulence Genes Are an Important Cause of Moderate to Severe Diarrhoeal Disease in Mexico", *PLoS Neglected Tropical Diseases*. doi: 10.1371/journal.pntd.0003510.

Pham, T. H. *et al.* (2013) "*Escherichia coli* virulence protein NleH1 interaction with the v-Crk sarcoma virus CT10 oncogene-like protein (CRKL) governs NleH1 inhibition of the ribosomal protein S3 (RPS3)/nuclear factor κ B (NF- κ B) pathway", *Journal of Biological Chemistry*. doi: 10.1074/jbc.M113.512376.

Ramamurthy, S. *et al.* (2018) "759-Dissection of the Contributions of Enteropathogenic *Escherichia Coli* Secreted Effector Protein ESPZ to Virulence", *Gastroenterology*. Elsevier, 154(6), p. S-161.

Rappelli, P. *et al.* (2005) "Pathogenic enteric *Escherichia coli* in children with and without diarrhea in Maputo, Mozambique", *FEMS Immunology & Medical Microbiology*. Blackwell Publishing Ltd Oxford, UK, 43(1), pp. 67–72.

Ratchtrachenchai, O.-A. *et al.* (2004) "Prevalence of childhood diarrhoea-associated *Escherichia coli*

- in Thailand”, *Journal of medical microbiology*. Microbiology Society, 53(3), pp. 237–243.
- Richardson, V. *et al.* (2010) “Effect of rotavirus vaccination on death from childhood diarrhea in Mexico”, *New England Journal of Medicine*. Mass Medical Soc, 362(4), pp. 299–305.
- Salvador, F. A. *et al.* (2014) “Distribution of non-LEE-encoded type 3 secretion system dependent effectors in enteropathogenic *Escherichia coli*”, *Brazilian Journal of Microbiology*. SciELO Brasil, 45(3), pp. 851–855.
- Samba-Louaka, A. *et al.* (2009) “The enteropathogenic *Escherichia coli* effector Cif induces delayed apoptosis in epithelial cells”, *Infection and immunity*. Am Soc Microbiol, 77(12), pp. 5471–5477.
- Sana, T. G. *et al.* (2016) “Salmonella Typhimurium utilizes a T6SS-mediated antibacterial weapon to establish in the host gut”, *Proceedings of the National Academy of Sciences*. National Acad Sciences, 113(34), pp. E5044–E5051.
- Sana, T. G., Lugo, K. A. y Monack, D. M. (2017) “T6SS: The bacterial "fight club" in the host gut”, *PLoS pathogens*. Public Library of Science, 13(6), p. e1006325.
- Santos, A. S. y Finlay, B. B. (2015) “Bringing down the host: enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli* effector-mediated subversion of host innate immune pathways”, *Cellular microbiology*. Wiley Online Library, 17(3), pp. 318–332.
- Sarantuya, J. *et al.* (2004) “Typical enteroaggregative *Escherichia coli* is the most prevalent pathotype among *E. coli* strains causing diarrhea in Mongolian children”, *Journal of clinical microbiology*. Am Soc Microbiol, 42(1), pp. 133–139.
- Scaletsky, I. C. A. *et al.* (2002) “Diffusely adherent *Escherichia coli* as a cause of acute diarrhea in young children in Northeast Brazil: a case-control study”, *Journal of clinical microbiology*. Am Soc Microbiol, 40(2), pp. 645–648.
- Seemann, T. (2014) “Prokka: rapid prokaryotic genome annotation”, *Bioinformatics*. Oxford University Press, 30(14), pp. 2068–2069.
- Singh, A. P. *et al.* (2018) “Enteropathogenic *E. coli* effectors EspF and Map independently disrupt tight junctions through distinct mechanisms involving transcriptional and post-transcriptional regulation”, *Scientific reports*. Nature Publishing Group, 8(1), p. 3719.

Slinger, R. *et al.* (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”, *Annals of clinical microbiology and antimicrobials*. BioMed Central, 16(1), p. 16.

Stevens, M. P. *et al.* (2002) “Efa1 influences colonization of the bovine intestine by Shiga toxin-producing *Escherichia coli* serotypes O5 and O111”, *Infection and immunity*. Am Soc Microbiol, 70(9), pp. 5158–5166.

Tobe, T. *et al.* (2006) “An extensive repertoire of type III secretion effectors in *Escherichia coli* O157 and the role of lambdoid phages in their dissemination”, *Proceedings of the National Academy of Sciences*. National Acad Sciences, 103(40), pp. 14941–14946.

Varela, G. *et al.* (2015) “Enteropathogens associated with acute diarrhea in children from households with high socioeconomic level in uruguay”, *International Journal of Microbiology*, 2015. doi: 10.1155/2015/592953.

Vargas, M. *et al.* (2004) “Etiology of diarrhea in children less than five years of age in Ifakara, Tanzania”, *The American journal of tropical medicine and hygiene*. ASTMH, 70(5), pp. 536–539.

Verster, A. J. *et al.* (2017) “The landscape of type VI secretion across human gut microbiomes reveals its role in community composition”, *Cell host & microbe*. Elsevier, 22(3), pp. 411–419.

Vidal, M. *et al.* (2005) “Single multiplex PCR assay to identify simultaneously the six categories of diarrheagenic *Escherichia coli* associated with enteric infections”, *Journal of clinical microbiology*. Am Soc Microbiol, 43(10), pp. 5362–5365.

Vieira, M. A. *et al.* (2010) “Prevalence and characteristics of the O122 pathogenicity island in typical and atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strains”, *J Clin Microbiol*. doi: JCM.01944-09 [pii]r10.1128/JCM.01944-09 [doi].

Walker, C. L. F., Sack, D. y Black, R. E. (2010) “Etiology of diarrhea in older children, adolescents and adults: a systematic review”, *PLoS neglected tropical diseases*. Public Library of Science, 4(8), p. e768.

Wickham, M. E. *et al.* (2007) “*Citrobacter rodentium* virulence in mice associates with bacterial load and the type III effector NleE”, *Microbes and infection*. Elsevier, 9(3), pp. 400–407.

Wong, A. R. C. *et al.* (2012) "The enteropathogenic *E. coli* effector EspH promotes actin pedestal formation and elongation via WASP-interacting protein (WIP)", *Cellular microbiology*. Wiley Online Library, 14(7), pp. 1051–1070.

Zhang, Q. *et al.* (2010) "Enteropathogenic *Escherichia coli* changes distribution of occludin and ZO-1 in tight junction membrane microdomains in vivo", *Microbial pathogenesis*. Elsevier, 48(1), pp. 28–34.

Zhang, X. *et al.* (2017) "Multiple functional self-association interfaces in plant TIR domains", *Proceedings of the National Academy of Sciences*. National Acad Sciences, p. 201621248.