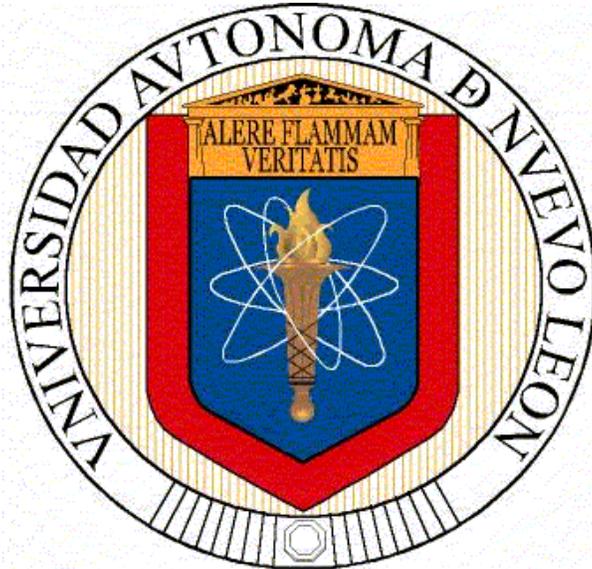


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



**DIVERSIDAD GENOTÍPICA Y PERFIL DE RESISTENCIA A  
ANTIBIÓTICOS DE CEPAS DE *ESCHERICHIA COLI* AISLADAS DE  
LA CADENA DE PRODUCCIÓN DE CHILE JALAPEÑO, TOMATE Y  
MELÓN DEL NORESTE DE MÉXICO.**

**POR**

**HESPERIA ANDREA CORZO ARIYAMA**

**COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRÍA  
EN CIENCIAS CON ACENTUACIÓN EN MICROBIOLOGÍA.**

**FEBRERO 2015**

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



DIVERSIDAD GENOTÍPICA Y PERFIL DE RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS DE  
CEPAS DE *Escherichia coli* AISLADAS DE LA CADENA DE PRODUCCIÓN DE  
CHILE JALAPEÑO, TOMATE Y MELÓN DEL NORESTE DE MÉXICO.

Por

Q.B.P. HESPERIA ANDREA CORZO ARIYAMA

Como requisito para obtener el Grado de MAESTRO EN CIENCIAS con Acentuación  
en Microbiología.

Febrero 2015

DIVERSIDAD GENOTÍPICA Y PERFIL DE RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS DE  
CEPAS DE *Escherichia coli* AISLADAS DE LA CADENA DE PRODUCCIÓN DE  
CHILE JALAPEÑO, TOMATE Y MELÓN DEL NORESTE DE MÉXICO.

Comité de Tesis

---

Dr. José Santos García Alvarado  
Director

---

Dra. Luisa Yolanda Solís Soto  
Secretario

---

Dra. Norma Laura Heredia Rojas  
Vocal

---

Dr. Carlos Eduardo Hernández Luna  
Vocal

---

Dr. Eduardo Sánchez García  
Vocal

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Bioquímica y Genética de Microorganismos de la Facultad de Ciencias Biológicas de la U.A.N.L. bajo la dirección del Dr. José Santos García Alvarado y la codirección de la Dra. Luisa Yolanda Solís Soto. El presente trabajo fue financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología de México, con el proyecto: Ciencia básica 183620,

## DEDICATORIA

A LO MÁS VALIOSO QUE EXISTE EN MI VIDA

A Dios

A MI MADRE

Sra. MARTHA PATRICIA ARIYAMA RUIZ

A MI PADRE

Sr. RAFAEL CORZO FLORES.

## **AGRADECIMIENTOS**

A Dios por darme TODO.

Al Dr. José Santos García Alvarado, Director de mi tesis y a la Dra. Norma Laura Heredia Rojas, por haberme asesorado y permitido el realizar este trabajo de investigación.

A la Dra. Luisa Yolanda Solís Soto, por su apoyo y asesoramiento durante la realización de este trabajo.

A mis padres, porque sin ellos esto no hubiera sido posible, por su amor y cariño por su gran apoyo en todo momento, consejos, comprensión y motivarme a superarme siempre y seguir adelante.

A mi pareja y mejor amigo Jesús Antonio Dávila Barboza, por su apoyo y motivación.

A mis mejores amigos Anhy, Viri y Kely por su apoyo incondicional durante todos estos años.

A mis compañeros de laboratorio y amigos Mayra, Diego, David y Blanca.

A mis compañeros y amigos de posgrado Choncho, Aida, Fer, Gina y a todas aquellas personas que de alguna manera contribuyeron en este trabajo.

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico que me brindó al otorgarme la beca para realizar mis estudios de Maestría.

## ÍNDICE

INTRODUCCIÓN .....	1
DEFINICIÓN DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN .....	3
ANTECEDENTES.....	5
<i>Escherichia coli</i> .....	5
<i>E. coli</i> Diarreogénicas .....	7
<i>E. coli</i> Enterotoxigénica (ETEC).....	7
<i>E. coli</i> Enteropatógena (EPEC) .....	7
<i>E. coli</i> Enteroagregativa (EAEC).....	9
<i>E. coli</i> Enteroinvasiva (EIEC) .....	10
<i>E. coli</i> de adherencia difusa (DAEC).....	11
<i>E. coli</i> Enterohemorrágica o productora de toxina shiga (EHEC/STEC).....	12
Brotos producidos por <i>E. coli</i> diarreogénicas (ECD).....	13
Determinación de los grupos filogenéticos de <i>E. coli</i> .....	16
Resistencia a antibióticos .....	22
HIPÓTESIS.....	27
OBJETIVO GENERAL.....	27
OBJETIVOS PARTICULARES.....	27
MATERIAL Y MÉTODO .....	28
Cepas bacterianas .....	28
Mantenimiento y activación de las cepas .....	28
Crecimiento en agares específicos para la posible presencia de <i>E. coli</i> .....	28
Determinación de grupos filogenéticos de <i>E. coli</i> .....	29
Determinación de <i>E. coli</i> STEC .....	32
Determinación de patotipos de <i>E. coli</i> .....	33
Determinación del perfil de resistencia a antibióticos de las cepas aisladas.....	34
Análisis estadístico .....	36
RESULTADOS.....	37
Cepas bacterianas .....	37
Determinación de grupos filogenéticos de <i>E. coli</i> .....	38

<i>E. coli</i> STEC.....	45
Patotipos de <i>E. coli</i> .....	46
Determinación del perfil de resistencia a antimicrobianos de las cepas aisladas.....	48
DISCUSIÓN .....	66
CONCLUSIONES .....	75
LITERATURA CITADA.....	77

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.-Diagrama que muestra la relación de los diferentes patotipos de <i>E. coli</i> . (Tomado de O’Sullivan, 2007) DAEC: <i>E. coli</i> de adherencia difusa; EPEC: <i>E. coli</i> enteropatógena; VTEC: <i>E. coli</i> productora de verotoxinas; EHEC: <i>E. coli</i> enterohemorrágica; ETEC: <i>E. coli</i> enterotoxigénica; EIEC: <i>E. coli</i> enteroinvasiva; EAaggEC: <i>E. coli</i> enteroagregativa. ....	13
Figura 2.- Determinación de grupos filogenéticos de <i>E. coli</i> .....	31
Figura 3.- Determinación de subgrupos filogenéticos de <i>E. coli</i> . ....	31
Figura 4.-Crecimiento característico de las <i>E. coli</i> en diferentes agares. ....	37
Figura 5.- Crecimiento característico de las <i>E. coli</i> en diferentes agares. ....	38
Figura 6.- Determinación de los grupos filogenéticos de <i>E. coli</i> de las cepas aisladas de chile jalapeño, tomate y melón. Línea 1 y 21: Marcador peso molecular (HyperLadder V 500-25pb, BIOLINE); línea 2: <i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 33495 (control -); línea 3 y 32: <i>E. coli</i> ATCC 25922 (control +, contiene los 3 genes: <i>chuA</i> , <i>yjaA</i> y TSPE4.C2). ....	43
Figura 7.-Determinación de los grupos filogenéticos de <i>E. coli</i> de las cepas aisladas de chile jalapeño, tomate y melón.....	44
Figura 8.- Gel representativo del PCR multiplex para la detección de <i>E. coli</i> STEC de las cepas aisladas de <i>E. coli</i> en la cadena de producción del chile jalapeño, tomate y melón. .	46
Figura 9. Detección de patotipos.....	47

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.-Secuencias de oligonucleótidos y tamaño previsto de los productos de amplificación para la genotipificación de <i>E. coli</i> .....	30
Tabla 2. Secuencias de oligonucleótidos y tamaño de los productos de amplificación para <i>E. coli</i> STEC.....	33
Tabla 3.- Secuencias de iniciadores y tamaño previsto de los productos de amplificación para <i>E. coli</i> STEC.....	34
Tabla 4.- Prevalencias de los principales grupos filogenéticos de las cepas de <i>E. coli</i> ...	38
Tabla 5.- Prevalencias de los subgrupos filogenéticos de las cepas de <i>E. coli</i> .....	39
Tabla 6.- Distribución de los grupos filogenéticos de <i>E. coli</i> según el tipo de producto.	41
Tabla 7.-Distribución de los subgrupos filogenéticos de <i>E. coli</i> según el producto .....	42
Tabla 8.- Cepas positivas para el gen de <i>eae</i> (intimina) .....	46
Tabla 9.- Cepas positivas para patotipos de <i>E. coli</i> .....	47
Tabla 10.- Relación de los patotipos con los genotipos de <i>E. coli</i> .....	48
Tabla 11.- Zonas de inhibición estándar interpretativas para bacterias de la familia <i>Enterobacteriaceae</i> de diferentes antibióticos mediante la técnica de difusión en disco de acuerdo al Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI (2012).....	49
Tabla 12.- Zonas de inhibición y patrón de sensibilidad a los antibióticos probados sobre los aislados de <i>E. coli</i> usando la metodología de difusión en disco.....	50
Tabla 13.- Patrón de resistencia, intermedia y sensibilidad de los aislados contra los antibióticos. ....	57
Tabla 14.- Perfil de resistencia a antibióticos de los principales grupos filogenéticos de los aislados de <i>E. coli</i> .....	59
Tabla 15.- Perfil de resistencia a antibióticos de los subgrupos filogenéticos de los aislados de <i>E. coli</i> .....	59
Tabla 16.- Perfil de resistencia a antibióticos de los principales grupos filogenéticos de los aislados de <i>E. coli</i> según el producto. ....	62
Tabla 17.- Perfil de resistencia a antibióticos de los subgrupos filogenéticos de los aislados de <i>E. coli</i> según el producto. ....	62

Tabla 18.- Perfil de resistencia a antibióticos de los aislados de <i>E. coli</i> según el tipo de muestra.....	63
Tabla 19.- Perfil de resistencia a uno o más antimicrobianos de las cepas aisladas de <i>E. coli</i> .....	64

## ÍNDICE DE GRÁFICOS

Grafico 1.- Prevalencia de los principales grupos filogenéticos de las cepas de <i>E. coli</i> ..	39
Grafico 2.- Prevalencia de los subgrupos filogenéticos de las cepas de <i>E. coli</i> .....	40
Grafico 3.- Abundancia relativa de los grupos filogenéticos de <i>E. coli</i> según el producto. .....	41
Grafico 4.- Abundancia relativa de los subgrupos filogenéticos de <i>E. coli</i> según el producto.....	42
Grafico 5.- Patrón de resistencia, intermedia y sensibilidad de los aislados de <i>E. coli</i> contra los antibióticos probados.....	56
Grafico 6.- Patrón de resistencia de los principales grupos filogenéticos de <i>E. coli</i> contra los antibióticos probados.....	58
Grafico 7.- Patrón de resistencia de los subgrupos filogenéticos de <i>E. coli</i> contra los antibióticos probados. ....	58

## SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

Simbología	Significado
%	Por ciento, porcentaje
$\beta$	Beta
°C	Grados Celcius
$\mu\text{g}$	Microgramos
$\mu\text{l}$	Microlitros
$\mu\text{M}$	Micromolar
$\mu\text{m}$	Micrometro
ADN	Acido desoxirribonucleico
ATCC	American Type Culture Collection
AMP	ampicilina
C	cloranfenicol
CAZ	ceftazidima
CIP	ciprofloxacina
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
cm	Centímetros
CN	gentamicina
CTX	cefotaxima
DAEC	<i>E. coli</i> de adherencia difusa
dNTP	Desoxirribonucleótidos trifosfato
EAEC	<i>E. coli</i> enteroagregativa
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECD	<i>E. coli</i> diarreogénicas
EHEC	<i>E. coli</i> enterohemorrágica
EIEC	<i>E. coli</i> enteroinvasiva
EMB	Agar Eosin methylene blue
EPEC	<i>E. coli</i> enteropatógena

ETEC	<i>E. coli</i> enterotoxigénica
<i>et al.</i>	y colaboradores
GUD -	β-glucuronidasa negativa
ICC	Agar infusión cerebro corazón
KCl	Cloruro de potasio
LIA	Agar Hierro-Lisina
M	molar
MAC	Agar MacConkey
mg	miligramos
MgCl <sub>2</sub>	Cloruro de magnesio
min	minutos
mM	mili molar
mm	Milímetros
ml	Mililitros
NA	ácido nalidíxico
NaCl	Cloruro de sodio
NCBI	National Center for Biotechnology Information
ng	Nanogramos
nm	Nanómetros
NOM	Norma Oficial Mexicana
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
pH	Potencial de hidrógeno
SMAC	Agar MacConkey sorbitol
STEC	<i>E. coli</i> shigatoxigénica
SXT	sulfametoxazol/trimetoprima
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TBX	Agar tryptona bilis X-glucurónido
TE	tetraciclina

## RESUMEN.

*Escherichia coli* es una bacteria que forma parte de la flora normal intestinal de animales y el humano. Sin embargo, se ha encontrado que ciertas cepas tienen la capacidad de causar infecciones entéricas y se les han denominado *E. coli* diarreogénicas (ECD), las cuales se dividen en seis grupos: enterotoxigénica (ETEC), enterohemorrágica (EHEC), enteroinvasiva (EIEC), enteropatógena (EPEC), enteroagregativa (EAEC) y de adherencia difusa (DAEC). En los países en vías de desarrollo las infecciones entéricas se encuentran como la segunda causa de muerte, sobre todo en menores de cinco años, con un total de 1.5 millones de muertes cada año y comúnmente en México se ha aislado a *E. coli* como agente etiológico de diarrea. La aparición de microorganismos resistentes a múltiples antibióticos se facilita en parte debido al mayor número de casos de enfermedades entéricas y al uso inapropiado de antibióticos; por ello la resistencia a antibióticos es un problema creciente en el tratamiento de las infecciones entéricas. Las frutas y hortalizas se presentan cada vez con más frecuencia como causantes de brotes asociados al consumo de frutas y hortalizas. Como parte de cualquier programa integrado y para garantizar la seguridad de los alimentos en toda la cadena de producción es indispensable la detección y/o enumeración de patógenos en los alimentos y en las superficies que entran en contacto con éstos; por ello varios métodos de seguimiento de la fuente bacteriana se han desarrollado para identificar la fuente principal de la contaminación fecal monitoreando a las cepas de *E. coli*. Uno de estos métodos es la clasificación en grupos filogenéticos con los cuales se puede obtener información acerca de sus nichos ecológicos, características evolutivas y la probabilidad de causar enfermedades. Basados en la hipótesis, de que existe una gran diversidad genotípica y diferentes perfiles de resistencia a antibióticos de cepas de *E. coli* aisladas en la cadena de producción de chile jalapeño, tomate y melón del noreste de México; y a que el impacto económico y clínico de las infecciones de *E. coli* es considerable, la vigilancia de los reservorios no clínicos de esta bacteria con factores de virulencia y resistencia a antibióticos se ha convertido en un problema grave en todo el mundo, es por ello que nos enfocamos en este aspecto. Determinando que el grupo filogenético A fue el más prevalente y el B2 fue el menos frecuente. En cuanto a los subgrupos, el A<sub>0</sub> fue el más frecuente y el menos el B2<sub>2</sub>. Los grupos filogenéticos no tuvieron una distribución diferente entre los productos, sin embargo si presentaron una diferencias cuanto al tipo de muestra. El 1.16% de las cepas aisladas a partir del chile jalapeño, tomate y melón pertenecieron a las DEC (EPECa y ETEC). La mayor resistencia a los antibióticos se obtuvo frente a la ampicilina, y el menor porcentaje de resistencia contra el TMP/SMX. Ninguna de las cepas fue resistente a la ciprofloxacina. Las cepas del grupo filogenético B2 y las pertenecientes al patotipo EPEC fueron sensibles a todos los antibióticos probados. Mientras que el porcentaje de multiresistencia al menos a 2 antibióticos de las cepas de *E. coli* encontrado en este estudio fue del 28.49%.

## INTRODUCCIÓN

*Escherichia coli* es una bacteria que forma parte de la flora normal intestinal de animales y el humano. Sin embargo, se ha encontrado que ciertas cepas tienen la capacidad de causar infecciones entéricas y se les han denominado *E. coli* diarreogénicas (ECD). Dentro de estas las cepas se han agrupado en seis grupos: enterotoxigénica (ETEC), enterohemorrágica (EHEC), enteroinvasiva (EIEC), enteropatógena (EPEC), enteroagregativa (EAEC) y adherencia difusa (DAEC).

Las cepas de ECD incluyen varios agentes patógenos emergentes de importancia para la salud pública en todo el mundo, ya que han sido asociados con brotes y se han reportado como responsables de la diarrea del viajero en varios países en los últimos años (Canizalez-Roman *et al.*, 2013), incluyendo México donde habitualmente las del grupo enterotoxigénico (ETEC) son las causantes de dicha diarrea (Cortés-Ortiz *et al.*, 2002; Harvey *et al.*, 2007). Las EPEC son una causa importante de diarrea en los niños menores de dos años en los países en desarrollo. Las cepas EAEC se han asociado mayormente con la diarrea persistente en niños, aunque también ha sido implicada como causa de diarrea esporádica en países en desarrollo.

Por otro lado, las cepas EIEC están estrechamente relacionadas bioquímica, genética y patogénicamente con *Shigella* spp. Mientras que las cepas DAEC, son capaces de adherirse a la línea celular Hep-2 (carcinoma laríngeo humano) en un patrón no localizado y sin formar microcolonias. Las bacterias EHEC son el grupo emergente más importante de patógenos causantes de enfermedades producidas por alimentos, los cuales pueden ocasionar diarrea hemorrágica intensa y complicaciones importantes como el síndrome urémico hemolítico en seres humanos (SUH).

A nivel mundial las infecciones entéricas se encuentran entre las principales causas de muerte y en donde las frutas y hortalizas se presentan cada vez con mayor frecuencia como vehículos de agentes bacterianos causantes de estas enfermedades.

Por otro lado, la aparición de microorganismos resistentes a múltiples antibióticos se ha favorecido debido al mayor número de casos de enfermedades entéricas y al uso de antimicrobianos no prescritos por el médico; por ello la resistencia antimicrobiana es un problema creciente en el tratamiento de las infecciones entéricas en México.

La determinación de la fuente de contaminación de los patógenos en los alimentos es muy importante, por ello se han desarrollado varios métodos para esto, tal como la clasificación en grupos filogenéticos con los cuales se puede obtener información acerca de sus nichos ecológicos, características evolutivas y la probabilidad de causar enfermedades. Por lo que en este trabajo determinamos la diversidad genotípica y los perfiles de resistencia a antibióticos de las cepas de *E. coli* aisladas en la cadena de producción de chile jalapeño, tomate y melón del noreste de México, además de determinar su patrón de resistencia frente a los antibióticos comúnmente utilizados en la clínica para el control de estas bacterias.

## DEFINICIÓN DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

La detección de patógenos en los alimentos y en las superficies que entran en contacto con éstos son un componente importante de cualquier programa integrado para garantizar la seguridad de los alimentos en toda la cadena de producción (López-Campos *et al.*, 2012).

En los países en vías de desarrollo las infecciones entéricas se encuentran aún entre las principales causas de muerte, sobre todo en menores de cinco años (Solórzano-Santos y Miranda-Navales, 1998); representando la segunda causa de muerte en infantes, sumando 1.5 millones cada año (Paniagua-Contreras, *et al.*, 2007).

Las cepas de *E. coli* se han clasificado en filogrupos en base a la combinación de tres marcadores genéticos: el gen *ChuA*, gen *yjaA* y el fragmento de ADN TspE4.C2. Mediante la asignación de las cepas a uno de los filogrupos reconocidos, se puede obtener información acerca de sus nichos ecológicos, características evolutivas y la probabilidad de causar enfermedades (Gordon *et al.*, 2008).

En los últimos años se ha visto un incremento en la resistencia de las cepas a antibióticos de uso común. Esta pudiera deberse en parte al uso inapropiado de antibióticos; por ello la resistencia a antibióticos es un problema creciente en el tratamiento de las infecciones entéricas (Solórzano-Santos y Miranda-Navales, 1998), y en nuestro medio el conocimiento sobre este aspecto es limitado.

Debido a que el impacto económico y clínico de las infecciones de *E. coli* es considerable, la vigilancia de los reservorios no clínicos de esta bacteria con factores de virulencia y resistencia a antibióticos se ha convertido en un problema grave en todo el mundo (Mokracka *et al.*, 2011), es por ello que en este trabajo nos enfocamos en la determinación de los grupos filogenéticos y patotipos de *E. coli* aisladas durante la cadena de producción de chile jalapeño, tomate y melón del área de Cadereyta Nuevo

León y Paila Coahuila, además de determinar su patrón de resistencia frente a los antibióticos comúnmente utilizados en la clínica para el control de estas bacterias.

## ANTECEDENTES

### *Escherichia coli*

La bacteria conocida ahora como *E. coli* fue descrita por primera vez por Theodor Escherich, en el siglo XIX (Torres *et al.*, 2005). Es un bacilo Gram negativo, anaerobio facultativo, perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae*, (Rodríguez-Angeles, 2002). Todas las cepas son anaerobias facultativas, fermentan la glucosa y son capaces de generar energía al reducir los nitratos a nitritos. La mayoría de estas cepas pueden fermentar lactosa y durante la fermentación de los carbohidratos, se produce ácido y gas. Principalmente son bacterias móviles sin embargo también se han reportado algunas cepas inmóviles. Las cepas no producen la enzima oxidasa, presentan fimbrias o pili cuyo papel es mediar la adherencia a las superficies mucosas del hospedador (Harvey *et al.*, 2007).

Se considera que *E. coli* tiene dos hábitats, llamados primario y secundario (dentro y fuera del huésped respectivamente) donde en este último se considera que es sólo un miembro transitorio de la microbiota que se encuentra en el agua y el suelo (Walk *et al.*, 2007).

Esta bacteria forma parte de la flora normal del colon de los humanos y de otros animales, aunque existen cepas que pueden ser patógenas y causar daño produciendo diferentes cuadros clínicos manifestándose principalmente como diarrea (Harvey *et al.*, 2007, Rodríguez-Angeles, 2002).

Las infecciones intestinales o extraintestinales por *E. coli* son causadas por las cepas que poseen numerosos factores de virulencia ubicados en plásmidos, bacteriófagos o en el cromosoma bacteriano (Mühldorfer & Hacker, 1994).

Las cepas causantes de infecciones entéricas son nombradas *E. coli* diarreogénicas (ECD), un grupo que incluye patógenos emergentes de importancia en salud pública a nivel mundial (Nataro y Kaper, 1998). En base a sus factores de virulencia específicos y

características fenotípicas, las cepas de *E. coli* causantes de diarrea se clasifican en seis grupos: enterotoxigénica (ETEC), enterohemorrágica, también conocidas como productoras de toxina Vero o toxina semejante a Shiga (EHEC o VTEC o STEC), enteroinvasiva (EIEC), enteropatógena (EPEC), enteroagregativa (EAEC) y de adherencia difusa (DAEC) (Kaper, 2005).

Actualmente, se utilizan dos sistemas para clasificar los aislados de *E. coli*, una agrupación por patotipo basado en los síntomas o patología y modo de transmisión de la enfermedad y otra mediante una agrupación filogenética basada en las propiedades genéticas. Los aislamientos de *E. coli* diarreogénicas se encuentran en diferentes grupos filogenéticos, lo que indica que los dos sistemas de clasificación no son mutuamente excluyentes (Lehti *et al.*, 2013).

Los patotipos de *E. coli* representan un grupo fenotípicamente diverso de patógenos y no existe una metodología exclusiva para identificar todos los patotipos de interés, por lo cual se han desarrollado métodos para detectar o aislar patotipos específicos (O'Sullivan *et al.*, 2006).

De esta manera, las cepas de *E. coli* patógenas pueden ser aisladas usando procedimientos estándares para *E. coli*; mediante el uso de medios de cultivo como agar eosina azul de metileno (EMB, por sus siglas en inglés) y agar MacConkey. Otro agar comúnmente usado para el aislamiento de *E. coli* patógenas es el agar MacConkey-Sorbitol, el cual es usado principalmente en la identificación de *E. coli* O157 debido a la incapacidad de ésta para fermentar el sorbitol. Así mismo se han desarrollado estrategias alternativas para la detección de las colonias características de estas cepas, tomando en consideración que *E. coli* O157 es  $\beta$ -glucuronidasa negativa (GUD -). Posteriormente, los pasos para la identificación y confirmación incluyen pruebas bioquímicas, serotipificación y la exanimación de los principales genes asociados a la virulencia (O'Sullivan *et al.*, 2006).

## ***E. coli* Diarreogénicas**

### ***E. coli* Enterotoxigénica (ETEC)**

Los miembros de este grupo son causantes habituales de la diarrea del viajero (Harvey *et al.*, 2007) para lo cual primero deben adherirse a los enterocitos del intestino delgado por medio de fimbrias denominadas factores de colonización antigénicos (CFA: del inglés colonization factor antigens), siendo su principal mecanismo de patogenicidad la síntesis de alguna o ambas enterotoxinas: toxina termolábil (LT) y toxina termoestable (ST) (Rodríguez-Angeles, 2002, Nataro y Kaper, 1998). Los genes de estas enterotoxinas se encuentran codificados en un plásmido que también puede tener información genética para los CFAs, aunque algunos genes de ST se han encontrado en transposones (secuencias de DNA que pueden cambiar de lugar en el genoma). Las toxinas LT y ST aumentan el nivel intracelular de AMPc y GMPc respectivamente, que se encuentra en la membrana de las células intestinales, provocando la salida de agua y iones (Rodríguez-Angeles, 2002).

Estas cepas se han asociado con dos principales síndromes clínicos: diarrea en lactantes y niños en países en desarrollo, y la diarrea del viajero. La enfermedad tiene un periodo de incubación de 14 a 50h. El cuadro clínico se caracteriza por diarrea acuosa, generalmente sin sangre, moco o pus, y en menor medida fiebre y vómito (Rodríguez-Angeles, 2002, Nataro y Kaper, 1998).

Investigaciones epidemiológicas han implicado a los alimentos y agua contaminados como los vehículos más comunes para la infección por ETEC, siendo la dosis infectiva de alrededor de  $10^8$  UFC. La detección de este grupo de *E. coli* se ha basado en la presencia de enterotoxinas LT y/o ST (Nataro y Kaper, 1998).

### ***E. coli* Enteropatógena (EPEC)**

Las EPEC son una causa importante de diarrea en los niños menores de dos años en países en desarrollo. Las características básicas de las cepas EPEC son la lesión A/E (del

inglés attachment and effacing) y la ausencia de shiga toxinas con lo que la lesión de adhesión y remoción (A/E) es su principal efecto en el enterocito. Dicha lesión se caracteriza por la remoción de las microvellosidades y la adherencia íntima entre la bacteria y la membrana de la célula epitelial, causando cambios importantes en el citoesqueleto, entre los cuales se presenta la acumulación de actina polimerizada en el que las bacterias en ocasiones forman una estructura de tipo pedestal. Estas estructuras de pedestal se pueden extender hasta 10  $\mu\text{m}$  por fuera de la célula epitelial en una estructura similar a un pseudópodo (Nataro y Kaper, 1998).

Se ha propuesto que el modelo de patogénesis consiste en tres fases: (1) adherencia localizada; (2) traducción de señales y; (3) adherencia íntima (Donnenberg y Kaper, 1992). La adherencia localizada es mediada por fimbrias que tienden a formar “bucles” (BFP del inglés bundle-forming pili), las cuales son codificadas por el gen estructural *bfpA*, presente en el plásmido EAF. La adherencia íntima de EPEC a las células epiteliales es mediada por una proteína de membrana externa llamada intimina que es codificada por el gen *eae* y que sirve como señal en A/E, el cual está presente en todas las EPEC. Las cepas EPEC se consideran típicas cuando tienen los genes *eae* y el plásmido EAF que codifica para el *bfp*, en tanto que se consideran atípicas aquellas cepas que sólo presentan los genes *eae* más no el plásmido EAF (Rodríguez-Angel, 2002; Nataro y Kaper, 1998).

Las EPEC causan diarrea aguda principalmente, aunque se han reportado casos de diarrea crónica. El vómito y la fiebre baja son síntomas comunes de dicha infección. Para la identificación de estas cepas se han desarrollado pruebas de PCR para los tres factores de virulencia principales de EPEC: el gen *eae*, el gen *bfp* y la ausencia de los genes de shiga toxina (Nataro y Kaper, 1998).

Según la vigilancia epidemiológica en México, *E. coli* enteropatógena se presenta en forma endémica hasta en un 6% de la población, similar a lo reportado para países industrializados como Alemania y Australia, en los que se ha encontrado el 5.9 y 7.6%,

respectivamente en niños sanos que son portadores (Vidal *et al.*, 2007; Beutin *et al.*, 2003).

### ***E. coli* Enteroagregativa (EAEC)**

Las *E. coli* de este grupo se han asociado mayormente con la diarrea persistente en niños, aunque también ha sido implicada como causa de diarrea esporádica en países en desarrollo. Estas cepas se definen como cepas de *E. coli* que no secretan enterotoxinas LT o ST y que se adhieren a la línea celular HEp-2 (de carcinoma laríngeo humano) y eritrocitos humanos en un patrón de adherencia agregativa, caracterizada por autoaglutinación de las bacterias entre sí (Nataro y Kaper, 1998). La adherencia a células Hep-2 y la hemaglutinación de eritrocitos humanos se debe a la presencia de una fimbria o adhesina flexible llamada fimbria I de adherencia agregativa (AAF/I) codificada por el gen *aggA* que se encuentra en un plásmido de 60 MDa. También se ha descrito la fimbria AAF/II inmunológicamente diferente a AAF/I y que está codificada en el plásmido pAA por el gen *aafII*; sin embargo, no todas las EAEC presentan estas fimbrias (Vidal *et al.*, 2005; Rodríguez-Angeles, 2002). La fimbria AAF/II es la que muestra mayor prevalencia y relación con la capacidad de adherencia de las EAEC a la superficie intestinal (Vidal *et al.*, 2005). En el plásmido de 60 MDa de EAEC también se encuentran los genes que codifican para la toxina EASTI, que es homóloga a la toxina ST de *E. coli* ETEC (Rodríguez-Angeles, 2002; Nataro y Kaper, 1998).

El mecanismo de patogenicidad inicia cuando el microorganismo se adhiere a los enterocitos por medio de fimbrias, causando un aumento en la secreción de moco, con la captura de las bacterias en una biopelícula bacteria-moco. La formación de esta biopelícula puede estar relacionada con la capacidad de colonización y diarrea persistente (Rodríguez-Angeles, 2002 y Nataro y Kaper, 1998).

También se han identificado dos proteínas de alto peso molecular responsables de la virulencia. Una de las proteínas, llamada Pet (del inglés plasmid-encoded toxin) se encuentra codificada en un plásmido de 65 MDa y tiene la capacidad de producir un efecto citopático en células Hep-2, caracterizado por el redondeamiento y

desprendimiento de las células así como contracción del citoesqueleto y pérdida de fibras de actina. La otra proteína, llamada Pic (del inglés *protein involved in intestinal*) está codificada en el genoma y tiene actividad de proteasa (Rodríguez-Angeles, 2002).

El periodo de incubación de esta cepa es menor a 8h pudiendo durar hasta 18 a 20 días. Se han reportado brotes o casos aislados de diarrea persistente gracias a este patógeno. El cuadro clínico se presenta como diarrea líquida con moco con o sin sangre, vómito y puede haber fiebre ligera. La prueba de referencia para el diagnóstico de EAEC es la observación de su adherencia agregativa en la línea celular Hep-2 (Rodríguez-Angeles, 2002).

### ***E. coli* Enteroinvasiva (EIEC)**

Las cepas de este grupo están estrechamente relacionadas bioquímica y genéticamente con *Shigella* spp., no producen la lisina descarboxilasa, son inmóviles y no son capaces de fermentar lactosa; también se considera que sus características patogénicas son virtualmente idénticas a *Shigella* spp (Rodríguez-Angeles, 2002; Nataro y Kaper, 1998).

El modelo actual de la patogénesis de EIEC comprende: la penetración de células epiteliales, la lisis de la vacuola endocítica, la multiplicación intracelular, el movimiento direccional a través del citoplasma y la extensión hacia las células epiteliales adyacentes. Los genes necesarios para la invasión celular se encuentran codificados en un plásmido de 140MDa llamado *plnv*. Dichos genes son el *mxi* y el *oci spa*, los cuales codifican el sistema de secreción tipo III. Asimismo se han reportado otras proteínas que participan en la invasión celular, tales como las proteínas Ipa (IpaA a IpaD) de las cuales IpaB, IpaC y IpaD son las efectoras. Se ha demostrado que IpaC promueve la captación de la bacteria en la célula eucariota, mientras que IpaB se cree que funciona en la lisis de la vacuola fagocítica y en la inducción de la apoptosis en los macrófagos. El movimiento de las EIEC en el citoplasma parece estar mediado por la proteína de superficie VirG (denominada también IcsA), que es esencial para la nucleación de filamentos de actina y el movimiento a través del citoplasma y en las células adyacentes (Nataro y Kaper, 1998).

La regulación de la virulencia de este grupo bacteriano es compleja y presenta al menos una cascada de regulación donde VirR es una proteína similar a una histona codificada cromosómicamente, que actúa conjuntamente con VirF, un activador de la transcripción codificado en el plásmido plnv. VirF ejerce efectos pleiotrópicos, algunos de los cuales funcionan a través de un activador intermediario transcripcional (Nataro y Kaper, 1998).

Las infecciones por EIEC se caracterizan por un periodo de diarrea acuosa que precede a la aparición de deposiciones disentéricas escasas con sangre y moco, aunque en algunos casos solo se presenta la diarrea. Estas cepas se asocian más con brotes que con casos aislados, en los cuales la transmisión puede ser de persona a persona o bien, por ingestión de alimentos y agua contaminada, convirtiéndose en un patógeno importante en niños mayores de seis meses (Rodríguez-Angeles, 2002).

#### ***E. coli* de adherencia difusa (DAEC)**

Las cepas DAEC, son capaces de adherirse a la línea celular Hep-2 en un patrón no localizado sin formar microcolonias. Se sabe poco de su mecanismo de patogenicidad y solo se ha caracterizado una fimbria de superficie conocida como F1845, la cual, además de ser codificada por el gen *daa* se ha propuesto como un factor de virulencia putativo que está involucrada en el fenotipo de adherencia difusa (Vidal *et al.*, 2005; Rodríguez-Angeles, 2002).

Estas cepas se pueden aislar tanto de personas sanas como con diarrea, siendo más importante en niños de 4 a 5 años. Los principales síntomas que se presentan incluyen: diarrea acuosa sin sangre y sin leucocitos (Rodríguez-Angeles, 2002). Se ha sugerido que las cepas DAEC pueden ser patógenos importantes causantes de diarrea en países desarrollados (Nataro y Kaper, 1998).

El método “estándar de oro” para la detección de cepas DAEC se basa en el fenotipo de la adherencia difusa en cultivos de tejidos o por la detección del gen *daa* (Vidal *et al.*, 2005).

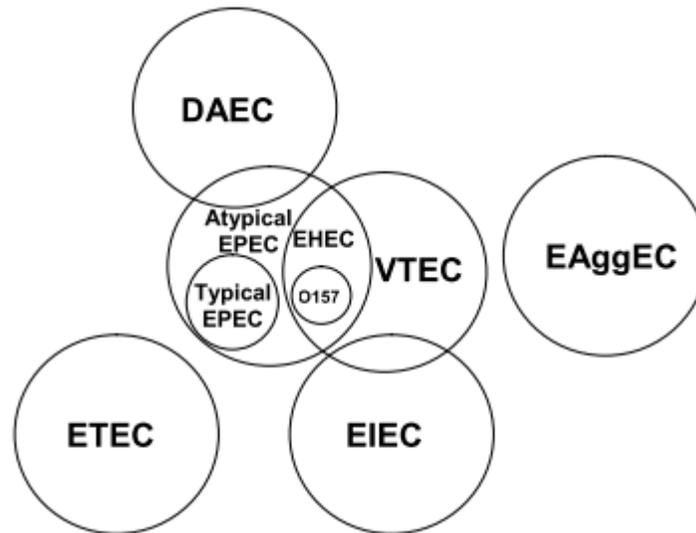
### ***E. coli* Enterohemorrágica o productora de toxina shiga (EHEC/STEC)**

En 1982 se identificó a una cepa de este grupo (cuyo serotipo más representativo es el O157:H7) como causantes de la diarrea hemorrágica intensa y de complicaciones importantes como el síndrome urémico hemolítico en seres humanos (SUH). Otros serogrupos pertenecientes a este grupo incluyen O157:NH y los que pertenecen a O55, O26, O113, O111 y O117. Se cree que los portadores de este microorganismo son los animales, en particular el ganado lechero y bovino. Se ha estimado que la ingestión de 10 a 100 células puede causar la enfermedad. Los aislados de EHEC producen toxinas tipo Shiga (Stx), enterohemolisina y el factor de adhesión íntima (intimina), que son los principales responsables de la sintomatología (Ray y Bhunia, 2008; Labbé y García, 2001).

Hay más de 200 serotipos de *E. coli* que producen toxinas Stx, aunque no todos son patógenos para los humanos o considerados como EHEC (Labbé y García, 2001). La mejor representante de este grupo patogénico es la *E. coli* O157:H7 ya que se ha asociado con colitis enterohemorrágica. Este patotipo a diferencia de las otras *E. coli*, no fermentan sorbitol ni tienen actividad glucuronidasa. Crecen con rapidez entre 30 y 42°C y no así a 10°C o menos. Otra característica fundamental es su resistencia a pH 4.5 o menor (Ray y Bhunia, 2008; García y Labbé, 2001).

Existen dos diferentes tipos de toxina shiga conocidas como Stx1 y Stx2. Una cepa STEC puede producir Stx1, Stx2 o ambas. Estas toxinas dañan las células epiteliales del colon ocasionando colitis hemorrágica, o bien pueden ser absorbidas dentro del torrente sanguíneo y dañar los vasos pequeños de los intestinos, riñones y cerebro; resultando en complicaciones tales como el síndrome urémico hemolítico (SUH) y púrpura trombocitopénica trombótica (coágulo en el cerebro con convulsiones, coma y a menudo la muerte). Los síntomas se presentan después de tres a nueve días de la ingestión del microorganismo y en general duran de 4 a 10 días e incluyen calambres abdominales de inicio súbito, diarrea acuosa (que en 35 a 75% de los casos se convierte en diarrea hemorrágica) y vómito. La fiebre puede estar o no asociada a los síntomas (Ray y Bhunia, 2008; Labbé y García, 2001).

Se ha reportado una relación entre los grupos patogénicos de *E. coli*, principalmente entre ciertos grupos como se muestra en la Fig 1.



**Figura 1.**-Diagrama que muestra la relación de los diferentes patotipos de *E. coli*. (Tomado de O'Sullivan, 2007) DAEC: *E. coli* de adherencia difusa; EPEC: *E. coli* enteropatógena; VTEC: *E. coli* productora de verotoxinas; EHEC: *E. coli* enterohemorrágica; ETEC: *E. coli* enterotoxigénica; EIEC: *E. coli* enteroinvasiva; EAggEC: *E. coli* enteroagregativa.

### **Brotos producidos por *E. coli* diarreogénicas (ECD)**

En los países en vías de desarrollo las infecciones entéricas se encuentran aún entre las principales causas de muerte, sobre todo en menores de cinco años (Solórzano-Santos y Miranda-Navales, 1998) representando en este caso la segunda causa de muerte (Paniagua-Contreras, *et al.*, 2007). Al año se reportan un total de 2.5 millones de muertes, la tasa de mortalidad infantil es de 4.9 por 1000 niños y una incidencia de 3.2 episodios por niño por año en menores de cinco años (Estrada-García *et al.*, 2009).

Las cepas de *E. coli* diarreogénicas representan la causa bacteriana principal de la diarrea pediátrica en regiones en desarrollo (Estrada-Garcia *et al.*, 2009), estas cepas se transmiten típicamente por alimentos y agua contaminados, siendo una causa importante de síndromes intestinales en los países en desarrollo que afectan principalmente a los niños (Canizalez-Roman *et al.*, 2013). Estas cepas ECD con frecuencia afectan a los turistas de los países desarrollados que viajan a México, causando la llamada "diarrea del viajero" (Estrada-Garcia *et al.*, 2009; Canizalez-Roman *et al.*, 2013) y son también una causa emergente de diarrea en países industrializados (Estrada-Garcia *et al.*, 2009).

La mayoría de los casos de diarrea del viajero reportados en México están estrechamente relacionados a la presencia de patotipos de *E. coli*, presentándose en más de 50% de los casos, principalmente las cepas de ETEC y EAEC (Paredes-Paredes *et al.*, 2011; Hernández *et al.*, 2011). Sin embargo, la participación de los distintos microorganismos difiere según áreas geográficas, del grupo de población, la estación y el tipo de clima (Hernández *et al.*, 2011).

Las cepas de los grupos patogénicos EPEC y EHEC pueden contaminar el agua a través de las heces de los animales huéspedes, siendo ambas cepas buenas indicadoras de contaminación fecal reciente en agua debido a su corto periodo de vida en ésta (aproximadamente de 4-12 semanas) (Cherry Lee, 2011).

*E. coli* O157:H7 se encuentra normalmente de manera asintomática en el intestino de animales, en especial en ganado vacuno. En 1993 hubo un brote en Washington, Nevada, Oregón y California EEUU que enfermó a más de 500 personas y causó cuatro muertes por el consumo de hamburguesas. Además de la carne molida de res, han estado implicados otros alimentos en los brotes, como leche cruda, mayonesa, sidra de manzana, algunas frutas, embutidos no cocidos, salami duro fermentado, aves de corral y ensaladas, donde en el 2006, un brote importante involucró diversos estados de la Unión Americana y estuvo asociado a ingesta de espinacas y lechuga (Ray y Bhunia, 2008).

En el año 2011, se reportó un brote causado por *E. coli* O104:H4 en Alemania. El brote se caracterizó por una alta prevalencia en mujeres adultas y por un elevado índice de casos de síndrome hemolítico urémico (SHU) como complicación grave. En este brote estuvieron implicados dieciséis países de Europa y América del Norte y se estimó que 4000 personas resultaron infectadas y causó la muerte a 51 de ellas. Se determinó como alimento implicado germinados de fenogreco provenientes de una huerta orgánica del norte de Alemania, cuyas semillas contaminadas provenían de Egipto (CISAN, 2012; INFOSAN, 2013).

Para determinar la prevalencia de los patotipos se han realizado diversas investigaciones, como el caso de Rúgeles *et al.*, (2010) quienes determinaron la presencia de *E. coli* diarreogénicas en muestras clínicas y productos alimenticios de tiendas al por menor en Colombia, encontrando que el 9.8% de las muestras fueron positivas para algún patotipo de *E. coli*. En este caso, cuatro diferentes patotipos fueron identificados de muestras clínicas, incluyendo EAEC, ETEC, STEC y EPEC. Las muestras de productos alimenticios fueron positivas para EAEC y STEC, sugiriendo que los vegetales (espinaca y lechuga) y la carne de res pueden estar involucrados en la transmisión de estos.

En cuanto a la información obtenida en nuestro país, Estrada-García *et al.*, (2009), quienes colectaron 795 muestras fecales de infantes durante 15 meses, encontraron 125(16%) que fueron positivas para *E. coli* diarreogénicas. *E. coli* enteropatógena atípica (EPECa) fue el patotipo más frecuente identificado, representando el 44.5% de las infecciones, seguido de las ETEC (36%), EPECt (*E. coli* enteropatógena típica) (10%), EIEC (5%), y STEC (2.5%). La mayoría de los aislados de ETEC (39.92%) fueron positivos para la presencia del gen que codifica para la toxina termolábil (*lt*<sup>+</sup>) y estos aislados fueron asociados a episodios diarreicos.

Por su parte López-Saucedo *et al.*, (2003) analizaron muestras de diferentes alimentos (salsa verde, col, cilantro y lechuga) de vendedores ambulantes en la ciudad de México

encontrando que 22(42%) de las muestras contenían *E. coli* de las cuales en 7(13%) se detectó la presencia de *E. coli* diarreogénicas siendo el ETEC la de mayor prevalencia.

Así mismo, Castro-Rosas *et al.*, en 2012 al evaluar 130 muestras de ensaladas mixtas (lechuga, espinacas, tomate, aguacate, pepino, cebolla y zanahoria) de diferentes restaurantes en la ciudad de Pachuca, Hidalgo, México, encontraron que 110 fueron positivas para *E. coli*, con una prevalencia del 7% de *E. coli* diarreogénicas, de las cuales el grupo prevalente fue el STEC seguidas de las EIEC y en menor porcentaje las ETEC.

De la misma manera, Cerna-Cortes *et al.*, (2012) aislaron *E. coli* diarreogénicas a partir del 36% de muestras de chile serrano y del 14% de muestras de chile jalapeño de México. Las ECD fueron identificadas como STEC y ETEC. En este caso las STEC fueron aisladas del 36% del chile serrano y el 14% de muestras de chile jalapeño y las ETEC del 12% de muestras de chile serrano y el 2% de chile jalapeño. Concluyendo que tanto el chile jalapeño como el serrano podrían ser un factor importante para que estas cepas se vuelvan endémicas en nuestro país.

En el 2013, en otro estudio en México se analizaron dos tipos de tomates (huaje y cherry), aislando ECD del 11% de las muestras. Las ECD identificadas incluyeron STEC, ETEC, EPEC y EIEC, siendo el grupo STEC el más frecuente tanto en tomate huaje y cherry con un 6 y 5% respectivamente, seguida por la ETEC (3 y 4%), la EPEC fueron aisladas de un 2 y 3% y por último la EIEC únicamente en el 1% de las muestras de tomate huaje (Gómez-Aldapa *et al.*, 2013).

### **Determinación de los grupos filogenéticos de *E. coli***

La determinación de la principal fuente de contaminación en los alimentos resulta de suma importancia, por ello se han desarrollado diversos métodos y técnicas para identificar la fuente animal de la contaminación fecal. Entre estos métodos están la ribotipificación, electroforesis en gel de campos pulsados (PFGE) y técnicas de rep-PCR de huella genética (“fingerprinting”) de ADN, las cuales han sido estudiadas por su eficacia, eficiencia y fiabilidad para identificar correctamente la fuente de contaminación

fecal. Sin embargo, hasta ahora solo se ha encontrado una supuesta cepa específica humana perteneciente al filogrupo B2<sub>3</sub> y una supuesta cepa específica de los animales perteneciente al filogrupo B1 (Cherry LeeCherry Lee, 2011; Carlos *et al.*, 2010).

En este caso, está bien establecido que *E. coli* se compone de un número de distintos filogrupos o grupos filogenéticos (Gordon *et al.*, 2008). La genotipificación permite correlacionar los grupos de *E. coli* y sus hospederos, siendo por ello usada para identificar la fuente de contaminación con esta bacteria (Cherry Lee, 2011).

Los análisis filogénicos han mostrado que todas las cepas de *E. coli* están dentro de 4 grupos filogenéticos principales: A, B1, B2 y D, de acuerdo a la combinación de tres marcadores genéticos: el gen *ChuA* (involucrado con el transporte del grupo hemo), gen *yjaA* (implicado en la respuesta celular al peróxido de hidrogeno y con el estrés ácido) y el fragmento de ADN TspE4.C2 (que contiene un gen putativo de una lipasa esterasa de 909, 921 o 984pb de acuerdo con la cepa, Clermont *et al.*, 2000; Cherry Lee, 2011; Gordon *et al.*, 2008). Dichos grupos filogenéticos a su vez pueden ser divididos en 7 subgrupos (A<sub>0</sub>, A<sub>1</sub>, B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>2</sub><sub>3</sub>, D<sub>1</sub> y D<sub>2</sub>) para incrementar el poder de discriminación del análisis de población de *E. coli* (Carlos *et al.*, 2010).

Gordon *et al.*, (2008) concluyeron que el método de Clermont *et al.* (2000) es una técnica excelente, rápida y económica para la designación de las cepas de *E. coli* en los grupos filogenéticos, indicando que el 85-90% de las cepas pueden ser asignados a un filogrupo y el 85-95% de los miembros de los filogrupos asignados son correctos.

Las cepas de estos grupos filogenéticos difieren en sus características fenotípicas y genotípicas, desde la utilización de diferentes azúcares, su perfil de resistencia a antibióticos, rangos de temperatura para su crecimiento, nichos ecológicos, y hasta en la presencia y/o ausencia de factores de virulencia (Gordon *et al.*, 2008; Carlos *et al.*, 2010).

En este caso, los grupos filogenéticos A y B1 son considerados grupos hermanos mientras que el grupo B2 se incluye en una rama ancestral (Leicointre *et al.*, 1988). Walk *et al.* (2007), demostraron que la mayoría de las cepas de *E. coli* que son capaces de persistir en el medio ambiente pertenecen al grupo filogenético B1; siendo más predominantes en los huéspedes no humanos y en muestras ambientales (Camina *et al.*, 2007; Tenaillon *et al.*, 2010). Algunos autores han reportado que las cepas pertenecientes a los grupos B2 y D contienen más factores de virulencia que las cepas de los grupos A y B1 (Johnson *et al.*, 2001) y son menos frecuentemente aisladas del medio ambiente (Gordon *et al.*, 2008).

Así mismo se ha reportado que las cepas del grupo B2 son menos resistentes a los antibióticos que las cepas que no pertenecen a este grupo (Johnson *et al.*, 1991), este grupo parece poseer rasgos aun no identificados que mejoran su supervivencia en el intestino humano (Nowrouzian *et al.*, 2005) y que persisten durante más tiempo en infantes que otras cepas (Gordon *et al.*, 2008).

También se ha reportado que las cepas consideradas comensales de *E. coli* típicamente pertenecen a los grupos filogenéticos A y B1 y se caracterizan por carecer de muchos de los determinantes de virulencia que están presentes en cepas patógenas, mientras que las patógenas intestinales se incluyen en los grupos filogenéticos A, B1 y D (Russo y Jonhson, 2000).

En cuanto a las cepas patógenas de *E. coli*, se ha reportado que STEC, al igual que *E. coli* O157:H7 pertenecen al grupo D (Carlos *et al.*, 2010). Algunos estudios han comparado los grupos filogenéticos con los patotipos, demostrando que la mayoría de los aislados del grupo B1 fueron EPEC y STEC, mientras que la mayoría de las cepas de los grupos B2 y A fueron EPEC o no contenían ningún factor de virulencia (Lobersil *et al.*, 2012).

En cuanto a la relación con el hospedero, se ha demostrado que la distribución de los grupos filogenéticos, subgrupos y marcadores genéticos de *E. coli* no es aleatoria entre

sus distintos hospederos; considerando a los grupos A y B1 como “generalistas” y a los grupos B2 y D como “especialistas” (Carlos *et al.*, 2010; Gordon y Cowling, 2003). Sin embargo, los humanos son los únicos hospederos que tienen cepas de los 7 subgrupos filogenéticos excepto por el subgrupo A<sub>0</sub>, siendo los grupos A y B2 los de mayor prevalencia; sugiriéndose al subgrupo B2<sub>3</sub> como indicador de contaminación por heces humanas ya que las cepas de este subgrupo solo han sido aisladas de muestras humanas (Carlos *et al.*, 2010).

Algunos autores han analizado la distribución de los principales grupos filogenéticos entre las cepas de *E. coli* aisladas de heces humanas y animales. Gordon y Cowling (2003) observaron que la prevalencia y la distribución de los grupos filogenéticos entre los mamíferos es dependiente de la dieta del hospedero, morfología intestinal, la masa y temperatura corporal, así como el clima; reportando una prevalencia de las cepas del grupo B2 entre los mamíferos herbívoros y omnívoros y de cepas del grupo B1 entre las aves y los mamíferos carnívoros.

Se ha sugerido que las condiciones climáticas geográficas, factores de la dieta y/o el uso de antibióticos, así como los factores genéticos del huésped influyen en la distribución de los grupos filogenéticos de *E. coli* comensales de humanos; algunas cepas pueden estar adaptadas principalmente a las condiciones intestinales de ciertas poblaciones (Duriez *et al.*, 2001). Las cepas del grupo A se prevén que predominen en huéspedes que viven en regiones desérticas y las cepas de los otros grupos se espera que sean poco frecuentes (Gordon y Cowling, 2003).

El análisis de la estructura genética de las poblaciones de *E. coli* en hospederos nativos en diferentes continentes sugiere que las cepas se organizan en una estructura ecotípica en el que la adaptación al huésped juega un papel importante en la estructura de la población (Souza *et al.*, 1999).

Escobar-Paramo *et al.*, (2006) analizaron cepas aisladas de heces de aves, animales mamíferos y seres humanos, observando la prevalencia de los grupos D y B1 en aves, A

y B1 en animales mamíferos, A y B2 en los seres humanos; concluyendo que uno de los principales factores que influyen en la estructura genética de las poblaciones de *E. coli* entre los hospederos es la domesticación, seguida por el clima. Baldy-Chudzik *et al.*, (2008) analizaron las heces de animales de zoológico y encontraron una prevalencia del grupo B1 en los animales herbívoros y una prevalencia del grupo A en los animales carnívoros y omnívoros.

En un estudio realizado por Carlos *et al.* (2010) en el cual se analizó la distribución de los grupos y subgrupos filogenéticos de *E. coli* a partir de heces de diferentes animales y humanos; demostraron que las cepas del grupo B1 estaban presentes en todos los hospederos analizados, sin embargo fueron más prevalentes en las muestras de vaca, cabra y oveja (mamíferos herbívoros), mientras que los cerdos y humanos (mamíferos omnívoros) presentaron una prevalencia del grupo A. La mayoría de las cepas de las muestras de pollo fueron incluidas en el subgrupo A<sub>0</sub>. Estos autores también reportaron que las cepas pertenecientes al grupo B2 no se encontraron en los mamíferos herbívoros.

Duriez *et al.*, (2001) estudiaron la prevalencia de cepas de *E. coli* comensales de humanos, aisladas de heces en tres poblaciones humanas de diferente zona geográfica (Francia, Croacia y Malí), encontrando que las cepas de los grupos filogenéticos A (40%) y B1 (34%) fueron las más comunes, seguidas por las cepas del grupo D (15%); y que estas cepas debían adquirir factores de virulencia para convertirse en patógenas. En contraste, las cepas del grupo B2 fueron poco frecuentes (11%) sin embargo parecían ser potencialmente virulentas.

En un estudio en el cual analizaron muestras fecales de humanos y animales en conjunto, las cepas de los grupos filogenéticos A (34,1%) y B1 (33,1%) fueron predominantes en comparación con las cepas del grupo filogenético D y B2 (20,4 y 12,4% respectivamente). Sin embargo, cuando se analizaron individualmente las muestras fecales de humanos y animales, se observaron diferencias significativas en la distribución de los grupos filogenéticos entre las cepas humanas y de mamíferos no

humanos, con una mayor proporción de los grupos A y B1 en animales y las cepas de los grupos A y B2 en humanos (Escobar-Paramo *et al.*, 2006).

Higgins *et al.*, (2007) analizaron cepas aisladas de agua, órganos de animales, heces humanas, de animales domésticos y de zoológico, encontrando que de los 445 aislados el 31% fueron del filogrupo B1, 26% del A, 25% del D y 17% del grupo B2.

Walk *et al.*, (2007) caracterizaron la estructura de la variación genética y la población de *E. coli* recuperadas de agua y arena en playas de agua dulce y templada, aislando cepas del grupo B1 con más frecuencia en cinco de los seis sitios de muestreo y el 56% de todas las cepas se clasificaron en este grupo. Las cepas del grupo B2 fueron recuperadas con poca frecuencia en todos los sitios; la cepas del grupo A y D fueron aisladas en el 23 y 15% respectivamente.

Recientemente, Karimi-Darehabi *et al.*, (2013) determinaron la prevalencia de los grupos filogenéticos de cepas de *E. coli* aisladas de muestras de comida congelada de origen animal y muestras fecales de niños con diarrea. Entre las cepas aisladas, para el caso de la comida congelada el 63.8% pertenecieron al grupo filogenético A, 23.4% al grupo D, 6.3% al B2 y el 4.2% al B1; similarmente, entre las cepas aisladas de niños con diarrea, el 59.5% pertenecieron al grupo A, en tanto que el 19, 12.1 y 9% a los grupos D, B1 y B2 respectivamente.

Con respecto a las aguas residuales, Sabaté *et al.*, en el 2008, analizaron aguas residuales de diversos organismos y en ellas encontraron que el grupo filogenético A fue el más común entre todas las fuentes de aguas residuales seguido por el grupo B1 de aguas residuales de puercos, vacas y gallinas, y los grupos B1 y B2 de humanos.

En este año, se realizó un estudio en el que se trató de hacer una asociación entre capacidad de *E. coli* para persistir en el intestino humano y su grupo filogenético. De 149 cepas aisladas, el 46% pertenecieron al grupo filogenético B2, 29% al grupo A, 14% al grupo D y 11% al grupo B1. Demostrando con ello que la capacidad para persistir en

la microflora intestinal humana de los grupos A y B1 es deficiente, esto debido quizá a que su nicho preferido es la microflora intestinal comensal de animales y que cuando aparecen en la microflora intestinal humana, en su mayoría colonizan solo transitoriamente. Sin embargo, las cepas del grupo B2 parecen poseer rasgos aun no identificados que mejoran su supervivencia en el intestino humano (Nowrouzian *et al.*, 2005).

### **Resistencia a antibióticos**

La resistencia a antibióticos por parte de los microorganismos es un fenómeno biológico natural debido en parte a las mutaciones y a la gran capacidad de las bacterias de transferir horizontalmente su material genético (Mosquito *et al.*, 2011).

En los países en desarrollo la aparición de microorganismos resistentes a múltiples antibióticos, también conocidos como multi-drogoresistentes o multiresistentes se facilita debido al mayor número de casos de enfermedades entéricas y al uso inapropiado o excesivo de antibióticos; por ello, la resistencia a éstos es un problema creciente en el tratamiento de las infecciones entéricas (Solórzano-Santos y Miranda-Novales, 1998).

El tratamiento antimicrobiano de las infecciones diarreicas ocasionadas por los patotipos de *E. coli* ha cambiado en los últimos años, debido a que las bacterias se han seleccionado como resistentes a algunos antibióticos que en el pasado eran considerados de primera elección, como la tetraciclina y el trimetoprima-sulfametoxazol (TMP-SMX) (Paniagua-Contreras, *et al.*, 2007). Se ha reportado que esta bacteria tiene altos porcentajes de resistencia hacia la ampicilina, cloranfenicol y ácido nalidíxico, lo que supone grandes complicaciones en el tratamiento antibiótico cuando este es requerido (Mosquito *et al.*, 2011)

Los antibióticos pueden ser encontrados en aguas residuales efluentes, particularmente de lugares donde estas drogas son ampliamente usadas, como hospitales, plantas de producción de fármacos y alrededor de granjas donde al alimento de animales contiene

estos compuestos (Young, 1993). Se ha sugerido que la resistencia en poblaciones bacterianas puede diseminarse de un ecosistema a otro (Johnson *et al.*, 2007).

A nivel mundial, Nys *et al.*, (2004) determinaron la prevalencia de resistencia a antibióticos de cepas *E. coli* de muestras humanas de áreas urbanas en ocho países en desarrollo: Kenya, México, Perú y Filipinas, y en locaciones rurales en Curacao, México, Venezuela, Ghana, Zimbabwe y Filipinas; presentando las cepas analizadas resistencia a cefazolina, gentamicina y ciprofloxacina, siendo dicha resistencia muy alta para los medicamentos más antiguos como la ampicilina, oxitetraciclina, cloranfenicol y trimetoprima.

Por otro lado, Hamelin *et al.*, (2007) realizaron un estudio de cepas de *E. coli* aisladas de muestras de aguas superficiales de diversos ecosistemas acuáticos en seis sitios diferentes en las zonas del río St. Clair y el río Detroit. La resistencia antimicrobiana más frecuente detectada entre las cepas fue para la tetraciclina, ampicilina y sulfonamida.

En lo que concierne a México, analizando cepas de *E. coli* aisladas de pacientes pediátricos durante 1960-1980, Solórzano-Santos y Miranda-Novales (1998) encontraron que la resistencia para la ampicilina se incrementó de 35 a 80%, en tanto que para la tetraciclina se mantuvo en más de 90%; en tanto que para el cloranfenicol, aumentó de 57 a 68%, y para el TMP-SMX de 52 a 72%.

Asimismo en nuestro país, López-Cuevas *et al.* en el 2009 evaluaron el perfil de resistencia a antibióticos de cepas de *E. coli* aisladas de agua y suelo de uso agrícola en el Valle de Culiacán Sinaloa, encontrando que el 19.5% fueron resistentes a tetraciclina, 82.6% a estreptomicina y 2.1% presentaron resistencia a gentamicina.

Recientemente, Dyar *et al.*, (2012) reportaron una alta resistencia a antibióticos en *E. coli* comensales de muestras de niños menores de 5 años; aislándose 738 cepas, de las cuales el 74% fue resistente a tetraciclina, el 65% a ampicilina, y para cloranfenicol y

ácido nalidíxico el 40 y 27% respectivamente. Cabe mencionar que todos los aislados fueron resistentes a ciprofloxacina.

Con respecto a las cepas de *E. coli* ECD se han realizado numerosos estudios, como el caso de Canizalez-Roman *et al.* en el 2013 que al estudiar aislados de 2008-2009 y encontraron que el 66% de las cepas de ECD eran resistentes al menos a uno de los antibióticos comúnmente recetados en México. De las cepas que se aislaron en el 2008, el 70% fueron resistentes a tetraciclina, 50% a ampicilina, 30% a sulfametoxazol-trimetoprima, 20% a gentamicina y 10% a la cefotaxima. De los aislados del 2009, el porcentaje de cepas DEC resistentes a tetraciclina, ampicilina y TMP/SMX se redujo a 26, 24 y 11%, respectivamente y el porcentaje de cepas resistentes a la gentamicina en 2009 mostró un aumento significativo del 20 al 35% con respecto al año anterior.

Estrada-García *et al.*, (2005) analizaron muestras fecales de niños con diarrea, identificando al 14% como *E. coli* diarreogénicas, de las cuales el 62% presentaron resistencia a múltiples antibióticos, de modo que el 85% fueron resistentes a la tetraciclina, seguido de ampicilina, TMP-SMX, cloranfenicol y finalmente a gentamicina con el 73, 75, 17 y 2% respectivamente. En esta ocasión no se reportó resistencia a ciprofloxacina ni cefotaxima. Con respecto a la asociación con el patotipo se encontró que las cepas EPEC atípicas fueron menos resistentes a la ampicilina y al TMP-SMX que las ETEC y EAEC.

Posteriormente, Paniagua-Contreras *et al.*, (2007) determinaron la resistencia a antibióticos de cepas de *E. coli* diarreinogénicas detectadas en infantes con y sin diarrea, en el que los patotipos que encontraron fueron STEC en el 12% de las muestras, seguido de ETEC, EPEC y EIEC con el 8.6, 2.9 y 1.7% respectivamente. La mayoría de las cepas fueron resistentes a la ampicilina y el TMP/SMX.

Con respecto a la asociación entre grupos filogenéticos de *E. coli* y su resistencia a antibióticos, Sabaté *et al.*, (2008) analizaron aguas residuales de diversos organismos y en ellas encontraron que el grupo filogenético A fue el más común entre las fuentes de

aguas residuales, seguido por el grupo B1 de aguas residuales de puercos, vacas y gallinas, y los grupos B1 y B2 de humanos. En cuanto a la resistencia a antibióticos, el 55% fueron resistentes al ácido nalidíxico y el 38% a la ciprofloxacina; el 12% fueron productores de  $\beta$ -lactamasas. Las cepas de *E. coli* del grupo B2 fueron asociadas a origen humano, la susceptibilidad a las fluoroquinolonas y la presencia de islas de patogenicidad, mientras que los grupo A, B1 y D mostraron un bajo perfil de virulencia y un alto nivel de resistencia a antibióticos. Con ello se intuyó que el abuso del uso de antibióticos en la producción de comida de animales pudiera promover el desarrollo de resistencia entre los filogrupos de *E. coli* intestinales, siendo éstos transmitidos a humanos a través de la cadena de producción.

Posteriormente, Figueira *et al.* (2011) investigaron la contribución de los diferentes grupos filogenéticos en la diseminación de la resistencia antimicrobiana en aguas urbanas. El grupo filogenético A fue el más prevalente en todos los tipos de agua, seguido por el grupo B1, así como el grupo B2 en agua residual y D en corrientes de agua. Los grupos menos prevalentes fueron D en agua residual y el B2 en las corrientes de agua. Entre los antibióticos utilizados la resistencia más alta fue frente al sulfametoxazol (77.6%), seguido de la tetraciclina (26.3%), estreptomycin (23.5%) y a los antibióticos  $\beta$ -lactámicos (amoxicilina 23.7%, ticarcilina 22.8% y cefalotina 18.0%).

En el 2011 Mokracka *et al.*, analizaron la distribución de la resistencia a las quinolonas (ácido nalidíxico) y fluoroquinolonas (ciprofloxacina) en los grupos filogenéticos de *E. coli*, encontrando que la distribución fue de la siguiente manera: grupo A: 69.7 y 42.4%, B1: 61.9 y 42.9%, B2: 60 y 60% y D: 50 y 57%, respectivamente. Sin embargo la resistencia de estos dos no mostró relación con el grupo filogenético al que pertenece la bacteria.

Recientemente, Karimi-Darehabi *et al.*, (2013) determinaron la prevalencia de los grupos filogenéticos de cepas de *E. coli* aisladas de muestras de comida congelada de origen animal y muestras fecales de niños con diarrea. Entre las cepas aisladas de las primeras, el 63.8% pertenecieron al grupo filogenético A, 23.4% al grupo D, 6.3% al B2

y el 4.2% al B1; similarmente, entre las cepas aisladas de niños con diarrea, el 59.5% pertenecieron al grupo A, en tanto que el 19, 12.1 y 9% a los grupos D, B1 y B2 respectivamente.

Teniendo como base lo anterior y la importancia de determinar la presencia de *E. coli* en muestras procedentes de la cadena de producción de chile jalapeño, tomate y melón de Nuevo León y Coahuila, determinamos la incidencia de estas bacterias y establecimos el patotipo, filogrupos y resistencia a antibióticos de cada aislado a fin de proporcionar información importante en cuanto a la ecología de estas *E. coli* en el ambiente de producción hortofrutícola y el posible origen de las cepas en cuanto a hospedero. Lo que conlleva a disponer de información importante para una posible intervención sanitaria o detectar la fuente de contaminación de *E. coli* a través de la cadena de producción de éstos.

## **HIPÓTESIS**

Existe una gran diversidad genotípica y diferentes perfiles de resistencia a antibióticos de cepas de *Escherichia coli* aisladas en la cadena de producción de chile jalapeño, tomate y melón del noreste de México.

## **OBJETIVO GENERAL**

Determinar la diversidad genotípica y los perfiles de resistencia a antibióticos de las cepas de *E. coli* aisladas en la cadena de producción de chile jalapeño, tomate y melón del noreste de México.

## **OBJETIVOS PARTICULARES**

- Determinar la prevalencia de patotipos de *E. coli* aisladas en la cadena de producción de chile jalapeño, tomate y melón.
- Determinación de los grupos filogenéticos de las cepas de *E. coli* mediante la técnica de PCR triplex.
- Determinar el perfil de resistencia a los antibióticos Gentamicina, Ciprofloxacina, Acido Nalidíxico, Trimetoprima/Sulfametoxazol, Tetraciclina, Ampicilina, Ceftazidima, Cefotaxima y Cloranfenicol de las cepas de *E. coli*.
- Determinar si existe una asociación entre los grupos filogenéticos de *E. coli* y su distribución en los diferentes productos y tipos de muestra.

## **MATERIAL Y MÉTODO**

### **Cepas bacterianas**

Se analizaron un total de 384 cepas presuntivas de *E. coli* aisladas de la cadena de producción de chile jalapeño, tomate y melón de regiones de Cadereyta N.L y Paila Coahuila respectivamente.

Así mismo se usaron cepas como controles *E. coli* O157:H7 ATCC 43895 donada por la Dr. Lynne McLandsborough del Departamento de Ciencia de los Alimentos de la Universidad de Massachusetts, Amherst, MA, USA., y la cepa *E. coli* ATCC 25922 donada por la compañía Becton and Dickinson de México. Las cepas utilizadas como controles en determinación de patotipos: *E. coli* O111:NM ATCC 43887 (EPEC), *E. coli* O111:NM ATCC 35401 (ETEC), *E. coli* O78:H11 *E. coli* O42 (EAEC) todas adquiridas comercialmente.

### **Mantenimiento y activación de las cepas**

Las cepas se conservaron en caldo infusión cerebro corazón (ICC, Difco) con glicerol (20% v/v, Sigma) a -80°C. Para su activación, se tomó una alícuota de 10µl de dicho cultivo y se inoculó en 5ml de caldo soya tripticaseína (Difco) y se incubaron por 18-24h a 37°C. Una vez crecido el cultivo se tomó una alícuota de las cepas y se estrió en agar ICC inclinado el cual fue incubado por 24h a 37°C. Pasado el tiempo de incubación, la cepa se mantuvo a 4°C y cada tres meses se realizaron resiembras. Para la activación de las cepas, se tomó una azada de los cultivos anteriores y se sembraron en caldo soya tripticaseína y se incubaron por 18-24h a 37°C.

### **Crecimiento en agares específicos para la posible presencia de *E. coli***

Para la verificación de la características macroscópicas de las colonias de las 384 cepas presuntivas, todas estas fueron sembradas en agares selectivos y diferenciales como MacConkey con Sorbitol (SMAC, Difco) para determinar las no fermentadoras de sorbitol y presuntivas de STEC, además de agar RAPID *E. coli* 2™ (BIORAD) y agar TBX (por sus siglas en inglés, tryptona bilis X-glucurónido, Difco) para diferenciar

fácilmente las *E. coli* de los coliformes, además de la utilización de ciertos compuestos cromogénicos por parte de las STEC en agar TBX y finalmente agar eosina azul de metileno (EMB, por sus siglas en inglés, Eosin methylene blue; Difco) y MacConkey (MCK, Difco) ya que son tradicionalmente empleados para aislar a *E. coli*. Para ello, una vez activadas las cepas, se tomó una azada y se estrío en cuatro cuadrantes sobre placas con agar respectivo, una vez estriadas se incubaron a 37°C por 24h. Pasado el tiempo de incubación se realizó la observación macroscópica de las colonias en cada uno de los agares.

### **Determinación de grupos filogenéticos de *E. coli***

Se realizó mediante la técnica de PCR triplex según la metodología descrita por Clermont *et al.*, 2000 para *E. coli* en donde los aislados se cultivaron en caldo soya tripticaseína a 37°C toda la noche. Para este ensayo se utilizó la cepa de *E. coli* ATCC 25922 como control positivo ya que pertenece al genotipo B2 que contiene los tres genes (*chuA*, *yjaA* y TSPE4.C2) de técnica de PCR triplex utilizada. En tanto que se usó como control negativo una cepa de *Klebsiella pneumoniae* ATCC 33495 la cual no posee estos genes.

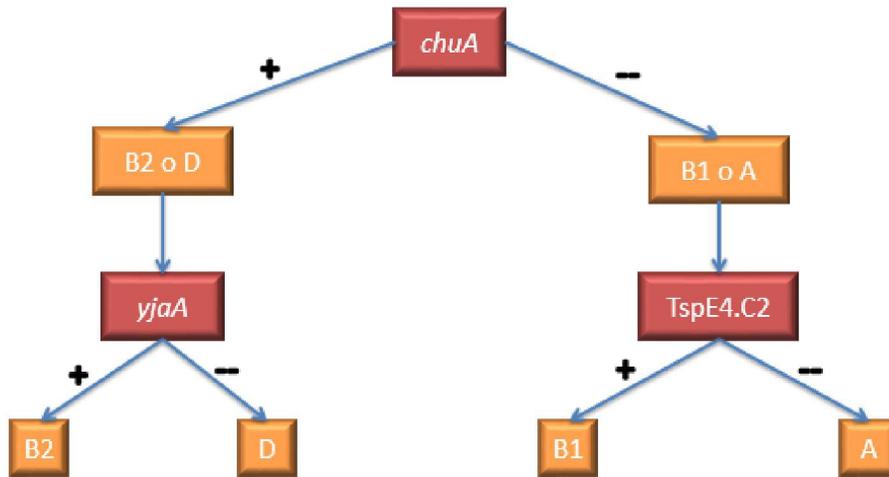
La extracción del DNA se realizó siguiendo la metodología propuesta por Wang *et al.*, (1997) para lo cual se tomó una alícuota de 0.5ml del cultivo activado y se mezcló con 1ml de una solución amortiguadora de fosfatos (PBS 0.05mol/L, pH 7.4) en tubos Eppendorf y se centrifugó a 9000xg durante 3 min (microcentrífuga Eppendorf modelo 5415C). Se resuspendió el precipitado en 50µl de agua ultrapura (miliQ). Las muestras se diluyeron 1:10 con tritón X-100 (Sigma) al 1% y se calentaron a 95-100°C durante 10 min. Posteriormente se enfriaron inmediatamente en baño de agua con hielo, de ahí se tomaron 3µl que sirvieron como templado para la amplificación la cual se realizó según lo descrito por Clermont *et al.*, (2000) como se describe brevemente a continuación.

El volumen final de la mezcla de PCR fue de 20 µl que contenía 2.5U Taq polimerasa (BIOLINE, México), 1.5mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2mM de dNTP (BIOLINE, México), 2µl del amortiguador de reacción 10x, 3µl del DNA templado, 1µM de cada uno de los

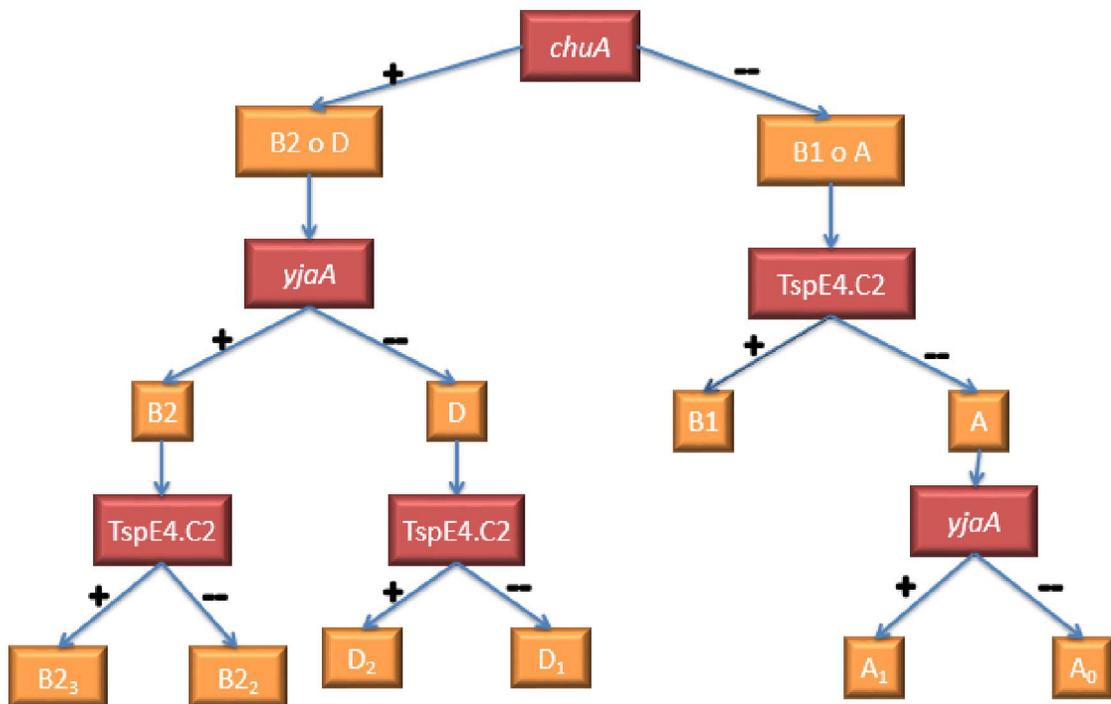
oligonucleótidos TSPE4.C2, *chuA* y *yjaA* (Tabla 1). Se usó un termociclador ThermoHybaid (Modelo HBPX110) donde las condiciones de amplificación incluyeron una paso inicial de desnaturalización de 4min a 94°C, seguido de 30 ciclos que comprendieron 94°C durante 5s, 59°C durante 10s y una extensión final de 5min a 72°C. Los productos de la amplificación (10µl) fueron separados en un gel de agarosa al 2% con una corriente de 120V y se visualizaron al ser teñidos con bromuro de etidio (50µg/ml) bajo luz UV, los geles fueron fotografiados usando un Gel Logic 200, Imaging System, Kodak.

<b>Tabla 1.-Secuencias de oligonucleótidos y tamaño previsto de los productos de amplificación para la genotipificación de <i>E. coli</i>.</b>		
Oligonucleótido Gen blanco (producto)	Secuencia 5'-3'	Tamaño del producto (pb)
<i>chuA</i> (involucrado con el transporte del grupo hemo)	F-GACGAACCAACGGTCAGGAT R-TGCCGCCAGTACCAAAGACA	279
<i>yjaA</i> (implicado en la respuesta celular al peróxido de hidrógeno y con el estrés ácido)	F-TGAAGTGTGTCAGGAGACGCTG R-ATGGAGAATGCGTTCCTCAAC	211
TSPE4.C2 (contiene un gen putativo de una lipasa esterasa de 909, 921 o 984pb de acuerdo con la cepa)	F-GAGTAATGTCGGGGCATTCA R-CGCGCCAACAAAGTATTACG	152

La identificación de los grupos y subgrupos filogenéticos se determinó mediante la presencia o ausencia de los genes como se muestra a continuación (Fig 2 y 3):



**Figura 2.-** Determinación de grupos filogenéticos de *E. coli*.



**Figura 3.-** Determinación de subgrupos filogenéticos de *E. coli*.

La confirmación de los aislados del genotipo  $A_0$  de *E. coli*, se realizó según el protocolo de PCR propuesto por Higgins *et al.*, 2007, en el que se amplifica un fragmento de 365pb del gen de beta-galactosidasa de *E. coli* (denominado *lacZ*) utilizando el oligonucleótido: 5'GCA GCG TTG TTG TGC CAG 3' y el oligonucleótido inverso: 5'

GTC CCG CAG CGC AGA C 3'; correspondiente a los nucleótidos 2458-2475 y 2807-2822 respectivamente, de este gen. La mezcla de reacción consistió en un volumen final de 50  $\mu$ l que contenía una solución amortiguadora de 1U Taq polimerasa, 1.5mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2mM dNTP, 5 $\mu$ l del buffer de reacción 10x, 5 $\mu$ l del DNA templado, 1 $\mu$ M de cada uno de los oligonucleótidos. Las condiciones de amplificación fueron 35 ciclos de 94°C durante 15s, 60 °C durante 30s y 72 °C durante 45s, con una extensión final de 7min a 72°C, posteriormente se separaron y visualizaron como anteriormente se mencionó.

### **Determinación de *E. coli* STEC**

Para la determinación de estos microorganismos se realizó la técnica de PCR múltiple siguiendo el protocolo reportado por Fagan *et al.* (1999) en las que las cepas de *E. coli* O157:H7 ATCC 43895 y ATCC 25922 se utilizaron como control positivo y negativo, respectivamente. Para esto se extrajo el DNA como se reportó en el apartado anterior (Wang *et al.*, 1997).

Para la amplificación, se mezclaron 2 $\mu$ l de templado de DNA con 48 $\mu$ l de la mezcla de reacción, la cual consistió de 10mM Tris HCL (pH 8.4), 10mM KCL, 3mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2mM de cada uno de los cuatro desoxirribonucleótidos trifosfatados (dATP, dGTP, dTTP y dCTP), 0.1 $\mu$ M de cada oligonucleótido (Tabla 2) y 4 U de Taq polimerasa. La amplificación se realizó en un termociclador cuyas condiciones de amplificación fueron: un ciclo de 95°C por 3min, seguida por 35 ciclos de 95°C por 20s, 58°C por 40s, 72°C por 90s, y con un ciclo final de 72°C por 5min. Los productos de la amplificación se visualizaron y fotografiaron como se determinó previamente.

<b>Tabla 2. Secuencias de oligonucleótidos y tamaño de los productos de amplificación para <i>E. coli</i> STEC</b>		
Oligonucleótido Gen blanco (producto)	Secuencia 5'-3'	Tamaño del producto (pb)
EHEC <i>hly</i> (hemolisina)	F-ACGATGTGGTTTATTCTGGA R-CTTCACGTGACCATACATAT	165
<i>stx1</i> (toxina shiga 1)	F-ACACTGGATGATCTCAGTGG R-CTGAATCCCCCTCCATTATG	614
<i>stx2</i> (toxina shiga 2)	F-CCATGACAACGGACAGCAGTT R-CCTGTCAACTGAGCAGCACTTTG	779
<i>eaeA</i> (intimina)	F-GTGGCGAATACTGGCGAGACT R-CCCCATTCTTTTTCACCGTCG	890

### **Determinación de patotipos de *E. coli***

La determinación de patotipos se realizó siguiendo la metodología de PCR múltiple propuesta por Vidal *et al.* (2005). Las cepas de *E. coli* de referencia utilizadas como controles positivos fueron: *E. coli* O157:H7 ATCC 43895 (EHEC), *E. coli* O111:NM ATCC 43887 (EPEC), *E. coli* O111:NM ATCC 35401 (ETEC), *E. coli* O78:H11 *E. coli* O42 (EAEC); y como control negativo *E. coli* ATCC 25922.

La extracción del DNA se realizó como en los ensayos anteriores. La reacción de amplificación constó de un volumen final de 50µl conteniendo 10U Taq polimerasa, 1.5mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM de dNTP, 5µl del buffer de reacción 10x, 3µl del DNA templado, 0.5µM de cada uno de los oligonucleótidos: *stII*, *virF*, *ipaH*, *daaE*, *aafII* y *lt*, 0.1µM cada uno de los siguientes oligonucleótidos: *stx1*, *stx2*, *eae* y *bfp* (Tabla 3). Se usó un termociclador en el que las condiciones de amplificación fueron de 35 ciclos de 94°C durante 1.5min, 60°C durante 1.5min, y 72°C durante 1.5min. Los productos de la amplificación se visualizaron y fotografiaron como se mencionó previamente.

<b>Tabla 3.- Secuencias de iniciadores y tamaño previsto de los productos de amplificación para <i>E. coli</i> STEC</b>		
Oligonucleótido Gen blanco	Secuencia 5'-3'	Tamaño del fragmento (pb)
<i>stx1</i>	F-CAGTTAATGTGGTGGCGAAGG RCACCAGACAATGTAACCGCTG	348
<i>stx2</i>	F-ATCCTATTCCCGGGAGTTTACG R-GCGTCATCGTATACACAGGAGC	584
<i>Eae</i>	F-TCAATGCAGTTCGGTTATCAGTT R-GTAAAGTCCGTTACCCCAACCTG	482
<i>Bfp</i>	F-GGAAGTCAAATTCATGGGGGTAT R-GGAATCAGACGCAGACTGGTAGT	300
<i>Lt</i>	F-GCACACGGAGCTCCTCAGTC R-TCCTTCATCCTTTCAATGGCTTT	218
<i>stII</i>	F-AAAGGAGAGCTTCGTCACATTTT R-AATGTCCGTCTTGCGTTAGGAC	129
<i>virF</i>	F-AGCTCAGGCAATGAAACTTTGAC R-TGGGCTTGATATTCCGATAAGTC	618
<i>ipaH</i>	F-CTCGGCACGTTTTAATAGTCTGG R-GTGGAGAGCTGAAGTTTCTCTGC	933
<i>daaE</i>	F-GAACGTTGGTTAATGTGGGGTAA R-TATTCACCGGTCGGTTATCAGT	542
<i>aafII</i>	F-CACAGGCAACTGAAATAAGTCTGG R-ATTCCCATGATGTCAAGCACTTC	378

### **Determinación del perfil de resistencia a antibióticos de las cepas aisladas**

Para la determinación del perfil de resistencia a antibióticos se utilizó la técnica de Kirby-Bauer de difusión en disco reportada en el manual M02–A11 del Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI (2012). Los antibióticos que se utilizaron son los más comúnmente usados para el tratamiento de infecciones por bacterias Gram

negativas: ácido nalidíxico (NA, 30µg), sulfametoxazol/trimetoprima (SXT, 1.25/23.75µg), tetraciclina (TE, 30µg), gentamicina (CN, 10µg), ciprofloxacina (CIP, 5µg), ampicilina (AMP, 10µg), ceftazidima (CAZ, 30µg), cefotaxima (CTX, 30µg) y cloranfenicol (C, 30µg) todos adquiridos de la compañía Oxoid (Cambridge, UK).

Las cepas activadas de *E. coli* (incluyendo la usada como control; *E. coli* ATCC 25922) fueron sembradas en placas de agar Mueller Hinton (Difco) en cuatro cuadrantes e incubadas por 18-20h a 37°C. Posteriormente se tomaron colonias aisladas con un hisopo estéril y se homogenizaron con solución salina fisiológica estéril hasta ajustar a una turbidez similar al estándar No. 0.5 del Nefelómetro de McFarland a 600nm (aproximadamente  $1.5 \times 10^8$  UFC/ml). Después de esto, se realizaron diluciones decimales seriadas en solución salina fisiológica estéril hasta alcanzar 10UFC/ml. Para verificar las cuentas de cada dilución, se tomó una alícuota de 10µl de éstas y se inocularon dejando caer una gota sobre la superficie del agar Mueller Hinton, según el método descrito por Miles y Misra (1938). Una vez inoculadas, las placas se dejaron secar y se incubaron por 16 a 18h a 37°C.

Para la resistencia a antibióticos, de la dilución de  $1 \times 10^6$  UFC/ml se tomó una alícuota de 100µl y se sembró con un asa de Digraskly por extensión en superficie en placas de agar Mueller Hinton y se dejó reposar por un máximo de 15min al cabo del cual, se colocaron los sensidiscos de los antibióticos antes mencionados con la ayuda de unas pinzas estériles. Las placas fueron incubadas a 37°C de 16 a 18h. Pasado el tiempo de incubación se determinó si existió inhibición o no en el crecimiento de las cepas de *E. coli* y en caso de presentarlo, se midieron los halos de inhibición. Los tamaños de las zonas de inhibición se interpretaron con las tablas de interpretación del suplemento M100-S21 (2011). Los organismos se reportaron como sensibles (S), intermedios (I) o resistentes (R) al antibiótico ensayado según correspondió.

### **Análisis estadístico**

Se aplicaron análisis de estadística descriptiva para los datos obtenidos en cuanto a la resistencia a antibióticos. Se analizó la asociación entre la distribución de los grupos filogenéticos en los diferentes productos analizados, usando la prueba de chi cuadrada ( $\chi^2$ ); y también se analizó a nivel de subgrupos. Así mismo, se analizó si existía una asociación entre la distribución de los grupos filogenéticos y subgrupos filogenéticos en los diferentes tipos de muestra.

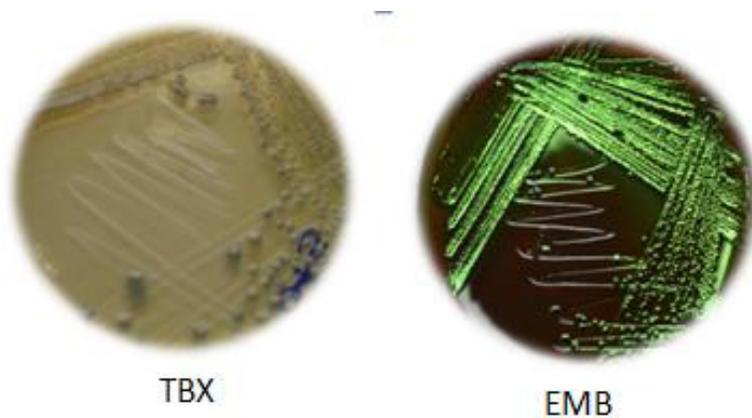
## RESULTADOS

### Cepas bacterianas

Cuando realizamos la verificación de la morfología colonial macroscópica característica de *E. coli* en cada agar ensayado, verificamos que en el agar SMAC las colonias fueron rosas e incoloras para las fermentadoras y no fermentadoras de sorbitol respectivamente, donde característicamente las del grupo STEC son sorbitol negativas. En el caso del agar RAPID *E. coli* 2™ todas las colonias de *E. coli* se observaron con una coloración morada (los coliformes generalmente presentan una coloración verdosa), al igual que los controles positivos de *E. coli* no patógena (ATCC 25922) y las STEC no-O157; las 3 cepas presuntivas para *E. coli* O157:H7 así como su control positivo presentaron un color verde, característico de los coliformes. En el agar TBX las *E. coli* se observaron con una coloración azul-verde, las cepas STEC usadas como control mostraron también colonias verdes, ocurriendo lo mismo con las 64 cepas presuntivas para este grupo. Para el caso del crecimiento en agar EMB, las cepas de *E. coli* todas mostraron el brillo metálico característico. Finalmente en el agar MCK las colonias fueron de color rosa característico de la misma manera que el control positivo de *E. coli* no patógena (Fig. 4 y 5).



**Figura 4.**-Crecimiento característico de las *E. coli* en diferentes agares.



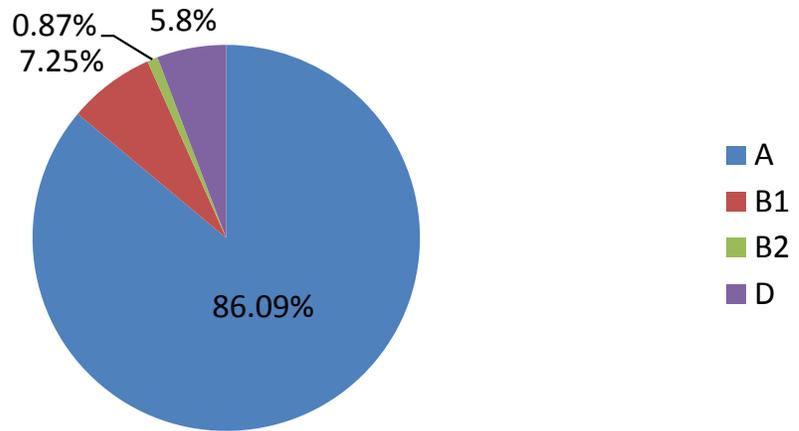
**Figura 5.-** Crecimiento característico de las *E. coli* en diferentes agares.

### **Determinación de grupos filogenéticos de *E. coli***

Se analizaron 384 cepas presuntivas de *E. coli* aisladas de la cadena de producción de chile jalapeño, tomate y melón, para los diferentes grupos filogenéticos de *E. coli*, además de la presencia del gen *lacZ* el cual identifica sólo a la especie *E. coli* siendo únicamente 345 cepas positivas para este gen. Estas últimas fueron seleccionadas y se realizó la determinación de los 4 filogrupos principales, obteniendo 297 (86.09%) que pertenecieron al filogrupo A, 25 (7.25%) al B1, 3 (0.87%) al B2 y 20 (5.8%) al D (Tabla 4, Gráfico 1). El filogrupo A fue el de mayor prevalencia con un 86.09%, en tanto que el filogrupo con menor prevalencia fue el B2.

**Tabla 4.-** Prevalencias de los principales grupos filogenéticos de las cepas de *E. coli*

<b>Filogrupos</b>	<b>Muestras</b>	<b>Porcentajes</b>
<b>A</b>	297	86.09
<b>B1</b>	25	7.25
<b>B2</b>	3	0.87
<b>D</b>	20	5.80
<b>Total</b>	345	100

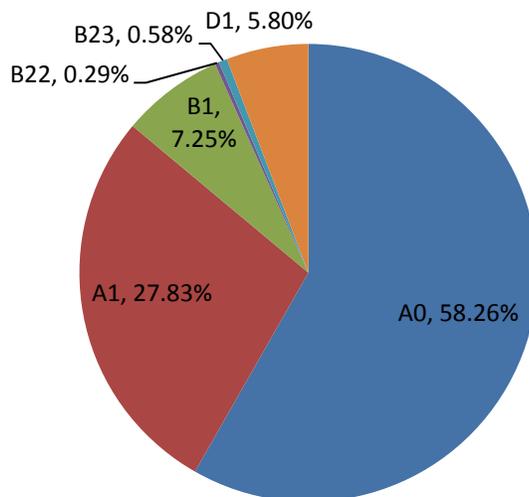


**Grafico 1.- Prevalencia de los principales grupos filogenéticos de las cepas de *E. coli***

Para una clasificación más completa, estos grupos se dividieron en 7 subgrupos filogenéticos obteniendo los siguientes resultados: 205 (58.26%) pertenecieron al filogrupo A<sub>0</sub>, 96 (27.83%) al A<sub>1</sub>, 25 (7.25%) al B<sub>1</sub>, 1 (0.29%) al B<sub>2<sub>2</sub></sub>, 2 (0.58%) al B<sub>2<sub>3</sub></sub>, 20 (5.8%) al D<sub>1</sub>, en tanto que ninguna de las cepas analizadas perteneció al genotipo D<sub>2</sub> (Tabla 5; Grafico 2). El filogrupo de mayor prevalencia fue el A<sub>0</sub> con un 58.26% y el filogrupo que presentó menor prevalencia fue el B<sub>2<sub>2</sub></sub>.

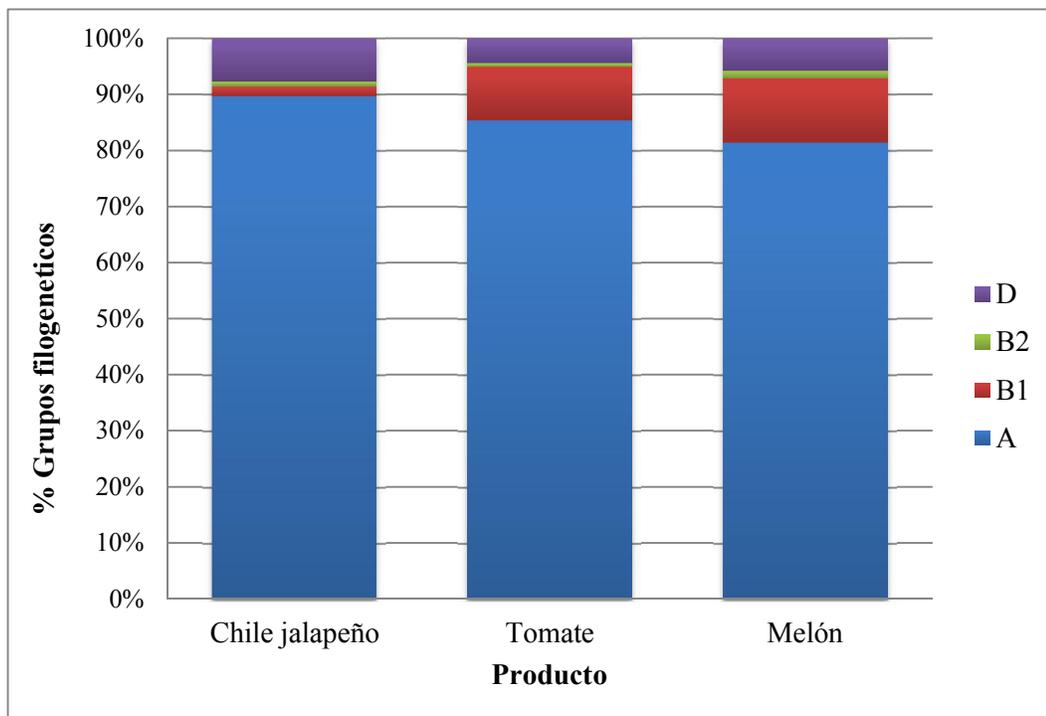
**Tabla 5.- Prevalencias de los subgrupos filogenéticos de las cepas de *E. coli***

Subgrupos filogenéticos	Muestras	Porcentajes
A <sub>0</sub>	201	58.26
A <sub>1</sub>	96	27.83
B <sub>1</sub>	25	7.25
B <sub>2<sub>2</sub></sub>	1	0.29
B <sub>2<sub>3</sub></sub>	2	0.58
D <sub>1</sub>	20	5.80
D <sub>2</sub>	0	0
<b>Total</b>	<b>345</b>	<b>100</b>



**Grafico 2.- Prevalencia de los subgrupos filogenéticos de las cepas de *E. coli***

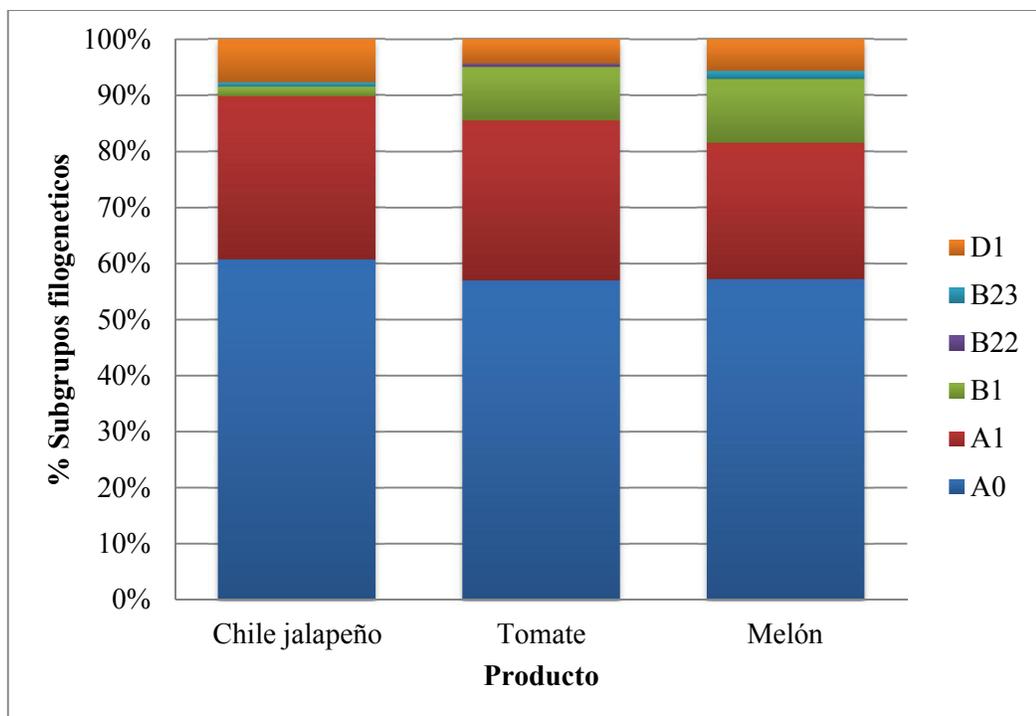
En base a estos resultados, el filogrupo A fue el más prevalente en los tres tipos de productos (chile jalapeño, tomate y melón), siendo el filogrupo B2 el que se encontró en menor número de muestras (Grafico 1). En cuanto a los subgrupos filogenéticos el más abundante fue el A<sub>0</sub>, cabe mencionar que tanto este subgrupo como el A<sub>1</sub>, B<sub>1</sub>, D<sub>1</sub> se encontraron en los tres tipos de producto; el subgrupo B<sub>23</sub> en chile jalapeño y melón; sin embargo el subgrupo B<sub>22</sub>, solo se encontró en el tomate (Grafico 2).



**Grafico 3.- Abundancia relativa de los grupos filogenéticos de *E. coli* según el producto.**

**Tabla 6.- Distribución de los grupos filogenéticos de *E. coli* según el tipo de producto.**

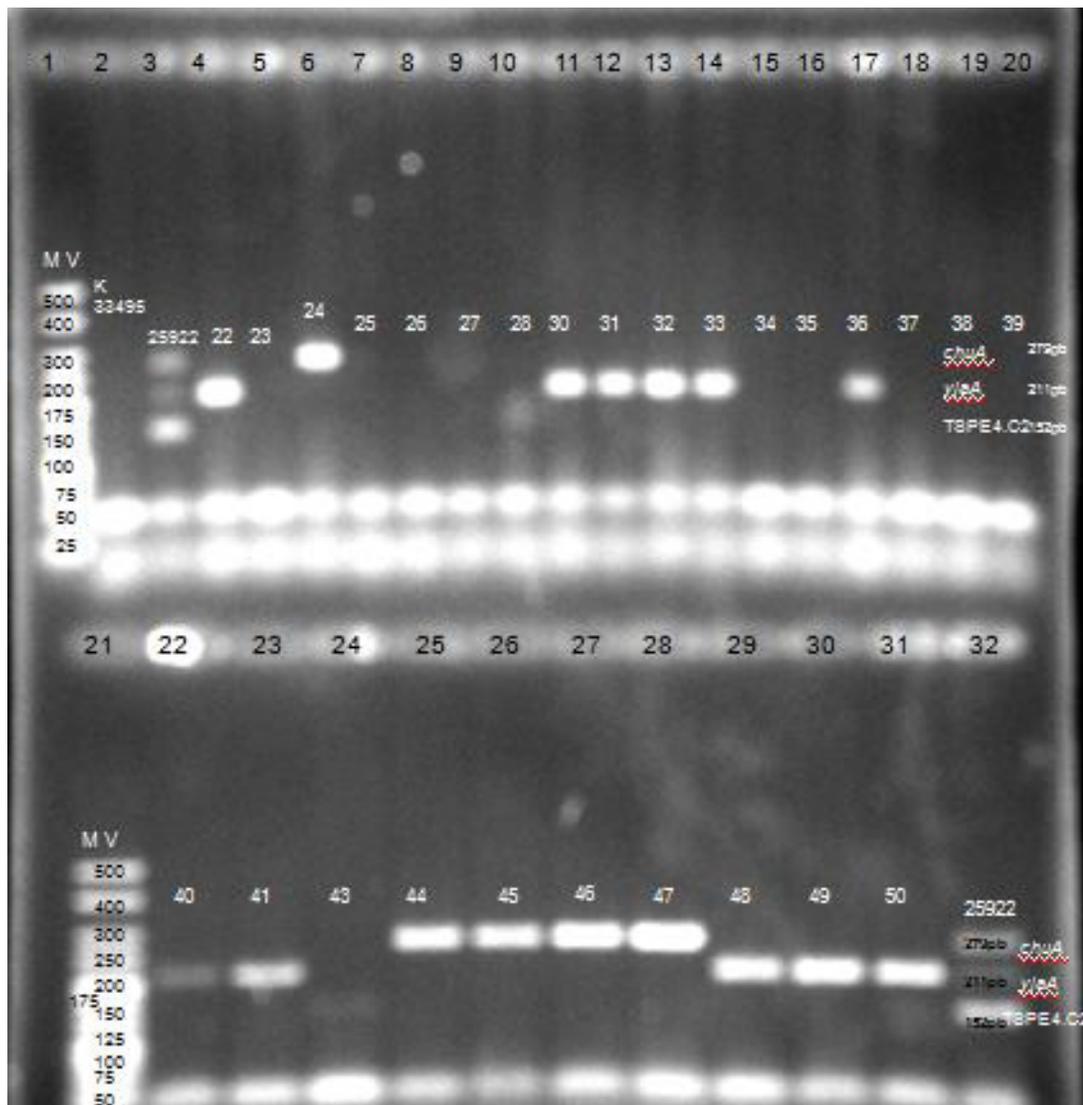
Producto	Grupos filogenéticos	Numero de muestras	%
Chile jalapeño	A	105	89.74
	B <sub>1</sub>	2	1.71
	B <sub>2</sub>	1	0.85
	D	9	7.69
	<b>Total</b>	117	100
Tomate	A	135	85.44
	B <sub>1</sub>	15	9.49
	B <sub>2</sub>	1	0.63
	D	7	4.43
	<b>Total</b>	158	100
Melón	A	57	81.43
	B <sub>1</sub>	8	11.43
	B <sub>2</sub>	1	1.43
	D	4	5.71
	<b>Total</b>	70	100
<b>Total de muestras</b>		345	



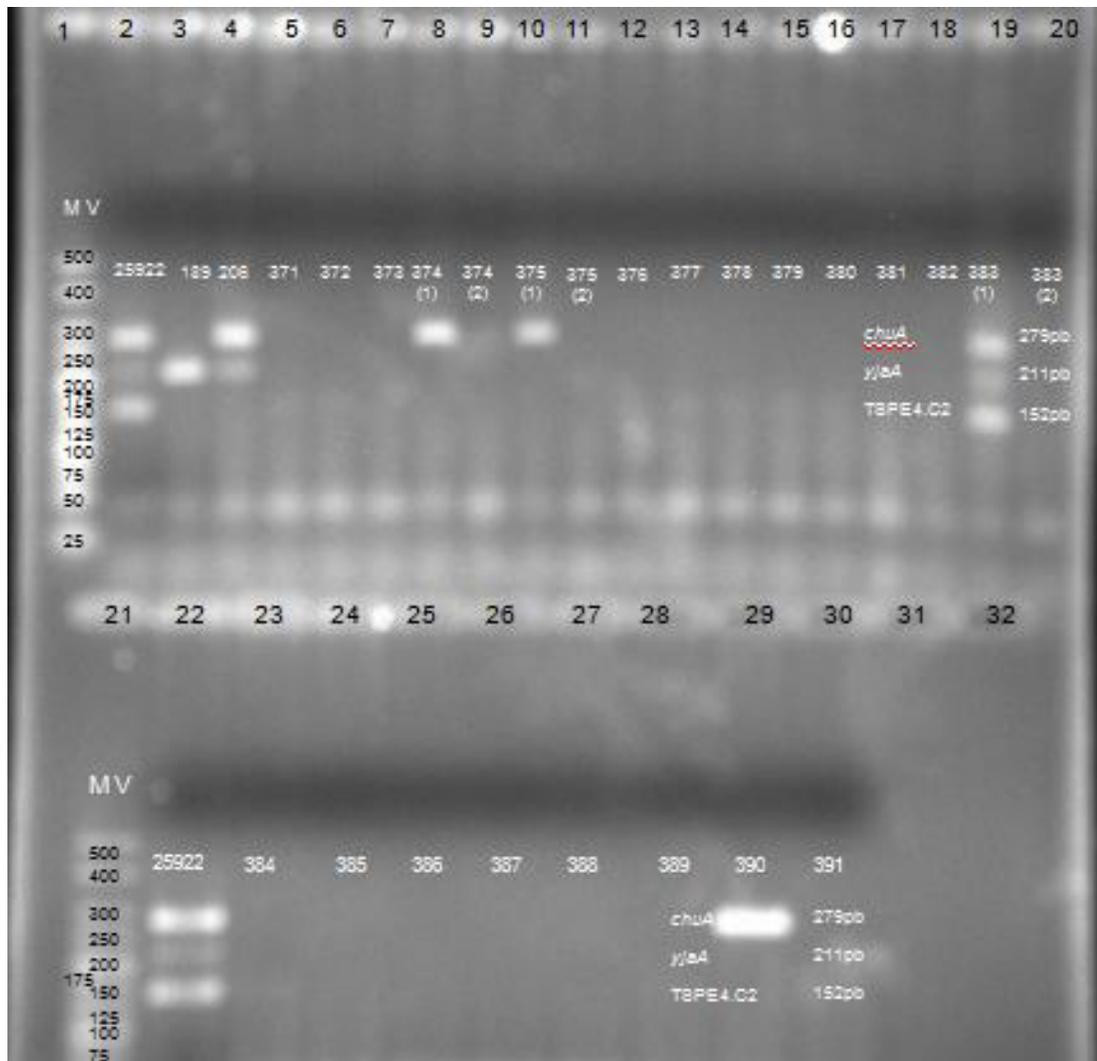
**Grafico 4.- Abundancia relativa de los subgrupos filogenéticos de *E. coli* según el producto**

**Tabla 7.-Distribución de los subgrupos filogenéticos de *E. coli* según el producto**

Producto	Subgrupos filogenéticos	Numero de muestras	%
Chile jalapeño	A <sub>0</sub>	71	60.68
	A <sub>1</sub>	34	29.06
	B <sub>1</sub>	2	1.71
	B <sub>23</sub>	1	0.85
	D <sub>1</sub>	9	7.69
	<b>Total</b>	117	100
Tomate	A <sub>0</sub>	90	56.96
	A <sub>1</sub>	45	28.48
	B <sub>1</sub>	15	9.49
	B <sub>22</sub>	1	0.63
	D <sub>1</sub>	7	4.43
	<b>Total</b>	158	100
Melón	A <sub>0</sub>	40	57.14
	A <sub>1</sub>	17	24.29
	B <sub>1</sub>	8	11.43
	B <sub>23</sub>	1	1.43
	D <sub>1</sub>	4	5.71
	<b>Total</b>	70	100
<b>Total de muestras</b>		345	



**Figura 6.-** Determinación de los grupos filogenéticos de *E. coli* de las cepas aisladas de chile jalapeño, tomate y melón. Línea 1 y 21: Marcador peso molecular (HyperLadder V 500-25pb, BIOLINE); línea 2: *Klebsiella pneumoniae* ATCC 33495 (control -); línea 3 y 32: *E. coli* ATCC 25922 (control +, contiene los 3 genes: *chuA*, *yjaA* y TSPE4.C2).



**Figura 7.-**Determinación de los grupos filogenéticos de *E. coli* de las cepas aisladas de Chile jalapeño, tomate y melón. Línea 1 y 21: Marcador peso molecular (HyperLadder V 500-25pb, BIOLINE); línea 2 y 22: *E. coli* ATCC 25922 (control +); línea 4: muestra 206 (genotipo B<sub>2</sub>); línea 19: muestra 383(1) (genotipo B<sub>3</sub>).

Se analizó la asociación entre la distribución de los grupos filogenéticos en los diferentes productos analizados, usando la prueba de chi cuadrada ( $X^2$ ); con lo cual se encontró que los grupos filogenéticos no tienen una distribución diferente entre los productos. De la misma manera se analizó a nivel de subgrupos, obteniéndose los mismos resultados, es decir que no existe relación entre algún grupo filogenético con algún producto en particular.

Cuando se analizó si existía una asociación entre la distribución de los grupos filogenéticos en algún producto en específico se encontró que los grupos filogenéticos se distribuyen de manera diferente entre los diferentes tipos de muestra. Sin embargo cuando se analizaron los subgrupos filogenéticos para verificar esta asociación, y se encontró que éstos no presentaron una distribución diferente entre los tipos de muestra. Debido a lo anterior se realizó de nuevo la prueba de chi cuadrada ( $X^2$ ) a nivel de grupos filogenéticos, descartando uno de estos para saber cuál de los cuatro grupos era el que presentaba la relación entre la distribución de estos en los tipos de muestra, obteniéndose que los grupos filogenéticos B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> y D no mostraron una distribución diferente entre los tipos de muestra, al contrario del filogrupo A que si se distribuyó de manera diferente entre los tipos de muestra.

### ***E. coli* STEC**

A partir de las 345 cepas de *E. coli*, se analizaron 64 muestras presuntivas para *E. coli* STEC. Sin embargo también analizamos las muestras restantes de las 345 cepas. Como resultado obtuvimos que todas fueron negativas para la presencia de los genes *eae*, *hlyA*, *Stx<sub>1</sub>* y/o *Stx<sub>2</sub>*. Sin embargo, solo una cepa aislada de suelo de la cadena de producción del chile jalapeño y dos cepas aisladas de agua fuente para riego del tomate fueron positivas para el gen *eae* (intimina), que pudiera indicar que pertenecen al patotipo EPEC.



**Figura 8.-** Gel representativo del PCR multiplex para la detección de *E. coli* STEC de las cepas aisladas de *E. coli* en la cadena de producción del chile jalapeño, tomate y melón. Línea 1: marcador de peso molecular 1000-100pb (HyperLadder IV, BIOLINE), Línea 2 y 3: Cepas control ATCC 25922 de *E. coli* no patogénica y ATCC 43894 O157:H7 respectivamente. Líneas 4 a 6: Aislados 207, 383(1), 206 de cadena de producción de tomate y chile positivas para el gen *eae*.

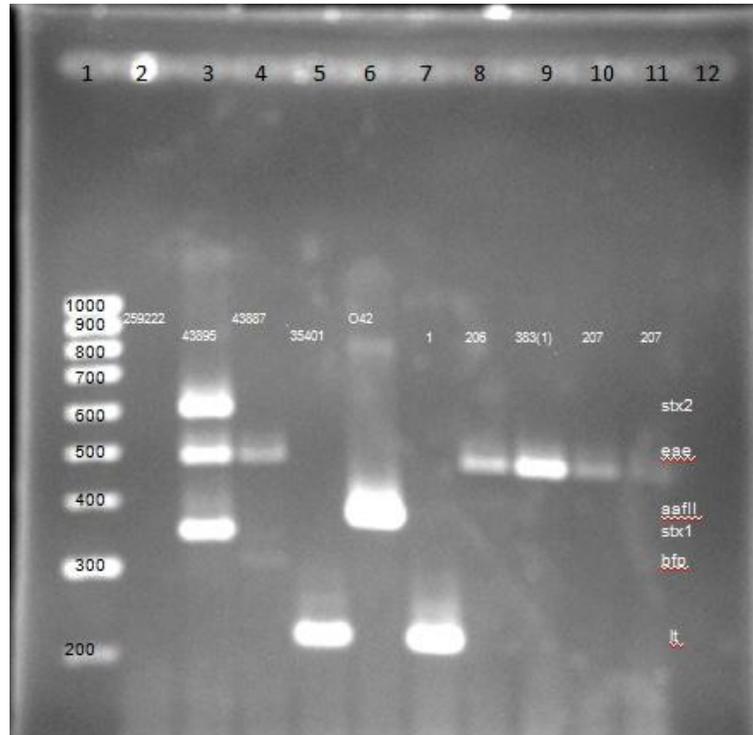
**Tabla 8.-** Cepas positivas para el gen de *eae* (intimina)

# Cepa	Tipo de muestra	Producto
206	Agua fuente	Tomate
207	Agua fuente	Tomate
383(1)	Suelo	Jalapeño

### Patotipos de *E. coli*

Entre las 345 cepas de *E. coli* analizadas para los diferentes patotipos, el 1.16% (4/345) de las muestras resultaron positivas para alguno de los genes buscados (*stII*, *virF*, *ipaH*, *daaE*, *aafIII*, *lt*, *stx1*, *stx2*, *eae* y *bfp*). Tres muestras (3/345; 0.87%) fueron positivas para el gen *eae*, lo que nos indica que pertenecen al patotipo de *E. coli* enteropatógena (EPEC) de modo atípico ya que presentaron el gen *eae* (intimina) más no el gen *bfp*; y

sólo una muestra (1/345; 0.29%) resultó positiva para el gen *lt*, es decir que pertenece al patotipo de *E. coli* enterotoxigénica (ETEC). Los patotipos EAEC, EHEC, DAEC y EIEC no estuvieron presentes (Fig. 9).



**Figura 9.** Detección de patotipos. Línea 1: Marcador peso molecular (HyperLadder IV 1000-100pb, BIOLINE); línea 2: *E. coli* no patógena ATCC 25922 (control -); línea 3: *E. coli* STEC ATCC 43895 (*stx*<sub>1</sub><sup>+</sup>, *stx*<sub>2</sub><sup>+</sup>, *eae*<sup>+</sup>); línea 4: *E. coli* EPEC ATCC 43887 (*eae*<sup>+</sup>, *bfp*<sup>+</sup>); línea 5: *E. coli* ETEC ATCC 35401 (*lt*<sup>+</sup>); línea 6: *E. coli* EAEC O42 (*aafII*<sup>+</sup>); línea 7: cepa 1 (*lt*<sup>+</sup>); línea 8,9,10: cepa 206,383(1) y 207 respectivamente (*eae*<sup>+</sup>).

**Tabla 9.-** Cepas positivas para patotipos de *E. coli*

# cepa	Gen	Patotipo	Tipo de muestra	Producto
1	<i>lt</i> <sup>+</sup>	ETEC	Suelo	Chile jalapeño
206	<i>eae</i> <sup>+</sup> , <i>bfp</i> <sup>-</sup>	EPEC	Agua fuente	Tomate
207	<i>eae</i> <sup>+</sup> , <i>bfp</i> <sup>-</sup>	EPEC	Agua fuente	Tomate
383(1)	<i>eae</i> <sup>+</sup> , <i>bfp</i> <sup>-</sup>	EPEC	Suelo	Chile Jalapeño

En relación con los patotipos encontrados de *E. coli* y sus genotipos, las 3 cepas de EPEC pertenecieron a diferentes genotipos: A<sub>0</sub>, B<sub>2</sub>, y B<sub>3</sub>; en tanto que la cepa de *E. coli* ETEC al genotipo A<sub>1</sub>.

**Tabla 10.-** Relación de los patotipos con los genotipos de *E. coli*.

# cepa	Patotipo	Filogrupo	Tipo de muestra	Producto
1	ETEC	A <sub>1</sub>	Suelo	Chile jalapeño
206	EPEC	B <sub>2</sub>	Agua fuente	Tomate
207	EPEC	A <sub>0</sub>	Agua fuente	Tomate
383(1)	EPEC	B <sub>3</sub>	Suelo	Chile Jalapeño

#### **Determinación del perfil de resistencia a antimicrobianos de las cepas aisladas**

A 172 cepas aisladas de *E. coli* se les determinó el perfil de resistencia a nueve antibióticos comúnmente usados para el tratamiento de infecciones por *E. coli*, siendo éstos: ácido nalidíxico (NA, 30µg), sulfametoxazol/trimetoprima (SXT, 1.25/23.75µg), tetraciclina (TE, 30µg), gentamicina (CN, 10µg), ciprofloxacina (CIP, 5µg), ampicilina (AMP, 10µg), ceftazidima (CAZ, 30µg), cefotaxima (CTX, 30µg) y cloranfenicol (C, 30µg).

Para determinar la sensibilidad (S), sensibilidad intermedia (I) y/o resistencia (R) de las cepas frente a los antibióticos usando la técnica de Kirby-Bauer de difusión en disco, nos basamos en lo reportado por el Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI (2012) usando las tablas de interpretación del suplemento M100–S21 (2011) (Tabla 11).

**Tabla 11.-** Zonas de inhibición estándar interpretativas para bacterias de la familia *Enterobacteriaceae* de diferentes antibióticos mediante la técnica de difusión en disco de acuerdo al Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI (2012).

Antibiótico	Concentración de antibiótico analizada ( $\mu\text{g}$ )	Zona de inhibición (mm)		
		Sensible	Intermedio	Resistente
<b>A. nalidixico</b>	30 $\mu\text{g}$	>19	14-18	<13
<b>Tetraciclina</b>	30 $\mu\text{g}$	>15	12-14	<11
<b>Gentamicina</b>	10 $\mu\text{g}$	>15	13-14	<12
<b>Ciprofloxacina</b>	5 $\mu\text{g}$	>21	16-20	<15
<b>Ampicilina</b>	10 $\mu\text{g}$	>17	14-16	<13
<b>Cefotaxima</b>	30 $\mu\text{g}$	>26	23-25	<22
<b>Ceftazidima</b>	30 $\mu\text{g}$	>21	18-20	<17
<b>Cloranfenicol</b>	30 $\mu\text{g}$	>18	13-17	<12
<b>SXT</b>	1.25/23.75 $\mu\text{g}$	>16	11-15	<10

En base a lo antes mencionado, en la Tabla 12 se muestra las medidas en milímetros de la zona de inhibición mediante la técnica de difusión en disco para 172 de las cepas aisladas de *E. coli*. La cepa usada como control fue *E. coli* no patógena ATCC 25922, cuyas zonas de inhibición estuvieron acorde a los rangos establecidos por Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI (2012) en el suplemento M100–S21 (2011).

**Tabla 12.-** Zonas de inhibición y patrón de sensibilidad a los antibióticos probados sobre los aislados de *E. coli* usando la metodología de difusión en disco.

Cepas	Genotipos	Promedio cuentas	Promedio inhibición (cm)								
		UFC/ml	NA	TE	CN	CIP	AMP	CTX	CAZ	C	SXT
1	A <sub>1</sub>	1.5 x10 <sup>6</sup>	21 ±0.7 (S)	7 ±0.4 (R)	18 ±0.4(S)	29 ±1.1(S)	NI (R)	28 ±1.1	20 ±0.7(I)	22 ±0.4(S)	NI (R)
1.1	A <sub>1</sub>	1.25 x10 <sup>6</sup>	20 ±0.3 (S)	20 ±1.2(S)	17 ±0.5(S)	26 ±0.4(S)	19 ±0.2(S)	26 ±0.5(S)	19 ±0.4(I)	20 ±0.4(S)	25 ±2.2(S)
2	A <sub>1</sub>	1.83 x10 <sup>6</sup>	21 ±0.8 (S)	22 ±0(S)	18 ±0.3(S)	27 ±1.9(S)	20 ±0.3(S)	27 ±1.1(S)	20 ±0.1(I)	21 ±0.3(S)	24 ±1.8(S)
3	A <sub>1</sub>	1.43 x10 <sup>6</sup>	21 ±0.9 (S)	21 ±1.2(S)	17 ±0.8(S)	28 ±0.6(S)	19 ±0.3(S)	26 ±0.5(S)	19 ±2(I)	21 ±1.2(S)	24 ±1(S)
4	A <sub>1</sub>	1.3 x10 <sup>6</sup>	20 ±0.8 (S)	22 ±0.5(S)	17 ±0.6(S)	25 ±1.3(S)	19 ±0.5(S)	26 ±0.5(S)	19 ±1.2(I)	21 ±0.5(S)	23 ±1.3(S)
5	A <sub>0</sub>	9.5 x10 <sup>5</sup>	18 ±2.1(I)	18 ±0.7(S)	19 ±1.4(S)	29 ±2.1(S)	14 ±0.7(I)	28 ±3.5(S)	22 ±1.4(S)	18 ±2.1(S)	24 ±2.1(S)
6	A <sub>0</sub>	1.68 x10 <sup>6</sup>	22 ±0.3 (S)	9 ±0.5 (R)	18 ±0.8(S)	27 ±2(S)	18 ±1.6(S)	27 ±1.1(S)	21 ±0.8(S)	21 ±1.1(S)	21 ±2.6(S)
7	A <sub>0</sub>	1.73 x10 <sup>6</sup>	22 ±1.8 (S)	6 ±4.3 (R)	17 ±0.5(S)	27 ±1.5(S)	17 ±1.6(S)	25 ±0.9(I)	19 ±1.2(I)	21 ±1(S)	21 ±0.9(S)
8	A <sub>0</sub>	1.23 x10 <sup>6</sup>	23 (S)	21 ±1.4(S)	22 ±0.4(S)	32 ±2.1(S)	17 ±2.1(S)	31 ±2.1(S)	24 ±1.4(S)	22 ±1.4(S)	26 ±0.7(S)
9	A <sub>0</sub>	1.78 x10 <sup>6</sup>	21 ±1 (S)	22 ±0.6(S)	17 ±0.2(S)	25 ±1.5(S)	18 ±1(S)	26 ±1.4(S)	20 ±1.4(I)	19 ±0.5(S)	23 ±1.1(S)
10	A <sub>0</sub>	1.93 x10 <sup>6</sup>	23 ±1.4 (S)	7.8 ±0.4(R)	17 ±0.2(S)	25 ±0.6(S)	19 ±1.3(S)	24 ±0.7(I)	20 ±0.7(I)	22 ±0.2(S)	22 ±0.8(S)
11	A <sub>0</sub>	1.58 x10 <sup>6</sup>	21 ±1.3 (S)	20 ±1.6(S)	17 ±1(S)	24 ±2(S)	19 ±0.5(S)	24 ±0-4(I)	19 ±0.5(I)	19 ±1.2(S)	23 ±0.7(S)
13 (1)	A <sub>0</sub>	1.53 x10 <sup>6</sup>	23 ±1.5 (S)	22 ±1.7(S)	18 ±0.4(S)	26 ±2.9(S)	20 ±0.6(S)	28 ±1.5(S)	22 ±1.1(S)	23 ±0.5(S)	23 ±1.7(S)
13 (2)	A <sub>1</sub>	1.23 x10 <sup>6</sup>	20 ±0.7 (S)	19 ±0(S)	21 ±0.7(S)	33 ±2.1(S)	18 ±0.7(S)	29 ±2.1(S)	24 ±2.1(S)	22 ±0.7(S)	23 ±0.7(S)
14	A <sub>1</sub>	1.43 x10 <sup>6</sup>	18 ±2(I)	8 ±0.3 (R)	18 ±0.5(S)	23 ±3.3(S)	18 ±0.6(S)	25 ±0.4(I)	20 ±1.8(I)	7 ±0.9 (R)	NI (R)
16	A <sub>1</sub>	2.4 x10 <sup>6</sup>	21±0 (S)	21 ±0.7(S)	20 ±0(S)	30 ±0.7(S)	18 ±1.1(S)	27 ±0(S)	22 ±0(S)	20 ±1.1(S)	22 ±0(S)
17	A <sub>1</sub>	1.9 x10 <sup>6</sup>	20 ±0 (S)	20 ±1.4(S)	20 ±2.1(S)	30 ±3.5(S)	18 ±0.7(S)	26 ±0(S)	22 ±0.7(S)	21 ±0(S)	23 ±0.7(S)
18	A <sub>1</sub>	2.15 x10 <sup>6</sup>	21 ±0 (S)	21 ±2.1(S)	20 ±1.4(S)	31 ±1.4(S)	18 ±2.8(S)	26 ±0(S)	21 ±0(S)	21 ±1.4(S)	22 ±2.1(S)
19	A <sub>1</sub>	2.23 x10 <sup>6</sup>	20 ±0 (S)	21 ±0.7(S)	20 ±1.4(S)	30 ±1.4(S)	18 ±0.7(S)	27 ±0.7(S)	21 ±0(S)	22 ±0.7(S)	23 ±0.7(S)
20	A <sub>1</sub>	2.28 x10 <sup>6</sup>	NI (R)	10 ±1.4(I)	19 ±0.7(S)	23 ±2.1(S)	11 ±4.9 (R)	23 ±0(I)	20 ±2.1(I)	NI (R)	NI (R)
21	A <sub>1</sub>	2.23 x10 <sup>6</sup>	19 ±0.7 (S)	18 ±0(S)	19 ±0.7(S)	28 ±0.7(S)	17 ±0(S)	26 ±0(S)	22 ±0(S)	20 ±1.4(S)	23 ±0.4(S)
22	A <sub>1</sub>	2.43 x10 <sup>6</sup>	19 ±0.7(S)	17 ±1.4(S)	7 ±0(I)	26 ±1.4(S)	NI (R)	26 ±0.7(S)	22 ±0.7(S)	NI (R)	21 ±1.4(S)
23	A <sub>0</sub>	1.58 x10 <sup>6</sup>	21 ±2.1(S)	20 ±0.7(S)	19 ±1.4(S)	24 ±1.8(S)	15 ±0.4(I)	24 ±2.8(I)	21 ±1.4(S)	20 ±0.7(S)	23 ±1.4(S)
24	D <sub>1</sub>	1.45 x10 <sup>6</sup>	18 ±0.7(I)	20 ±2.1(S)	19 ±0(S)	26 ±1.4(S)	15 ±0(I)	25 ±0(I)	20 ±0(I)	21 ±0.7(S)	22 ±1.4(S)

25	A <sub>0</sub>	1.73 x10 <sup>6</sup>	20 ±2.1(S)	19 ±2.1(S)	18 ±0.7(S)	25 ±2.1(S)	NI (R)	NI (R)	19 ±0.4(I)	20 ±0.7(S)	23 ±0(S)
26	A <sub>0</sub>	1.98 x10 <sup>6</sup>	23 ±1.4(S)	NI (R)	20 ±2.1(S)	27 ±0.7(S)	19 ±0.7(S)	19 ±0.7 (R)	24 ±0.7(S)	22 ±0(S)	23 ±1.4(S)
27	A <sub>0</sub>	1.55 x10 <sup>6</sup>	19 ±1.4(S)	19 ±1.4(S)	18 ±0(S)	25 ±0(S)	NI (R)	NI (R)	18 ±0(I)	18 ±1.4(S)	24 ±0.7(S)
30	A <sub>1</sub>	1 x10 <sup>6</sup>	22 ±0.7(S)	NI (R)	20 ±0.7(S)	26 ±1.4(S)	19 ±0.7(S)	19 ±0.7 (R)	22 ±1.4(S)	24 ±0.7(S)	24 ±1.4(S)
31	A <sub>1</sub>	7.5 x10 <sup>5</sup>	23 ±1.4(S)	NI (R)	18 ±0.5(S)	28 ±0.6(S)	21 ±2.2(S)	30 ±1.3(S)	23 ±0.1(S)	26 ±1.2(S)	27 ±0.1(S)
32	A <sub>1</sub>	1.03 x10 <sup>6</sup>	25 ±1.3(S)	NI (R)	19 ±0.1(S)	27 ±0.1(S)	19 ±0.9(S)	29 ±0.4(S)	23 ±2.3(S)	27 ±0.1(S)	25 ±0.5(S)
33	A <sub>1</sub>	1.53 x10 <sup>6</sup>	24 ±0.3(S)	NI (R)	19 ±0.7(S)	28 ±1(S)	19 ±0.4(S)	27 ±0.3(S)	22 ±0.8(S)	25 ±0.1(S)	22 ±1.1(S)
34	A <sub>0</sub>	1.25 x10 <sup>6</sup>	NI (R)	NI (R)	19 ±0.4(S)	18 ±0.4(I)	15 ±0.2(I)	26 ±1.1(S)	18 ±0.7(I)	17 ±0.1(I)	21 ±1.1(S)
35	A <sub>0</sub>	1.2 x10 <sup>6</sup>	NI (R)	NI (R)	17 ±0.9(S)	18 ±0.2(I)	14 ±1.2(I)	24 ±1.4(I)	20 ±1.1(I)	17 ±0.2(I)	23 ±0.1(S)
36	A <sub>1</sub>	1.28 x10 <sup>6</sup>	21 ±0.3(S)	20 ±0.2(S)	17 ±0.1(S)	26 ±2.6(S)	18 ±0.5(S)	27 ±1(S)	20 ±0.1(I)	20 ±0.5(S)	19 ±0.6(S)
37	A <sub>0</sub>	1.58 x10 <sup>6</sup>	18 ±1.3(I)	19 ±1.5(S)	18 ±1.2(S)	22 ±1.4(S)	NI (R)	20 ±0.9 (R)	18 ±0.9(I)	21 ±1.5(S)	14 ±0.7(I)
39	A <sub>0</sub>	1 x10 <sup>6</sup>	18 ±0.4(I)	19 ±0.3(S)	18 ±1.3(S)	24 ±3.6(S)	9 ±0.1 (R)	23 ±1.1(I)	19 ±2.3(I)	21 ±0.8(S)	16 ±2.1(S)
40	A <sub>1</sub>	1.1 x10 <sup>6</sup>	23 ±0.4(S)	NI (R)	18 ±0.7(S)	27 ±2(S)	20 ±0.4(S)	28 ±1.6(S)	21 ±0.9(S)	23 ±0(S)	24 ±2.5(S)
41	A <sub>1</sub>	1.8 x10 <sup>6</sup>	20 ±0.6(S)	NI (R)	19 ±0.8(S)	27 ±1.2(S)	19 ±0(S)	26 ±1.4(S)	22 ±0.9(S)	20 ±1(S)	20 ±0.9(S)
42	A <sub>0</sub>	1.65 x10 <sup>6</sup>	7 ±0.9(R)	11(I)	19 ±1.4(S)	20 ±0.8(I)	17 ±1.3(S)	26 ±1.5(S)	20 ±1.4(I)	NI (R)	NI (R)
43	B <sub>1</sub>	1.43 x10 <sup>6</sup>	NI (R)	11(I)	19 ±0.3(S)	19 ±1.9(I)	15 ±0.4(I)	25 ±2.1(I)	20 ±1.3(I)	NI (R)	NI (R)
44	D <sub>1</sub>	2.08 x10 <sup>6</sup>	21 ±0.7(S)	19 ±1.3(S)	18 ±0.9(S)	27 ±0(S)	18 ±2.4(S)	25 ±1.2(I)	19 ±0.4(I)	20 ±1.6(S)	21 ±1(S)
45	D <sub>1</sub>	1.73 x10 <sup>6</sup>	21 ±1.6(S)	20 ±0.9(S)	18 ±0.3(S)	27 ±2(S)	17 ±0.8(S)	26 ±0.7(S)	20 ±0.4(I)	20 ±1.3(S)	25 ±0.2(S)
46	D <sub>1</sub>	1.98 x10 <sup>6</sup>	20 ±1.4(S)	20 ±0(S)	18 ±0.6(S)	28 ±0.8(S)	18 ±0.5(S)	26 ±0.7(S)	20 ±1.1(I)	21(S)	24 ±0.1(S)
47	D <sub>1</sub>	1.86 x10 <sup>6</sup>	22 ±0.8(S)	21 ±0(S)	18 ±0.5(S)	26 ±1.5(S)	15 ±0(I)	22 ±5.1 (R)	18 ±3.1(I)	21 ±0.5(S)	17 ±9.8(S)
48	A <sub>1</sub>	1.58 x10 <sup>6</sup>	22 ±1.9(S)	8 ±0.1 (R)	19 ±0.3(S)	29 ±2(S)	18 ±0.5(S)	27 ±1.2(S)	21 ±0.2(S)	20 ±0.6(S)	25 ±0.3(S)
49	A <sub>1</sub>	1.80 x10 <sup>6</sup>	21 ±0.1(S)	8 ±0 (R)	21 ±0.7(S)	30 ±2.9(S)	18 ±0(S)	27 ±0.8(S)	21 ±0.6(S)	20 ±1.1(S)	24 ±2.4(S)
50	A <sub>1</sub>	1.53 x10 <sup>6</sup>	23 ±2(S)	NI (R)	20 ±0.4(S)	26 ±6.2(S)	19 ±1.3(S)	28 ±2(S)	22 ±0.4(S)	25 ±1.2(S)	25 ±1.9(S)
51	A <sub>1</sub>	1.88 x10 <sup>6</sup>	20 ±1.3(S)	NI (R)	20(S)	29(S)	19 ±0.2(S)	28 ±0.9(S)	21 ±2.4(S)	21 ±0.7(S)	23 ±0.8(S)
52	A <sub>0</sub>	1.25 x10 <sup>6</sup>	20 ±0.3(S)	13 ±0.1(I)	19 ±0.1(S)	25 ±0.4(S)	17 ±1.4(S)	23 ±0.3(I)	19 ±1(I)	18 ±1.5(S)	19 ±1.6(S)
53	A <sub>0</sub>	1.58 x10 <sup>6</sup>	21 ±1.8(S)	20 ±0.7(S)	19 ±0.3(S)	26 ±2.7(S)	NI (R)	24 ±1.1(I)	18 ±1(I)	20 ±0.1(S)	23 ±0.7(S)
54	A <sub>0</sub>	1.43 x10 <sup>6</sup>	20 ±0.5(S)	12 ±0(I)	20 ±0.6(S)	26 ±0.7(S)	16 ±0.4(I)	26 ±0.1(S)	19 ±0.1(I)	20 ±0.6(S)	21 ±0.2(S)
55	A <sub>0</sub>	1.28 x10 <sup>6</sup>	21 ±1.3(S)	12 ±0.1(I)	20 ±0.1(S)	26 ±1.6(S)	17 ±1.2(S)	25 ±1.5(I)	19 ±2.2(I)	18 ±0.2(S)	20 ±0.4(S)
56	A <sub>0</sub>	1.25 x10 <sup>6</sup>	20 ±0.4(S)	13 ±1.3(I)	20 ±0.9(S)	24 ±0.6(S)	17 ±0.9(S)	25 ±0.8(I)	18 ±0.4(I)	19 ±0.8(S)	21 ±1.6(S)
57	A <sub>0</sub>	1.48 x10 <sup>6</sup>	21 ±0.7(S)	22 ±0.8(S)	20 ±2.2(S)	25 ±0.6(S)	18 ±2(S)	23 ±2.5(I)	19 ±0.5(I)	23 ±0.8(S)	23 ±0.1(S)

59	A <sub>0</sub>	1.45 x10 <sup>6</sup>	20 ±1(S)	20 ±0.8(S)	20 ±0.6(S)	26 ±0.9(S)	17 ±0.8(S)	25 ±2.7(I)	18 ±2.2(I)	21 ±0.6(S)	21 ±1.3(S)
60	A <sub>0</sub>	1.58 x10 <sup>6</sup>	21 ±0.8(S)	20 ±2(S)	19 ±0.4(S)	25 ±2.8(S)	17 ±1.7(S)	25 ±0.9(I)	19 ±1.9(I)	21 ±0.2(S)	24 ±0.3(S)
61	A <sub>0</sub>	1 x10 <sup>6</sup>	22 ±0.1(S)	20 ±0.5(S)	19 ±0.7(S)	26 ±1(S)	18 ±2.8(S)	24 ±2.6(I)	20 ±1.3(I)	23 ±2.2(S)	25 ±0.5(S)
62	A <sub>0</sub>	2.15 x10 <sup>6</sup>	22(S)	19(S)	19(S)	27(S)	17(S)	26(S)	18(I)	22(S)	22(S)
63	A <sub>1</sub>	1.75 x10 <sup>6</sup>	23(S)	NI (R)	16(S)	21(S)	20(S)	25(I)	19(I)	23(S)	22(S)
64	A <sub>0</sub>	1.95 x10 <sup>6</sup>	21 ±2.6(S)	19 ±0(S)	19 ±1(S)	27 ±2.1(S)	16 ±1.1(I)	22 ±1 (R)	22 ±8.4(S)	19 ±2.5(S)	20 ±2.4(S)
65	A <sub>0</sub>	2.48 x10 <sup>6</sup>	21 ±1.3(S)	19 ±0.3(S)	19 ±1.3(S)	27 ±0(S)	16 ±0.4(I)	26 ±0.9(S)	19 ±1(I)	20 ±1.8(S)	21 ±1(S)
66	A <sub>0</sub>	1.85 x10 <sup>6</sup>	20 ±0.8(S)	19 ±0.1(S)	19 ±0.9(S)	28 ±0.5(S)	16 ±1(I)	25 ±0.1(I)	18 ±1.2(I)	20 ±0.8(S)	21 ±0.2(S)
67	A <sub>0</sub>	1.4 x10 <sup>6</sup>	21 ±0.5(S)	18 ±0(S)	19 ±0.4(S)	29 ±1.5(S)	16 ±1(I)	26 ±2.4(S)	19 ±0.8(I)	19 ±2.6(S)	20 ±0.5(S)
68	A <sub>0</sub>	1.58 x10 <sup>6</sup>	22 ±0.2(S)	19 ±0(S)	20 ±2.5(S)	27 ±1.7(S)	17 ±1.1(S)	27 ±1.5(S)	18 ±0.6(I)	18 ±1.1(S)	24 ±1.4(S)
69	A <sub>0</sub>	1.58 x10 <sup>6</sup>	21 ±1.1(S)	18 ±1(S)	20 ±2.7(S)	26 ±2.6(S)	17 ±0.2(S)	27 ±1.9(S)	20 ±0.4(I)	18 ±1.1(S)	21 ±1(S)
70	A <sub>0</sub>	1.45 x10 <sup>6</sup>	21(S)	22(S)	19 ±0.8(S)	24 ±2.8(S)	16 ±1.1(I)	24 ±1(I)	18 ±0.4(I)	20(S)	22(S)
71	A <sub>0</sub>	2.4 x10 <sup>6</sup>	20 ±0.9(S)	19 ±0.5(S)	18 ±1.3(S)	25 ±2(S)	16 ±0(I)	25 ±3.7(I)	18 ±2.6(I)	19 ±0.3(S)	20 ±2.8(S)
72	A <sub>0</sub>	2.58 x10 <sup>6</sup>	20 ±0.4(S)	19 ±0.4(S)	18 ±3.5(S)	24 ±1.1(S)	18 ±0.8(S)	24 ±0.2(I)	17 ±2.2 (R)	20 ±0.8(S)	20 ±2.1(S)
73	A <sub>1</sub>	1.75 x10 <sup>6</sup>	19 ±1.7(S)	19 ±0.7(S)	19 ±1.5(S)	24 ±2.3(S)	18 ±0.3(S)	25 ±3.3(I)	17 ±0.1 (R)	18 ±2.1(S)	19 ±2.3(S)
75	A <sub>0</sub>	1.45 x10 <sup>6</sup>	20 ±0.1(S)	20 ±1(S)	17 ±1.6(S)	26 ±1.7(S)	18 ±0.7(S)	25 ±3.1(I)	17 ±1.5 (R)	21 ±1.7(S)	22 ±0.7(S)
77	A <sub>0</sub>	6.28 x10 <sup>6</sup>	19 ±0.7(S)	20 ±0.5(S)	17 ±2(S)	24 ±1.9(S)	17 ±1.5(S)	23 ±2.7(I)	18 ±1.8(I)	19 ±0.5(S)	19 ±0.2(S)
78	A <sub>0</sub>	2.08 x10 <sup>6</sup>	18 ±0.4(I)	18 ±1(S)	19 ±0.4(S)	28 ±1.6(S)	NI (R)	22 ±1.4 (R)	16 ±0.7 (R)	18 ±0.6(S)	23 ±2.8(S)
80	A <sub>0</sub>	1.63 x10 <sup>6</sup>	19 ±0.7(S)	19 ±0.3(S)	18 ±0.1(S)	26 ±2.1(S)	17 ±0.5(S)	22 ±0.6 (R)	18 ±0.3(I)	19 ±0.5(S)	20 ±2.3(S)
81	A <sub>0</sub>	1.4 x10 <sup>6</sup>	20 ±0.3(S)	20 ±0.5(S)	19 ±0.2(S)	27 ±0.8(S)	18 ±0.7(S)	27 ±3.2(S)	19 ±1.4(I)	20 ±1(S)	21 ±0.2(S)
82	A <sub>0</sub>	2.25E+06	20 ±1.4(S)	20 ±1.4(S)	19 ±0.1(S)	26 ±0.2(S)	17 ±0.3(S)	26 ±2.4(S)	18 ±1.8(I)	19 ±0.5(S)	22 ±1.2(S)
83	A <sub>0</sub>	1.70E+06	20 ±1.4(S)	19 ±1.1(S)	18 ±1.2(S)	25 ±0.9(S)	17 ±2.8(S)	26 ±2.2(S)	17 ±1.2 (R)	20 ±0.2(S)	21 ±3.3(S)
84	A <sub>0</sub>	1.65E+06	19 ±0.1(S)	20 ±0.4(S)	18 ±0.7(S)	26 ±1.7(S)	17 0.7(S)	24 ±3.5(I)	17 ±0.2 (R)	22 ±0.8(S)	21 ±0.9(S)
85	A <sub>0</sub>	1.80E+06	22 ±0.1(S)	20 ±0.7(S)	19 ±0.3(S)	21 ±0.6(S)	17 ±1(S)	18 ±0 (R)	20 ±0.1(I)	22 ±0.2(S)	18 ±0.7(S)
86	A <sub>1</sub>	1.73E+06	19 ±0.7(S)	19 ±0.9(S)	19 ±0.7(S)	27 ±2(S)	16 ±3.3(I)	24 ±4.3(I)	19 ±1.3(I)	19 ±1.3(S)	20 ±4.3(S)
87	A <sub>1</sub>	1.98E+06	19 ±0.2(S)	18 ±0.5(S)	18 ±0.5(S)	27 ±0.2(S)	18 ±1.7(S)	24 ±0.1(I)	18 ±0.6(I)	19 ±1.5(S)	21 ±0.9(S)
88	A <sub>1</sub>	2.03E+06	18 ±0.3(I)	18 ±1(S)	19 ±0.7(S)	24 ±0.3(S)	18 ±0.7(S)	26 ±0.5(S)	17 ±0.7 (R)	21 ±0.8(S)	22 ±1.3(S)
89	A <sub>1</sub>	1.70E+06	20 ±0.3(S)	20 ±0.3(S)	20 ±0.1(S)	25 ±2.1(S)	17 ±2.3(S)	24 ±3.4(I)	18 ±2(I)	20 ±2.3(S)	22 ±2.4(S)
90	A <sub>1</sub>	1.80E+06	19 ±0.3(S)	19 ±0.3(S)	19 ±1.2(S)	26 ±0.4(S)	19 ±1.2(S)	25 ±1.2(I)	18 ±0.7(I)	20 ±2.3(S)	23 ±1.8(S)

91	A <sub>0</sub>	1.33E+06	18 ±1.5(I)	18 ±1.5(S)	20 ±0(S)	25 ±1.9(S)	9 ±0.1 (R)	24 ±2.1(I)	18 ±1.4(I)	23 ±0.5(S)	21 ±1.8(S)
92	A <sub>0</sub>	1.10E+06	19 ±0(S)	19 ±0(S)	21 ±1.7(S)	22 ±0.3(S)	11 ±4.1 (R)	23 ±0.5(I)	18(I)	21 ±0.5(S)	20 ±3.4(S)
93	A <sub>0</sub>	1.95E+06	19 ±0.3(S)	19 ±0.3(S)	NI (R)	21 ±4(S)	13 ±4.5 (R)	24 ±1.7(I)	16 ±0.4 (R)	18 ±1.7(S)	21 ±2.9(S)
94	A <sub>1</sub>	1.55E+06	19(S)	19(S)	NI (R)	21 ±1(S)	17 ±0(S)	22 ±0.2 (R)	16 ±0.8 (R)	19 ±0.2(S)	19 ±3.3(S)
95	A <sub>1</sub>	1.80E+06	22 ±2.5(S)	22 ±2.5(S)	NI (R)	25 ±3(S)	19 ±2.3(S)	26 ±1.1(S)	19 ±1.7(I)	22 ±4.1(S)	23 ±0(S)
96	A <sub>1</sub>	1.68E+06	22 ±1.4(S)	22 ±1.4(S)	NI (R)	25 ±2.4(S)	19 ±0.1(S)	25 ±0.9(I)	20 ±0.9(I)	NI (R)	22 ±0.6(S)
97	A <sub>1</sub>	1.30E+06	23 ±1.5(S)	23 ±1.5(S)	NI (R)	26 ±0.2(S)	19 ±0.7(S)	25 ±0.6(I)	18 ±1.3(I)	NI (R)	21 ±3.2(S)
98	A <sub>1</sub>	2.03E+06	23 ±0.7(S)	23 ±0.7(S)	NI (R)	22 ±0.1(S)	19 ±0.1(S)	24 ±1.6(I)	19 ±2(I)	NI (R)	20 ±0.7(S)
99	A <sub>0</sub>	1.65E+06	21 ±0.3(S)	21 ±0.3(S)	18 ±0.2(S)	24 ±0.8(S)	15 ±0.9(I)	24 ±2.7(I)	19 ±0.8(I)	19 ±0.7(S)	20 ±3.5(S)
100	A <sub>0</sub>	2.15E+06	21 ±2.4(S)	21 ±2.4(S)	19 ±0.1(S)	25 ±4.5(S)	15 ±1.4(I)	23 ±2.6(I)	17 ±1 (R)	19 ±0.2(S)	21 ±0.6(S)
101	A <sub>0</sub>	1.43E+06	21 ±1.7(S)	21 ±1.7(S)	19 ±0.6(S)	25 ±3.4(S)	15 ±0(I)	25 ±4.8(I)	18 ±1.7(I)	20 ±2(S)	20 ±3.3(S)
102	A <sub>0</sub>	1.55E+06	20 ±0.3(S)	20 ±0.3(S)	20 ±0.5(S)	27 ±0.2(S)	16(I)	25 ±1.2(I)	19 ±1.9(I)	20 ±0.8(S)	21 ±1(S)
103	D <sub>1</sub>	1.78E+06	20 ±0.6(S)	20 ±0.6(S)	19 ±0.4(S)	26 ±0.2(S)	17 ±1.7(S)	25 ±0(I)	17 ±1.7 (R)	20 ±0.5(S)	22 ±0(S)
104	D <sub>1</sub>	1.38E+06	21 ±1.4(S)	21 ±1.4(S)	21 ±1.3(S)	27 ±0.9(S)	17 ±0.1(S)	23 ±2.8(I)	17 ±0.2 (R)	21 ±1.6(S)	21 ±1.7(S)
105	D <sub>1</sub>	2.15E+06	19 ±2.1(S)	17 ±2.1(S)	18 ±0.5(S)	27 ±0.8(S)	15 ±0.8(I)	23 ±0.3(I)	16 ±1 (R)	17 ±1.2(I)	20 ±0.7(S)
105.1	D <sub>1</sub>	2.15E+06	22 ±0.4(S)	19 ±0.6(S)	18 ±0.6(S)	26 ±0.7(S)	16 ±0.1(I)	23 ±1(I)	18 ±0.8(I)	20 ±0.7(S)	20 ±0.9(S)
106	A <sub>1</sub>	1.80E+06	NI (R)	NI (R)	NI (R)	16 ±2.6(I)	NI (R)	24 ±0.1(I)	17 ±0.8 (R)	NI (R)	17 ±0.8(S)
107	A <sub>1</sub>	2.05E+06	NI (R)	NI (R)	NI (R)	16 ±0.7(I)	NI (R)	21 ±2.4 (R)	15 ±0.9 (R)	NI (R)	15 ±1.6(I)
108	A <sub>1</sub>	1.90E+06	NI (R)	NI (R)	NI (R)	17 ±0.8(I)	NI (R)	19 ±3.3 (R)	15 ±1.4 (R)	NI (R)	15 ±1.5(I)
109	A <sub>1</sub>	1.25E+06	NI (R)	NI (R)	NI (R)	17 ±0.6(I)	NI (R)	23 ±0.7(I)	18 ±0.1(I)	NI (R)	17 ±0.9(S)
110	A <sub>1</sub>	2.05E+06	NI (R)	NI (R)	NI (R)	16 ±0.3(I)	NI (R)	20 ±0.6 (R)	15 ±0.8 (R)	13 ±0.8(I)	16 ±1.1(S)
111	A <sub>1</sub>	1.75E+06	NI (R)	NI (R)	NI (R)	16 ±0.2(I)	NI (R)	20 ±0.9 (R)	15 ±1.1 (R)	11 ±0.5 (R)	15 ±0.5(I)
112	A <sub>1</sub>	1.00E+06	21 ±0.1(S)	NI (R)	17 ±0.6(S)	21 ±0.3(S)	18 ±1.1(S)	23 ±0.4(I)	19(I)	21 ±0.4(S)	22(S)
113	A <sub>0</sub>	9.50E+05	17 ±1.9(I)	18 ±0.6(S)	15 ±1.2(S)	22 ±1.4(S)	NI (R)	23 ±1.7(I)	16 ±2.1 (R)	18 ±2.4(S)	18 ±1.1(S)
114	A <sub>0</sub>	1.50E+06	21 ±2.2(S)	19 ±0(S)	16 ±1.3(S)	20 ±0.5(I)	NI (R)	24 ±0.7(I)	18 ±1(I)	20 ±0.6(S)	20 ±0.5(S)
115	A <sub>0</sub>	1.30E+06	18 ±0.3(I)	18 ±0.5(S)	18 ±0.2(S)	24 ±0.7(S)	NI (R)	22 ±1.2 (R)	15 ±0.7 (R)	19 ±0(S)	19 ±0.7(S)
116	A <sub>0</sub>	1.50E+06	21 ±1.4(S)	20 ±0.6(S)	18 ±0.4(S)	25 ±1.3(S)	NI (R)	25 ±0.3(I)	17 ±0.4 (R)	21 ±0.4(S)	21 ±0.6(S)
117	A <sub>0</sub>	2.40E+06	19 ±2.1(S)	19 ±1(S)	17 ±0.2(S)	23 ±0.3(S)	NI (R)	26 ±1.9(S)	17 ±2.2 (R)	19 ±2.4(S)	22 ±0.7(S)
118	A <sub>0</sub>	1.20E+06	18 ±0.5(I)	20 ±0.3(S)	17 ±0.1(S)	25 ±1.8(S)	NI (R)	24 ±1.1(I)	18 ±0.3(I)	20 ±0.7(S)	23 ±0.7(S)

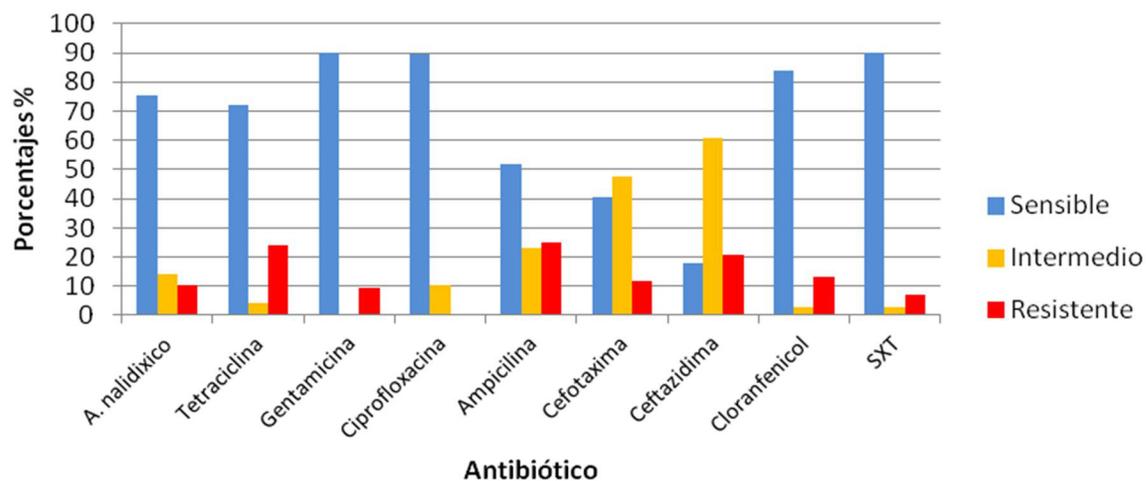
119	A <sub>0</sub>	1.30E+06	21 ±0.3(S)	21 ±0.1(S)	18 ±0.2(S)	27 ±0.8(S)	NI (R)	24 ±0.6(I)	17 ±1.4 (R)	21 ±0.1(S)	22 ±0.7(S)
120	A <sub>0</sub>	1.25E+06	19 ±2.2(S)	20 ±0.3(S)	18 ±0.1(S)	26 ±1.6(S)	NI (R)	24 ±0.6(I)	16 ±0.1 (R)	20 ±1(S)	21 ±1(S)
121	A <sub>0</sub>	2.20E+06	19 ±1.1(S)	20 ±0.4(S)	18 ±0.1(S)	25 ±1.9(S)	15 ±1.1(I)	25 ±1.4(I)	18 ±0.4(I)	20 ±0.7(S)	22 ±1(S)
122	A <sub>1</sub>	7.50E+05	NI (R)	NI (R)	NI (R)	18 ±0.9(I)	NI (R)	26 ±0.4(S)	19 ±0.2(I)	NI (R)	19 ±0.6(S)
123	A <sub>1</sub>	1.40E+06	NI (R)	NI (R)	NI (R)	17 ±0.1(I)	NI (R)	26 ±0.8(S)	18 ±1.2(I)	NI (R)	17 ±1.3(S)
124	A <sub>1</sub>	1.50E+06	NI (R)	NI (R)	NI (R)	17 ±0.7(I)	NI (R)	25 ±0(I)	18 ±0.3(I)	NI (R)	18 ±0.9(S)
125	B <sub>1</sub>	3.15E+06	18 ±0.3(I)	19 ±0.2(S)	18 ±0.2(S)	26 ±0.2(S)	16 ±1.1(I)	23 ±0.8(I)	17 ±1 (R)	18 ±0.8(S)	19 ±0.4(S)
126	B <sub>1</sub>	1.35E+06	19 ±0.5(S)	NI (R)	17 ±0.1(S)	27 ±1(S)	NI (R)	26 ±0.7(S)	20 ±0.2(I)	19 ±1.4(S)	24 ±2.4(S)
127	B <sub>1</sub>	1.15E+06	18 ±0.4(I)	NI (R)	17 ±1.9(S)	21 ±2.2(S)	NI (R)	26 ±0.9(S)	20 ±0.4(I)	19 ±2.9(S)	23 ±0.4(S)
128	A <sub>0</sub>	1.50E+06	14 ±0(I)	NI (R)	18 ±0.1(S)	19 ±1.4(I)	15 ±1.5(I)	28 ±1.9(S)	20 ±0.1(I)	NI (R)	NI (R)
129	A <sub>0</sub>	1.50E+06	13 ±0.6(R)	NI (R)	17 ±0.9(S)	17 ±0.5(I)	15 ±0.2(I)	27 ±1.3(S)	20 ±0.7(I)	NI (R)	NI (R)
130	A <sub>0</sub>	2.45E+06	13 ±0.6(R)	NI (R)	17 ±0.4(S)	19 ±0.2(I)	16 ±0.9(I)	22 ±0.9 (R)	16 ±1.5 (R)	NI (R)	NI (R)
131	A <sub>1</sub>	8.50E+05	NI (R)	NI (R)	NI (R)	17 ±0.2(I)	NI (R)	24 ±1.6(I)	17 ±2.4 (R)	NI (R)	15 ±0.8(I)
132	B <sub>1</sub>	1.80E+06	20 ±0.4(S)	18 ±0.9(S)	18 ±1.3(S)	21 ±0.7(S)	15 ±0.4(I)	23 ±1.6(I)	16 ±1 (R)	18 ±1(S)	20 ±2.6(S)
133	A <sub>0</sub>	1.80E+06	17 ±0.3(I)	18 ±0.8(S)	17 ±0.5(S)	24 ±3(S)	NI (R)	22 ±0.3 (R)	16 ±0.3 (R)	20 ±0.2(S)	19 ±0.2(S)
134	A <sub>0</sub>	1.10E+06	19 ±0.4(S)	NI (R)	17 ±1.3(S)	24 ±1.5(S)	NI (R)	26 ±0.1(S)	20 ±0.4	NI (R)	18 ±0.9(S)
135	A <sub>0</sub>	1.40E+06	19 ±0.9(S)	NI (R)	16 ±0.7(S)	23 ±3.2(S)	NI (R)	21 ±0 (R)	17 ±1.2 (R)	NI (R)	18 ±0.5(S)
136	A <sub>0</sub>	1.00E+06	12 ±0.7(R)	NI (R)	17 ±0.6(S)	22 ±0.8(S)	NI (R)	26 ±0.2(S)	18(I)	NI (R)	NI (R)
137	B <sub>1</sub>	9.50E+05	17 ±1.1(I)	16 ±1.3(S)	17 ±0.1(S)	24 ±1.9(S)	17 ±0.7(S)	27 ±0.2(S)	19 ±1(I)	18 ±0.3(S)	21 ±1(S)
138	B <sub>1</sub>	1.10E+06	16 ±0.8(I)	16 ±0.3(S)	18 ±0.2(S)	24 ±0.2(S)	16 ±0.6(I)	26 ±0.9(S)	19 ±1.8(I)	17 ±0.2(I)	19 ±0.3(S)
139	B <sub>1</sub>	1.25E+06	19 ±0.4(S)	18 ±0.5(S)	18 ±0.7(S)	25 ±0.3(S)	15 ±0.2(I)	27 ±1.8(S)	20 ±1.1(I)	21 ±0.2(S)	21 ±1.3(S)
141	B <sub>1</sub>	1.25E+06	19 ±0.5(S)	18 ±0.3(S)	18 ±0.5(S)	25 ±0.2(S)	13 ±0.3 (R)	27 ±0.3(S)	19 ±0.1(I)	18 ±0.7(S)	22 ±2.6(S)
144	A <sub>0</sub>	1.20E+06	20 ±0.5(S)	20 ±0.5(S)	18 ±0.5(S)	28 ±0.8(S)	8 ±0.3 (R)	26 ±0.3(S)	21 ±0.1(S)	23 ±0.8(S)	20 ±5.6(S)
145 (1)	A <sub>0</sub>	1.75E+06	18 ±0(I)	21 ±1(S)	18 ±0(S)	27 ±1.2(S)	18 ±0.2(S)	28 ±0.3(S)	20 ±0.9(I)	21 ±0.5(S)	23 ±0(S)
145 (2)	A <sub>0</sub>	1.80E+06	16 ±0.9(I)	18 ±0.4(S)	18 ±0.2(S)	28 ±0.1(S)	16 ±0.2(I)	26 ±0.4(S)	20 ±0.1(I)	19 ±0.4(S)	21 ±0.9(S)
146	A <sub>1</sub>	2.50E+06	17 ±1.7(I)	18 ±0.3(S)	17 ±0.7(S)	25 ±1.3(S)	16 ±2.7(I)	25 ±1.4(I)	17 ±0.8 (R)	18 ±1.3(S)	23 ±0.3(S)
147	A <sub>0</sub>	1.85E+06	21 ±2.9(S)	19 ±1.5(S)	19 ±0.6(S)	25 ±4.5(S)	20 ±0.8(S)	27 ±0.3(S)	21 ±0.5(S)	20 ±1.8(S)	24 ±0.4(S)
148	A <sub>0</sub>	1.05E+06	19 ±1(S)	NI (R)	18 ±1.4(S)	26 ±1.2(S)	NI (R)	25 ±0.9(I)	19 ±0.9(I)	21 ±0.6(S)	NI (R)
149	A <sub>0</sub>	1.20E+06	19 ±1.5(S)	NI (R)	19 ±0.1(S)	26 ±0.3(S)	NI (R)	25 ±3.2(I)	19 ±1.3(I)	20 ±0.5(S)	NI (R)

150	A <sub>0</sub>	1.75E+06	19 ±0.1(S)	NI (R)	19 ±0(S)	26 ±1.1(S)	NI (R)	26 ±1.5(S)	19 ±0.2(I)	21 ±0.4(S)	NI (R)
151	A <sub>0</sub>	1.75E+06	21 ±1.2(S)	20 ±1(S)	19 ±0.5(S)	32 ±0.7(S)	14 ±0.4(I)	26 ±0.1(S)	19 ±0.4(I)	21 ±1.7(S)	23 ±0.9(S)
152	A <sub>0</sub>	1.25E+06	10 ±0.7(S)	19 ±0(S)	20 ±1.2(S)	29 ±0.7(S)	16 ±1(I)	24 ±1.5(I)	17 ±0.3 (R)	20 ±0.4(S)	21 ±1.1(S)
153	A <sub>0</sub>	1.55E+06	19 ±0.5(S)	20 ±0.2(S)	18 ±0.6(S)	29 ±2.7(S)	15 ±0.1(I)	26 ±0.7(S)	18 ±0.6(I)	19 ±0.9(S)	21 ±1.1(S)
154	A <sub>0</sub>	1.35E+06	20 ±0(S)	19 ±0.2(S)	19 ±0(S)	29 ±0.1(S)	16 ±1.1(I)	23 ±0.2(I)	19 ±1.3(I)	20 ±0(S)	22 ±1.1(S)
155	A <sub>0</sub>	2.50E+06	21 ±1.5(S)	18 ±0.7(S)	18 ±0.2(S)	28 ±1(S)	17 ±1.2(S)	24 ±1.4(I)	18 ±1.1(I)	19 ±1.3(S)	23 ±1.3(S)
155.1	A <sub>1</sub>	1.95E+06	17 ±0.2(I)	19 ±0.5(S)	18 ±0.4(S)	26 ±0.7(S)	18 ±0.2(S)	25 ±0.9(I)	19 ±1.2(I)	20 ±0.5(S)	20 ±0.6(S)
156	A <sub>0</sub>	1.70E+06	19 ±0(S)	19 ±0(S)	18 ±0.8(S)	25(S)	NI (R)	23 ±0.7(I)	17 ±0.6 (R)	20 ±0.9(S)	21 ±2.3(S)
157	A <sub>1</sub>	2.00E+06	20 ±0.6(S)	20 ±0.6(S)	18 ±1.3(S)	26 ±2.9(S)	18 ±0.8(S)	25 ±2.9(I)	18 ±1.1(I)	22 ±0.5(S)	20 ±3.1(S)
158	A <sub>1</sub>	1.90E+06	20 ±0.1(S)	19 ±1.2(S)	19 ±0.3(S)	26 ±0.3(S)	19 ±0.2(S)	24 ±0.7(I)	17 ±2.8 (R)	23 ±0.4(S)	21 ±0.7(S)
159 (1)	A <sub>0</sub>	1.80E+06	19 ±1(S)	19 ±0.1(S)	18 ±0.3(S)	26 ±1.6(S)	17 ±0.4(S)	25 ±1.1(I)	18 ±1.3(I)	19 ±0.3(S)	21 ±1.1(S)
159 (2)	A <sub>0</sub>	1.50E+06	18 ±0.6(I)	19 ±2.1(S)	18 ±0.5(S)	24 ±2.2(S)	NI (R)	24 ±0.3(I)	18 ±0.9(I)	20 ±0.9(S)	22 ±1.2(S)
160	A <sub>0</sub>	2.35E+06	21 ±0.9(S)	19 ±0.1(S)	19 ±0.8(S)	29 ±1.9(S)	16 ±0.6(I)	24 ±0.8(I)	19 ±0.8(I)	19 ±1.1(S)	21 ±0.9(S)
161	A <sub>0</sub>	2.00E+06	21 ±0.9(S)	20 ±0.1(S)	18 ±0(S)	29 ±0.4(S)	18 ±0.9(S)	26 ±1.1(S)	19 ±0.3(I)	21 ±0.8(S)	22 ±1.1(S)
162	A <sub>0</sub>	1.80E+06	25(S)	21 ±1.1(S)	19 ±0.3(S)	28 ±0.7(S)	21 ±0.6(S)	27 ±1.9(S)	20 ±0.5(I)	24 ±0.5(S)	23 ±3.1(S)
163	A <sub>0</sub>	1.60E+06	20 ±0.2(S)	19 ±0(S)	18 ±0.5(S)	28 ±0.7(S)	15 ±0.7(I)	22 ±0.1 (R)	17 ±0.6 (R)	20 ±1(S)	21 ±0.1(S)
164	A <sub>1</sub>	2.30E+06	20 ±0.3(S)	20 ±0.9(S)	19 ±0(S)	28 ±2.4(S)	18 ±1.1(S)	25 ±1.1(I)	20 ±0.7(I)	20 ±0.9(S)	20 ±1.4(S)
165	A <sub>1</sub>	1.30E+06	21 ±0.8(S)	20 ±0.1(S)	19 ±0.1(S)	26 ±0.1(S)	18 ±0.5(S)	25 ±1.4(I)	21 ±0(S)	22 ±0.9(S)	21 ±0.4(S)
166	A <sub>0</sub>	2.05E+06	18(I)	17 ±0.6(S)	17 ±0.8(S)	25 ±1.2(S)	15 ±0.3(I)	26 ±1.4(S)	19 ±0.4(I)	18 ±0.4(S)	24 ±0.4(S)
167	A <sub>0</sub>	2.05E+06	21(S)	19 ±0.9(S)	19 ±1.1(S)	23 ±3.5(S)	16 ±0.1(I)	24 ±1.1(I)	18 ±0.4(I)	24 ±0(S)	20 ±0(S)
168	A <sub>0</sub>	2.05E+06	18 ±0.8(I)	16 ±0.4(S)	20 ±1.2(S)	25 ±0.8(S)	15 ±0.9(I)	24 ±2.9(I)	19 ±0.4(I)	19 ±1.5(S)	18 ±1.8(S)
169	A <sub>1</sub>	2.40E+06	20(S)	21 ±0(S)	18 ±0.7(S)	28 ±0.2(S)	18 ±1.5(S)	25 ±1.1(I)	18 ±0.6(I)	21 ±0.2(S)	21 ±1.1(S)
170	A <sub>1</sub>	1.60E+06	20 ±0.7(S)	20 ±0.9(S)	19 ±0.3(S)	27 ±0.4(S)	18 ±1.4(S)	24 ±0.4(I)	19 ±0(I)	21 ±0.9(S)	22 ±0.1(S)
171	A <sub>1</sub>	1.30E+06	22 ±0.3(S)	20 ±0.5(S)	19 ±1.5(S)	25 ±0.9(S)	18 ±0.5(S)	24 ±1.1(I)	20 ±0.7(I)	22 ±0.5(S)	21 ±0.1(S)
172	A <sub>1</sub>	1.75E+06	20 ±0.6(S)	21 ±0.6(S)	20 ±0.5(S)	29 ±0.7(S)	19 ±0.1(S)	26 ±0(S)	20 ±0.7(I)	22 ±0.4(S)	22 ±0.4(S)
173	A <sub>1</sub>	1.80E+06	19 ±1.1(S)	21 ±0.5(S)	20 ±0.2(S)	27 ±0.7(S)	19 ±0.6(S)	25 ±2.1(I)	17 ±1.8 (R)	22 ±0.1(S)	21 ±2.1(S)
174	A <sub>1</sub>	2.35E+06	19 ±0.6(S)	20 ±0.4(S)	20 ±1.4(S)	28 ±0.1(S)	18 ±1.2(S)	24 ±1.1(I)	18 ±0.7(I)	20 ±0.5(S)	22 ±1.4(S)
206	B <sub>2</sub>	1.20E+06	24 ±1.4(S)	25 ±0(S)	20 ±0(S)	22 ±0.7(S)	21 ±2.8(S)	32 ±0(S)	23 ±1.4(S)	27 ±1.4(S)	26 ±1.4(S)
207	A <sub>0</sub>	3.75E+06	22 ±1.1(S)	23 ±2.5(S)	20 ±0.3(S)	30 ±0(S)	21 ±1.1(S)	29 ±2.8(S)	22 ±0.7(S)	23 ±1.1(S)	26 ±2.9(S)

383 (I)	B2 <sub>3</sub>	1.20E+06	24 ±2.1(S)	24 ±2.9(S)	20 ±0(S)	31 ±0.7(S)	23 ±1.4(S)	30 ±4(S)	23 ±0.1(S)	24 ±2.2(S)	28 ±3.5(S)
348	B2 <sub>3</sub>	1.55E+06	24 ±2.1(S)	20 ±0(S)	19 ±1.4(S)	28 ±0.7(S)	21 ±1.4(S)	28 ±0.7(S)	23 ±0.7(S)	23 ±0.7(S)	23 ±1.4(S)

NI: no inhibición; (R) resistente; (I) intermedio; (S) sensible.

Se determinó que de las 172 cepas de *E. coli* analizadas, la mayor resistencia con un 25% (43) se obtuvo frente a la ampicilina. El 23.84% (41) de las cepas fueron resistentes a la tetraciclina, el 20.93% (36) a la ceftazidima, 13.37% (23) al cloranfenicol, 11.63% (20) a la cefotaxima, 10.47% (18) al ácido nalidixico, 9.3% (16) a la gentamicina, y el 6.98% (12) al trimatoprima/sulfametoxazol. Es importante mencionar que ninguna de las cepas fue resistente a la ciprofloxacina (Grafico 5 y Tabla 13).



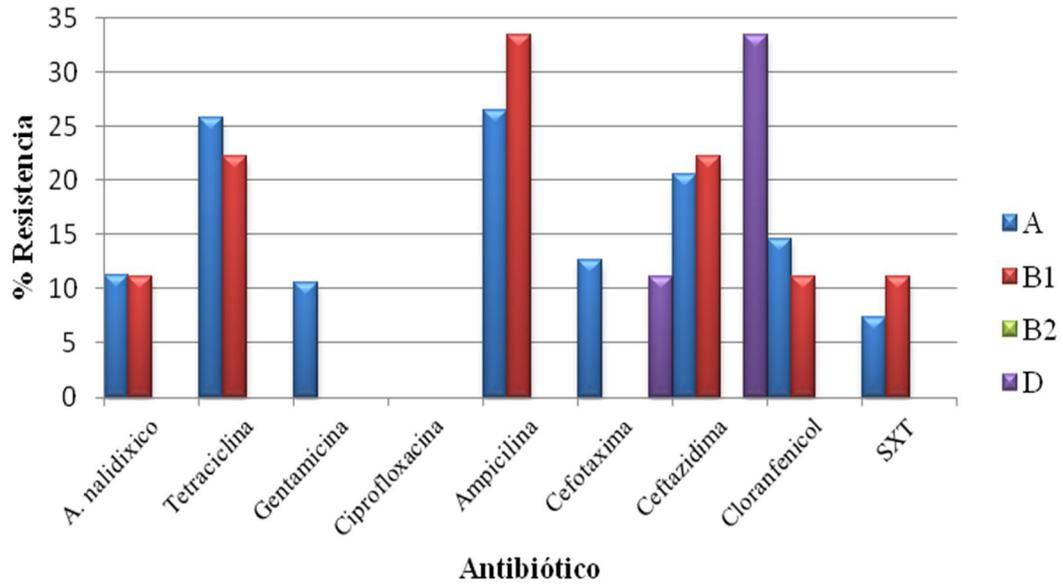
**Grafico 5.-** Patrón de resistencia, intermedia y sensibilidad de los aislados de *E. coli* contra los antibióticos probados.

**Tabla 13.-** Patrón de resistencia, intermedia y sensibilidad de los aislados contra los antibióticos.

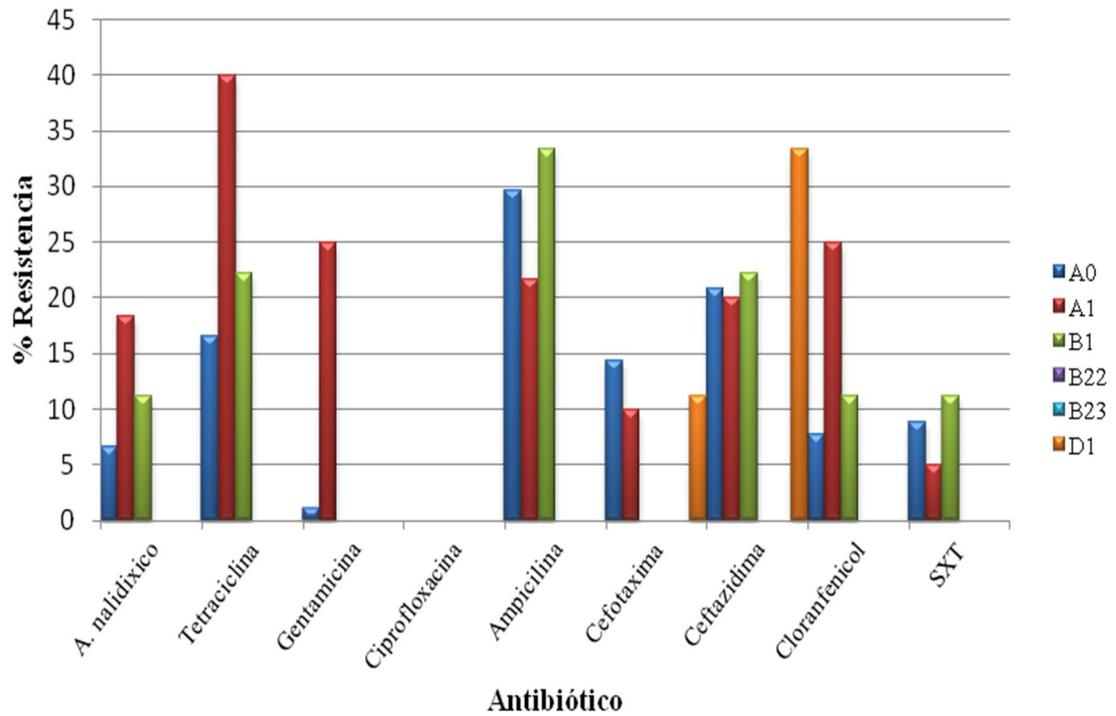
Antibiótico	Sensible		Intermedio		Resistente	
	#	%	#	%	#	%
<b>A. nalidíxico</b>	130	76	24	13.95	18	10.47
<b>Tetraciclina</b>	124	72.09	7	4.07	41	23.84
<b>Gentamicina</b>	155	90.12	1	0.58	16	9.30
<b>Ciprofloxacina</b>	154	89.53	18	10.47	0	0
<b>Ampicilina</b>	89	51.74	40	23.26	43	25
<b>Cefotaxima</b>	70	40.7	82	47.67	20	11.63
<b>Ceftazidima</b>	31	18.02	105	61.05	36	20.93
<b>Cloranfenicol</b>	144	83.72	5	2.91	23	13.37
<b>SXT</b>	155	90.12	5	2.91	12	6.98

Al comparar los perfiles de resistencia a antibióticos encontrados en relación con los grupos filogenéticos (Tabla 14), se encontró que de los cuatro grupos filogenéticos principales, los filogrupos A y B1 son los que tuvieron mayor resistencia para los antibióticos probados, con excepción de la ceftazidima en el cual el filogrupo D mostró mayor resistencia. Así mismo estos dos filogrupos tuvieron un porcentaje de resistencia similar para casi todos antibióticos probados, con excepción de la gentamicina y la cefotaxima. Cabe mencionar que el filogrupo B2 fue sensible para todos los antibióticos y que para el antibiótico gentamicina solo el filogrupo A mostró resistencia.

En cuanto a los perfiles de resistencia a antibióticos encontrados en los subgrupos filogenéticos de *E. coli* (Tabla 15), el A<sub>1</sub> fue el que mostró mayores porcentajes de resistencia en la mayoría de los antibióticos: tetraciclina 40%, gentamicina y cloranfenicol 25% y el ácido nalidíxico 18.33%. El subgrupo A<sub>0</sub> mostró mayor resistencia para la cefotaxima, siendo de 14.29%. Para la ampicilina y el SXT, el B1 fue el que mostró mayor porcentaje de resistencia, con un 33.33 y 11.11% respectivamente.



**Grafico 6.-** Patrón de resistencia de los principales grupos filogenéticos de *E. coli* contra los antibióticos probados.



**Grafico 7.-** Patrón de resistencia de los subgrupos filogenéticos de *E. coli* contra los antibióticos probados.

**Tabla 14.-** Perfil de resistencia a antibióticos de los principales grupos filogenéticos de los aislados de *E. coli*.

Grupos filogenéticos	Perfil de resistencia a antibióticos																	
	A. nalidíxico		Tetraciclina		Gentamicina		Ciprofloxacina		Ampicilina		Cefotaxima		Ceftazidima		Cloranfenicol		SXT	
	#	%	#	%	#	%	#	%	#	%	#	%	#	%	#	%	#	%
<b>A</b>	17	11.26	39	25.83	16	10.6	0	0	40	26.49	19	12.58	31	20.53	22	14.57	11	7.28
<b>B<sub>1</sub></b>	1	11.11	2	22.22	0	0	0	0	3	33.33	0	0	2	22.22	1	11.11	1	11.11
<b>B<sub>2</sub></b>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>D</b>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	11.11	3	33.33	0	0	0	0

**Tabla 15.-** Perfil de resistencia a antibióticos de los subgrupos filogenéticos de los aislados de *E. coli*.

Subgrupos filogenéticos	Perfil de resistencia a antibióticos																	
	A. nalidíxico		Tetraciclina		Gentamicina		Ciprofloxacina		Ampicilina		Cefotaxima		Ceftazidima		Cloranfenicol		SXT	
	#	%	#	%	#	%	#	%	#	%	#	%	#	%	#	%	#	%
<b>A<sub>0</sub></b>	6	6.59	15	16.48	1	1.1	0	0	27	29.67	13	14.29	19	20.88	7	7.69	8	8.79
<b>A<sub>1</sub></b>	11	18.33	24	40	15	25	0	0	13	21.67	6	10	12	20	15	25	3	5
<b>B<sub>1</sub></b>	1	11.11	2	22.22	0	0	0	0	3	33.33	0	0	2	22.22	1	11.11	1	11.11
<b>B<sub>2<sub>2</sub></sub></b>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>B<sub>2<sub>3</sub></sub></b>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>D<sub>1</sub></b>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	11.11	3	33.33	0	0	0	0

Al analizar los perfiles de resistencia a antibióticos obtenidos desde el punto de vista del origen de las cepas, se encontró que aquellas que fueron aisladas a partir de tomate, tuvieron un mayor porcentaje de resistencia contra todos los antibióticos probados, con excepción de la gentamicina en comparación con las cepas que se aislaron de chile jalapeño. Con respecto a ello, las cepas aisladas de tomate, estas fueron en su mayoría resistentes a la ampicilina con un 38.55% (32/83) en tanto que las de chile jalapeño presentaron mayor resistencia a la tetraciclina con un 22.73% (20/88).

En cuanto a la relación de los principales grupos filogenéticos y el producto (Tabla 16), las cepas del filogrupo A aisladas a partir de tomate, mostraron mayor porcentaje de resistencia a todos los antibióticos con excepción de la gentamicina, comparadas con las cepas pertenecientes al mismo grupo filogenético aisladas de chile jalapeño. Las cepas del filogrupo D aisladas a partir de tomate no mostraron resistencia a ninguno de los antibióticos, a diferencia de las cepas de este mismo filogrupo aisladas de chile jalapeño, las cuales presentaron resistencia a la cefotaxima y la ceftazidima.

También se analizó la relación entre los subgrupos filogenéticos con el producto del cual se aislaron (Tabla 17), siendo el subgrupo A0 aislado a partir de tomate, el que mostró mayor porcentaje de resistencia a casi todos los antibióticos, en comparación con el mismo grupo filogenético aislado a partir de chile jalapeño. Así mismo las cepas del subgrupo A1 aisladas a partir de tomate presentaron mayor porcentaje de resistencia para el ácido nalidíxico, ampicilina, ceftazidima, cloranfenicol y SXT, que las cepas de este mismo subgrupo provenientes de chile jalapeño.

Tomando en cuenta el tipo de muestra (Tabla 18), las cepas aisladas de manos del punto de distribución de chile jalapeño mostraron los mayores porcentajes de resistencia para casi todos los antibióticos probados: ácido nalidíxico, tetraciclina, gentamicina, ciprofloxacina, ampicilina, ceftazidima y cefotaxima. En cuanto a las cepas de tomate, aquellas que mostraron mayores porcentajes de resistencia a la mayoría de los antibióticos, fueron las aisladas a partir de producto en el área de empaque. Sólo una cepa fue aislada a partir de

producto del área de empaque del chile jalapeño, la cual no mostró resistencia a ninguno de los antibióticos probados, cabe mencionar que esta cepa perteneció al subgrupo A0.

**Tabla 16.-** Perfil de resistencia a antibióticos de los principales grupos filogenéticos de los aislados de *E. coli* según el producto.

Producto	Genotipo	Perfil de resistencia																		
		A. nalidixico		Tetraciclina		Gentamicina		Ciprofloxacina		Ampicilina		Cefotaxima		Ceftazidima		Cloranfenicol		SXT		
		#	%	#	%	#	%	#	%	#	%	#	%	#	%	#	%	#	%	
Chile jalapeño	A	78	6	7.69	20	25.64	9	11.54	0	0	11	14.1	9	11.54	13	16.67	7	8.97	2	2.56
	B1	1	1	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	100	1	100
	B2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	D	8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	12.5	3	37.5	0	0	0	0
	Total	88	7	7.95	20	22.73	9	10.23	0	0	11	12.5	10	11.36	16	18.18	8	9.09	3	3.41
Tomate	A0	73	12	16.44	19	26.03	7	9.589	0	0	29	39.73	10	13.7	18	24.66	15	20.55	9	12.33
	B1	8	0	0	2	25	0	0	0	0	3	37.5	0	0	2	25	0	0	0	0
	B2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	D	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Total	83	12	14.46	21	25.3	7	8.43	0	0	32	38.55	10	12.05	20	24.1	15	18.07	9	10.84
<b>Total de muestras</b>	<b>171</b>	<b>19</b>	<b>11.11</b>	<b>41</b>	<b>23.98</b>	<b>16</b>	<b>9.36</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>43</b>	<b>25.15</b>	<b>20</b>	<b>11.7</b>	<b>36</b>	<b>21.05</b>	<b>23</b>	<b>13.45</b>	<b>12</b>	<b>7.02</b>	

**Tabla 17.-** Perfil de resistencia a antibióticos de los subgrupos filogenéticos de los aislados de *E. coli* según el producto.

Producto	Genotipo	Perfil de resistencia																		
		A. nalidixico		Tetraciclina		Gentamicina		Ciprofloxacina		Ampicilina		Cefotaxima		Ceftazidima		Cloranfenicol		SXT		
		#	%	#	%	#	%	#	%	#	%	#	%	#	%	#	%	#	%	
Chile jalapeño	A0	47	3	6.38	5	10.64	1	2.13	0	0	7	14.89	5	10.64	7	14.89	1	2.13	1	2.13
	A1	31	3	9.68	15	48.39	8	25.81	0	0	4	12.9	4	12.9	6	19.35	6	19.35	1	3.23
	B1	1	1	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	100	1	100
	B23	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	D1	8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	12.5	3	37.5	0	0	0	0
	Total	88	7	7.95	20	22.73	9	10.23	0	0	11	12.5	10	11.36	16	18.18	8	9.09	3	3.41
Tomate	A0	44	3	6.82	10	22.73	0	0	0	0	20	45.45	8	18.18	12	27.27	6	13.64	7	15.91
	A1	29	9	31.03	9	31.03	7	24.14	0	0	9	31.03	2	6.9	6	20.69	9	31.03	2	6.897
	B1	8	0	0	2	25	0	0	0	0	3	37.5	0	0	2	25	0	0	0	0
	B22	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	D1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Total	83	12	14.46	21	25.3	7	8.43	0	0	32	38.55	10	12.05	20	24.1	15	18.07	9	10.84
<b>Total de muestras</b>	<b>171</b>	<b>19</b>	<b>11.11</b>	<b>41</b>	<b>23.98</b>	<b>16</b>	<b>9.36</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>43</b>	<b>25.15</b>	<b>20</b>	<b>11.7</b>	<b>36</b>	<b>21.05</b>	<b>23</b>	<b>13.45</b>	<b>12</b>	<b>7.02</b>	

**Tabla 18.-** Perfil de resistencia a antibióticos de los aislados de *E. coli* según el tipo de muestra.

Producto	Tipo de muestra	Grupo filogenético	Resistencia									
			NA	TE	CN	CIP	AMP	CTX	CAZ	C	SXT	
Chile jalapeño	Agua fuente	A0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		A1	5	0	0	0	0	0	20	0	0	
		D1	4	0	0	0	0	25	0	0	0	
		Total	11	0	0	0	0	9.09	9.09	0	0	
	Agua irrigación	A0	6	0	0	0	0	0	16.67	0	0	
		A1	2	0	50	0	0	0	50	0	0	
		Total	8	0	12.5	0	0	0	25	0	0	
	Manos cosecha	A0	15	13.33	33.33	0	0	20	6.67	0	0	
		A1	5	0	20	60	0	0	0	60	0	
		D1	4	0	0	0	0	0	75	0	0	
		Total	24	8.33	25	12.5	0	12.5	4.17	12.5	12.5	0
	Manos distribución	A0	5	0	0	0	60	20	40	0	0	
		A1	4	75	100	75	0	75	50	75	0	
		Total	9	33.33	44.44	33.33	0	66.67	33.33	55.56	33.33	0
	Manos empaque	A0	5	0	0	0	0	20	40	0	0	
		Total	5	0	0	0	0	20	40	0	0	
	Producto cosecha	A0	2	0	0	0	0	0	50	0	0	
		Total	2	0	0	0	0	0	50	0	0	
	Producto distribución	A0	3	33.33	0	0	0	33.33	0	33.33	33.33	
		B1	1	100	0	0	0	0	0	100	100	
Total		4	50	0	0	0	25	0	50	50		
Producto precosecha	A0	8	0	0	12.5	0	12.5	12.5	12.5	0	0	
	A1	10	0	80	20	0	20	10	0	0		
	Total	18	0	44.44	16.67	0	5.56	16.67	11.11	0	0	
Producto empaque	A0	1	0	0	0	0	0	0	0	0		
	Total	1	0	0	0	0	0	0	0	0		
Suelo	A1	5	0	20	0	0	20	0	0	20		
	B23	1	0	0	0	0	0	0	0	0		
	Total	6	0	16.67	0	0	16.67	0	0	16.67		
Total		88	7.95	22.73	10.23	0	12.5	11.36	18.18	9.09	3.41	
Tomate	Agua fuente	A0	22	0	4.545	0	0	36.36	18.18	22.73	0	0
		A1	12	8.33	8.33	0	0	8.333	0	16.67	8.33	8.33
		B1	3	0	66.67	0	0	66.67	0	33.33	0	0
		B22	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Total	38	2.63	10.53	0	0	28.95	10.53	21.05	2.63	2.63
	Agua irrigación	A0	16	12.5	37.5	0	0	43.75	12.5	31.25	18.75	37.5
		A1	7	14.29	14.29	0	0	0	0	14.29	14.29	14.29
		B1	4	0	0	0	0	25	0	0	0	0
		D1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Total	28	10.71	25	0	0	28.57	7.14	21.43	14.29	25	
	Manos cosecha	A0	1	0	0	0	0	100	0	0	0	0
		Total	1	0	0	0	0	100	0	0	0	0
	Manos distribución	A0	1	0	0	0	0	100	100	100	0	0
		A1	1	100	100	100	0	100	0	100	100	0
		B1	1	0	0	0	0	0	0	100	0	0
		Total	3	33.33	33.33	33.33	0	66.67	33.33	100	33.33	0
	Producto	A0	1	0	0	0	0	100	0	100	0	0

cosecha	A1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	Total	2	0	0	0	0	50	0	0	50	0	
Producto distribución	A1	4	75	75	75	0	75	0	0	75	0	
	Total	4	75	75	75	0	75	0	0	75	0	
Producto empaque	A0	3	33.33	100	0	0	100	33.33	33.33	100	33.33	
	A1	3	100	100	100	0	100	66.67	66.67	66.67	0	
	Total	6	66.67	100	50	0	100	50	50	83.33	16.67	
Suelo	A1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	Total	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Total			83	14.46	25.3	8.434	0	38.55	12.05	24.1	18.07	10.84
<b>Total de muestras</b>			171	11.11	23.98	9.36	0	25.15	11.7	21.05	13.45	7.018

En cuanto a la aparición de multirresistencia encontramos que el 54.07% de los aislados fueron resistentes al menos a un antibiótico, 20 (11.63%) presentaron resistencia a 2 antibióticos, 14 (8.14%) aislados fueron resistentes a 3 antibióticos, solo 2 (1.16%) fueron resistentes a 4 antibióticos, 6 (3.49%) mostraron resistencia a 5 antibióticos, 4 (2.33%) cepas fueron resistentes a 6 antibióticos y 3(1.74%) presentaron resistencia a 7 antibióticos. Ninguno de los aislados fue resistente a todos los antimicrobianos probados. En tanto que el 45.93% (79/172) de las cepas analizadas no fueron resistentes para ningún antibiótico. En resumen, encontramos que el 28.49% de las muestras presentaron resistencia a 2 o más antibióticos.

**Tabla 19.-** Perfil de resistencia a uno o más antimicrobianos de las cepas aisladas de *E. coli*

Cantidad de antibióticos	Resistente %	No. de aislados
0	45.93	79
1	25.58	44
2	11.63	20
3	8.14	14
4	1.16	2
5	3.49	6
6	2.33	4
7	1.74	3

Cabe mencionar las tres cepas que presentaron resistencia para 7 de los antibióticos probados pertenecieron al subgrupo filogenético A<sub>1</sub>, de las cuales, dos provenían de chile jalapeño y una de tomate.

## DISCUSIÓN

Para la verificación de las características coloniales de las diversas cepas aisladas de *E. coli* se utilizaron cinco medios de cultivo diferentes (MacConkey, MacConkey-Sorbitol, Rapid *E. coli*2, TBX y EMB) los cuales han sido ampliamente utilizados para el aislamiento e identificación de *E. coli*, estos medios nos permitieron observar las diferentes características fenotípicas de estas cepas. Sin embargo se ha reportado que no todas las cepas de *E. coli* aisladas llegan a presentar las características típicas, por lo cual se optó por utilizar un método reportado por Clermont *et al* (2000), el cual podría ser considerado como un método “universal” para la identificación de *E. coli* (Higgins *et al.*, 2007), dicho método consistió en una PCR Triplex que asigna a las cepas de *E. coli* en uno de sus cuatro principales grupos filogenéticos (A, B1, B2 y D) en base a la presencia o ausencia de tres marcadores genéticos: el gen *ChuA*, el gen *yjaA* y el fragmento TSPE4.C2.

Está bien establecido que *E. coli* se compone de un número de distintos grupos filogenéticos (Gordon *et al.*, 2008). La genotipificación permite correlacionar los grupos de *E. coli* y sus hospederos, siendo por ello usada para identificar la fuente de contaminación con esta bacteria (Cherry Lee, 2011).

Debido a lo anterior en este estudio se utilizó el método reportado por Clermont, el cual se ha demostrado ser una técnica excelente, rápida y económica para la asignación de las cepas de *E. coli* en los grupos filogenéticos, indicando que el 85-90% de las cepas pueden ser asignados a un grupo y que el 80-85% de los miembros de los filogrupos asignados son correctos (Gordon *et al.*, 2008).

Al analizar los principales grupos filogenéticos obtenidos a partir de las 345 cepas de *E. coli*, el grupo filogenético más abundante fue el A (86.09%), seguido por el B1 (7.25%) y el D (5.8%); siendo el grupo filogenético B2 (0.87%) el menos frecuente. Resultados similares fueron reportados por Duriez *et al.*, (2001), en cepas de *E. coli* aisladas de heces provenientes de tres poblaciones humanas geográficamente distintas (Francia, Croacia y

Mali), encontrando que las cepas de los grupos filogenéticos A y B1 (40% y 34% respectivamente) fueron las más comunes, seguidas por las cepas del grupo D (15%) y B2 (11%).

De la misma manera otro estudio reportó que los grupos filogenéticos A (34,1%) y B1 (33,1%) fueron también predominantes en comparación con las cepas del grupo filogenético D (20,4%) y B2 (12,4%) al analizar muestras fecales de humanos y animales en conjunto (Escobar-Paramo *et al.*, 2006).

Nuestros resultados también son similares a los observados por Karimi-Darehabi *et al.*, (2013) quienes determinaron que el grupo filogenético A fue el más abundante con 63.8% de las cepas aisladas de comida congelada de origen animal; similarmente, entre las cepas aisladas de niños con diarrea, el grupo A también fue el más prevalente (59.5%), siendo el menos abundante el grupo B2. Sabaté *et al.*, (2008) analizaron aguas residuales de animales y humanos, siendo el grupo filogenético A el más común entre las fuentes de aguas residuales, seguido por el grupo B1 de aguas residuales de puercos, vacas y gallinas, y los grupos B1 y B2 de humanos.

En contraste con nuestros resultados Higgins *et al.*, (2007) al analizar cepas aisladas de agua, órganos animales, heces humanas, animales domésticos y de zoológico, con un total de 445 aislados encontraron que el 31% pertenecieron al grupo filogenético B1, el 26% al A y 25% al D; a su vez Walk *et al.*, (2007) caracterizaron la estructura de la variación genética y la población de *E. coli* recuperadas de agua y arena en playas de agua dulce y templada, aislando cepas del grupo B1 con más frecuencia (56%).

Sin embargo ambos autores coinciden en que el grupo filogenético B2 fue el de menor frecuencia en ambos estudios, lo cual coincide con los resultados obtenidos en nuestro estudio.

A diferencia con lo anterior Nowrouzian *et al.* (2005) analizaron la persistencia de los grupos filogenéticos de *E. coli* en intestino humano, reportando que el 46% de las cepas

aisladas pertenecieron al grupo filogenético B2, 29% al grupo A, 14% al grupo D y 11% al grupo B1.

A pesar de que en diversos estudios se ha reportado que las cepas del grupo filogenético B1 tienen una mayor capacidad de persistir en el medio ambiente que los otros grupos (Walk *et al.*, 2007), por lo que son más predominantes en los huéspedes no humanos y muestras ambientales (Camina *et al.*, 2007; Tenaillon *et al.*, 2010); en nuestro caso solo el 7.25% de las cepas aisladas de *E. coli* pertenecieron a este grupo. Se ha considerado que los grupos B2 y D son menos frecuentemente aislados del medio ambiente (Gordon *et al.*, 2008), lo que concuerda con nuestros resultados.

Las cepas de estos grupos filogenéticos difieren en sus características desde cómo usar los diferentes azúcares, sus perfiles de resistencia a antibióticos, rangos de temperatura para su crecimiento, nichos ecológicos y hasta en la presencia o ausencia de factores de virulencia (Gordon *et al.*, 2008; Carlos *et al.*, 2010).

Se ha demostrado que la distribución de los grupos filogenéticos, subgrupos y marcadores genéticos de *E. coli* no es aleatoria entre sus distintos hospederos; considerando a los grupos A y B1 como “generalistas” y a los grupos B2 y D como “especialistas” (Carlos *et al.*, 2010; Gordon y Cowling, 2003).

Algunos autores reportan que los grupos A y B1 presentan una mayor proporción en animales, los grupos A y B2 en humanos y una mayor prevalencia de los grupos D y B1 en aves (Escobar-Paramo *et al.*, 2006). El grupo B1 se ha relacionado con los animales herbívoros y una prevalencia del grupo A en los animales carnívoros y omnívoros (Carlos *et al.* 2010; Baldy-Chudzik *et al.*, 2008). Carlos *et al.* (2010) también reportaron que las cepas pertenecientes al grupo B2 no se encontraron en los mamíferos herbívoros.

Para incrementar el poder de discriminación del análisis de población de *E. coli* también se determinaron los 7 subgrupos filogenéticos: A<sub>0</sub>, A<sub>1</sub>, B<sub>1</sub>, B<sub>22</sub>, B<sub>23</sub>, D<sub>1</sub> y D<sub>2</sub>. El subgrupo A<sub>0</sub> (58.26%) fue el más frecuente, seguido por el subgrupo A<sub>1</sub> (27.83%), el B<sub>1</sub> (7.25%), D<sub>1</sub>

(5.8%), B<sub>23</sub> (0.58%) y por último el B<sub>22</sub> (0.29%), cabe mencionar que ninguna cepa perteneció al grupo D<sub>2</sub>.

En un estudio realizado por Carlos *et al.* (2010) la mayoría de las cepas de las muestras de pollo fueron incluidas en el subgrupo A<sub>0</sub>. Mientras que los humanos fueron los únicos hospederos que presentaron cepas de los 7 subgrupos filogenéticos excepto por el subgrupo A<sub>0</sub>; sugiriéndose al subgrupo B<sub>23</sub> como indicador de contaminación por heces humanas, ya que las cepas de este subgrupo solo han sido aisladas de muestras humanas.

En base a lo anterior se puede sugerir que la mayoría de las cepas aisladas, las cuales pertenecían al subgrupo filogenético A<sub>0</sub>, podrían estar asociadas principalmente a contaminación de origen animal tanto carnívoros como omnívoros y no a contaminación de origen humano; sin embargo por la presencia del subgrupo B<sub>23</sub>, el 0.58% de los aislados se podrían asociar exclusivamente a muestras de origen fecal humana.

Las condiciones climáticas, geográficas, factores de la dieta y/o el uso de antibióticos, así como también los factores genéticos del huésped influyen en la distribución de los grupos filogenéticos de *E. coli* comensales de humanos; algunas cepas pueden estar adaptadas principalmente a las condiciones intestinales de ciertas poblaciones (Duriez *et al.*, 2001).

La gran abundancia encontrada en este estudio del grupo filogenético A, se podría relacionar al clima de la región de los estados de Nuevo León y Coahuila, ya que se ha asociado la presencia predominante de este grupo en huéspedes que viven en regiones desérticas, a diferencia de las cepas de los otros grupos que son poco frecuentes en estas regiones (Gordon y Cowling, 2003).

Actualmente no existen reportes en México de los grupos filogenéticos de *E. coli*, además, son muy pocos los estudios en otros países de estos grupos en muestras del medio ambiente y sobre todo del tipo de muestras analizadas en este estudio, lo que hace difícil una comparación, o bien, un “rastreo” de la fuente de contaminación; aunado a esto los diversos factores ya mencionados que pudieran influir en la presencia de los diferentes grupos

filogenéticos en los huéspedes. Sin embargo, se considera que el método de agrupación por filogrupos puede ser implementado en diferentes regiones del mundo, como una herramienta complementaria de seguimiento de la fuente de contaminación bacteriana (Carlos *et al.*, 2010).

En cuanto a la determinación de patotipos de *E. coli*, el 1.16% (4/345) de los aislados pertenecieron algún patotipo. Tres cepas pertenecieron al patotipo de *E. coli* enteropatógena, representando esto el 0.87% (3/345), en tanto que sólo una cepa resultó positiva para el patotipo de *E. coli* enterotoxigénica representando el 0.29% (1/345). Este hallazgo es de suma importancia para nuestro país, ya que, Canizalez-Roman *et al.*, (2013) analizaron más de 5000 muestras de distintos tipos de alimentos en Sinaloa, Culiacán, México, encontrando una prevalencia de un 1% de DEC; siendo más prevalente la cepa EPEC.

En cuanto a la prevalencia en general de las *E. coli* diarreogénicas, nuestros resultados muestran una baja prevalencia comparado con diversos estudios reportados tanto en México como en otros países. Estrada-Garcia *et al.*, (2009) reportaron una prevalencia del 16% de ECD en muestras fecales humanas clínicas. Estos autores también reportan a *E. coli* enteropatógena atípica (EPECa) como el más frecuente de las ECD identificadas, seguido de las ETEC, indicando que la mayoría de los aislados de ETEC fueron *lt* positivos.

Diversos estudios han reportado una mayor prevalencia de ETEC que los otros patotipos de *E. coli*. López-Saucedo *et al.*, (2003) analizaron muestras de diferentes alimentos (salsa verde, col, cilantro y lechuga) de vendedores ambulantes en la ciudad de México, de las cuales el 13% contenían *E. coli* diarreogénicas, siendo *E. coli* ETEC la de mayor prevalencia. Rúgeles *et al.*, (2010) reportaron que el 9.8% de las muestras analizadas fueron positivas para algún patotipo de *E. coli*, siendo las cepas EPEC atípicas las más comunes de los patotipos entre muestras clínicas y STEC fue el más común entre las muestras de productos alimenticios.

En contraste a esto, algunos autores reportan a STEC como las de mayor prevalencia en diversos productos alimenticios. Cerna-Cortes *et al.*, (2012) aislaron *E. coli* diarreogénicas a partir del 36% de muestras de chile serrano y del 14% de muestras de chile jalapeño. Las STEC fueron aisladas del 36 y 14% de muestras de chile serrano y chile jalapeño respectivamente, y ETEC del 12% de muestras de chile serrano y el 2% de chile jalapeño. Concluyendo que tanto el chile jalapeño como el serrano podrían ser un factor importante contribuyendo a la gastroenteritis causada por ECD en México. Castro-Rosas *et al.*, (2012) al evaluar muestras de ensaladas mixtas (lechuga, espinacas, tomate, aguacate, pepino, cebolla y zanahoria) de diferentes restaurantes en la ciudad de Pachuca, Hidalgo, México, encontraron que el 7% de las cepas aisladas fueron *E. coli* diarreogénicas; encontrándose con mayor prevalencia las cepas STEC seguidas de las EIEC y en menor porcentaje las ETEC.

Así mismo, en un estudio en donde analizaron dos tipos de tomates (huaje y cherry), aislaron ECD del 11% de las muestras. STEC fue el patotipo más frecuente tanto en tomate huaje y cherry con un 6 y 5%, respectivamente, seguida por la ETEC (3 y 4%), la EPEC fueron aisladas de un 2 y 3% y por último la EIEC de un 1% de muestras de tomate huaje (Gómez-Aldapa *et al.*, 2013).

Rúgeles *et al.*, (2010) determinaron la presencia de *E. coli* diarreogénicas en muestras clínicas y de productos alimenticios de tiendas al por menor en Colombia, encontrando que el 9.8% de las muestras analizadas fueron positivas para algún patotipo de *E. coli*. Cuatro diferentes patotipos fueron identificados de muestras clínicas (EAEC, ETEC, STEC y EPEC) y las muestras de productos alimenticios fueron positivas para EAEC y STEC. Al igual que en nuestro estudio la mayoría de las cepas de *E. coli* pertenecieron a los grupos filogenéticos A y B1 y las EPEC atípicas fue el más común de los patotipos entre todos los positivos clínicos, sin embargo, STEC fue el más común entre las muestras de productos alimenticios.

Los patotipos de *E. coli* y sus grupos filogenéticos no son mutuamente excluyentes (Lehti *et al.*, 2013), por ello se analizó su relación, las tres cepas de EPEC pertenecieron a

diferentes grupos filogenéticos: A<sub>0</sub>, B<sub>2</sub> y B<sub>2</sub><sub>3</sub>; en tanto que la cepa de *E. coli* ETEC al genotipo A<sub>1</sub>. Algunos autores han reportado que las cepas pertenecientes a los grupos B<sub>2</sub> y D contienen más factores de virulencia que las cepas de los grupos A y B<sub>1</sub> (Johnson *et al.*, 2001). Sin embargo, Rúgeles *et al.*, (2010) encontraron que el 50% de los patotipos *E. coli* pertenecieron a los grupos filogenéticos A y B<sub>1</sub> y el 50% a los filogrupos B<sub>2</sub> y D. Las cepas de EPEC y ETEC fueron identificadas como del grupo B<sub>2</sub> y D. También se ha reportado que la mayoría de los aislados del grupo B<sub>1</sub> fueron EPEC y STEC, mientras que la mayoría de las cepas de los grupos B<sub>2</sub> y A pertenecieron a EPEC (Lobersil *et al.*, 2012).

La mayoría de las cepas de *E. coli* encontradas en este estudio se podrían considerar comensales, de acuerdo con otros estudios donde se ha reportado que las cepas comensales típicamente pertenecen a los grupos filogenéticos A y B<sub>1</sub> y se caracterizan por carecer de muchos de los determinantes de virulencia que están presentes en cepas patógenas (Russo y Jonhson, 2000).

Cabe resaltar que una de las cepas de *E. coli* EPEC se podría considerar que fue de contaminación fecal humana ya que perteneció al subgrupo filogenético B<sub>2</sub><sub>3</sub> (Carlos *et al.*, 2010). Así mismo, podríamos sugerir que las otras tres cepas de los patotipos de *E. coli* (tanto EPEC como ETEC), son indicadoras de contaminación fecal reciente debido a su corto periodo de vida reportada (aproximadamente de 4-12 semanas) (Cherry- Chu, 2011).

En cuanto a la determinación de resistencia contra nueve de los antibióticos más comúnmente usados como tratamiento en las infecciones causadas por *E. coli*, encontramos que el 23.84% de las cepas fueron resistentes a la tetraciclina, el 20.93% a la ceftazidima, 13.37% al cloranfenicol, 11.63% a la cefotaxima, 10.47% al ácido nalidíxico, 9.3% a la gentamicina, 6.98% al trimatoprima/sulfametoxazol y ninguna de las cepas presentó resistencia a la ciprofloxacina.

Según la literatura, el tratamiento antimicrobiano de las infecciones diarreicas ocasionadas por los patotipos de *E. coli* ha cambiado en los últimos años, debido a que las bacterias se han seleccionado como resistentes a los antibióticos que en el pasado eran considerados de

primera elección, como la tetraciclina, o TMP/SMX (Paniagua-Contreras, *et al.*, 2007); ampicilina, cloranfenicol y ácido nalidíxico, lo que supone grandes complicaciones en el tratamiento antibiótico cuando este es requerido (Mosquito *et al.*, 2011)

En contraste con nuestros resultados, la mayoría de los estudios no sólo reportan mayores porcentajes de resistencia para los antibióticos probados, sino que también indican que los porcentajes más altos de resistencia son frente a la tetraciclina, variando desde un 74% hasta un 90% a partir de muestras de heces humanas de casos clínicos (Solórzano-Santos y Miranda-Navales, 1998; Dyar *et al.*, 2012; Estrada-García *et al.*, 2005, Karimi-Darehabi *et al.*, 2013). En el caso de muestras de alimentos los porcentajes aunque son menores que los clínicos, también son superiores a los nuestros (desde un 53% hasta un 70%) (Canizalez-Roman *et al.*, 2013; Karimi-Darehabi *et al.*, 2013)

En nuestro caso, la mayor resistencia fue contra la ampicilina (23.84%), reportándose en otros estudios, porcentajes de 65 a 80 de cepas aisladas de muestras clínicas (Solórzano-Santos y Miranda-Navales, 1998; Dyar *et al.*, 2012; Estrada-García *et al.*, 2005, Karimi-Darehabi *et al.*, 2013); mientras que en cepas aisladas de muestras alimenticias se ha reportado porcentajes menores a estos, alrededor de un 50% (Canizalez-Roman *et al.*, 2013; Karimi-Darehabi *et al.*, 2013).

La menor resistencia a antibióticos encontrada aquí fue contra el TMP/SMX con un 6.98%, aunque se esperaba según la literatura encontrar un mayor porcentaje, ya que este antibiótico forma parte de los antibióticos históricamente más usados contra las infecciones por patotipos de *E. coli* y que se ha reportado que existe una frecuente resistencia a este, sobre todo en países en desarrollo (Nys *et al.*, 2004). Ninguna de las cepas fue resistente a la ciprofloxacina. Resultados similares fueron publicados por Estrada-García *et al.*, (2005).

Los perfiles de resistencia a antibióticos encontrados en relación con los grupos filogenéticos, mostraron que de los cuatro grupos principales, el A y B1 son los que tuvieron mayor resistencia para los antibióticos probados, con excepción de la ceftazidima en el cual el grupo D mostró mayor resistencia. De manera similar, Tenaillon *et al.*, (2010)

reportaron que las cepas del grupo A y D presentaron mayor resistencia a los diferentes antibióticos.

Por otro lado, el grupo filogenético B2 fue sensible para todos los antibióticos. Nuestros resultados concuerdan con reportes en este sentido que afirman que las cepas de este filogrupo son menos resistentes a los antibióticos que las cepas que no pertenecen a este grupo (Johnson *et al.*, 1991; Tenailon *et al.*, 2010).

El grupo filogenético B1 mostró alta prevalencia de resistencia a los antibióticos probados con excepción a la gentamicina, cefotaxima y ciprofloxacina (Figueira *et al.* 2011).

Similarmente a nuestros resultados Sabaté *et al.*, (2008) encontraron que las cepas de *E. coli* del grupo B2 fueron asociadas con ser de origen humano, susceptibilidad a las fluoroquinolonas y la presencia de islas de patogenicidad, mientras que los grupo A, B1 y D mostraron un bajo perfil de virulencia y un alto nivel de resistencia a antibióticos. Proponiendo que el abuso del uso de antibióticos en la producción de comida de animales podría promover el desarrollo de resistencia entre los grupos filogenéticos de *E. coli* intestinales que pudieran ser transmitidos a humanos a través de la cadena de producción.

Aunque en nuestro estudio todas las cepas de EPEC fueron sensibles a los nueve antibióticos probados, Canizalez-Roman *et al.* (2013) reportaron cepas *E. coli* aisladas de diferentes tipos de alimentos, en donde las EPEC fueron resistentes a los mismos antibióticos que nosotros probamos, y en cuanto a las ETEC encontraron que estas sólo fueron resistentes a la tetraciclina y a la cefotaxima, a diferencia de nuestros resultados donde las cepas de ETEC fueron resistentes a la tetraciclina, ampicilina y sulfametoxazol trimetoprima y sensibles a la cefotaxima.

El porcentaje de multirresistencia al menos a 2 antibióticos de las cepas de *E. coli* encontrado en este estudio fue del 28.49%, el cual es un porcentaje bajo en comparación con lo reportado en otros estudios (Estrada-García *et al.*, 2005; Ríos-Torres, 2012).

## CONCLUSIONES

El grupo filogenético A fue el más prevalente y el B2 fue el menos frecuente. En cuanto a los subgrupos, el A<sub>0</sub> fue el más frecuente y el menos el B2<sub>2</sub>.

La mayoría de las cepas aisladas, las cuales pertenecían al subgrupo filogenético A<sub>0</sub>, por lo que pueden estar asociadas principalmente a contaminación de origen animal tanto carnívoros como omnívoros,; sin embargo por la presencia del subgrupo B2<sub>3</sub>, en el 0.58% de los aislados se podrían asociar exclusivamente a origen fecal humano.

Los grupos filogenéticos no tuvieron una distribución diferente entre los productos, sin embargo si presentaron una diferencias cuanto al tipo de muestra.

El 1.16% de las cepas aisladas a partir del chile jalapeño, tomate y melón pertenecieron a las DEC (EPECa y ETEC). La cepa de ETEC fue aislada a partir de suelo de cultivo de chile jalapeño, y las cepas de EPEC, dos de estas fueron aisladas de agua de fuente de cultivo de tomate y una a partir de suelo de cultivo de chile jalapeño.

La mayor resistencia a los antibióticos se obtuvo frente a la ampicilina, y el menor porcentaje de resistencia contra el TMP/SMX. Ninguna de las cepas fue resistente a la ciprofloxacina.

Las cepas del grupo filogenético B2 y las pertenecientes al patotipo EPEC fueron sensibles a todos los antibióticos probados.

El porcentaje de multiresistencia al menos a 2 antibióticos de las cepas de *E. coli* encontrado en este estudio fue del 28.49%.

El filogrupo A fue el más prevalente en los tres tipos de productos (chile jalapeño, tomate y melón). En cuanto a los subgrupos filogenéticos el más abundante fue el A<sub>0</sub>, y el subgrupo B2<sub>2</sub>, solo se encontró en el tomate.

Las cepas aisladas a partir de tomate, tuvieron un mayor porcentaje de resistencia contra casi todos los antibióticos probados, presentando resistencia a la ampicilina con un 38.55%.

Las cepas del filogrupo A aisladas a partir de tomate, mostraron mayor porcentaje de resistencia a todos los antibióticos con excepción de la gentamicina, mientras que las cepas del filogrupo D aisladas a partir de este producto no mostraron resistencia a ninguno de los antibióticos.

Las cepas aisladas de manos en la etapa de distribución en el cultivo de chile jalapeño mostraron los mayores porcentajes de resistencia para casi todos los antibióticos probados. En cuanto a las cepas de tomate, aquellas que mostraron mayores porcentajes de resistencia a diferentes antibióticos, fueron las aisladas a partir de producto del área de empaque.

## LITERATURA CITADA

- Baldy-Chudzik K, Mackiewicz P & Stosik M. 2008. Phylogenetic background, virulence gene profiles, and genomic diversity in commensal *Escherichia coli* isolated from ten mammal species living in one zoo. *Veterinary microbiology* 131(1):173-184.
- Beutin L, Marchés O, Bettelheim KA, Gleier K, Zimmermann S, Schmidt H & Oswald E. 2003. HEp-2 cell adherence, actin aggregation, and intimin types of attaching and effacing *Escherichia coli* strains isolated from healthy infants in Germany and Australia. *Infection and immunity* 71(7):3995-4002.
- Canizalez-Roman A, Gonzalez-Nuñez E, Vidal JE, Flores-Villaseñor H & León-Sicairos N. 2013. Prevalence and antibiotic resistance profiles of diarrheagenic *Escherichia coli* strains isolated from food items in northwestern Mexico. *International Journal of Food Microbiology* 164(1):36-45.
- Carlos C, Pires M, Stoppe N, Hachich E, Sato M, Gomes T, Amaral L & Ottoboni L. 2010. *Escherichia coli* phylogenetic group determination and its application in the identification of the major animal source of fecal contamination. *BMC microbiology* 10(1):161.
- Castro-Rosas J, Cerna-Cortés JF, Méndez-Reyes E, Lopez-Hernandez D, Gómez-Aldapa CA & Estrada-García T. 2012. Presence of faecal coliforms, *Escherichia coli* and diarrheagenic *E. coli* pathotypes in ready-to-eat salads, from an area where crops are irrigated with untreated sewage water. *International Journal of Food Microbiology* 156(2):176-180.
- Cerna-Cortés JF, Gómez-Aldapa CA, Rangel-Vargas E, Torres-Vitela M, Villarruel-López A & Castro-Rosas J. 2012. Presence of some indicator bacteria and diarrheagenic *E. coli* pathotypes on jalapeño and serrano peppers from popular markets in Pachuca City, Mexico. *Food Microbiology* 32(2):444-447.

CISAN, 2012. Brotes de enfermedades transmitidas por alimentos en 2011, [Online].  
Disponible en:  
[http://www.cisan.org.ar/articulo\\_ampliado.php?id=173&hash=ba844db1cadff8ae52fa6d1c07de5019](http://www.cisan.org.ar/articulo_ampliado.php?id=173&hash=ba844db1cadff8ae52fa6d1c07de5019). Accesado: 18 Diciembre 2014.

Clermont O, Bonacorsi Sp & Bingen E. 2000. Rapid and Simple Determination of the *Escherichia coli* Phylogenetic Group. *Applied and Environmental Microbiology* 66(10):4555-4558.

Cockerill FR. 2011. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Twenty-first Informational Supplement. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).

Cortés-Ortiz IA, Rodríguez-Angeles G, Moreno-Escobar EA, Tenorio-Lara JM, Torres-Mazadiego BP & Montiel-Vázquez E. 2002. Brote causado por *Escherichia coli* en Chalco, México. *Salud pública de México* 44(4):297-302.

Cherry Lee. 2011. Genotyping *Escherichia coli* Isolates from Duck, Goose, and Gull Fecal Samples with Phylogenetic Markers using Multiplex Polymerase Chain Reaction for Application in Microbial Source Tracking. *J. Exp. Microbiol. Immunol.* (15): 130-135.

Darehabi HK, Naseri MH, 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. *Int J Entric Pathog* 1(1):2.

Donnenberg MS & Kaper JB. 1992. Enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infection and immunity* 60(10):3953.

Duriez P, Clermont O, Bonacorsi S, Bingen E, Chaventré A, Elion J, Picard B & Denamur E. 2001. Commensal *Escherichia coli* isolates are phylogenetically distributed among geographically distinct human populations. *Microbiology* 147(6):1671-1676.

Dyar OJ, Hoa NQ, Trung NV, Phuc HD, Larsson M, Chuc NTK & Lundborg CS. 2012. High prevalence of antibiotic resistance in commensal *Escherichia coli* among children in rural Vietnam. *BMC infectious diseases* 12(1):92.

Escobar-Páramo P, Menac'h L, Le Gall T, Amorin C, Gouriou S, Picard B, Skurnik D & Denamur E. 2006. Identification of forces shaping the commensal *Escherichia coli* genetic structure by comparing animal and human isolates. *Environmental microbiology* 8(11):1975-1984.

Estrada-Garcia T, Lopez-Saucedo C, Thompson-Bonilla R, Abonce M, Lopez-Hernandez D, Santos JI, Rosado JL, DuPont HL & Long KZ. 2009. Association of diarrheagenic *Escherichia coli* pathotypes with infection and diarrhea among Mexican children and association of atypical enteropathogenic *E. coli* with acute diarrhea. *Journal of clinical microbiology* 47(1):93-98.

Estrada-García T, Cerna JF, Paheco-Gil L, Velázquez RF, Ochoa TJ, Torres J & DuPont HL. 2005. Drug-resistant diarrheagenic *Escherichia coli*, Mexico. *Emerging infectious diseases* 11(8):1306.

Fagan PK, Hornitzky MA, Bettelheim KA & Djordjevic SP. 1999. Detection of Shiga-Like Toxin (stx1 and stx2), Intimin (eaeA), and Enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) Hemolysin (EHEC hlyA) Genes in Animal Feces by Multiplex PCR. *Applied and Environmental Microbiology* 65(2):868-872.

Figueira Vn, Serra E & Manaia CIM. 2011. Differential patterns of antimicrobial resistance in population subsets of *Escherichia coli* isolated from waste- and surface waters. *Science of The Total Environment* 409(6):1017-1023.

Gómez-Aldapa CA, Torres-Vitela M, Acevedo-Sandoval OA, Rangel-Vargas E, Villarruel-López A & Castro-Rosas A. 2013. Presence of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli*,

Enteroinvasive *E. coli*, Enteropathogenic *E. coli*, and Enterotoxigenic *E. coli* on Tomatoes from Public Markets in Mexico. *Journal of Food Protection* 76(9):1621-1625.

Gordon DM, Clermont O, Tolley H & Denamur E. 2008. Assigning *Escherichia coli* strains to phylogenetic groups: multi-locus sequence typing versus the PCR triplex method. *Environmental microbiology* 10(10):2484-2496.

Gordon DM & Cowling A. 2003. The distribution and genetic structure of *Escherichia coli* in Australian vertebrates: host and geographic effects. *Microbiology* 149(12):3575-3586.

Hamelin K, Bruant G, El-Shaarawi A, Hill S, Edge TA, Fairbrother J, Harel Je, Maynard C, Masson L & Brousseau R. 2007. Occurrence of virulence and antimicrobial resistance genes in *Escherichia coli* isolates from different aquatic ecosystems within the St. Clair River and Detroit River areas. *Applied and Environmental Microbiology* 73(2):477-484.

Harvey R. A., Champe P. C. y Fisher B. D., 2007. *Microbiología*. Lippincott Williams & Wilkins. 2ª Edición. pp 111-121, 291.

Hernández CC, Aguilera AMG & Castro EG. 2011. Situación de las enfermedades gastrointestinales en México.

Higgins J, Hohn C, Hornor S, Frana M, Denver M & Joerger R. 2007. Genotyping of *Escherichia coli* from environmental and animal samples. *Journal of microbiological methods* 70(2):227-235.

INFOSAN, 2012. Informe de actividades 2011-2012, [Online]. Disponible en: [http://www.who.int/foodsafety/fs\\_management/INFOSAN-ActivityReport2011-2012-Sp.pdf](http://www.who.int/foodsafety/fs_management/INFOSAN-ActivityReport2011-2012-Sp.pdf). Accesado: 18 Diciembre 2014.

Johnson JR, Sannes MR, Croy C, Johnston B, Clabots C, Kuskowski MA, Bender J, Smith KE, Winokur PL & Belongia EA. 2007. Antimicrobial drug-resistant *Escherichia coli* from

humans and poultry products, Minnesota and Wisconsin, 2002-2004. *Emerging infectious diseases* 13(6):838.

Johnson JR, Delavari P, Kuskowski M & Stell AL. 2001. Phylogenetic distribution of extraintestinal virulence-associated traits in *Escherichia coli*. *Journal of Infectious Diseases* 183(1):78-88.

Johnson JR, Goulet P, Picard B, Moseley SL, Roberts PL & Stamm WE. 1991. Association of carboxylesterase B electrophoretic pattern with presence and expression of urovirulence factor determinants and antimicrobial resistance among strains of *Escherichia coli* that cause urosepsis. *Infection and immunity* 59(7):2311-2315

Karimi Darehabi H, Naseri MH, 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. *Int J Entric Pathog* 1(1):1-4.

Labbé R. G. y García S., 2001. *Guide to foodborne pathogens*. Wiley-Interscience. pp. 373.

Lehti, T. A., Bauchart, P., Kukkonen, M., Dobrindt, U., Korhonen, T. K., & Westerlund-Wikström, B. 2013. Phylogenetic group-associated differences in regulation of the common colonization factor Mat fimbria in *Escherichia coli*. *Molecular microbiology*, 87(6), 1200-1222.

Lecointre G, Rachdi L, Darlu P & Denamur E. 1998. *Escherichia coli* molecular phylogeny using the incongruence length difference test. *Molecular biology and evolution* 15(12):1685-1695.

Lobersli I, Haugum K & Lindstedt Br-A. Rapid and high resolution genotyping of all *Escherichia coli* serotypes using 10 genomic repeat-containing loci. *Journal of microbiological methods* 88(1):134-139.

López-Campos G, Martínez-Suárez JV, Aguado-Urda M & López-Alonso V. 2012. Detection, Identification, and Analysis of Foodborne Pathogens. Microarray Detection and Characterization of Bacterial Foodborne Pathogens. Springer US. p. 13-32.

López-Cuevas O, Félix JL, Edeza MJ & Quiroz CC. 2009. Detección y resistencia a antibióticos de *Escherichia coli* Y Salmonella en agua y suelo agrícola. Revista Fitotecnia Mexicana (2):119-126.

López-Saucedo C, Cerna JF, Villegas-Sepulveda N, Thompson R, Velazquez FR, Torres J, Tarr PI & Estrada-García T. 2003. Single multiplex polymerase chain reaction to detect diverse loci associated with diarrheagenic *Escherichia coli*. Emerging infectious diseases 9(1):127.

Miles AA, Misra SS & Irwin JO. 1938. The estimation of the bactericidal power of the blood. Journal of Hygiene 38(06):732-749.

Mokracka J, Koczura R, Jablonska L & Kaznowski A. 2011. Phylogenetic groups, virulence genes and quinolone resistance of integron-bearing *Escherichia coli* strains isolated from a wastewater treatment plant. Antonie Van Leeuwenhoek 99(4):817-824.

Mosquito S, Ruiz J, Bauer JL & Ochoa TJ. Mecanismos moleculares de resistencia antibiótica en *Escherichia coli* asociadas a diarrea. Rev Peru Med Exp Salud Pública 28(4):648-656.

Mühldorfer, I., & Hacker, J. (1994). Genetic aspects of *Escherichia coli* virulence. Microbial pathogenesis, 16(3), 171-181.

Nataro, J. P., & Kaper, J. B. (1998). Diarrheagenic *Escherichia coli*. Clinical microbiology reviews, 11(1), 142-201.

- Nowrouzian FL, Wold AE & Adlerberth I. 2005. *Escherichia coli* strains belonging to phylogenetic group B2 have superior capacity to persist in the intestinal microflora of infants. *Journal of Infectious Diseases* 191(7):1078-1083.
- Nys S, Okeke IN, Kariuki S, Dinant GJ, Driessen C & Stobberingh EE. 2004. Antibiotic resistance of faecal *Escherichia coli* from healthy volunteers from eight developing countries. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 54(5):952-955.
- O'Sullivan J, Bolton D. J., Duffy G., Baylis C., Tozzoli R., Wasteson Y. y Lofdahl S. 2006. Methods for Detection and Molecular Characterisation of Pathogenic *Escherichia coli*. Pathogenic *Escherichia coli* Network (PEN).
- Paniagua-Contreras, G. L., Monroy-Pérez, E., & Vaca-Pacheco, S. (2007). Fenotipos de resistencia a antibióticos en cepas de *Escherichia coli* diarreogénicas detectadas en infantes mediante reacción en cadena de la polimerasa multiplex. *Revista Médica del Hospital General de México*, 70(4), 158-167.
- Paredes-Paredes M, Okhuysen PC, Flores J, Mohamed JA, Padda RS, Gonzalez-Estrada A, Haley CA, Carlin LG, Nair P & DuPont HL. 2011. Seasonality of diarrheagenic *Escherichia coli* pathotypes in the US students acquiring diarrhea in Mexico. *Journal of travel medicine* 18(2):121-125.
- Ray B. y Bhunia A., 2008. Fundamentos de microbiología de los alimentos. Ed. Mc Graw Hill. 4° Edición. pp. 352.
- Ríos-Torres. 2012. Caracterización de la resistencia a  $\beta$ -lactámicos y quinolonas en cepas de *E. coli* aisladas de la microbiota intestinal humana. Tesis Maestría en ciencias. BUAP.
- Rodríguez-Angeles, G. 2002. Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. *Salud pública de México*, 44(5), 464-475.

Rúgeles LC, Bai J, Martínez AJ, Vanegas MC & Gómez-Duarte OG. 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.

Russo TA & Johnson JR. 2000. Proposal for a new inclusive designation for extraintestinal pathogenic isolates of *Escherichia coli*: ExPEC. *Journal of Infectious Diseases* 181(5):1753-1754.

Sabaté M, Prats G, Moreno E, Ballesté E, Blanch AR & Andreu A. 2008. Virulence and antimicrobial resistance profiles among *Escherichia coli* strains isolated from human and animal wastewater. *Research in Microbiology* 159(4):288-293.

Solórzano-Santos, F., & Miranda-Navales, M. (1998). Resistencia de bacterias respiratorias y entéricas a antibióticos. *Salud pública de México*, 40(6), 510-516.

Souza V, Rocha M, Valera A & Eguiarte LE. 1999. Genetic Structure of Natural Populations of *Escherichia coli* in Wild Hosts on Different Continents. *Applied and Environmental Microbiology* 65(8):3373-3385.

Tenaillon O, Skurnik D, Picard B & Denamur E. 2010. The population genetics of commensal *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology* 8(3):207-217.

Torres, A. G., Zhou, X., & Kaper, J. B. (2005). Adherence of diarrheagenic *Escherichia coli* strains to epithelial cells. *Infection and immunity*, 73(1), 18-29.

Vidal JE, Canizález-Román A, Gutiérrez-Jiménez J & Navarro-García F. 2007. Patogénesis molecular, epidemiología y diagnóstico de *Escherichia coli* enteropatógena. *Salud pública de México* 49(5):376-386.

Vidal M, Kruger E, Durán C, Lagos R, Levine M, Prado V, Toro C & Vidal R. 2005. Single multiplex PCR assay to identify simultaneously the six categories of diarrheagenic *Escherichia coli* associated with enteric infections. *Journal of clinical microbiology* 43(10):5362-5365.

Wang R. F., Cao W. W. y Cerniglia C. E., 1997. A universal protocol for PCR detection of 13 species of foodborne pathogens in foods. *Journal of Applied Microbiology*, 83: 727–736.

Walk ST, Alm EW, Calhoun LM, Mladonicky JM & Whittam TS. 2007. Genetic diversity and population structure of *Escherichia coli* isolated from freshwater beaches. *Environmental microbiology* 9(9):2274-2288.

Young H-K. 1993. Antimicrobial resistance spread in aquatic environments. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 31(5):627-635.