



**CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE PATOTIPOS DE *Escherichia coli* DE
TRANSMISIÓN ALIMENTARIA AISLADOS EN PAMPLONA, COLOMBIA**

LUIS FELIPE APERADOR TARAZONA

C.C. 1.098.789.594

**UNIVERSIDAD DE PAMPLONA
FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA
PAMPLONA, COLOMBIA
2020.**



**CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE PATOTIPOS DE *Escherichia coli* DE
TRANSMISIÓN ALIMENTARIA AISLADOS EN PAMPLONA, COLOMBIA**

LUIS FELIPE APERADOR TARAZONA

C.C. 1.098.789.594

**TESIS DE INVESTIGACIÓN PARA OPTAR EL TITULO DE
MICROBIÓLOGO**

TUTOR: JESUS ANGEL SANTOS

UNIVERSIDAD DE LEON

COTUTORA: FANNY HERRERA ARIAS

UNIVERSIDAD DE PAMPLONA

**UNIVERSIDAD DE PAMPLONA
FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA
PAMPLONA, COLOMBIA
2020.**



Nota de aceptación:

Firma del Primer Jurado

Firma del Segundo Jurado

**UNIVERSIDAD DE PAMPLONA
FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA
PAMPLONA, COLOMBIA
2020**



TABLA DE CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	1
1. MARCO TEÓRICO	2
1.1. Características generales de <i>escherichia coli</i>	2
1.2. Características de los patotipos de <i>escherichia coli</i>	2
1.2.1. <i>E. coli</i> enterotoxigenica (ETEC):.....	3
1.2.2. <i>E. coli</i> enteroagregativa (EAEC):.....	4
1.2.3. <i>E. coli</i> enteroinvasiva (EIEC):	5
1.2.4. <i>E. coli</i> difusa adherente (DAEC):.....	5
1.2.5. <i>E. coli</i> enteropatógena (EPEC):.....	6
1.2.6. <i>E. coli</i> productora de Toxina Shiga (STEC):	7
1.3. Factores de virulencia y mecanismos de patogenicidad	9
1.3.1. Patogenicidad de stec	9
1.3.2. Patogenicidad de epec:	11
1.3.3. Otros factores de virulencia	13
1.3.4. Resistencia antibiotica bacteriana	13
1.4. Epidemiología.....	14
1.5. Caracterización molecular de <i>e. coli</i>	17
1.5.1. Análisis mediante Rep-PCR GTG ₅	18
1.5.2. Análisis mediante MALDI-TOF	19
1.5.3. Análisis mediante MLST	20
1.6. Marco legal.....	21
1.6.1. Norma Técnica Colombiana (NTC 4899:2015).....	21
1.6.2. Norma Técnica Colombiana (NTC 5158:2003).....	21
2. ANTECEDENTES	22
3. JUSTIFICACIÓN	24
4. OBJETIVOS	25
4.1. Objetivo general	25
4.2. Objetivos especificos.....	25
5. MATERIALES Y MÉTODOS	26



5.1. Identificación mediante maldi-tof	26
5.2. Detección de los genes <i>eae</i> , <i>bfpA</i> y <i>stx</i> mediante PCR:	27
5.3. Resistencia antibiotica bacteriana:.....	29
5.4. Determinación del grupo filogenético	29
5.5. Caracterización mediante rep-PCR (GTG) ₅	31
5.6. Caracterización mediante MLST	31
6. RESULTADOS	34
6.1. Identificación mediante MALDI TOF:.....	34
6.2. Detección de los genes <i>eae</i> , <i>bfpA</i> y <i>stx</i> mediante PCR:	35
6.3. Resistencia antibiotica bacteriana	36
6.4. Determinación del grupo filogenético:	37
6.5. Caracterización mediante rep-PCR (GTG) ₅	38
6.6. Caracterización mediante MLST	40
7. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	42
7.1. Identificación mediante MALDI-TOF	42
7.2. Detección de los genes <i>eae</i> , <i>bfpA</i> y <i>stx</i> mediante PCR:	43
7.3. Resistencia antibiotica bacteriana	45
7.4. Determinación de grupo filogenético	45
7.5. Caracterización mediante rep-PCR (GTG) ₅	46
7.6. Caracterización mediante MLST	48
8. CONCLUSIONES	49
9. RECOMENDACIONES	50
10. REFERENCIAS	51



LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema del comportamiento de los seis grupos de <i>E. coli</i> diarreagénicos.....	3
Figura 2. Micrografías de luz que muestran los patrones distintivos de adherencia de <i>E. coli</i> Enteroagregativa	4
Figura 3. Representación esquemática de la estructura de las Toxinas Shiga.	9
Figura 4. Mecanismo de patogenicidad de <i>E. coli</i> productora de Toxina Shiga..	10
Figura 5. Toxina Shiga en la patogénesis de STEC.....	11
Figura 6. Adherencia e invasión celular de EPEC.....	12
Figura 7. Mecanismo de resistencia a antibióticos.. ..	14
Figura 8. Incidencia de infección STEC humana notificada por serogrupo y año, Estados Unidos, 1996–2016.. ..	16
Figura 9. Reporte epidemiológico colombiano.....	17
Figura 10. Representación del principio de Maldi-TOF.....	20
Figura 11. <i>Escherichia coli</i> en agar MacConkey Sorbitol.....	34
Figura 12. Ensayo fenotípico del carácter productor ESBL mediante la técnica de difusión en placa.	36
Figura 13. Perfil filogenético de <i>E. coli</i> obtenido mediante PCR Cuadruplex.....	37
Figura 14. Bandas de los perfiles obtenidos por PCR (GTG) ₅ para los aislados de <i>E.coli</i>	39
Figura 15. Agrupación de los perfiles clonales obtenidos.....	39
Figura 16. Árbol filogenético del análisis de las secuencias de los 7 genes housekeeping obtenido mediante el MLST... ..	41



LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Cebadores empleados en la prueba de PCR para la detección de genes de virulencia.	28
Tabla 2. Condiciones del proceso de PCR para la detección de genes de virulencia de <i>E. coli</i>	28
Tabla 3. Genotipos Cuádruplex de referencia para asignar grupos filo a <i>E. coli</i>	30
Tabla 4. Condiciones utilizadas para la detección de los determinantes característicos de los grupos filogenéticos de <i>E. coli</i> mediante PCR Quadruplex.	30
Tabla 5. Condiciones del proceso de la PCR palindrómica extragénica	31
Tabla 6. Cebadores empleados en la amplificación MLST.	32
Tabla 7. Condiciones de la técnica de PCR utilizada para la detección de los genes housekeeping mediante MLST.	33
Tabla 8. Rango de valores de interpretación e identificación de microorganismos mediante MALDI-TOF.	35
Tabla 9. Ejemplos de especies bacterianas obtenidas del análisis de MALDI-TOF	35
Tabla 10. Genes de virulencia implicados en la patogenicidad de <i>E. coli</i>	36
Tabla 11. Clasificación de las cepas <i>E. coli</i> estudiadas según el conjunto de genes de la clasificación Clermont.	38
Tabla 12. Perfiles clonales detectados mediante PCR (GTG) ₅	39
Tabla 13. Perfiles de alelos y frecuencias obtenidas mediante MLST de las cepas analizadas.	40
Tabla 14. Número de alelos compartidos relacionados entre las cepas estudiadas.	40



GLOSARIO

- **Beta-lactamasas de espectro extendido (ESBL):** Enzimas producidas por ciertas bacterias y que son responsable de conferir la capacidad de hidrolizar antibióticos generando resistencia antibiótica microbiana.
- **Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETAs):** evento desarrollado por una infección o intoxicación que afectan la salud tras la ingestión de organismos vivos o sus toxinas presentes en un alimento.
- **Intimina:** Es una proteína de membrana externa que se encarga del proceso de fijación y borrado celular.
- **Locus of Enterocyte Effacement (LEE):** Isla de patogenicidad presente en el genoma de *E. coli* e importante para el proceso de fijación y borrado de los enterocitos celulares.
- **Patotipo bacteriano:** especies de una población bacteriana que varían y se clasifican según su potencial patogénico y virulento.
- **Reacción en Cadena Polimerasa (PCR):** Técnica de análisis molecular para incrementar el número de copias de una muestra de ADN en particular.
- **Síndrome Urémico Hemolítico (SUH):** Es un trastorno o afectación en la salud causada por una infección en el aparato digestivo por la producción de sustancias tóxicas de origen bacteriano.
- **Tipificación Multilocus de Secuencias (MLST):** Técnica de análisis molecular que permite la caracterización filogenética de distintos microorganismos.
- **Toxinas Shiga:** Grupo de toxinas presentes en algunas enterobacterias como *E.coli* y que desencadenan distintas patologías en la salud humana.



INTRODUCCIÓN

Escherichia coli es una bacteria que forma parte de la microbiota normal intestinal de muchos seres vivos, no obstante, la variabilidad de su genoma ha permitido la evolución de algunos grupos que pueden causar Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETAs) afectando la salud por diversas patologías que varían desde enfermedades gastrointestinales hasta colitis hemorrágica, en algunos casos mortales, al ocasionar Síndrome Urémico Hemolítico (SUH). Los patotipos reconocidos de esta bacteria son: *E. coli* Enteropatógena (EPEC), *E. coli* Enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* Enteroagregativa (EAEC), *E. coli* Difusa Adherente (DAEC), *E. coli* Enterotoxigénica (ETEC) y *E. coli* Enterohemorrágica (EHEC). Esta última puede ocasionar lesiones de fijación-borrado en las microvellosidades del epitelio intestinal debido a la presencia de la isla de patogenicidad locus of Enterocyte Effacement (LEE), además de producir toxinas denominadas Shiga. Aunque existen muchos serotipos de *E. coli* capaces de producir estas toxinas, la mayor parte no poseen la isla de patogenicidad LEE, razón por la cual se usa el término *E. coli* productoras de toxinas Shiga (STEC) para designar a cualquier cepa de *E. coli* que produce estas toxinas y el término EHEC para las cepas que, además de producirlas presentan la isla de patogenicidad LEE (Kaper et al., 2004). Por otra parte, muchas de estas cepas han generado interés desde el punto de vista de la salud pública ya que pueden portar genes que codifican resistencia a diversos antibióticos tales como β -lactámicos, quinolonas, aminoglucósidos, entre otros (Fang et al., 2016) conllevando al interés de determinar su diversidad, relaciones filogenéticas y epidemiología (Amézquita et al., 2018). En ese sentido, el presente trabajo consistió en la caracterización molecular de patotipos de *E. coli* de transmisión alimentaria aislados en Pamplona, Colombia con el fin de ahondar en el comportamiento epidemiológico del microorganismo que contribuyan a establecer estrategias y toma de decisiones eficaces para controlar posibles ETAs causadas por este patógeno.



1. MARCO TEÓRICO

1.1. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE *Escherichia coli*

Escherichia coli es una bacteria de forma bacilar Gram-negativa, ubicua, anaerobia facultativa, perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae*, con un tamaño de 2 µm de largo y 0,5 µm de ancho, posee movilidad por flagelos peritricos que rodean su cuerpo, no forma esporas y es capaz de fermentar la glucosa y la lactosa (**Rodríguez, 2002**). La mayoría de las cepas pertenecientes a esta especie son mesófilos típicos y crecen en un amplio rango de temperatura aunque la óptima oscila entre 37° C y 44° C, pH cercanos a la neutralidad y actividad de agua de 0,95 (**Percival & Williams, 2013**), además bioquímicamente se reconocen por ser catalasa positiva y oxidasa negativa, productoras de indol, positivas para la prueba de rojo de metilo y H₂S negativas (**Rodríguez, 2002**). Se diferencian serológicamente por la presencia de antígenos O (somáticos) y H (flagelares) por medio de los cuales se definen los serogrupos (sólo el antígeno O) o serotipos (antígeno O y antígeno H) (**Rojas et al., 2018**).

1.2. CARACTERÍSTICAS DE LOS PATOTIPOS DE *Escherichia coli*

Dentro de las especies de una población bacteriana existen muchos miembros de que pueden diferir por su capacidad patogénica y su perfil virulento, los cuales son denominados como patotipos bacterianos. Los diferentes patotipos de *E. coli* poseen diversas características y mecanismos de infección (figura 1) que pueden dar lugar a tres tipos principales de síndromes causados por la infección: i) infecciones del tracto urinario, ii) septicemias y otras infecciones extraintestinales iii) infecciones gastrointestinales. Las cepas responsables de los dos primeros tipos de enfermedades se conocen como *E. coli* patógena extraintestinal (ExPEC, por sus siglas en inglés), mientras que las infecciones gastrointestinales producidas por las cepas denominadas de forma genérica “diarrhoeagenic *E. coli*” (DEC) son las que tienen interés como enfermedades de transmisión alimentaria,

por su posible diseminación a través de los alimentos contaminados (**Kaper et al, 2004**).

1.2.1. *E. coli* enterotoxigenica (ETEC):

Este patotipo bacteriano es conocido como el causante de la diarrea del viajero, se encuentra relacionado con el desarrollo de diarrea acuosa en humanos y animales, produce síntomas parecidos al cólera, llegando a generar deshidratación con riesgo de muerte. ETEC se define por la capacidad de las bacterias para producir una o más enterotoxinas específicas que son termolábiles y estables al calor (LT y ST) y sus diversos subtipos siendo los principales de ST, el subtipo STa (también conocido como STI) y Stb (STII), que ejercen su máximo impacto en el transporte de agua y electrolitos en el intestino delgado y para liberar estas toxinas al epitelio del intestino delgado. Las toxinas STa son importantes en humanos por ser la principal implicada en el desarrollo de sus patologías (**Robins et al., 2016**).

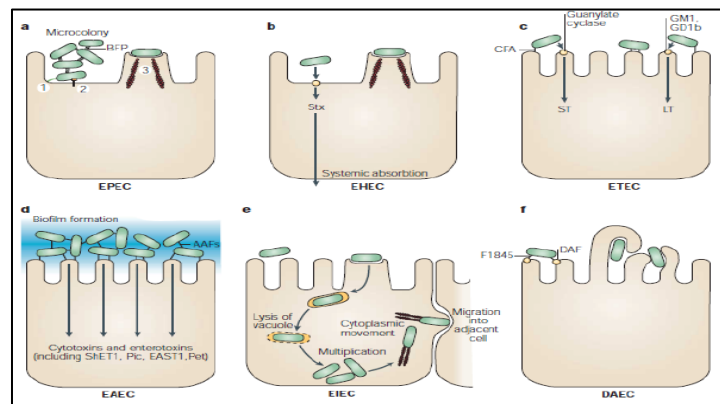


Figura 1. Esquema del comportamiento de los seis grupos de *E. coli* diarreagénicos. Tomado de: **Kaper et al., 2004**.

1.2.2. *E. coli* enteroagregativa (EAEC):

Este patotipo se asocia principalmente a diarrea en países en desarrollo en población infantil, no obstante ha sido relacionado con diarrea en adultos. Posee un patrón de adherencia de "ladrillo apilado" (figura 2) característica *in vitro* de las células de cultivo de tejidos, atribuido a una de varias fimbrias agregantes hidrófobas, conocidas como (AAF / I, II, III, IV), codificadas por plásmidos pAA o plásmidos similares. Otros posibles factores de virulencia de EAEC incluyen una citotoxina codificada por pAA, una enterotoxina estable al calor codificada por pAA, conocida como toxina estable enteroagregativa (EAST-1) que está relacionada con STa de ETEC, pero no restringido a EAEC, y ShET1, una posible enterotoxina que también se encuentra en *Shigella flexneri* (Robins et al., 2016). En algunos casos se ha reportado la aparición de cepas enteroagregativas que han desarrollado la producción de Toxinas Shiga volviéndolas muy virulentas como el caso reportado en 2011 en Alemania por un serotipo circulante denominado *E. coli* O104: H4 que tenía genes de EAEC como el gen *aatA* y el gen *agg* para la sub-unidad de la fimbria AAF/I y adicionalmente genes *stx* de Toxinas Shiga, asociado a la producción de un brote de diarrea y Síndrome Urémico Hemolítico (ECDC, 2011).

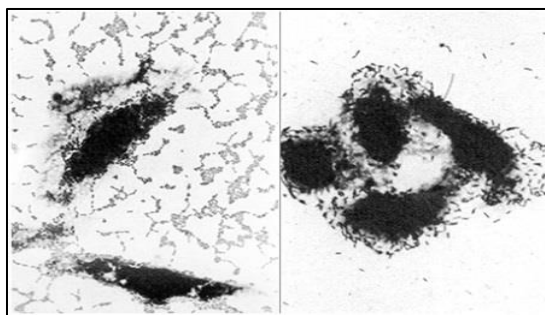


Figura 2. Micrografías de luz que muestran los patrones distintivos de adherencia de *E. coli* Enteroagregativa (izquierda) y *E. coli* difusa adherente (derecha) a células epiteliales cultivadas. Tomada de: Robins et al., 2016.



1.2.3. *E. coli* enteroinvasiva (EIEC):

Se encuentra muy relacionada tanto patogénicamente como fenotípicamente con *Shigella*, ya que comparten los principales genes de virulencia de esta bacteria. EIEC produce colitis inflamatoria invasiva y disentería con presencia de mucus y sangre en las heces, fiebre y dolor severo igual que en el caso de *Shigella*, aunque en muchas ocasiones llega a causar diarrea acuosa. Los genes asociados clave de virulencia se hallan en un plásmido conocido como pINV y codifica un sistema de secreción tipo III y varios efectores que permiten que EIEC penetren en las células epiteliales, se muevan dentro de las mismas e invadan las células vecinas. EIEC tienen otros determinantes de virulencia putativos, incluidas las adhesinas y las toxinas secretadas. Al adquirir pINV y otros elementos genéticos permiten a las bacterias adoptar un estilo de vida intracelular, así, la capacidad para vivir dentro de las células se ve continuamente mejorada por la eliminación o inactivación de genes como *nadA*, *nadB* y *ompT* que codifican factores de defensa celular que intentan anular su virulencia, y aquellos para rutas metabólicas como la descarboxilación de lisina, cuyos productos finales restringen el crecimiento intracelular y que son hostiles a este estilo de vida (**Robins et al., 2016**).

1.2.4. *E. coli* difusa adherente (DAEC):

Esta especie es heterogénea, puede causar diarrea en niños menores de un año y se ha demostrado que el riesgo relativo de diarrea asociada con DAEC aumenta con la edad de los niños de 18 meses a 5 años. Posee un patrón de adherencia a células Hep-2, el cual es mediado por una proteína autotransportadora de membrana externa conocida como AIDA-I. Hasta el momento, existen 2 clases descritas de adhesinas mediadoras del patrón DA, separando las cepas de *E. coli* enteroagregativas en un grupo dependiente de AIDA-I y en otro grupo en el que sus adhesinas son codificadas por una familia de genes que se expresan con una variedad de antecedentes genéticos, además, de las adhesinas fimbriales y adhesinas afimbriales (Afa / Dr) que favorecen la patogénesis de DAEC las cuales son predominantes en células huésped (**Bouzari et al., 2012**).



1.2.5. *E. coli* enteropatógena (EPEC):

Este patotipo de *E. coli* posee una histopatología distintiva inducida que se denomina lesiones de fijación y borrado (A / E) codificada por el gen *eae* y es causada por la unión de una proteína, conocida como intimina, a las células epiteliales intestinales causando el borrado de las microvellosidades de los enterocitos. Es una de las principales causas de diarrea en niños entre 3 y 5 años en países en vías de desarrollo mientras que en países desarrollados su frecuencia es más reducida pero siguen siendo una causa importante de diarrea no sanguinolenta (**Bouzari et al., 2012**). Posee una isla de patogenicidad llamada “*locus of enterocyte effacement*” (LEE), en la cual están presentes, entre otros, los genes *eae* responsables de producir la intimina, esta proteína posee 2 regiones funcionales; la primera región se denomina amino-terminal y se encuentra altamente conservada en los distintos tipos antigénicos que se han descrito sobre esta proteína. Contrario a esto, la otra región denominada carboxilo-terminal es muy variable y se encarga de la respuesta de interacción con el receptor translocado de intimina (Tir) (**Varela et al., 2007**). Estudios en voluntarios adultos han demostrado que la intimina en conjunto con EspB, un componente clave del sistema de secreción tipo 3, son determinantes esenciales de la virulencia de EPEC (**Robins et al., 2016**).

El avance de las técnicas de detección y caracterización molecular han permitido obtener un mejor conocimiento del genoma completo, además de los mecanismos de virulencia y las características que presenta *E. coli* EPEC con lo cual se ha podido establecer una subclasificación de este patotipo como EPEC típica (tEPEC) y atípica (aEPEC). La primera se caracteriza por poseer un plásmido responsable de la virulencia conocido como EAF donde se desarrolla el pili formador de haces (BFP) (**Trabulsi et al., 2002**). La biogénesis de BFP se especifica mediante un grupo de 14 genes *bfp* ubicados en el plásmido EAF; el primer gen de este grupo es conocido como *bfpA* y es encargado de la formación de BFP para favorecer la adherencia localizada sobre las células causando la destrucción de microvellosidades, la adherencia íntima de las bacterias al epitelio



intestinal, la formación de pedestales y la agregación de actina polarizada y otros elementos de fijación bacteriana (**Contreras et al., 2010**). Contrario a esto, las cepas de aEPEC no poseen este plásmido de adherencia. La mayoría de las cepas típicas de EPEC abarca los serotipos: O:H bien reconocidos tales como: O55:H6, O86:H34, O111:H2, a O114:H2, O119:H6, O127:H6, O142:H6, O142:H34; así mismo entre las cepas asociadas a EPEC atípica están los serotipos O26:H11, O55:H7, O55:H34, O86:H8, O111:H8, O111:H9, O111:H25, O119:H2, O125:H6, O128:H2. Las cepas típicas de EPEC son más homogéneas en cuanto a sus características de virulencia con respecto a las cepas atípicas y con pocas excepciones, las cepas típicas producen solo los factores de virulencia codificados por la región LEE y el plásmido EAF. Mientras que las cepas EPEC atípicas con frecuencia expresan una toxina termoestable codificada por *EAST1* y otros posibles factores de virulencia que no son codificados en la región LEE. Finalmente, no se ha evidenciado que los serotipos típicos de EPEC tengan relación con los animales, lo que sugiere que los humanos son el único reservorio vivo de estos organismos. En contraste, la mayoría de los serotipos atípicos de EPEC se han aislado de diferentes especies animales, por ejemplo la asociación entre el serotipo O26: H11 y los terneros es bien conocida (**Trabulsi et al., 2002**).

1.2.6. *E. coli* productora de Toxina Shiga (STEC):

E. coli STEC es una bacteria que afecta principalmente a niños menores de 5 años y ancianos. La alta virulencia de las cepas STEC no solo depende de los factores de virulencia sino también en parte de la capacidad del patógeno para sobrevivir a las condiciones de estrés ambiental, como la resistencia a los bajos niveles de pH en el tracto gastrointestinal que contribuyen a su baja dosis infecciosa de (50-100) bacterias. Existen más de 200 serotipos de STEC y algunos de ellos, poseen en su genoma la isla de patogenicidad (LEE) igual que los EPEC así como la unión íntima a las células huésped que se produce a través de la interacción entre una adhesina llamada intimina (*eaeA*) y Tir (receptor translocado de intimina) y suelen denominarse como EHEC (enterohemorrágicos) y son los que se implican regularmente con la aparición de SUH, además de diarrea no



hemorrágica, colitis hemorrágica (CH) y púrpura trombocitopénica. La producción de las Toxinas Shiga tiene lugar en el intestino grueso, una vez diseminadas ejercen una acción local al inducir apoptosis celular en el epitelio del intestino, dando lugar a diarrea hemorrágica, colitis hemorrágica, necrosis y formación de úlceras. Estas toxinas también tienen la capacidad de diseminarse a través del torrente sanguíneo llegando a los riñones, donde causan daño a las células endoteliales del riñón, obstruyendo la microvascularización a través de una toxicidad directa, así como una inducción de producción local de citoquinas y quimioquinas, terminando en inflamación renal y evolucionando en síndrome urémico hemolítico caracterizado por una triada de anemia hemolítica, trombocitopenia y fallo renal **(Bouzari et al., 2012)**.

1.2.6.1. ROL DE LAS TOXINAS SHIGA (*stx*)

La virulencia de cepas STEC está relacionada con la producción de Toxinas Shiga codificadas por los genes *stx1* y / o *stx2* que están localizados en el genoma de bacteriófagos lamboides llamados fagos-*stx*, **(Amézquita et al., 2018)**. Los genes que codifican las Toxinas Shiga se consideran el factor de virulencia primario y definitivo y se pueden encontrar tanto en el cromosoma bacteriano como en plásmidos. Este tipo de toxinas son toxinas de tipo AB₅, es decir, consisten en una sola subunidad A con actividad enzimática y cinco subunidades B idénticas con capacidad de unión a receptores celulares (figura 3) como a la globotriaosilceramida (Gb3) o globotetraosilceramida (Gb4), presentes en la superficie celular de las células de mamíferos, además estas toxinas se han dividido en dos grupos principales, *stx1* y *stx2*, y cada grupo tiene varios subtipos. En particular, el grupo *stx1* está compuesto por tres subtipos, *stx1a*, *stx1c* y *stx1d*; mientras que el grupo *stx2* es más heterogéneo y diverso y consta de siete subtipos, *stx2a*, *stx2b*, *stx2c*, *stx2d*, *stx2e*, *stx2f* y *stx2g*, no obstante, no todos los subtipos están presentes en los patotipos humanos, ya que algunos están muy relacionados con porcinos, por ejemplo *stx2e* **(Amézquita et al., 2018)**.

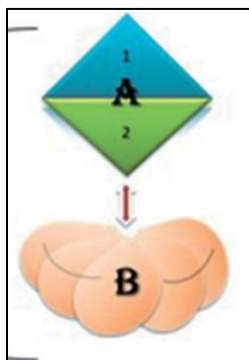


Figura 3. Representación esquemática de la estructura de las Toxinas Shiga. Tomado de: **Farfán et al., 2016.**

1.3. FACTORES DE VIRULENCIA Y MECANISMOS DE PATOGENICIDAD

1.3.1. PATOGENICIDAD DE STEC

La patogenicidad de STEC es generada por algunos antígenos superficiales y diferentes factores principales claves en dicho proceso (**Canet, 2016**) como la producción de Toxinas Shiga, indispensables para su patogenicidad. Así mismo se encuentra la enterohemolisina codificada por el plásmido pO157 presente en diversas cepas de *E. coli* que contiene los genes *Ent-Hly* para su producción. Esta proteína pertenece a la familia de las citolisinas que forman los poros RTXs, siendo *ehxA* el gen que conlleva su síntesis, para intervenir en la lisis de eritrocitos, liberando al grupo hemo favoreciendo el crecimiento del patógeno. Finalmente la intimina, está implicada en el proceso de fijación y borrado de las células del colon y su interacción es con las microvellosidades generando con su adhesión un cáliz, elongación y caída de estas microvellosidades provocando la adherencia y esfacelación (A./E) (**Nazaret, 2009**).

El proceso inicia con las cepas uniéndose al epitelio intestinal por medio de los factores de colonización FQ los cuales son fimbriales, no fimbriales o fibrilares. La intimina, actúa fijándose al receptor Tir translocado en el Sistema de Secreción Tipo 3 (T3SS) para su asociación con el epitelio celular del hospedero pero antes de esta unión se cree que la intimina interactúa primero con una nucleolina localizada en la superficie celular, la cual puede unirse a la intimina permitiendo

que *stx2* induzca la localización de la nucleolina en la superficie celular. Una vez que la bacteria está en la superficie de la célula el sistema de secreción de tipo 3 (T3SS) se inserta en el colonocito y libera efectores, tanto de origen LEE como no LEE, en el citoplasma de la célula huésped (Figura. 4). Este receptor Tir de intimina codificado por la bacteria, también se inyecta en la célula hospedera a través del T3SS (**Melton et al., 2012**).

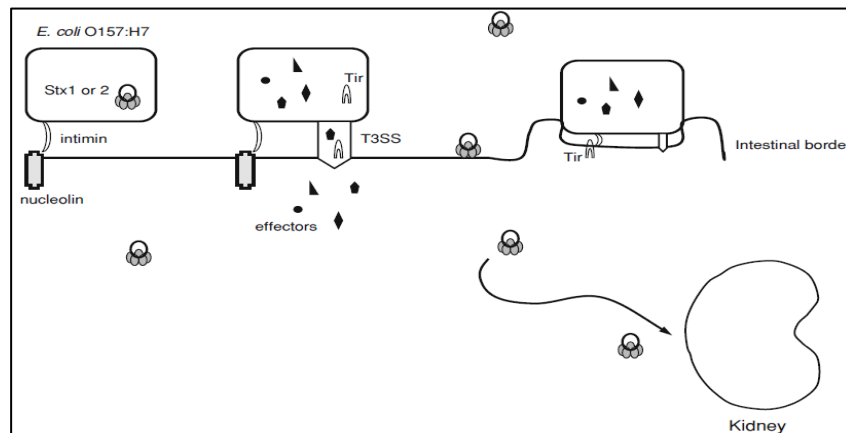


Figura 4. Mecanismo de patogenicidad de *E. coli* productora de Toxina Shiga. produce *stx1* y / o *stx2* que conduce a la localización de la nucleolina en la superficie. La adhesina intimina se une a la nucleolina y pone a la bacteria en contacto más cercano con la célula hospedera. El Sistema de Secreción Tipo 3 de la bacteria se inserta en la membrana celular intestinal y entrega Tir y otros efectores. Tir se localiza en la membrana de la célula hospedera y se une fuertemente a la intimina. Tomada de: **Melton et al., 2012**.

Una vez adheridas colonizan todas células e inicia la producción de las Toxinas Shiga, donde el fragmento A2 es la porción helicoidal de la molécula ancla la subunidad A al pentámero B que interactúa con las globotriaosilceramidas (Gb3s) en la superficie de la mucosa intestinal humana y las células epiteliales renales (figura 5), lo que resulta en la internalización de la toxina donde la subunidad A se activa y causa la muerte celular desarrollando la producción de diarrea sanguinolenta (**Bouzari et al., 2012**). La susceptibilidad a las Toxinas Shiga depende en parte de la cantidad producida así como el tipo de globotriaosilceramida (Gb3) presente en la célula, la cual está restringida a ciertos

tipos de células humanas, principalmente en las células del epitelio y endotelio renales, células endoteliales de la lámina propia del intestino, plaquetas y linfocitos B (Amézquita et al., 2018).

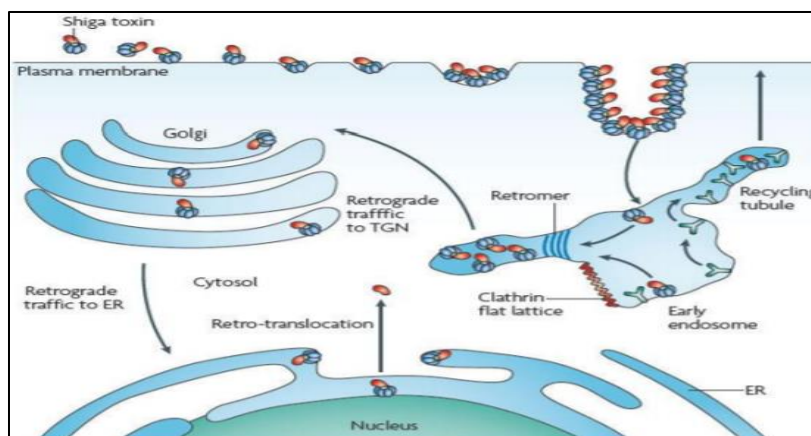


Figura 5. Toxina Shiga en la patogénesis de STEC. La unión de la Toxina Shiga con el receptor Gb3, induce la invaginación de la membrana. Mecanismo dependiente de Clatrina. Una vez la toxina se internaliza llega hasta RER para inhibir la síntesis proteica. Tomada de: **Arias et al., 2016.**

1.3.2. PATOGENICIDAD DE EPEC:

El mecanismo de patogenicidad de EPEC genera cambios en el funcionamiento normal de los enterocitos a causa de aumento de secreción extracelular de electrolitos por parte de las células y al aumento de la permeabilidad de las uniones intra e intercelulares, así como al cambio estructural en la forma de la región apical de los enterocitos. El proceso inicia con la adherencia a los enterocitos donde EPEC hace su contacto celular por medio de flagelos y el pili tipo IV, el cual induce la auto agregación y adherencia bacteriana al enterocito. Una vez realizado el proceso de adhesión, se desarrolla el proceso de Translocación de señales intracelulares (Tir), el cual es mediado por el T3SS con el cual favorece el ingreso de proteínas efectoras a los enterocitos, este proceso es codificado por su isla de patogenicidad LEE donde se codifican los genes para las proteínas secretoras Esp y a su vez los genes eae para la intimina y Tir. Dichas proteínas contribuyen al daño celular por la formación de conductos o

filamentos así como poros que permiten la translocación de proteínas membranales en los enterocitos, generando ciertos cambios en el potencial de la membrana mitocondrial como una formación transitoria de filopodios a través de la activación de GTPasas, una reorganización y pérdida de la nucleolina para el proceso de bloqueo del ARNr con ayuda de la proteína EspF y por último la alteración de microtúbulos en ciertas células epiteliales. Finalmente, el proceso de adhesión íntima bacteriana, conlleva de forma simultánea la unión de T3SS a los enterocitos y la entrada de las proteínas efectoras a través de los poros, en el cual se da el ingreso de la proteína Tir que actúa como receptora y que facilita la adhesión a la intimina bacteriana, indispensable para formar el pedestal y la lesión intestinal, permitiendo la transmisión de señales luego de la interacción Tir-intimina. La proteína Tir se fosforila en tirosina, la cual se une a proteínas adaptadoras (Nck o Crk. Nck) activando a la proteína N-WASP y a su vez, este activa al complejo Arp que media la polimerización de actina donde finalmente la unión Tir-intimina termina generando la reorganización de la actina, y de esta forma altera la morfología y forma las lesiones de fijación y borrado (figura 6) (Farfán et al., 2016).

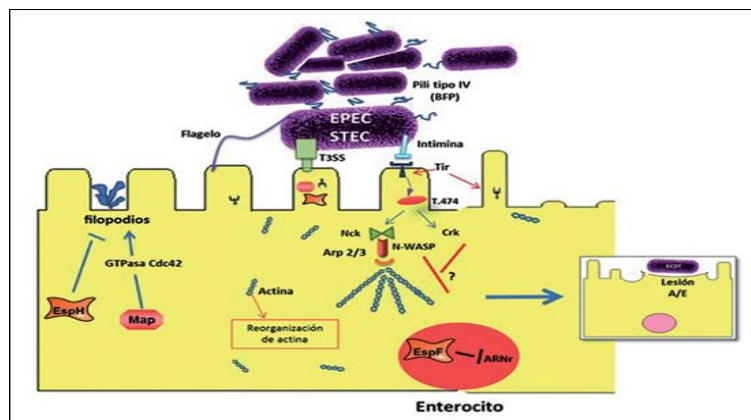


Figura 6. Adherencia e invasión celular de EPEC. Formación de proceso de adhesión y borrado mediante la adhesión inicial, translocación de señales intracelulares y adherencia íntima bacteriana. Tomada de: Farfán et al., 2016.



1.3.3. OTROS FACTORES DE VIRULENCIA

Flagelina H7 y LPS O157, esta proteína de unos 40,000 Da está implicada en el proceso destacado de la lesión intestinal durante la infección de STEC O157:H7 para generar la inflamación y desempeña un importante papel en las señales proinflamatorias en las células epiteliales del colon y respuesta inflamatoria a nivel vascular; **la Subtilasa**, es una toxina ab5 producida por ciertas cepas de *E. coli* asociadas a enfermedades en humanos que se une a receptores específicos de la superficie celular causando la enfermedad; también han sido reconocidos también **16 operones** potenciales similares a las fimbrias, en cepas STEC aunque no se han estudiado ampliamente, y recientemente **un pilus** involucrado en la adherencia y la formación de biopelículas llamada coli pilus hemorrágico, es un pilus tipo IV, identificado en STEC (**Bouzari et al., 2012**).

1.3.4. RESISTENCIA ANTIBIOTICA BACTERIANA

El aumento global de cepas de *E. coli* resistente a múltiples antibióticos hoy en día representa una amenaza para la salud pública. Esta resistencia implica la reducción de la acción de un antibiótico para reducir o eliminar a un microorganismo (**Shaikh et al., 2015**). De los mecanismos de resistencia que existen, uno emergente en *E. coli* se basa en la producción de genes que codifican la producción de enzimas modificadoras como las β -lactamasas de Espectro Extendido (ESBL) codificadas por genes como *bla_{TEM}*, *bla_{SHV}*, *bla_{OXA}*, *bla_{CTX-M}* (**Mosquito et al., 2011**). Por otro lado se encuentran los antibióticos aminoglucósidos que inhiben la síntesis de proteínas al unirse a la subunidad ribosómica bacteriana 30S en el sitio A del ARNr 16S y las enzimas modificadoras de fenicoles las cuales bloquean a la enzima cloranfenicol acetil transferasa (Cat) de tipo A o B. También, se encuentra la modificación de la membrana bacteriana, con lo cual se disminuye la permeabilidad al antimicrobiano (**Reygaert, 2017**) o resistencia por mutaciones de las secuencias de genes que codifican el objetivo de ciertos antibióticos (figura 9) (por ejemplo, la resistencia a la rifampicina y las fluoroquinolonas) causadas por mutaciones en los genes *RpoB* y ADN-topoisomerasas, así mismo pueden realizar una expulsión activa del antibiótico al

exterior de la bacteria, por ejemplo por medio de las Bombas de expulsión de tetraciclinas (Shaikh et al., 2015).

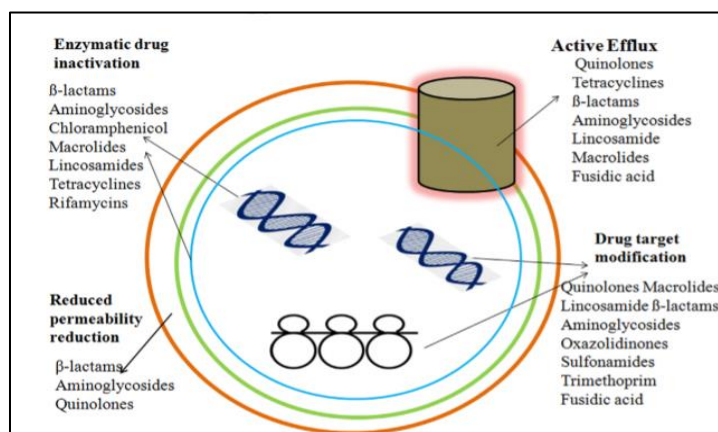


Figura 7. Mecanismo de resistencia a antibióticos. Tomada de: Padmini et al., 2017.

Sumado a esto, las enzimas de modificación de la diana celular favorecen a la resistencia por ejemplo del Trimetoprim un análogo del sustrato natural de la enzima dihidrofolato reductasa, y es mediado por, genes como *dhfrA* y *dhfrB*, (Reygaert, 2017). Así mismo se da la resistencia a las sulfamidias, mediada por genes que codifican formas resistentes de la enzima dihidropteroico sintetasa, encargada de intervenir para la síntesis del ácido dihidropteroico para generar la biosíntesis de aminoácidos y bases nitrogenadas y las quinolonas encargadas de Interfieren con la síntesis de ácido nucleico durante la replicación del ADN al inhibir la ADN girasa o la topoisomerasa IV (Reygaert, 2017).

1.4. EPIDEMIOLOGÍA

Escherichia coli se encuentra muy distribuida a nivel mundial, de forma general la Organización Mundial de la Salud ha informado que la carga de ETAs causada oscila en más de 300 millones de casos y 200,000 muertes cada año, sin embargo, estas tasas de infección son diferentes según la región donde se presente. Los estudios epidemiológicos estiman que el 75% de las infecciones por



STEC son causadas por cepas que son no O157 (**CDC, 2019a**). Por otro lado, los registros del CDC, han indicado que STEC fue el patotipo vinculado como el segundo mayor causante de infecciones bacterianas causadas por ETAs con diversos serogrupos identificados tales como O157, O26, O111, O121, O145, O45, O103 y O186 en Estados Unidos entre el 2009 y 2015 con una tasa de hospitalización y mortalidad del 13% y 9% respectivamente (figura 8) (**Mattia & Manikonda, 2018**), presentando en 2016 5,441 casos de infecciones incluyendo 2,323 casos asociados a O157 y 3,104 casos no O157 y 1,574 casos adicionales con un serogrupo desconocido terminando en un aumento del 26% (**CDC, 2018**).

Según el reporte epidemiológico Europeo de abril de 2019 realizado por el Centro Europeo de Prevención y Control de Enfermedades (ECDC), para el 2017, STEC , causó 547 casos confirmados de cuadros diarreagénicos asociados a ETAs con una tasa de notificación de 1.8 casos por cada 100,000 habitantes y una tasa más alta de casos en niños entre 0 y 4 años (**ECDC, 2019**). Además, otros datos epidemiológicos sobre los distintos patotipos de *E. coli*, han reportado a *E. coli* enteropatógena (EPEC) como otro agente de interés y principal causante de diarrea en niños que suponen a este patotipo como un enteropatógeno emergente asociado con serogrupos clásicos (O39, O111, O127, O157) como a los no clásicos (O2, O33, O108), detectado en distintas especies de animales, muestras de alimentos y ambientales, lo cual sugiere que algunas infecciones asociadas a esta cepa aEPEC puedan ser zoonóticas (**Rios, 2018**). Las cifras de letalidad en países subdesarrollados llegan a ser elevadas entre 20 a 50%, lo que convierte a las infecciones causadas por EPEC en una anomalía clínica de respuesta inmediata. En naciones de América Latina como Brasil y Chile, la epidemiología de EPEC ha registrado un 23% en grado significativo en casos de niños con diarrea, aun por encima de otros patógenos importantes como rotavirus o ETEC; México ha reportado valores del 17.5% de los casos relacionados con EPEC (**Vidal, 2007**).

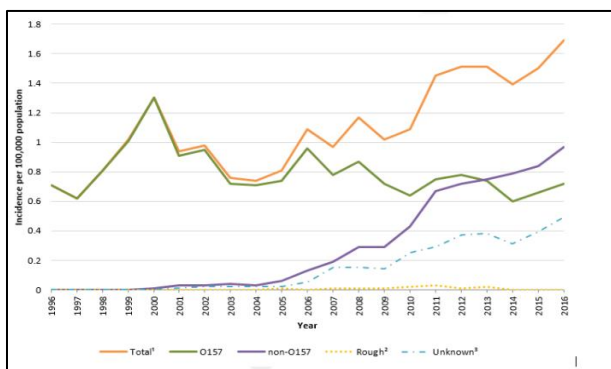


Figura 8. Incidencia de infección STEC humana notificada por serogrupo y año, Estados Unidos, 1996–2016. Tomada de: **CDC, 2018.**

En Colombia, las enfermedades diarreogénicas causadas por enterobacterias, son la segunda causa más común de morbilidad con una incidencia de 110 casos por 100,000 habitantes y además se estima que en un 50% de estos casos están asociados con agentes virales, un 20 a 30% a agentes bacterianos y un 20 a 30% a otro tipo de causas (**Gómez, 2014**). El Instituto Nacional de Salud (INS) en 2017 registró en el Sistema de Vigilancia de Salud Pública que entre 2008 – 2015 se dio en promedio más de dos millones de casos de enfermedades diarreicas por año; el mayor número de casos en 2015 con más de 3 millones y en 2016 se registró un número mayor de casos, siendo el año con el mayor número de casos y un comportamiento similar en lo corrido del año asociadas a grupos de enterobacterias incluyendo a *E. coli* O157:H7 (**INS, 2010**). Del mismo modo, para ese periodo, el INS notificó que de un total de niños menores de cinco años hospitalizados, entre el 5.93 % y el 7.25 % fueron diagnosticados con EDA causada por EPEC (**Sivigila, 2018**); otro reporte importante fue en 2010, por un brote a cusa de productos alimentarios contaminados con cepas de *E. coli* enteropatógena en Bogotá (**Gomez, 2014**).

En 2018 se notificaron al sistema de vigilancia (Sivigila) 881 brotes de ETAs mientras que para la misma semana en el 2017 se notificaron 859 brotes involucrándose 11,502 casos (figura 9), es decir, un 49.8% más que el año 2017 y un incremento del 2.5% con alimentos implicados como queso, carne de pollo, alimentos mixtos, la carne de res y cerdo, pescados y mariscos y en general del

total de los casos se notificó el 62% de muestra de alimentos, biológicas o de superficies (INS, 2018).

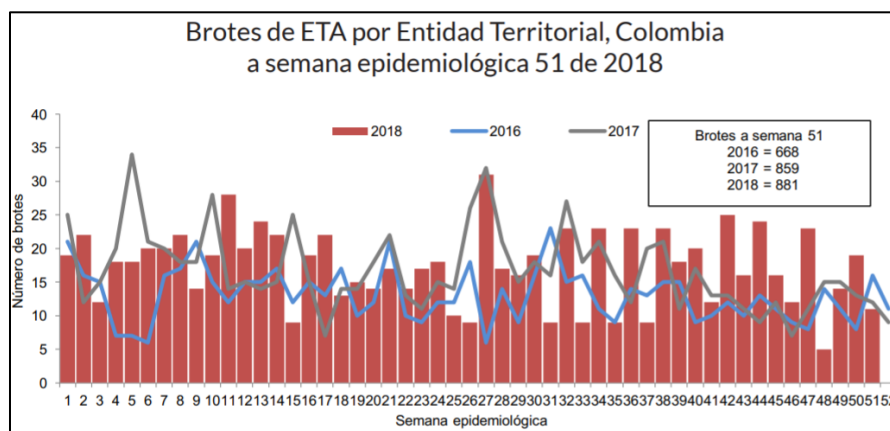


Figura 9. Reporte epidemiológico colombiano. Tomada de: **INS, 2018.**

En general, las enfermedades diarreicas son responsables de más de la mitad de toda la carga mundial reportada de enfermedades transmitidas por alimentos y son atribuidas a patógenos presentes en los alimentos como carne y productos mal cocidos, verduras y frutas mal lavadas, y productos lácteos, contaminados por *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp. y cepas de *Escherichia coli* patógena (OMS, 2015).

1.5. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE *E. coli*

Durante mucho tiempo se ha clasificado y caracterizado muchos microorganismos a fin de conocer la diversidad microbiana. Un esquema de clasificación que se ha usado tradicionalmente para clasificar a *E. coli* es el serotipado inmunológico. Este serotipado se basa en la identificación de serotipos bacterianos con base en combinaciones de 174 antígenos de superficie somática (antígenos O) y 53 flagelos (antígenos H) así como de serogrupos bacterianos basados en la detección de un antígeno celular en común. Adicionalmente, hoy en día, las técnicas moleculares que analizan las características o polimorfismos genéticos de microorganismos han ampliado notablemente el campo de la tipificación de bacterias patógenas de interés epidemiológico como *E. coli* y que permiten



determinar la relación y origen clonal de cepas de la misma especie, determinar el número de clones circulantes, reconocer brotes infecciosos de casos no relacionados, así como evaluar la eficacia de las medidas de control dirigidas a evitar la diseminación de clones con características particulares de patogenicidad o resistencia; dentro de estas técnicas destacan la amplificación por Reacción en Cadena de la Polimerasa de elementos palindrómicos extragénicos repetitivos (Rep-PCR), Tipificación Multilocus de Secuencias (MLST, del inglés Multilocus sequence typing) además de técnicas de espectrometría como MALDI (del inglés Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization) **(Guillen et al., 2014)**.

1.5.1. ANALISIS MEDIANTE Rep-PCR GTG₅

La técnica Rep-PCR o PCR (GTG)₅ es un método de análisis genotípico que permite diferenciar microorganismos empleando cebadores complementarios a las secuencias consenso repetitivas intercaladas presentes en sus genomas. Estas secuencias no codificantes tales como secuencias repetitivas palíndromas extragénicas repetitivas (REP), las secuencias de consenso intergénicas repetitivas enterobacterianas (ERIC), las secuencias BOX y las secuencias de polinucleótidos (GTG)₅ están presentes en múltiples copias en los genomas de la mayoría de las bacterias Gram-negativas y Gram-positivas **(Mohapatra et al., 2008)**. En ese sentido, su fundamento se basa en la amplificación de regiones que separan las secuencias rep, por lo cual, el polimorfismo resulta de la variabilidad en la repetición de dichas secuencias y de la distancia entre copias contiguas causadas por inserciones o deleciones del ADN. Esta técnica se ha convertido en una de las herramientas moleculares altamente poderosas aplicables para la identificación de bacterias y la diferenciación de cepas bacterianas de la misma especie y una de sus ventajas es su simplicidad ya que no requiere el uso de enzimas de restricción, ni técnicas electroforéticas especiales, con una rapidez de menos de 24 horas y su relativo bajo costo **(Castro et al., 2009)**.



1.5.2. ANÁLISIS MEDIANTE MALDI-TOF

La caracterización bacteriana recientemente, ha sido facilitada empleando técnicas que permiten el uso de células enteras en conjunto con la espectrometría de masas de ionización o desorción asistida por matriz, MALDI-TOF por sus siglas en inglés (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight), es una técnica que se basa en el análisis de espectros de masa de células que representan docenas de proteínas microbianas como picos con una proporción de masa a carga (m / z) exactamente determinable. Esta técnica es rentable, y el análisis es rápido y no requiere anticuerpos específicos de tipo celular. El análisis MALDI debe co-cristalizarse con un gran exceso molar de matriz (generalmente un ácido orgánico que absorbe los rayos UV) en las placas objetivo. Los iones de muestra se generan luego por radiación láser, seguido de procesos de desorción e ionización. La matriz juega un papel clave porque absorbe la energía de la luz láser e indirectamente hace que el analito se vaporice. El proceso MALDI genera iones cargados individualmente casi exclusivamente. Un analizador de masa de tiempo de vuelo (TOF) mide el tiempo dependiente de la masa requerido para que los iones de diferentes masas se muevan desde la fuente de iones al detector; Las masas de los iones se determinan a partir del tiempo que se tarda en recorrer esta distancia (figura 10). Finalmente, La identificación microbiana se logra mediante la búsqueda en bases de datos que contienen los espectros MS de péptidos y proteínas extraídos de microorganismos de interés, utilizando algoritmos de puntuación para unir los espectros analizados con los espectros de referencia **(Jang & Kim, 2018)**.

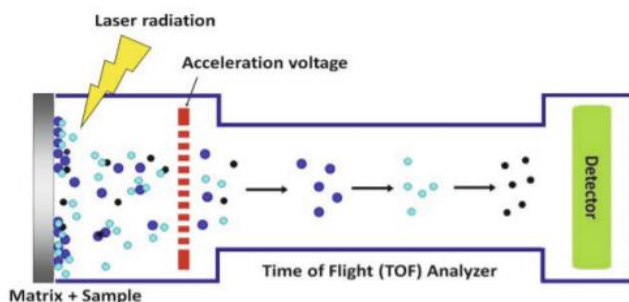


Figura 10. Representación del principio de Maldi-TOF. Tomada de: **Jang & Kim, 2018.**

1.5.3. ANÁLISIS MEDIANTE MLST

La Tipificación Multilocus de Secuencias (MLST) es otra técnica de análisis molecular de gran importancia para el estudio de las relaciones filogenéticas, y análisis evolutivo de distintos aislamientos bacterianos tales como las cepas de *Escherichia coli* patógenas. Esta técnica permite caracterizarlas basada en la secuenciación de genes conservados (housekeeping) que son de suma importancia para el mantenimiento básico de la función celular. Normalmente se emplean regiones entre 450 y 500bp de 7 genes. Estos genes, se encuentran bajo una selección estabilizadora para poder mantener las funciones metabólicas que permitan una evolución lenta en el tiempo, suministrando de forma confiable las relaciones genéticas entre especies bacterianas (**Ríos, 2018**). Para cada gen de mantenimiento, las diferentes secuencias presentes dentro de una especie bacteriana se asignan como alelos distintos y, para cada aislado, los alelos en cada uno de los siete loci definen el perfil alélico o el tipo de secuencia (ST). En MLST se ignora el número de diferencias de nucleótidos entre alelos y las secuencias reciben diferentes números de alelos, ya sea que difieran en un solo sitio de nucleótidos o en muchos sitios. La gran ventaja de MLST es que los datos de secuencia no son ambiguos y los perfiles alélicos de los aislados se pueden comparar fácilmente con los de una gran base de datos central a través de Internet (en contraste con la mayoría de los procedimientos de tipificación que



implican comparar tamaños de fragmentos de ADN en geles (**Urwin & Martin, 2003**).

1.6. MARCO LEGAL

1.6.1. NORMA TÉCNICA COLOMBIANA (NTC 4899:2015). Microbiología de alimentos y productos de alimentación animal. Método horizontal para la detección de *Escherichia coli* O157.

Esta norma especifica un método horizontal para la detección de *Escherichia coli* serogrupo O157. Es aplicable a los productos destinados al consumo humano o para productos de alimentación animal. Con el fin de salvaguardar la salud del personal del laboratorio, es esencial que la totalidad de este método sea ejecutado por personal entrenado, utilizando buenas prácticas de laboratorio y, de preferencia, trabajando en una instalación de contención. Se deben cumplir los reglamentos de salud y seguridad relacionados con este organismo (**NTC, 2015**).

1.6.2. NORMA TÉCNICA COLOMBIANA (NTC 5158:2003). Microbiología de alimentos y alimentos para animales. Reacción en cadena de la polimerasa -PCR- para la detección de patógenos de alimentos. Requerimientos específicos para el método general.

Aplica para las pruebas de patógenos en alimentos, productos alimenticios y aislados obtenidos de ellos usando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) relaciona los requerimientos generales para la amplificación *in-vitro* de secuencias de ácido nucleicos. Los mínimos requerimientos relacionados en el método están propuestos para asegurar que los resultados obtenidos son comparables y reproducibles en diferentes laboratorios (**NTC, 2003**).



2. ANTECEDENTES

Diversos estudios han caracterizado y descrito la prevalencia de STEC y EPEC, además de su transmisión y capacidad de causar ETAs en humanos y animales. En 2015, en un estudio realizado por investigadores en Arabia Saudita, describieron la caracterización molecular de STEC asociada con muestras de carne cruda y leche, revelando la presencia de *E. coli* O157:H7, O111, O113:H21, O22:H8 y O172:H21 en leche y de *E. coli* O157:H7, O111 y O174:H2 y O22:H8 en carne cruda, así como de la prevalencia del gen *stx2* detectado en 58 (67.44%) cepas de *E. coli* recuperadas de muestras de leche y 16 (94.12%) cepas recuperadas de muestras de carne **(Al-Zogibi et al., 2015)**. Por otro lado, en España en 2016, se caracterizó una colección de cepas de *Escherichia coli* STEC y *Escherichia* EPEC aisladas a partir de muestras de leche de cabra. La tipificación molecular por MLST, así como la electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE) permitieron obtener 38 patrones agrupados en 10 grupos, con la identificación de serotipos STEC como O157:H7, O146:H21 y O166:H28 y de EPEC O102:H11, O177:H11, O103:H2 y O26:H11 **(Álvarez et al., 2016)**.

Así mismo, investigadores en 2008, reportaron el estudio y evaluación de la eficacia de PCR (GTG)₅ en la obtención de Huellas filogenéticas de cepas patógenas de *Escherichia coli* aisladas de distintas aves de corral y de vida libre. Los resultados de las huellas genéticas mostraron con porcentajes entre 70% y 95% las fuentes de contaminación y su hospedero del cual provenían permitiendo hacer un rastreo correcto **(Mohapatra et al., 2008)**.

En la región de las Américas, STEC y EPEC mantiene una alta prevalencia en los alimentos. En América del Norte, ha demostrado afectar gravemente a más del 50% de las personas infectadas **(CDC, 2020)**. En países de América del Sur como Argentina y Brasil la tasa de prevalencia varía entre el 6 y el 28% **(Gómez, 2014)**. En Colombia, los registros de la prevalencia de cepas de *E. coli* patógenas en los de transmisión en alimentos es limitada, pero algunos estudios han reportado su presencia. Se ha estimado que en el caribe Colombiano se presentan tasas diarreogénicas con una prevalencia del 7.5%. **Amézquita et al., (2015)** estudiaron la relación genética entre patotipos de *Escherichia coli* aislados de productos



alimenticios en Cartagena, Colombia. Los resultados del análisis molecular de esta investigación revelaron la presencia de serotipos patógenos de *E. coli* STEC, EPEC y ETEC con una prevalencia del 2.1% asociados a su presencia en los alimentos. Un estudio adicional realizado por **Rugeles et al., (2010)**, reportaron la caracterización molecular de patotipos de *E. coli* circulantes en Colombia entre niños con diarrea y productos alimenticios para consumo humano. No obstante, aunque se hayan realizado algunos estudios de caracterización sobre *Escherichia coli*, este es el primer trabajo de caracterización molecular de patotipos de *E. coli* aislados de carne de origen bovino circulantes en Pamplona, Colombia.



3. JUSTIFICACIÓN

Debido a su asociación con el desarrollo de ETAs, sintomatología, mortalidad y aumentada resistencia antibiótica, los patotipos de *Escherichia coli* EPEC y STEC son relevantes para la salud pública y la seguridad alimentaria. El principal reservorio de STEC es el ganado bovino razón por la cual la carne es uno de los principales alimentos implicados con esta bacteria, no obstante se han relacionado brotes de ETAs por consumo de espinacas, mezcla de lechugas, productos lácteos, zumos de manzana sin pasteurizar y semillas germinadas de rábano, entre otros **(Rípodas et al., 2017)**. A nivel mundial, la transmisión y el desarrollo de ETAs por cepas patógenas de *E. coli* resistentes a antibióticos en alimentos es todavía una causa de morbimortalidad de interés. La OMS estima que el 10% de los pacientes con ETAs asociadas a serotipos de *E. coli* como STEC pueden desarrollar SUH, y la tasa de mortalidad de este patógeno es del 3% al 5% **(WHO, 2018)**. Por otro lado, los reportes de la OMS en 2018 respecto a la resistencia antimicrobiana han revelado que los niveles de resistencia son muy elevados en todo el mundo **(OMS, 2018)** y que la carga mundial de ETAs causa más de 300 millones de enfermedades y casi 200,000 muertes por *E. coli* diarreogénicas cada año **(CDC, 2019a)**. Con el fin de tomar acciones correctivas y preventivas pertinentes, los agentes etiologicos de ETAs deben ser completamente identificados y caracterizados. Por lo anterior, es necesario contar con métodos altamente confiables, que permitan caracterizar y discernir entre aislados. La genotipificación bacteriana es una herramienta fundamental en la asignación e identificación de agentes etiológicos infecciosos implicados en brotes de ETAs, así como para conocer sus implicaciones en la salud **(Bou et al., 2011)**. De esta forma se logra además escudriñar el riesgo potencial así como conocer la fuente y vía de infección al analizar la relación clonal entre los aislados **(Chalbaud et al., 2012)**. Con base a lo expuesto anteriormente, en el presente trabajo de investigación se realizó la caracterización molecular de patotipos de *E. coli* de transmisión alimentaria aislados en Pamplona, Colombia.



4. OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO GENERAL

- Caracterizar molecularmente patotipos de *Escherichia coli* de transmisión alimentaria aislados en Pamplona, Colombia.

4.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Identificar cepas de *Escherichia coli* empleando la técnica MALDI-TOF.
- Detectar mediante PCR los genes *sxt*, *eae* y *bfpA* relacionados con la virulencia de *E.coli*.
- Determinar mediante ensayo fenotípico la presencia/ausencia de producción de *B*-lactamasas de espectro extendido en cepas EPEC.
- Determinar el grupo filogenético de los aislados mediante la clasificación PCR Quadruplex de Clermont.
- Construir el perfil genético bacteriano mediante la técnica de rep-PCR.
- Establecer el perfil alélico de las cepas de *E. coli* mediante la tipificación multilocus de secuencias (MLST).



5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. IDENTIFICACIÓN MEDIANTE MALDI-TOF

Las cepas fueron aisladas a partir de 100 muestras obtenidas de carne cruda de bovino expendido formalmente en establecimientos de la ciudad de Pamplona, Colombia. Inicialmente fueron aisladas trece (13) cepas asociadas al patotipo STEC según lo reportado en un estudio anterior por **Herrera et al., (2019)**. Fueron conservadas en glicerol a temperatura de congelación y transportadas al laboratorio del departamento de Higiene y Tecnología de los Alimentos de la Universidad de León en España donde se reactivaron empleando caldo Trypticasa de Soja (TSB) con incubación a 37°C / 24 h. Posteriormente sembradas en agar MacConkey Sorbitol incubado a 37°C/24 h, realizando la transferencia de colonias típicas en agar Trypticasa de Soja (TSA) incubado a 37°C /24 h. Adicionalmente a partir de las mismas muestras de carne obtenidas en Colombia, se aislaron dos (2) nuevas cepas asociadas al patotipo EPEC las cuales fueron incluidas en el estudio para un total de Quince (15) cepas para el estudio. A partir de las colonias aisladas se realizó la caracterización de genes de virulencia *stx*, *eae* y *bfpA* (**Rios et al., 2019**).

Una vez reactivadas las cepas, para el proceso de identificación mediante Maldi-TOF, las cepas aisladas fueron cultivadas en agar TSA e incubadas a 37°C en un periodo no mayor a 24 horas para obtener un cultivo joven. La preparación de la muestra se realizó acorde a las pautas recomendadas por el fabricante del espectrómetro de masas. Cada muestra se añadió como una película delgada sobre la lámina Maldi y seguidamente, después del secado al aire, cada muestra se superpuso con 0,5 L de la solución de matriz (Ácido ciano-4-hidroxicinámico) y se dejó secar. Después del secado de los puntos, se llevó la lámina al equipo de análisis Maldi para la obtención de un espectro de masas a partir de cada punto. Se empleó el método de procesamiento MALDI Biotyper (Bruker Daltonik, Bremer, Alemania) y se compararon por duplicado con la base de datos de referencia (Bruker Daltonik), con el fin de obtener resultados confiables con cepas totalmente identificadas (**Alegría et al., 2020**).



5.2. DETECCIÓN DE LOS GENES *eae*, *bfpA* y *stx* MEDIANTE PCR:

Tras el proceso de identificación Maldi-TOF, se tomó una colonia aislada por placa de cada una de las 15 cepas aisladas y se realizó la verificación en un equipo Mastercycler personal los genes *stx*(+) *eae*(-) a las cepas del patotipo STEC para comprobar la presencia según lo reportado por **Herrera et al., (2019)**, así mismo a las cepas del patotipo EPEC para determinar cepas *stx* (-) *eae* (+). Para ello, se tomó una colonia de cada cepa y se suspendieron en tubos eppendorf con un volumen de 300 μ L de agua Milli-Q para cada tubo; fueron agitadas empleando un vórtex durante 10 segundos para homogenizarlas y centrifugadas a 10,000g / 1 minuto. Se recuperó el sedimento celular y posteriormente, se adicionaron 300 μ L de agua milli-Q resuspendiendo el pellet completamente, se agitó cada tubo empleando un vórtex durante 10 segundos; luego se transfirió cada tubo a un bloque de calentamiento a 100°C durante 15 minutos para extraer el ADN. Finalmente, cada tubo fue centrifugado a 10,000g /2 min, y almacenados a temperatura de congelación. De este preparado se tomaron 5 μ l como molde para la reacción de PCR Se realizó una PCR para detectar los genes *stx1*, *stx2*, y *eae*, *bfpA* empleando los pares de cebadores específicos a cada gen en una concentración de 25 mM (tabla1) así como un cóctel comercial MyTaq Bioline MasterMix (Taq polimerasa, buffer, dNTPs y Mg+2) (**Rios et al., 2019**).

Tabla 1. Cebadores empleados en la prueba de PCR para la detección de genes de virulencia.

Gen	Cebador	Secuencia (5' → 3')	Tamaño (pb)
<i>stx1</i>	VT1a	GAAGAGTCCGTGGGATTACG	130
	VT1b	AGCGATGCAGCTATTAATAA	
<i>stx2</i>	SLTII1	CTTCGGTATCCTATTCCCGG	448
	SLTII2	GGATGCATCTCTGGTCATTG	
<i>eae</i>	SK1	CCCGAATTCGGCACAAGCATAAGC	881
	SK2	CCCGGATCCGTCTCGCCAGTATTCG	
<i>bfpA</i>	EP1	ATTGGTGCTTGCGCTTGCTGC	326
	EP2	GCCGCTTTATCCAACCTGGTA	

Tabla 2. Condiciones del proceso de PCR para la detección de genes de virulencia de *E. coli*. A: *stx*, *eae*; B: *bfpA*.

A: Etapa	Ciclos	T°	Tiempo
Desnaturalización inicial	1	94° C	3 min.
Desnaturalización Hibridación Elongación	30	94° C	30 sec.
		56° C	30 sec.
		72° C	30 sec.
Elongación final	1	72° C	3 min.
(Rios et al., 2019).			

B: Etapa	Ciclos	T°	Tiempo
Desnaturalización inicial	1	96° C	2 min
Desnaturalización Hibridación Elongación	30	96° C	40 seg
		60° C	1 min
		70° C	45 seg
Elongación final	1	70° C	2 min
(Frankie et al., 1994).			



5.3. RESISTENCIA ANTIBIOTICA BACTERIANA:

Una vez caracterizados los genes de virulencia, se realizó un antibiograma mediante la técnica de difusión en placa combinada como ensayo fenotípico para determinar la presencia/ausencia de enzimas *B*-lactamasas de espectro extendido en los patotipos EPEC, adicionalmente se comprobó en las cepas STEC su ausencia según lo reportado por **Herrera et al (2019)**. Para ello se realizó una siembra masiva de las quince cepas en agar Müller Hilton y se incubaron a 37°C por 24 horas. Transcurrido el tiempo de incubación, se agregó a cada placa discos en combinación, utilizando discos de cefotaxima y ceftazidima solos y en conjunto con ácido clavulánico cada uno. Finalmente, se incubaron a 37°C por 24 horas. La interpretación del resultado se realizó de acuerdo con los lineamientos de EUCAST (http://www.eucast.org/clinical_breakpoints) (**EUCAST, 2019**).

5.4. DETERMINACIÓN DEL GRUPO FILOGENÉTICO

La determinación del grupo filogenético se llevó a cabo realizando una PCR Quadruplex a las 15 cepas para clasificarlas en alguno de los cuatro grupos filogenéticos según la clasificación de Clermont para *E. coli* (A, B1, B2 y D o E) con base a la presencia de los genes *chuA*, *yjaA*, *TspE4C2*, *arpA* (tabla 3) (**Clermont et al., 2013**). A partir de cada una de las cepas en medio TSA, se realizó una disrupción celular y el material genético para la amplificación de los genes en cuestión se obtuvo como se describió anteriormente en el apartado 5.2. Las condiciones del proceso se describen en la tabla 4. De los productos de la amplificación se tomaron 3 µl y se sometieron a electroforesis en gel de agarosa al 0.5 % p/v a 100 V durante 1 h. Se empleó un marcador de peso molecular de 1kb como patrón de la electroforesis. Para la visualización del gel, se empleó el reactivo de RedSafe™ para su tinción, y se llevó a un transiluminador con luz ultravioleta, acoplado a una cámara digital Canon Power Shot G11 (**Clermont et al., 2013**).

Tabla 3. Genotipos Cuádruplex de referencia para asignar grupos filo a *E. coli*.
Tomada de: Clermont et al., 2013.

Quadruplex genotype				Phylo-group	Next step
<i>arpA</i> (400 bp)	<i>chuA</i> (288 bp)	<i>yjaA</i> (211 bp)	TspE4.C2 (152 bp)		
+	-	-	-	A	
+	-	-	+	B1	
-	+	-	-	F	
-	+	+	-	B2	
-	+	+	+	B2	
-	+	-	+	B2	
+	-	+	-	A or C	Could be confirmed by testing <i>ibeA</i> gene ^a
+	+	-	-	D or E	Screen using C-specific primers. If C+ then C, else A
+	+	-	+	D or E	Screen using E-specific primers. If E+ then E, else D
+	+	+	-	E or clade I	Screen using E-specific primers. If E- then E, else D
-	-	+	-	Clade I or II	Screen using E-specific primers. If E- then clade I, confirm using cryptic clade primers ^b
-	(476) ^c	-	-	Clade III, IV or V	Confirm using cryptic clade primers ^b
-	-	-	+	Unknown	Perform MLST
-	-	+	+	Unknown	Perform MLST
+	-	+	+	Unknown	Perform MLST
+	+	+	+	Unknown	Perform MLST
-	-	-	-	Unknown	Confirm <i>Escherichia</i> identification using <i>uidA</i> or <i>gadA/B</i> ^d , if positive screen using cryptic clade primers ^b and/or perform MLST

Tabla 4. Condiciones utilizadas para la detección de los determinantes característicos de los grupos filogenéticos de *E. coli* mediante PCR Cuádruplex.

Cebador	Target	Secuencia de primer	Etapas	Ciclos	T°
chuA.1b	<i>chuA</i>	5'-ATGGTACCGGACGAACCAAC-3'	Desnaturalización inicial	1	94°C
chuA.2		5'-TGCCGCCAGTACCAAAGACA-3'			
yjaA.1b	<i>yjaA</i>	5'-CAAACGTGAAGTGTCAGGAG-3'	Desnaturalización Hibridación Elongación	30	94°C 59°C 72°C
yjaA.2b		5'-AATGCGTTCCTCAACCTGTG-3'			
TspE4C2.1b	<i>TspE4.C2</i>	5'-CACTATTCGTAAGGTCATCC-3'	Elongación final	1	72°C
TspE4C2.2b		5'-AGTTTATCGCTGCGGGTTCGC-3'			
AceK.f	<i>arpA</i>	5'-AACGCTATTCGCCAGCTTGC-3'			
ArpA1.r		3'-TCTCCCCATACCGTACGCTA-5'			
ArpAgpE.f	<i>arpA</i> (g. E)	5'-GATTCCATCTTGTCAAAATATGCC-3'	Desnaturalización	30	94°C
ArpAgpE.r		3'-GAAAAGAAAAAGAATTCCTCAAGAG-5'			
TrpBA.f	<i>trpA</i> (C.Int)	5'-CGGCGATAAAGACATCTTCAC-3'	Elongación		72°C
trpBA.r		3'-GCAACGCGGCCTGGCGGAAG-5'			

5.5. CARACTERIZACIÓN MEDIANTE (GTG)₅

Para llevar a cabo el proceso, se realizó la extracción del ADN mediante el procedimiento de ebullición descrito previamente en el apartado 5.2 y se realizó la amplificación rep-PCR GTG₅ siguiendo el perfil descrito por **Healy et al., (2005)**. Las condiciones del proceso se describen en la tabla 4. Finalmente los productos se sometieron a electroforesis en gel de agarosa al 1 % p/v a 100 V durante 1 h. Se empleó un marcador de peso molecular de 1kb como patrón de la electroforesis, el gel se visualizó con el reactivo de RedSafeTM de tinción, y se llevó a un transiluminador con luz ultravioleta, acoplado a una cámara digital Canon Power Shot G11 y el análisis filogenético se realizó empleando el programa PyELph con el método de agrupamiento jerárquico aglomerativo simple UPGMA y el coeficiente de similitud de Dice con una tolerancia del 2 % (**Rios et al., 2019**).

Tabla 5. Condiciones del proceso de la PCR palindrómica extragénica

Cebador	Secuencia de primer	Etapas	Ciclos	T°	Tiempo
GTG ₅	5'-GTGGTGGTGGTGGTG-3'	Desnaturalización inicial	1	95°C	2 min
		Desnaturalización Hibridación elongación	30	94°C 90°C 72°C	30 seg 1 min 2 min
		Elongación final	1	72°C	8 min

5.6. CARACTERIZACIÓN MEDIANTE MLST

Para establecer las relaciones filogenéticas de las cepas de *E. coli* se utilizó la técnica de MLST mediante la amplificación, purificación y secuenciación de siete genes conservados “housekeeping” (*adh*, *fumC*, *gyrB*, *icd*, *mdh*, *purA* y *recA*) que se encuentran en la tabla 6. Las condiciones del proceso llevado a cabo se muestran en la tabla 7 (**Wirth et al., 2006**).

Tabla 6. Cebadores empleados en la amplificación MLST.

Diana	Cebador	Secuencia 5` - 3`	Tamaño pb
<i>adk</i>	<i>adkF</i> <i>adkR</i>	ATTCTGCTTGGCGCTCCGGG CCGTCAACTTTTCGCGTATTT	583
<i>fumC</i>	<i>fumCF</i> <i>fumCR</i>	TCACAGGTCGCCAGCGCTTC GTACGCAGCGAAAAAGATTC	806
<i>gyrB</i>	<i>gyrBF</i> <i>gyrBR</i>	TCGGCGACACGGATGACGGC ATCAGGCCTTCACGCGCATC	911
<i>icd</i>	<i>icdF</i> <i>icdR</i>	ATGGAAAGTAAAGTAGTTGTTCCGGCACA GGACGCAGCAGGATCTGTT	878
<i>mdh</i>	<i>mdhF1</i> <i>mdhR1</i>	AGCGGTTCTGTTCAAATGC CAGGTTCAGAACTCTCTCTGT	932
<i>purA</i>	<i>PurAF</i> <i>purAR</i>	CGCGCTGATGAAAGAGATGA CATACGGTAAGCCACGCAGA	816
<i>recA</i>	<i>RecAF</i> <i>recAR</i>	CGCATTGCTTTACCCTGACC TCGTGAAATCTACGGACCGGA	780

Una vez realizada la PCR, los productos obtenidos fueron purificados con el kit (NucleoSpin Gel and PCR Clean-up, Mini kit) siguiendo las indicaciones del fabricante. La secuenciación de los productos de PCR fue realizada en el Laboratorio de Técnicas Instrumentales (LTI) de la Universidad de León utilizando el secuenciador Megabace 500 (Amersham Bioscience, Piscataway, NJ, USA). Las secuencias obtenidas se revisaron y editaron visualmente utilizando el Software Chromas Lite 2.1 y alineado con ClustalW. A cada locus genético se le asignó un número de alelo y una secuencia implementado en la plataforma EnteroBase. El análisis para establecer la agrupación de los aislamientos en complejos clonales involucró 7 secuencias de nucleótidos y hubo un total de 3427 posiciones analizadas para el conjunto final de datos. Se realizó el analisis filogenetico empleando el programa MEGA 7, utilizando el metodo estadistico de



Maxima Verosimilitud Compuesta (MCL) y las distancias fueron estimadas con el modelo Kimura de 2 parámetros y el arbol se construyó aplicando el algoritmo neighbor joining y el metodo bootstrap con un N° de 1000 repeticiones.

Tabla 7. Condiciones de la técnica de PCR utilizada para la detección de los genes housekeeping mediante MLST.

<i>adk, fumC, icd y purA</i>					
Etapa	Desnaturalización inicial	30 ciclos			Elongación final
		Desnaturalización	Hibridación	Elongación	
Temperatura	95°C	95°C	54°C	72°C	72°C
Tiempo	2 min	1 min	1 min	2 min	5 min
<i>recA</i>					
Etapa	Desnaturalización inicial	30 ciclos			Elongación final
		Desnaturalización	Hibridación	Elongación	
Temperatura	95°C	95°C	58°C	72°C	72°C
Tiempo	2 min	1 min	1 min	2 min	5 min
<i>gyrB y mdh</i>					
Etapa	Desnaturalización inicial	30 ciclos			Elongación final
		Desnaturalización	Hibridación	Elongación	
Temperatura	95°C	95°C	60°C	72°C	72°C
Tiempo	2 min	1 min	1 min	2 min	5 min

6. RESULTADOS

6.1. IDENTIFICACIÓN MEDIANTE MALDI TOF:

Se recuperaron Quince cepas en total obtenidas a partir de las muestras de carne analizadas, de las cuales, trece cepas fueron asociadas al patotipo STEC denominadas (ST) y dos cepas asociadas al patotipo EPEC (F). Todas fueron caracterizadas en el laboratorio de Higiene y Tecnología de los Alimentos de la Universidad de León en España.

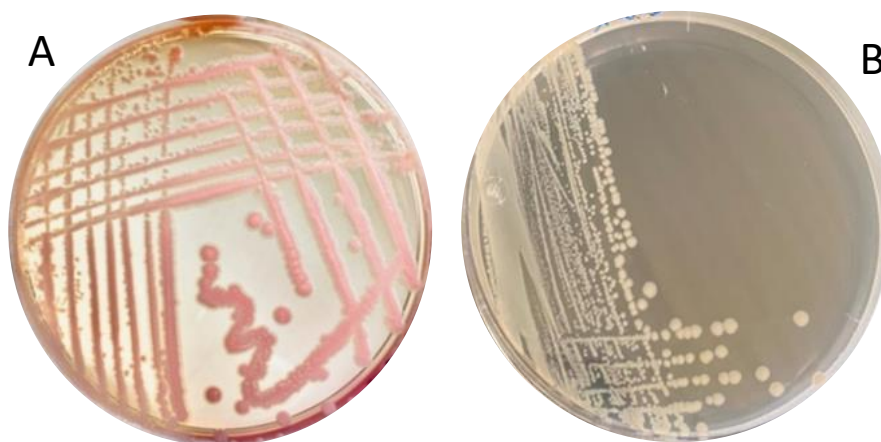


Figura 11. A: *Escherichia coli* sorbitol positivo en agar MacConkey Sorbitol; **B:** colonias positivas en agar TSA. **Fuente propia.**

Posteriormente, la identificación bacteriana mediante MALDI-TOF se realizó a las 15 cepas aisladas a partir de muestras de carne obtenida en establecimientos en Pamplona, Colombia. Los resultados de los espectros de masas del perfil proteico bacteriano permitieron identificar a las cepas como 100% especies de *Escherichia coli* con valores de puntaje entre 2.3 y 3.0 lo que indica una buena identificación definitiva a nivel de especie (**Tabla 8-9**). El proceso de identificación se realizó por duplicado para obtener una mayor precisión de los resultados, y las consecuencias de la reproducibilidad del MALDI-TOF MS mostraron que el resultado era consistente para todas las muestras bacterianas analizadas.

Tabla 8. Rango de valores de interpretación e identificación de microorganismos mediante MALDI-TOF.

Range	Interpretation	Symbols	Color
2.00 - 3.00	High-confidence identification	(+++)	green
1.70 - 1.99	Low-confidence identification	(+)	yellow
0.00 - 1.69	No Organism Identification Possible	(-)	red
Category	Interpretation		
(A)	High consistency: The best match is a high-confidence identification. The second-best match is (1) a high-confidence identification in which the species is identical to the best match, (2) a low-confidence identification in which the species or genus is identical to the best match, or (3) a non-identification.		
(B)	Low consistency: The requirements for high consistency are not met. The best match is a high- or low-confidence identification. The second-best match is (1) a high- or low-confidence identification in which the genus is identical to the best match or (2) a non-identification.		
(C)	No consistency: The requirements for high or low consistency are not met.		

Tabla 9. Ejemplos de especies bacterianas obtenidas del análisis de MALDI-TOF

Sample Name	Sample ID	Organism (best match)	Score Value	Organism (second-best match)	Score Value	Matched Pattern	Comment
A8 (+++)(A)	80 (Standard)	Escherichia coli	2.41	Escherichia coli	2.36	Citrobacter anomalanicus DSM 4593T DSM	Species of this genus have very similar patterns: Therefore distinguishing their species is difficult.
A9 (+++)(A)	82 (Standard)	Escherichia coli	2.38	Escherichia coli	2.16	Citrobacter farmeri CCUG 29877 CCUG	Species of this genus have very similar patterns: Therefore distinguishing their species is difficult.
A10 (+++)(A)	84 (Standard)	Escherichia coli	2.38	Escherichia coli	2.23	Citrobacter farmeri CCUG 57349 CCUG	Species of this genus have very similar patterns: Therefore distinguishing their species is difficult.
A11 (+++)(A)	86 (Standard)	Escherichia coli	2.48	Escherichia coli	2.31	Citrobacter freundii 22054_1 CHB	Species of this genus have very similar patterns: Therefore distinguishing their species is difficult.
B1 (+++)(A)	87 (Standard)	Escherichia coli	2.34	Escherichia coli	2.31	Escherichia coli ATCC 25922 CHB	closely related to Shigella / Escherichia fergusonii and not definitely distinguishable at the moment
B2 (+++)(A)	94 (Standard)	Escherichia coli	2.32	Escherichia coli	2.27	Escherichia coli ATCC 25922 THL	closely related to Shigella / Escherichia fergusonii and not definitely distinguishable at the moment

6.2. DETECCIÓN DE LOS GENES *eae*, *bfpA* y *stx* MEDIANTE PCR:

Para la detección de los genes de virulencia, se realizó un ensayo de PCR para los genes *stx*, *eae* y *bfpA* en las 15 cepas. La electroforesis en gel de agarosa realizada a los amplificadores permitió confirmar la presencia de los genes *stx* (+) así como ausencia de los genes *eae*(-) en 13 de los 15 aislados según lo reportado por **Herrera et al en 2019**, donde se evidenció que el gen *stx2* tuvo mayor prevalencia en comparación a *stx1* asociándolas al patotipo STEC, adicionalmente, el ensayo de PCR permitió detectar que las 2 cepas incluidas al estudio (denominadas F25 y F26) portaban los genes *eae* (13%) pero no portaban genes *stx* implicados en la producción de Toxinas Shiga ni los genes *bfpA* atribuyendo a la presencia del patotipo *E. coli* aEPEC por su asociación con tales genes (**tabla 10**).

Tabla 10. Genes de virulencia implicados en la patogenicidad de E. coli.

cepa →	ST15	ST16	ST20	ST37	ST74	ST80	ST82	ST84	ST86	ST87	ST94	ST97	ST98	F25	F26
↓ Gen															
Stx (1-2)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
eae	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
bfpA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

6.3. RESISTENCIA ANTIBIOTICA BACTERIANA

El ensayo fenotípico realizado a las cepas mediante la técnica de difusión en disco para el carácter productor de ESBL mostró que las cepas eran ESBL negativas siendo sensibles a los antibióticos β -lactámicos de tercera generación ensayados de forma individual (cefotaxima y ceftazidima) y en conjunto (cefotaxima + ácido clavulánico y ceftazidima + ácido clavulánico) evidenciándose halos obtenidos con más de 20 mm de diámetro (figura 12) en todas las cepas ensayadas.

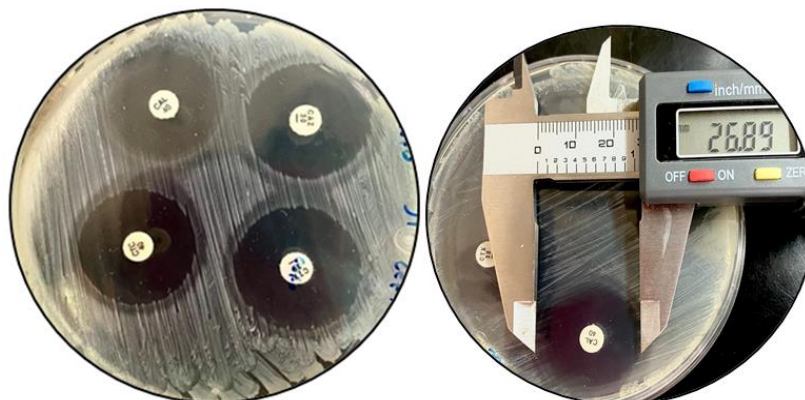


Figura 12. Ejemplo del ensayo fenotípico del carácter productor ESBL mediante la técnica de difusión en placa. **Fuente propia.**

6.4. DETERMINACIÓN DEL GRUPO FILOGENÉTICO:

Establecida la presencia de los genes *stx*, *eae* y *bfpA* en las 15 cepas, se realizó la determinación de los grupos filogenéticos para *E. coli* mediante la PCR Quadruplex según el protocolo descrito por Clermont *et al* en 2013, con base en el cual se analizaron las cepas para clasificarlas en alguno de los cuatro grupos filogenéticos (A, B1, B2, D o E) según la detección de un patrón del conjunto de genes característicos de acuerdo a las combinaciones establecidas de los genes *chuA*, *yjaA*, *TspE4C2* y *arpA*. (Clermont *et al.*, 2013). Una vez amplificados los genes en las quince cepas, se obtuvo como resultado presuntivo la asociación al filo grupo “E” con la presencia de los genes *chuA*, *TspE4.C2* y *arpA* y ausencia del gen *yjaA*. Mediante una PCR adicional se realizó la detección de una variante del gen *arpA* (figura 13A), específica del filogrupo E así como del gen *trpA* empleado como control interno e igualmente específico de dicho filogrupo (figura 13 B). Con base a los resultados obtenidos en este estudio (tabla 9) se encontró que todas las cepas pertenecían al grupo filogenético “E” con verificación de la presencia de la variante *arpA* y el control interno *trpA*. (Clermont *et al.*, 2013).



Figura 13. Bandas amplificadas de confirmación del filo grupo E mediante PCR. (A): verificación de filogrupo mediante la variante del gen *arpA*. (B): Confirmación de la variante del filogrupo E más control interno (gen *trpA*). **Fuente propia.**

Tabla 11. Clasificación de las cepas *E. coli* estudiadas según el conjunto de genes de la clasificación Clermont.

Grupo filogenético →	A	B1	F	B2	B2	B2	A o C	D o E	E
Genotipo ↓ Cuadruplex									
<i>chuA</i>	+	+	-	-	-	-	+	+	+
<i>yjaA</i>	-	-	-	+	+	-	+	-	-
<i>TspE4C2</i>	-	+	-	-	+	+	-	-	+
<i>arpA</i>	+	+	-	-	-	-	+	+	+
Control interno <i>trpA</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	+

6.5. CARACTERIZACIÓN MEDIANTE (GTG)₅

En este estudio se realizó la clasificación genética de las cepas empleando la PCR de repeticiones palindrómicas GTG₅, esta técnica ha sido ampliamente utilizada para taxonomía bacteriana, análisis filogenético y aplicaciones epidemiológicas durante los últimos años gracias a su poder discriminatorio. Los resultados obtenidos del análisis de conglomerados de los perfiles bacterianos mediante GTG₅, evidenció un perfil clonal heterogéneo de las cepas analizadas, que se pudieron adscribir a 6 perfiles concretos de los cuales el perfil 1 representa el grupo con el mayor número de cepas agrupadas (8 cepas de las 13 cepas de STEC), y otras cinco agrupaciones de las cepas según los perfiles de las bandas obtenidas (figura 14- 15; Tabla 12), agrupadas en patrones clonales distintos y las cepas de EPEC agrupadas como iguales. Posteriormente, con base a dicho criterio molecular se seleccionaron las cepas que mostraron perfiles de bandas distintos y unos ejemplares representativos de las que poseían patrones iguales para realizar el Análisis Multilocus de Secuencias (MLST).

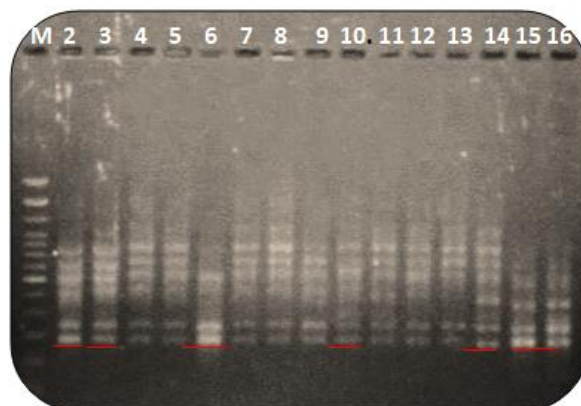


Figura 14. Bandas de los perfiles obtenidos por PCR (GTG)₅ para los aislados de *E. coli*. Línea 1: Marcador de peso molecular (1kb DNA Ladder, Promega, USA), Línea 2-16: amplificados de cepas aisladas. **Fuente propia.**

Tabla 12. Perfiles clonales detectados mediante PCR (GTG)₅.

Perfil I		Perfil II	Perfil III	Perfil IV	Perfil V	Perfil VI
ST 16	ST 82	ST 15	ST 86	ST 98	ST 74	F 25
ST 20	ST 87	ST 84				F 26
ST 37	ST 94					
ST 80	ST 97					

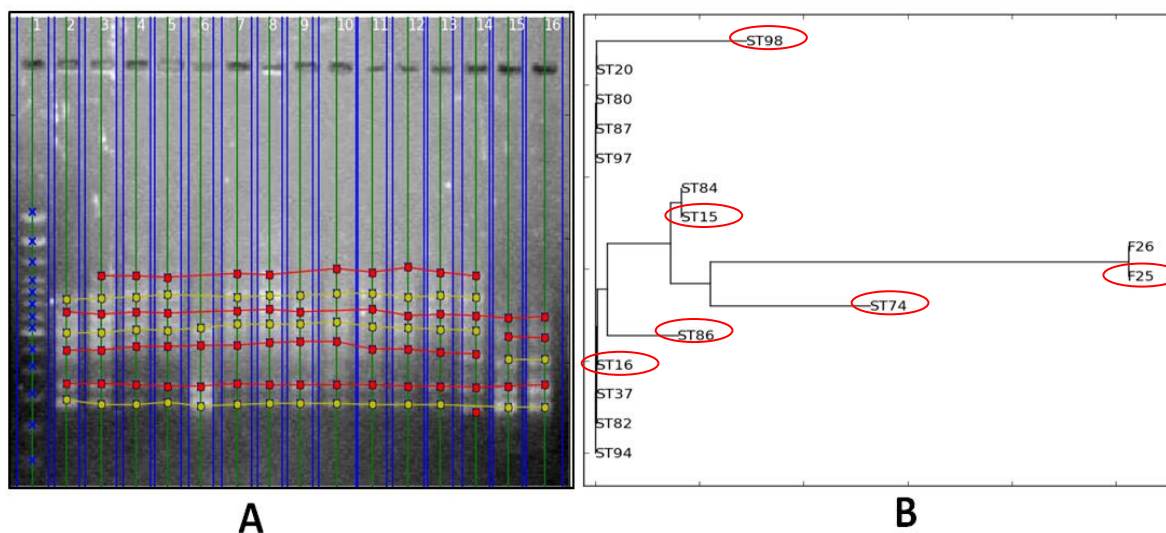


Figura 15. A: Agrupación de los perfiles bacterianos obtenidos. B: Árbol filogenético representativo de la clasificación de los 6 perfiles obtenidos de las cepas mediante PRC (GTG)₅. **Fuente propia.**

6.6. CARACTERIZACIÓN MEDIANTE MLST

Siete genes housekeeping fueron amplificados y secuenciados para las cepas seleccionadas (*adk*, *fumC*, *gyrB*, *icd*, *mdh*, *purA*, *recA*). Se determinaron entre 1 y 5 alelos diferentes que son compartidos entre las distintas cepas lo cual se evidencia en la tabla 14. El resultado MLST reveló una agrupación de las cepas en 5 perfiles, agrupando a las cepas ST15 y ST16 anteriormente clasificadas como distintas, en un mismo perfil idéntico mediante MLST las cuales son representativas de 10 cepas STEC de las 13 en total; además, se evidenciaron nuevos posibles perfiles alelicos no registrados hasta el momento en la base de datos MLST las cuales fueron nombradas como NmD (No Match Detected) evidenciándose que la mayoría de las cepas poseían una o más secuencias desconocidas, por lo cual no se estableció ningún ST bacteriano. El gen *fumC* fue el gen más variable (no se evidenció ninguna secuencia detectada conocida en las cepas), mientras que el gen *mdh* y *purA* fueron los que mostraron un perfil alelico más estable, y los demás genes con 1 o más secuencias desconocidas (tabla 13).

Tabla 13. Perfiles de alelos y frecuencias obtenidas mediante MLST de las cepas analizadas.

	<i>adk</i>	<i>fumC</i>	<i>gyrB</i>	<i>icd</i>	<i>mdh</i>	<i>PurA</i>	<i>recA</i>
15	Nm D	Nm 1	3	16	9	7	7
16	Nm D	Nm 2	Nm D	1251	9	8	7
74	Nm 3	Nm D	Nm D	12	8	8	Nm D
86	Nm 4	Nm 4	32	Nm 1	9	8	NM 2
98	6	Nm D	5	12	8	8	Nm D
f25	6	Nm 6	5	Nm 2	20	8	NM 4

Nm: No match.

Nm D: Alelos nuevos obtenidos relacionados filogenéticamente.

Tabla 14. Número de alelos compartidos relacionados entre las cepas estudiadas.

	ST15	ST16	ST74	ST86	ST98	F25
ST 15	7	3	0	1	0	0
ST 16	3	7	1	1	0	0
ST 74	0	1	7	1	5	1
ST 86	1	1	1	7	1	1
ST 98	0	0	5	1	7	3
f25	0	0	1	1	3	7

Se realizó el árbol filogenético empleando el programa MEGA 7; el análisis involucró 7 secuencias de nucleótidos. Se evidenció que algunas de las cepas de *E. coli* analizadas tenían una menor relación filogenética entre sí. El análisis individual de las secuencias de los alelos para cada gen en las cepas permitió evidenciar que algunas secuencias desconocidas (Nm D) eran iguales entre distintas cepas, las cuales se muestran resaltadas en la tabla 13, no obstante algunas de ellas diferían entre sí. Finalmente, el árbol filogenético de las secuencias concatenadas de los 7 genes en las cepas estudiadas se presenta en la figura 16.

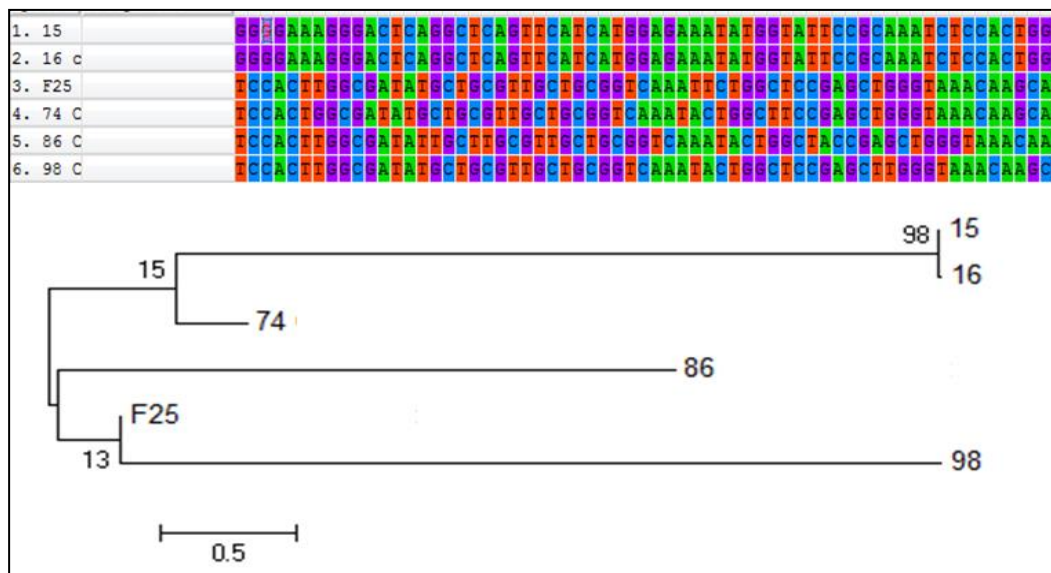


Figura 16. Árbol filogenético obtenido del análisis de las secuencias concatenadas de los 7 genes housekeeping en las cepas estudiadas de *E.coli* mediante el MLST. Fuente propia.



7. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

7.1. IDENTIFICACIÓN MEDIANTE MALDI-TOF

El medio de cultivo MacConkey Sorbitol (SMAC) es un medio de diferenciación selectivo para el aislamiento y diferenciación fenotípica de cepas de *E. coli*. Este medio utiliza peptona como fuente principal de nitrógeno, además de otros compuestos como las sales biliares y el cristal violeta que actúan como agentes selectivos para inhibir el crecimiento de organismos Gram positivos. Adicionalmente, emplea D-sorbitol, como carbohidrato fermentable para la diferenciación de cepas de *E. coli* a partir de diferentes muestras. **(Becton, 2003)**. En MacConkey Sorbitol, *E. coli* O157 no tienen la capacidad de fermentar el D-sorbitol, mientras que otras cepas de *E. coli* generalmente si fermentarán el sorbitol, permitiendo su diferenciación e identificación dando lugar a colonias de color rosa **(Herrera et al., 2019)**.

La identificación de patógenos en alimentos depende principalmente de las características fenotípicas que expresan los microorganismos, además existen características genotípicas de los mismos que permiten su identificación **(Shell et al., 2017)**. El análisis mediante MALDI-TOF o análisis proteómicos para la identificación de aislados bacterianos identifica de forma rápida y precisa la mayoría de las especies bacterianas mediante el análisis del espectro de masas de células bacterianas enteras. Los patrones de masa bacteriana se derivan de proteínas bacterianas ribosómicas u otras proteínas bacterianas abundantes que permiten identificar distintos microorganismos, además podrían usarse como biomarcadores para la discriminación de subespecies **(Sauget et al., 2017)**.

Ha sido reconocido como un método de identificación rápido, confiable y económico. En nuestro estudio, MALDI-TOF dio una puntuación válida para la identificación de género y especies cuando se usó en la identificación de cultivos de *E. coli* previamente analizados mediante PCR, esto concuerda con otros estudios realizados por **Ge et al., (2017)** y **Shell et al., (2017)** donde reportaron la identificación de especies bacterianas de *E. coli* utilizando la técnica MALDI-TOF



con un porcentaje de confiabilidad del 94.7% y del 80% respectivamente, en comparación con otros métodos de identificación.

Los resultados de este estudio revelaron que no se observaron diferencias importantes y que la sensibilidad del análisis MALDI-TOF fue buena. Esta técnica muestra ser una promesa significativa en la caracterización de *E. coli* a nivel de género y especie, no obstante también se podría utilizar como una herramienta para la tipificación de subespecies y serovar, pero esto requerirá de la realización de estudios adicionales y modificaciones de los protocolos existentes así como las bases de datos comerciales y extendidas (**Jesumirhewe et al., 2016; Ge et al., 2017**). Por otro lado, las características operativas superiores de la técnica también han generado un considerable interés en la aplicación con fines epidemiológicos. La diferenciación de subespecies mediante el análisis de espectros de masas MALDI-TOF de células completas se ha realizado hasta ahora en una serie de estudios taxonómicos para apoyar las filogenias basadas en secuenciación de foco único o múltiple (**Christner et al., 2014**).

7.2. DETECCIÓN DE LOS GENES *eae*, *bfpA* y *stx* MEDIANTE PCR:

La presencia de los genes *stx* en cepas de *E. coli* representan la característica principal del patotipo STEC y se asocian con la producción de Toxinas Shiga (*stx1*, *stx2*) implicadas en la virulencia principal de STEC. La Toxina Shiga 1 es 98% homóloga al *stx* producido por *Shigella dysenteriae* tipo 1, mientras que *stx2* es aproximadamente 60% homólogo con *stx1* y es antigénicamente diferente (**De Sablet et al., 2008; Lv et al., 2010**). Estudios epidemiológicos y experimentales *in vivo* e *in vitro* han permitido evidenciar que los genes *stx2* en este patógeno son el factor de virulencia más importante asociado con la enfermedad grave en humanos, son mil veces más citotóxicos que *stx1* para las células endoteliales renales humanas, ya que cuando *E. coli* STEC presenta producción de *stx2*, se ha evidenciado más comúnmente—enfermedades graves en humanos que aquellos aislados que producen *stx1* o *stx1* más *stx2* (**Sallam et al., 2013**).

Por otro lado, los resultados evidenciaron la presencia del gen *eae* que codifica para la intimina en las dos nuevas cepas incluidas con ausencia de genes *stx* y



bfpA estableciéndolas como cepas de *E. coli* aEPEC. Por definición, todos los patotipos de EPEC carecen de genes para producir la Toxina Shiga, pero tienen la capacidad de producir la intimina, una proteína de membrana externa encargada de favorecer al proceso de fijación y borrado (A/E) en la cual las bacterias se adhieren firmemente a la membrana celular del huésped causando una interrupción de la superficie celular que conduce a la eliminación de las microvellosidades provocando consigo los cuadros diarreagénicos (**Asadi et al., 2010**). Adicionalmente, se observó que no estaba presente el gen *bfpA*, esta característica principal se da en EPEC atípico (aEPEC) ya que no posee el plásmido EAF y no expresan los genes *bfp* encargados de codificar fimbrias formadoras de haces que originan la adherencia localizada a diferencia de EPEC típicos (tEPEC) los cuales son de origen humano y poseen el plásmido de virulencia EAF (factor de adherencia EPEC) que codifica la adherencia localizada en células epiteliales. Según este concepto, la diferencia básica entre EPEC típico y atípico es la presencia del plásmido EAF en el primer grupo de organismos y su ausencia en el segundo. Este último grupo es de gran importancia ya que su reservorio principal son los animales y tienen implicación directa en procesos de infección por su transmisión a los humanos (**Trabulsi et al., 2002**). En un estudio reportado por **Contreras et al., (2010)** se obtuvo que a partir de una colección de cepas de *E. coli* caracterizadas, el 73% de las cepas pertenecían a EPEC atípicas siendo *eae* (+), *bfp* (-). Su determinación en muestras alimentarias es de gran importancia ya que la caracterización y determinación de las cepas de EPEC ha cobrado preocupación debido a que su aislamiento se ha incrementado en niños que no son solamente asintomáticos, sino también en niños con diarrea durante brotes epidémicos (**Farfán et al., 2016**) Resultados análogos fueron obtenidos por **Asadi et al., (2010)** evidenciando la presencia de genes de intimina (*eae*) en 17 (5.3%) aislamientos de cepas EPEC caracterizadas genéticamente y sin presencia de genes *stx*.



7.3. RESISTENCIA ANTIBIOTICA BACTERIANA

Los resultados obtenidos del ensayo fenotípico del carácter productor de ESBL de los patotipos EPEC mostraron que eran (100%) ESBL negativos. La detección fenotípica de producción de ESBL está condicionada por la presencia y cantidad de enzima β -lactamasa producida y por otros mecanismos de resistencia basados en la capacidad de esta enzima para hidrolizar cefalosporinas de tercera y de cuarta generación, así como monobactámicos (**Jiménez et al., 2016**). Estos hallazgos son importantes debido a que algunos artículos han descrito a cepas de *E. coli* del patotipo STEC que son ESBL positivo como por ejemplo lo reportado por **Ishii et al., (2005)**, lo que puede dar lugar a un incremento en problemas de salud más graves generando mayor preocupación (**Torpdahl et al., 2013**).

7.4. DETERMINACIÓN DE GRUPO FILOGENÉTICO

Las cepas de *E. coli* han demostrado ser genéticamente muy diversas, de modo que ha sido necesario llegar a una clasificación basada en antecedentes filogenéticos. Inicialmente el científico Clermont diseñó un protocolo de clasificación basado en una PCR-triple, mediante la utilización de diferentes genes tales como *ChuA*, *yjaA* y *TspE4C2*. En el 2000 inicialmente se adoptó la clasificación de *E. coli* en cuatro grupos filogenéticos distinguiendo a las cepas de *E. coli* como intestinales comensales, pertenecientes a los grupos A y B1, así como las cepas extra intestinales capaces de producir virulencia asociadas a los grupos B2 y D. Debido a la complejidad estructural genética de *E. coli*, tres años más tarde se estableció una nueva combinación con la adición del gen *arpA* así como más grupos filogenéticos (A, B1, B2, C, D, E, F) y otro grupo filogenético sin completa identificación que permite clasificarlas según los datos obtenidos (**Serrano et al., 2016**).

Las cepas del grupo E son consideradas como patógenos de relevancia clínica e implicadas en procesos infecciosos capaces de producir distintos factores de virulencia, además tienen la capacidad de albergar genes encargados de causar la colonización, adherencia, invasión así como evasión de los distintos mecanismos de defensa del hospedero humano (**Millán et al., 2014**). El gen *arpA* tiene la



función de actuar con base a dos objetivos claves en la identificación y clasificación de *E. coli*; uno de ellos, es actuar como control interno para la calidad del ADN, ya que con su adición todas las cepas de *E. coli* y clado I producen al menos un producto de PCR usando la PCR cuádruplex y por otro lado, favorece a la diferenciación de las cepas que pertenecen al grupo filo identificadas tiempo atrás como D, ya que *arpA* está presente en todas las cepas de *E. coli* a excepción de las que pertenecen al grupo filo B2 y F como por ejemplo *Escherichia albertii* y *Escherichia fergusonii* (Hasanpour & Najafi, 2017). Los resultados obtenidos concuerdan con lo reportado por Karimi *et al.*, (2013) quienes realizaron la asignación filogenética de cepas aisladas de muestras de alimentos congelados de origen animal, obteniendo cepas de *E. coli* patógenas implicadas en procesos infecciosos al grupo filogenético B2 (6.3%) y el D (23.4 %). Adicionalmente, sus datos mostraron que estas cepas eran resistentes a la tetraciclina y la amoxicilina. Por otro lado, la presencia de los genes *chuA*, han revelado que estos contribuyen como un sistema para transportar el grupo hemo en *E. coli* O157:H7, así mismo se ha descubierto que *TspE4.C2* actúa como un gen putativo de lipasa esterasa y el gen *yjaA*, se considera aún con función desconocida, pero se ha observado que está presente en el genoma de *E. coli* k-12 (Hasanpour & Najafi, 2017).

7.5. CARACTERIZACIÓN MEDIANTE PCR (GTG)₅

La rep-PCR GTG₅ representa un método fácil de realizar basado en cebadores complementarios a ciertas secuencias repetitivas de los genomas bacterianos. Esta PCR es un conjunto de repeticiones palindrómicas extragénicas que amplifica el elemento repetitivo (GTG) 5 que se extiende por los genomas bacterianos (Švec *et al.*, 2005). En este estudio, se realizó la rep-PCR GTG₅ a 15 cepas aisladas de muestras de carne, y el resultado obtenido evidenció un perfil clonal heterogéneo de las cepas analizadas, que se pudieron adscribir a perfiles concretos. En total se diferenciaron 6 patrones distintos, de los cuales el perfil 1 agrupó 8 de las 13 cepas de STEC con características genéticas similares y los



demás con agrupaciones de 1 o 2 cepas; a partir de ello se pudo realizar un screening de las mismas con perfiles clónales característicos para el análisis MLST. Durante el proceso de la rep-PCR GTG₅, se emplea cebadores complementarios a secuencias consensos repetitivas no codificantes que están presentes en múltiples copias en los genomas de la mayoría de las bacterias Gram-negativas y Gram-positivas, de esta forma permite que se unan al ADN llevando a cabo la diferenciación de los microorganismos mediante análisis genotípico, amplificando los distintos sitios de repetición produciendo fragmentos de ADN de diversos tamaños que se separan por electroforesis en gel de agarosa resultando en perfiles de bandas únicas comparables y que serán característicos para una cepa bacteriana específica permitiendo analizar sus relaciones genéticas. Por otro lado, se considera que estas unidades repetitivas están altamente conservadas porque los sitios de repetición son sitios cruciales de interacción ADN-proteína y/o que estas secuencias pueden diseminarse a sí mismas como ADN egoísta por conversión génica (**Mohapatra et al., 2008**). **Kathleen et al., (2013)** reportaron el uso de la rep-PCR GTG₅ como una herramienta para detectar la diversidad clonal de aislamientos bacterianos de distintos ambientes con una posterior secuenciación genómica bacteriana. Por otro lado, **Silvia et al., (2009)** reportaron el análisis genotípico y relaciones filogenéticas empleando GTG₅ de 72 cepas de *E. coli* aisladas de vacas lecheras, encontrando una amplia diversidad genética 40 tipos de patrones clonales obtenidos. Esta técnica, es un método sencillo basado en PCR que ofrece las ventajas de ser confiable, de bajo costo y útil para estudios de ecología microbiana, microbiología ambiental, diagnóstico molecular, microbiología médica y análisis epidemiológicos para escribir un amplio rango de bacterias Gram-negativas (**Kathleen et al., 2014**).



7.6. CARACTERIZACIÓN MEDIANTE MLST

El análisis multilocus de secuencias empleando los genes vinculados housekeeping, es una herramienta funcional para investigar las relaciones filogenéticas y entender la relación clonal entre los aislados, MLST se dirige a secuencias de varios genes de "mantenimiento" para la diferenciación de cepas proporcionando una nomenclatura de tipos de secuencia basada en los perfiles alélicos de las cepas (**Verma et al., 2020**).

Los hallazgos obtenidos de este estudio evidenciaron que algunas de las cepas analizadas tienen menor relación filogenética entre sí, así como que son alélicamente variables y que poseen secuencias no registradas en la base de datos MLST de *E. coli* y por ende no es posible asignar un ST bacteriano, además que ST15 y ST16 fueron agrupadas en un perfil idéntico mediante MLST evidenciando 5 perfiles clónales representando a 10 cepas STEC. Algunas razones por las que un evento genético como este resulte en nuevas secuencias desconocidas no identificadas de posibles alelos desconocidos, es que ocurra por una mutación puntual, bien sea alterando solo un sitio de nucleótidos o por un reemplazo recombinacional, lo que a menudo cambiará múltiples sitios dando lugar a diferencias generando nuevas secuencias (**Urwin & C.J, 2003**). Hallazgos de resultados similares a este estudio han sido reportados como el realizado por **Cavalcanti et al., (2020)** quienes realizaron la tipificación molecular de cepas de *Escherichia coli*, obteniendo que un 35% de las cepas estudiadas tenían secuencias sin registrar y sin asignación de ST de acuerdo a la base de datos de MLST de *E. coli*. Por otro lado, **Goldberg et al., (2006)** analizaron las relaciones filogenéticas de cepas de *Escherichia coli* mediante rep-PCR y MLST obteniendo que los datos rep-PCR arrojaron árboles con una alta correspondencia topológica con los árboles basados en MLST indicando que tanto rep-PCR como MLST producen un buen análisis de las relaciones de *E. coli* pero MLST con un poder discriminatorio mayor. El uso de métodos con un poder discriminatorio superior como MLST pueden mejorar la precisión de los resultados obtenidos con otras técnicas como los obtenidos con Rep-PCR GTG₅ (**Goldberg et al., 2006**).



8. CONCLUSIONES

- Este es el primer reporte de patotipos de *E. coli* de transmisión alimentaria de origen bovino circulantes en Pamplona, Colombia. El análisis del espectro de masas MALDI-TOF identificó molecularmente a las cepas como *Escherichia coli*.
- Se detectó y se comprobó la presencia de genes que codifican factores de virulencia (*stx* y *eae*) asociando patotipos STEC y EPEC respectivamente; las cepas analizadas están asociadas al filo grupo E, consideradas como patógenos de relevancia clínica e implicadas en procesos infecciosos;
- Las cepas asociadas al patotipo EPEC analizadas, no evidenciaron fenotípicamente resistencia frente a antibióticos β -lactámicos de tercera generación.
- El perfil genético GTG₅ reveló 6 agrupaciones de las cepas estableciendo un patrón clonal heterogéneo con diferencias y agrupaciones clonales entre sí.
- El perfil alélico MLST agrupó finalmente las cepas en 5 grupos clonales y reveló cepas con baja relación filogenética entre sí y alélicamente variables con secuencias desconocidas no incluidas en la base de datos MLST de *E. coli*.



9. RECOMENDACIONES

- Se recomienda realizar estudios adicionales de serotipificación para ampliar el conocimiento sobre serogrupos específicos circulantes en la región, y el uso de otras técnicas moleculares como Electroforesis en Gel de Campo Pulsado (PFGE) para obtener mayor información genética de las cepas en cuestión y dirigir acciones preventivas y correctivas con el fin de disminuir el impacto sobre la salud pública de las cepas STEC y EPEC.



10. REFERENCIAS.

1. Al-Zogibi, O., Mohamed, M., Hessain, A., El-Jakee, J., & Kabli, S. (2015). Molecular and serotyping characterization of shiga toxigenic *Escherichia coli* associated with food collected from Saudi Arabia. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 22(4), 438–442. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2015.02.019>
2. Alegría, Á., Arias, M., Fernández, I., Rodríguez, JM., García, M., & Santos, J. (2020). Molecular diversity of ESBL-producing *Escherichia coli* from foods of animal origin and human patients. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17(4). <https://doi.org/10.3390/ijerph17041312>
3. Álvarez, M., Otero, A., García, M., Dahbi, G., Blanco, M., Mora, A., Blanco, J., & Santos, J. (2016). Genetic characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and atypical enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) isolates from goat's milk and goat farm environment. *International Journal of Food Microbiology*, 236, 148–154. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.07.035>
4. Amézquita, B., Soto, M., Lee, G., Yambao, C., & Quiñones, B. (2018). Isolation, genotyping and antimicrobial resistance of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, 51(4), 425–434. <https://doi.org/10.1016/j.jmii.2017.07.004>
5. Amézquita, Z., Tamborski, M., Kopsombut, G., Zhang, C., Arzuza, O., & Gómez, O. (2015). Genetic relatedness among *Escherichia coli* pathotypes isolated from food products for human consumption in Cartagena, Colombia. *Foodborne Pathogens and Disease*, 12(5), 454–461. <https://doi.org/10.1089/fpd.2014.1881>
6. Arias, M., Farfán, A., Iqbal, J., Sánchez, T., Zhang, C., & Gómez, O. (2016). Caracterización genotípica y fenotípica de cepas emergentes de *Escherichia coli* aisladas de niños con diarrea en Bucaramanga y su área metropolitana, Colombia. *Revista Facultad de Ciencias de La Salud UDES*, 3(1. S1), 29. <https://doi.org/10.20320/rfcsudes.v3i1.s1.p015>
7. Asadi, R., Bouzari, S., Oloomi, M., Aslani, M., & Jafari, A. (2010). Phenotypic and genotypic characterization of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) strains in Tehran, Iran. *Iranian Journal of Microbiology*, 2(1), 3–7.
8. Becton Dickinson and Company. (2003). BD MacConkey Agar with Sorbitol. <https://www.bd.com/es-es/about-bd>
9. Bou, G., Fernández, A., García, C., Sáez, J., & Valdezate, S. (2011). Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología.



Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica, 29(8), 601–608.
<https://doi.org/10.1016/j.eimc.2011.03.012>

10. Bouzari, S., Jafari, A., & Aslani, M. (2012). *Escherichia coli*: A brief review of diarrheagenic pathotypes and their role in diarrheal diseases in Iran. *Iranian Journal of Microbiology*, 4(3), 102–117.
11. Canet J. (2016). *Escherichia Coli*: características, patogenicidad y prevención (I). <http://www.betelgeux.es/blog/2016/01/19/escherichia-coli-caracteristicas-patogenicidad-y-prevencion-i/>
12. Castro, N., Alonso, A., Silva, J., & Armenta, A. (2009). *para la tipificación molecular de aislados de Enterobacter cloacae productores de β - lactamasas de espectro extendido*. 4, 165–174.
13. Cavalcanti, F., Hernandes, T., Takagi, E., Guth, C., Ori, É. de L., Pinheiro, S., De Andrade, S., Oliveira, S., Cergole, C., Francisco, G., & Dos Santos, L. (2020). Virulence profiling and molecular typing of shiga toxin-producing *E. Coli* (STEC) from human sources in brazil. *Microorganisms*, 8(2). <https://doi.org/10.3390/microorganisms8020171>.
14. (CDC)Centers for Disease Control and Prevention . (2018). National Enteric Disease Surveillance: Shiga Toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) Annual Report, 2016.
15. (CDC) Centers for Disease Control and Prevention . (2019a). Chapter 4 Travel-Related Infectious Diseases. <https://wwwnc.cdc.gov/travel/yellowbook/2020/travel-related-infectious-diseases/escherichia-coli-diarrheagenic>
16. (CDC)Centers for Disease Control and Prevention. (2020). Outbreak of *E. coli* Infections Linked to Romaine Lettuce. <https://www.cdc.gov/ecoli/2019/o157h7-11-19/index.html>
17. Chalbaud, A., Redondo, C., Fernandez, S., & Pino, Y. (2012). Genotipificación bacteriana y Epidemiología Molecular de las infecciones bacterianas. *Memorias Del Instituto de Biología Experimental*, 6, 41–44.
18. Christner, M., Trusch, M., Rohde, H., Kwiatkowski, M., Schlüter, H., Wolters, M., Aepfelbacher, M., & Hentschke, M. (2014). Rapid MALDI-TOF mass spectrometry strain typing during a large outbreak of Shiga-toxigenic *Escherichia coli*. *PLoS ONE*, 9(7), 1–11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0101924>
19. Clermont, O., Christenson, J., Denamur, E., & Gordon, D. (2013). The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: Improvement of specificity and detection of new phylo-groups. *Environmental Microbiology Reports*, 5(1), 58–65. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12019>



20. Contreras, C., Ochoa, T., Lacher, D., DebRoy, C., Navarro, A., Talledo, M., Donnenberg, M., Ecker, L., Gil, A., Lanata, C., & Cleary, T. (2010). Allelic variability of critical virulence genes (*eae*, *bfpA* and *perA*) in typical and atypical enteropathogenic *Escherichia coli* in Peruvian children. *Journal of Medical Microbiology*, 59(1), 25–31. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.013706-0>
21. De Sablet, T., Bertin, Y., Varelle, M., Girardeau, J., Garrivier, A., Gobert, A., & Martin, C. (2008). Differential expression of *stx2* variants in Shiga toxin-producing *Escherichia coli* belonging to seropathotypes A and C. *Microbiology*, 154(1), 176–186. <https://doi.org/10.1099/mic.0.2007/009704-0>
22. EUCAST: European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Antimicrobial susceptibility testing EUCAST disk diffusion method [Internet].
23. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases; (2019). Disponible en: http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Disk_test_documents/2019_manuals/Manual_v_7.0_EUCAST_Disk_Test_2019.pdf.
24. (ECDC)European Center for Disease Prevention and Control. (2011). EU case definition: HUS caused by epidemic strain Shiga toxin 2-producing *Escherichia Coli*. <https://www.ecdc.europa.eu/en/all-topics-zescherichia-coli-ecolithreats-and-outbreaksoutbreak-stec-0104h4-2011/eu-case-definition>
25. (ECDC)European Center for Disease Prevention and Control . (2019). Shiga toxin/verocytotoxin-producing *Escherichia coli* (STEC/VTEC) infection - Annual Epidemiological Report. <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/shiga-toxinverocytotoxin-producing-escherichia-coli-stecvtec-infection-annual-0>
26. Fang, L., Li, X., Li, L., Li, S., Liao, X., Sun, J., & Liu, Y. (2016). Co-spread of metal and antibiotic resistance within ST3-IncHI2 plasmids from *E. coli* isolates of food-producing animals. *Scientific Reports*, 6(December 2015), 1–8. <https://doi.org/10.1038/srep25312>
27. Farfán, E., Ariza, C., Vargas, F., & Vargas, L. (2016). Mecanismos de virulencia de *Escherichia coli* enteropatógena. *Revista Chilena de Infectología*, 33(4), 438–450. <https://doi.org/10.4067/s0716-10182016000400009>
28. Franke, J., Franke, S., Schmidt, H., Schwarzkopf, A., Wieler, L. H., Baljer, G., Beutin, L., & Karch, H. (1994). Nucleotide sequence analysis of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) adherence factor probe and development of PCR for rapid detection of EPEC harboring virulence plasmids. *Journal of Clinical Microbiology*, 32(10), 2460–2463. <https://doi.org/10.1128/jcm.32.10.2460-2463.1994>



29. Ge, M. C., Kuo, A., Liu, K., Wen, Y., Chia, J., Chang, P., Lee, M., Wu, T., Chang, S., & Lu, J. (2017). Routine identification of microorganisms by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry: Success rate, economic analysis, and clinical outcome. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, 50(5), 662–668. <https://doi.org/10.1016/j.jmii.2016.06.002>
30. Goldberg, T., Gillespie, T., & Singer, R. (2006). Optimization of analytical parameters for inferring relationships among *Escherichia coli* isolates from repetitive-element PCR by maximizing correspondence with multilocus sequence typing data. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(9), 6049–6052. <https://doi.org/10.1128/AEM.00355-06>
31. Gómez, O (2014). Acute diarrheal disease caused by enteropathogenic *Escherichia coli* in Colombia. *Revista Chilena de Infectología: Organo Oficial de La Sociedad Chilena de Infectología*, 31(5), 577–586. <https://doi.org/10.4067/S0716-10182014000500010>
32. Guillen, L., Millan, B., & Araque, M. (2014). Caracterización molecular de cepas de *Escherichia coli* aisladas de productos lácteos artesanales elaborados en Mérida, Venezuela. *Infectio*, 18(3), 100–108.
33. Hasanpour, M., & Najafi, A. (2017). Development of a multiplex real-time PCR assay for phylogenetic analysis of Uropathogenic *Escherichia coli*. *Journal of Microbiological Methods*, 137, 25–29. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2017.03.009>
34. Healy, M., Huong, J., Bittner, T., Lising, M., Frye, S., Raza, S., Schrock, R., Manry, J., Renwick, A., Nieto, R., Woods, C., Versalovic, J., & Lupski, J. R. (2005). Microbial DNA typing by automated repetitive-sequence-based PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(1), 199–207. <https://doi.org/10.1128/JCM.43.1.199>
35. Herrera, F., Santos, J., & Villamizar, R. (2019). Primer reporte de *Escherichia coli* productora de Toxina Shiga no O157 que codifica el gen de la enterohemolisina en carne cruda en Colombia. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 69, 59–67.
36. (INS) Instituto Nacional de Salud. (2018). Informe de evento: Enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) 2017.
37. (INS) Instituto Nacional de Salud. (2010). Enfermedad diarreica aguda. *Revista de Salud*, 7. <https://doi.org/10.4067/S0716-10182014000500010>
38. (INS) Instituto Nacional de Salud. (2018). Boletín epidemiológico semanal Semana epidemiológica 52, 23 al 29 de Diciembre de 2018. <https://bit.ly/2C3CCKY>
39. Ishii, Y., Kimura, S., Alba, J., Shiroto, K., Otsuka, M., Hashizume, N.,



- Tamura, K., & Yamaguchi, K. (2005). Extended-spectrum β -lactamase-producing Shiga toxin gene (stx 1)-positive *Escherichia coli* O26:H11: A new concern. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(3), 1072–1075. <https://doi.org/10.1128/JCM.43.3.1072-1075.2005>
40. Jang, K., & Kim, Y. (2018). Rapid and robust MALDI-TOF MS techniques for microbial identification: a brief overview of their diverse applications. *Journal of Microbiology*, 56(4), 209–216. <https://doi.org/10.1007/s12275-018-7457-0>
41. Jesumirhewe, C., Ogunlowo, P., Olley, M., Springer, B., Allerberger, F., & Ruppitsch, W. (2016). Accuracy of conventional identification methods used for Enterobacteriaceae isolates in three Nigerian hospitals. *PeerJ*, 2016(9), 1–12. <https://doi.org/10.7717/peerj.2511>
42. Jiménez, G., Hoyos, Y., Rodríguez, J., Navarro, J., & Gutiérrez, J. (2016). Método rápido para la detección de la sensibilidad a cefotaxima en enterobacterias. *Revista Argentina de Microbiología*, 48(4), 320–324. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2016.08.002>
43. Kaper, J., Nataro, J., & Mobley, H. (2004). Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology*, 2(2), 123–140. <https://doi.org/10.1038/nrmicro818>
44. Karimi, H., Naseri, M., Menbari, S., Mobaleghi, J., & Kalantar, E. (2013). Antibiotic Resistance Pattern of *Escherichia coli* Groups A, B1, B2 and D Isolated from Frozen Foods and Children with Diarrhea in Sanandaj, Iran. *International Journal of Enteric Pathogens*, 1(1), 1–4. <https://doi.org/10.17795/ijep9037>
45. Kathleen, M., Samuel, L., Felecia, C., Ng, K., Lesley, M., & Kasing, A. (2014). (GTG)₅-PCR analysis and 16s rRNA sequencing of bacteria from Sarawak aquaculture environment. *International Food Research Journal*, 21(3), 915–920.
46. Lv, H., Ding, Y., Tong, J., Liu, A., Yi, X., Li, Q., & Wang, X. (2010). Fabrication and performances analysis of ball lenses. *2010 OSA-IEEE-COS Advances in Optoelectronics and Micro/Nano-Optics, AOM 2010*, 2(1), 8–13. <https://doi.org/10.1109/AOM.2010.5713556>
47. Mattia, D., & Manikonda, K. (2018). Morbidity and Mortality Weekly Report Surveillance for Foodborne Disease Outbreaks — United States Centers for Disease Control and Prevention MMWR Editorial and Production Staff MMWR Editorial Board. *Surveillance Summaries MMWR*, 6262(2), 1–11. <https://www.cdc.gov/mmwr/pdf/ss/ss6202.pdf>
48. Mejía, R., Fernando, L., Sosa, G., Aguilar López, A., Damián, P., & Lara, L. (2017). Caracterización molecular de *Escherichia coli* resistente a antibióticos aislada de mastitis bovina en Michoacán, México *Molecular*



- characterization of antibiotic resistant *Escherichia coli* isolated from bovine mastitis in Michoacán, México. *Rev Mex Cienc Pecu*, 8(4), 387–396. <https://doi.org/10.22319/rmcp.v8i4.4251>
49. Melton, A., Mohawk, K., Teel, L., & O'Brien, A. (2012). Pathogenesis of Shiga-Toxin Producing *Escherichia coli*. *Assessment & Evaluation in Higher Education*, 37, 435. <https://doi.org/10.1007/82>
50. Millán, Y., Hernández, E., Millán, B., & Araque, M. (2014). Distribución de grupos filogenéticos y factores de virulencia en cepas de *Escherichia coli* uropatógena productora de β -lactamasa CTX-M-15 aisladas de pacientes de la comunidad en Mérida, Venezuela. *Revista Argentina de Microbiología*, 46(3), 175–181. [https://doi.org/10.1016/S0325-7541\(14\)70069-0](https://doi.org/10.1016/S0325-7541(14)70069-0)
51. Mohapatra, B., Broersma, K., & Mazumder, A. (2008). Differentiation of fecal *Escherichia coli* from poultry and free-living birds by (GTG)₅-PCR genomic fingerprinting. *International Journal of Medical Microbiology*, 298(3–4), 245–252. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2007.03.019>
52. Mosquito, S., Ruiz, J., Bauer, J., & Ochoa, T. (2011). Mecanismos moleculares de resistencia antibiótica en *Escherichia coli* asociadas a diarrea. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 28(4), 648–656. <https://doi.org/10.17843/rpmesp.2011.284.430>
53. Nazaret, E. (2009). *Escherichia coli* Shiga Toxigénica: Patogénesis, diagnóstico y tratamiento. *Revista de La Sociedad Venezolana de Microbiología*, v.29 n.1, 13-20. http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1315-25562009000100004&lng=es&tlng=es.
54. (NTC)NORMA TECNICA COLOMBIANA. (2003). *NTC 5158:2003*. <https://www.icontec.org/rules/microbiologia-de-alimentos-y-alimentos-para-animales-reaccion-en-cadena-de-la-polimerasa-pcr-para-la-deteccion-de-patogenos-de-alimentos-requerimientos-especificos-para-el-metodo-general/>
55. (NTC)NORMA TECNICA COLOMBIANA. (2015). *NTC 4899:2015*. <https://tienda.icontec.org/gp-microbiologia-de-alimentos-y-productos-de-alimentacion-animal-metodo-horizontal-para-la-deteccion-de-escherichia-coli-o157-ntc4899-2015.html>
56. (OMS)Organización Mundial de la Salud. (2015). Informe de la OMS señala que los niños menores de 5 años representan casi un tercio de las muertes por enfermedades de transmisión alimentaria. <https://www.who.int/es/news-room/detail/03-12-2015-who-s-first-ever-global-estimates-of-foodborne-diseases-find-children-under-5-account-for-almost-one-third-of-deaths>
57. (OMS)Organización Mundial de la Salud. (2005). *MANUAL DE*



BIOSEGURIDAD EN EL LABORATORIO.

https://www.paho.org/spanish/ad/ths/ev/lab-biosafety_omsspa.pdf

58. (OMS) Organización Mundial de la Salud. (2018). *Datos recientes revelan los altos niveles de resistencia a los antibióticos en todo el mundo.* <https://www.who.int/mediacentre/news/releases/2018/antibiotic-resistance-found/es/>.
59. Padmini, N., Ajilda, A., Sivakumar, N., & Selvakumar, G. (2017). Extended spectrum β -lactamase producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*: critical tools for antibiotic resistance pattern. *Journal of Basic Microbiology*, 57(6), 460–470. <https://doi.org/10.1002/jobm.201700008>
60. Percival, S., & Williams, D. (2013). *Escherichia coli*. In *Microbiology of Waterborne Diseases: Microbiological Aspects and Risks: (Second Edition)*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-415846-7.00006-8>
61. Reygaert, C. (2017). *Antimicrobial Mechanisms of Escherichia coli | IntechOpen* (pp. 7–8). <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.5772/67363> Abstract
62. Rios, E., Santos, J., García, I., Flament, S., Blanco, J., García, M., Otero, A., & Rodríguez, J. (2019). Characterisation, antimicrobial resistance and diversity of atypical EPEC and STEC isolated from cow's milk, cheese and dairy cattle farm environments. *Lwt*, 108, 319–325. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.03.062>
63. Rios, E. (2018). Incidencia y control de tipos de patógenos de *Escherichia coli* STEC Y EPEC en leche de vaca y quesos derivados en Castilla y León.
64. Rípodas A., Fernández, D., & Macho Martínez, M. (2017). Investigación de *Escherichia Coli* productor de toxinas Shiga (STEC) en carnes y derivados cárnicos. *Sanidad Militar*, 73(3), 147–152. <https://doi.org/10.4321/s1887-85712017000300002>
65. Robins, R., Holt, K., Ingle, D., Hocking, D., Yang, J., & Tauschek, M. (2016). Are *Escherichia coli* pathotypes still relevant in the era of whole-genome sequencing? *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 6(NOV), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2016.00141>
66. Rodríguez, M. (2002). Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. *Salud Publica de Mexico*, 44(5), 464–475. <https://doi.org/10.1590/s0036-36342002000500011>
67. Rojas, M., Monterio, R., Pizza, M., Desvaux, M., & Rosini, R. (2018). Intestinal pathogenic *Escherichia coli*: Insights for vaccine development. *Frontiers in Microbiology*, 9(MAR), 1–17. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00440>



68. Rúgeles, L. C., Bai, J., Martínez, A. J., Vanegas, M. C., & Gómez-Duarte, O. G. (2010). Molecular characterization of diarrheagenic *Escherichia coli* strains from stools samples and food products in Colombia. *International Journal of Food Microbiology*, 138(3), 282–286. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.01.034>
69. Sallam, K., Mohammed, M., Ahdy, A., & Tamura, T. (2013). Prevalence, genetic characterization and virulence genes of sorbitol-fermenting *Escherichia coli* O157:H and *E. coli* O157: H7 isolated from retail beef. *International Journal of Food Microbiology*, 165(3), 295–301. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.05.024>
70. Sauget, M., Valot, B., Bertrand, X., & Hocquet, D. (2017). Can MALDI-TOF Mass Spectrometry Reasonably Type Bacteria? *Trends in Microbiology*, 25(6), 447–455. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2016.12.006>
71. Serrano, A., Serrano, J., Ayala, D., Guerra, Y., Padilla, J., & Trejos, J. (2016). Caracterización por PCR- múltiple del grupo filogenético de *Escherichia coli* uropatógena aisladas de pacientes ambulatorios de Bucaramanga, Santander. *Revista Facultad de Ciencias de La Salud UDES*, 3(1. S1), 25. <https://doi.org/10.20320/rfcsudes.v3i1.s1.p011>
72. Shaikh, S., Fatima, J., Shakil, S., Rizvi, D., & Kamal, A. (2015). Antibiotic resistance and extended spectrum beta-lactamases: Types, epidemiology and treatment. In *Saudi Journal of Biological Sciences* (Vol. 22, Issue 1). King Saud University. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2014.08.002>
73. Shell, W., Sayed, M., Allah, F., Gamal, F., Khder, A., Samy, A., & Ali, A. (2017). Matrix-assisted laser desorption-ionization-time-of-flight mass spectrometry as a reliable proteomic method for characterization of *Escherichia coli* and *Salmonella* isolates. *Veterinary World*, 10(9), 1083–1093. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2017.1083-1093>
74. Silva, E., Leitão, S., Tenreiro, T., Pomba, C., Nunes, T., Lopes da Costa, L., & Mateus, L. (2009). Genomic and phenotypic characterization of *Escherichia coli* isolates recovered from the uterus of puerperal dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 92(12), 6000–6010. <https://doi.org/10.3168/jds.2009-2358>
75. SIVIGILA, I. N. de S. (2018). *Boletín Epidemiológico Semanal del Instituto Nacional de Salud, Colombia*.
76. Švec, P., Vancanneyt, M., Seman, M., Snauwaert, C., Lefebvre, K., Sedláček, I., & Swings, J. (2005). Evaluation of (GTG)₅-PCR for identification of *Enterococcus* spp. *FEMS Microbiology Letters*, 247(1), 59–63. <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2005.04.030>



77. Torpdahl, M., Nielsen, E., Scheutz, F., Olesen, B., Hansen, D., & Hasman, H. (2013). Detection of a Shiga toxin- and extended-spectrum- β -lactamase-producing *Escherichia coli* O157:H7 human clinical isolate. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 68(5), 1203–1204. <https://doi.org/10.1093/jac/dks516>
78. Trabulsi, L., Keller, R., & Tardelli Gomes, A. (2002). Typical and atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. *Emerging Infectious Diseases*, 8(5), 508–513. <https://doi.org/10.3201/eid0805.010385>
79. UNE, A. E. D. N. (2011). *UNE-EN ISO 22119*. file:///C:/Users/Usuario/Music/Documents/BluetoothFolder/Searches/Downloads/EXT_6TusmuVtd8aJHKXBg4uJ.pdf
80. Urwin, R., & Martin, C. (2003). Multi-locus sequence typing: a tool for global epidemiology. *TRENDS in Microbiology*, Vol.11(10), 479–487. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2003.08.006>
81. Varela, G., Jasinski, C., Gadea, P., Tanzi, N., Mota, I., Arenas, C., Pardo, L., González, S., González, G., Sirok, A., & Schelotto, F. (2007). *Escherichia coli* enteropatógeno clásico (EPEC) asociado a casos de diarrea en niños usuarios del Hospital Pereira Rossell. Aspectos clínicos y características de las cepas involucradas. *Revista Médica Del Uruguay*, 23(3), 153–163.
82. Verma, A., Abdel, M., Madesh, A., Gupta, S., Karunakaran, A., Inbaraj, S., Abhishek, V., Chaudhuri, P., Agarwal, R., & Thomas, P. (2020). Multilocus sequence typing of *Clostridium perfringens* strains from neonatal calves, dairy workers and associated environment in India. *Anaerobe*, 63, 102212. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2020.102212>
83. Vidal, E., Canizález, A., Gutiérrez, J., & Navarro-García, F. (2007). Patogénesis molecular, epidemiología y diagnóstico de *Escherichia coli* enteropatógena. *Salud Pública de Mexico*, 49(5), 376–386. <https://doi.org/10.1590/s0036-36342007000500008>
84. Wirth, T., Falush, D., Lan, R., Colles, F., Mensa, P., Wieler, L., Karch, H., Reeves, P., Maiden, M., Ochman, H., & Achtman, M. (2006). Sex and virulence in *Escherichia coli*: An evolutionary perspective. *Molecular Microbiology*, 60(5), 1136–1151. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05172.x>
85. (WHO)World Health Organization. (2018). *E. coli*. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/e-coli>