

# UNIVERSIDAD DE CHILE



**FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS  
ESCUELA DE POSGRADO Y POSTÍTULO**

## **POTENCIAL PATOGENICO Y CLONALIDAD DE CEPAS DE *Escherichia coli* DIARREOGÉNICA AISLADAS DESDE HECES DE PERROS, GATOS Y HUMANOS.**

**MARÍA BELÉN VARGAS SALAS**

**Proyecto de tesis para optar al  
Título Profesional de Médico Veterinario y  
Grado de Magíster en  
Ciencias Animales y Veterinarias**

Profesor guía: Dra. Magaly Toro Ibaceta  
Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos (INTA)

**Santiago – Chile  
2022**

## **INFORME APROBACIÓN TESIS DE MAGÍSTER**

Se informa a la Dirección de Posgrado y Postítulo de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias que la Tesis de Magíster presentada por el candidato

**MARÍA BELÉN VARGAS SALAS**

**POTENCIAL PATOGENICO Y CLONALIDAD DE CEPAS DE *Escherichia coli* DIARREOGÉNICAS AISLADAS DESDE PERROS, GATOS Y HUMANOS.**

Ha sido aprobada por la Comisión Evaluadora como requisito para optar al grado de Magíster en Ciencias Animales y Veterinarias, en Examen de Defensa de tesis rendido el día \_ de \_\_\_\_ del 2022.

**Director De Tesis**

Dra. Magaly Toro Ibaceta .....

**Comisión Evaluadora**

Dra. Lisette Lapierre A. ....

Dr. Patricio Retamal M. ....

**Ministro de fe**

Dr. Pedro Ávalos P. ....

**Esta Tesis de grado se realizó en el Laboratorio de Microbiología y Probióticos del Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos (INTA) de la Universidad de Chile, bajo la dirección de la Dra. Magaly Toro del INTA y la comisión correctora constituida por la Dra. Lisette Lapierre y el Dr. Patricio Retamal ambos de la Facultad de Ciencia Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile.**

**Algunos resultados de la tesis fueron presentados en el XLI Congreso de la Sociedad de Microbiología de Chile, 2019 (SOMICH) y en la III Jornadas de Presentación de resultados de Estudiantes tesistas de postgrado del INTA 2019.**

*A mi abuelita Olga,  
quien me enseñó lo esencial,  
vivir el momento...*

## **Agradecimientos**

A mi profesora guía Magaly Toro, por creer en mis capacidades y entregarme las herramientas necesarias para mi formación, compartir sus conocimientos y sobre todo por su apoyo incondicional durante este proceso.

A mis profesores correctores, la Dra. Lisette Lapierre y al Dr. Patricio Retamal, por sus recomendaciones para mejorar la realización de mi tesis.

A la Dra. Daniela Iragüen, por apoyarme y poner fe en cada uno de mis proyectos que surgió a lo largo de este camino.

A las secretarias Carolina Barrera y Marianne Leporati, quienes siempre estuvieron disponibles para atender cualquier inquietud, incluso en tiempos de pandemia.

Al programa de Magíster en Ciencias Animales y Veterinarias de la Universidad de Chile, por contribuir económicamente y darme la oportunidad de pertenecer a dicho programa.

## Dedicatoria

*... A cada persona que fue parte de mi vida, en especial a los que ya no están.*

A mi hermano Sergio Vargas Salas quien ha sido mi motivación y fuente de inspiración, mi confidente y mejor amigo. Gracias por permitirme soñar y transformar mis sueños en realidad.

A mis padres Adriana Salas y Sergio Vargas, por entregarme los cimientos para mi desarrollo, permitirme acceder a una educación de calidad, y por inculcarme principios y valores. Por su esfuerzo constante y sus años de sacrificio, no me resta más que agradecer.

A mi tío Aquiles Salas y Mario Salas, quienes fueron un pilar fundamental durante mi formación, gracias por enseñarme sobre el amor incondicional.

A mi abuelita Olga, quien fue mi gran compañera y estoy segura, aunque ya no este, se que estaría orgullosa de mi.

A mis amigas Lina Trincado, Natalia Villalobos, Andrea Philp y Katherine Valdivia, quienes me han brindado su amistad, gracias por enseñarme que la amistad puede durar a través del tiempo.

A mi querida amiga Constanza Yañez, quien fue la primera persona en acogermme cuando comencé mi viaje universitario, y aunque en vida no pueda agradecerte, quiero plasmar en este documento el legado que dejaste en mí, "perseverar".

A mi amigo y camarada Sebastián Gutiérrez, gracias por compartir tu sabiduría, por animarme en momentos que lo necesite y por aceptarme como soy.

A mi amiga y maestra Leonela Díaz, quien me acogió durante mis comienzos en el INTA, gracias por tener la disposición de enseñarme y por ser parte de esta etapa de mi vida.

A mi equipo del laboratorio de Microbiología y Probióticos del INTA, con quienes compartí alegrías y frustraciones, pero sobretodo, quienes me enseñaron a trabajar en equipo.

*¡Gracias Totales!*

## Índice de contenidos

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
<b>2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>2</b>
<b>2.1 CARACTERÍSTICAS GENERALES Y CLASIFICACIÓN DE <i>ESCHERICHIA COLI</i></b> .....	<b>2</b>
<b>2.3 PATOTIPOS DE <i>ESCHERICHIA COLI</i> DIARREOGÉNICA: MECANISMOS DE PATOGENICIDAD, TRANSMISIÓN Y RESERVORIOS</b> .....	<b>3</b>
<b>2.2.1 <i>Escherichia coli</i> enteropatógena (EPEC)</b> .....	<b>3</b>
<b>2.2.2 <i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica (EHEC)</b> .....	<b>5</b>
<b>2.2.3 <i>Escherichia coli</i> enterotoxigénica (ETEC)</b> .....	<b>7</b>
<b>2.2.4 <i>Escherichia coli</i> enteroagregativa (EAEC)</b> .....	<b>10</b>
<b>2.2.5 <i>Escherichia coli</i> enteroinvasiva (EIEC)</b> .....	<b>11</b>
<b>2.2.6 <i>Escherichia coli</i> adherente difusa (DAEC)</b> .....	<b>13</b>
<b>2.3 POTENCIAL PATOGENICO DE <i>E. COLI</i> DIARREOGÉNICA</b> .....	<b>13</b>
<b>2.4 SITUACIÓN EPIDEMIOLÓGICA DE DEC EN CHILE Y EL MUNDO</b> .....	<b>17</b>
<b>2.5 <i>ESCHERICHIA COLI</i> DIARREOGÉNICA EN PERROS Y GATOS</b> .....	<b>20</b>
<b>2.6 HERRAMIENTAS DE CARACTERIZACIÓN Y TIPIFICACIÓN DE DEC</b> .....	<b>21</b>
<b>3. HIPÓTESIS</b> .....	<b>23</b>
<b>4. OBJETIVO GENERAL</b> .....	<b>23</b>
<b>5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	<b>23</b>
<b>6. MATERIAL Y MÉTODO</b> .....	<b>24</b>
<b>OBJETIVO ESPECÍFICO 1: IDENTIFICAR CEPAS DE <i>ESCHERICHIA COLI</i> DIARREOGÉNICA DESDE HECES DE PERROS, GATOS Y HUMANOS</b> .....	<b>24</b>
<b>OBJETIVO ESPECÍFICO 2: CARACTERIZAR FENOTÍPICAMENTE CEPAS DE <i>ESCHERICHIA COLI</i> DIARREOGÉNICA MEDIANTE ENSAYOS DE FORMACIÓN DE BIOPELÍCULAS Y RESISTENCIA ANTIMICROBIANA</b> .....	<b>29</b>
<b>OBJETIVO ESPECÍFICO 3: DETERMINAR LA RELACIÓN CLONAL ENTRE CEPAS DE <i>ESCHERICHIA COLI</i> DIARREOGÉNICA AISLADAS DESDE PERROS, GATOS Y HUMANOS</b> .....	<b>32</b>
<b>7. RESULTADOS</b> .....	<b>35</b>
<b>OBJETIVO ESPECÍFICO 1: IDENTIFICAR CEPAS DE <i>ESCHERICHIA COLI</i> DIARREOGÉNICA DESDE HECES DE PERROS, GATOS Y HUMANOS</b> .....	<b>35</b>
<b>OBJETIVO ESPECÍFICO 2: CARACTERIZAR FENOTÍPICAMENTE CEPAS DE <i>ESCHERICHIA COLI</i> DIARREOGÉNICA MEDIANTE ENSAYOS DE FORMACIÓN DE BIOPELÍCULAS Y RESISTENCIA ANTIMICROBIANA</b> .....	<b>37</b>
<b>OBJETIVO ESPECÍFICO 3: DETERMINAR LA RELACIÓN CLONAL ENTRE CEPAS DE <i>ESCHERICHIA COLI</i> DIARREOGÉNICA AISLADAS DESDE PERROS, GATOS Y HUMANOS</b> .....	<b>42</b>
<b>8. DISCUSIÓN</b> .....	<b>44</b>
<b>9. CONCLUSIÓN</b> .....	<b>54</b>
<b>10. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>55</b>

## Índice de Tablas

<b>Tabla 1.</b> Secuencia de partidores para la detección de genes de DEC mediante PCR múltiple y tamaño de amplicones.....	26
<b>Tabla 2.</b> Secuencia partidores para la detección de genes de ETEC mediante PCR múltiple y tamaño de amplicones.....	28
<b>Tabla 3.</b> Secuencia de partidador para la detección del gen <i>uspA</i> y tamaño de amplicones.....	29
<b>Tabla 4.</b> Categorías de formación de biopelículas según densidad óptica.....	31
<b>Tabla 5.</b> Perfil de virulencia identificados de aislados DEC provenientes de perros, gatos y humanos.....	37
<b>Tabla 6.</b> Categorización de aislados DEC según capacidad de formación de biopelículas y distribución según hospedero.....	38
<b>Tabla 7.</b> Distribución de aislados de <i>E. coli</i> diarreogénica formadoras de biopelículas asociado a patotipo.....	39
<b>Tabla 8.</b> Distribución de resistencia antimicrobiana de los 46 aislados de <i>E. coli</i> diarreogénica.....	40
<b>Tabla 9.</b> Patrones de multiresistencia en aislados de <i>E. coli</i> diarreogénica provenientes de perros, gatos y humanos.....	41

## Índice de Figuras

<b>Figura 1.</b> Porcentaje de muestras con aislados confirmados de E. coli diarreogénica obtenidos desde heces de perros, gatos y humanos (n= 737) ....	35
<b>Figura 2.</b> Aislados de E. coli diarreogénica confirmados por especie. ....	36
<b>Figura 3.</b> Porcentaje de muestras positivas a patotipos de E. coli diarreogénica identificados en perros, gatos y humanos. ....	36
<b>Figura 4.</b> Distribución de resistencia antimicrobiana de aislados EPEC y ETEC provenientes de perros, gatos y humanos. GE, gentamicina; SF, estreptomicina; AM, ampicilina; CT, ceftiofur; MRP, maropinem; AMC, amoxicilina/ac. Clavulánico; CTR, ceftriaxona; FOX, cefoxitin; STX, trimetropim/sulfametoxazol; SSS, sulfizoxazol; W, ácido nalidíxico; C, cloranfenicol; AZT, azitromicina; TE, tetraciclina; CIP, ciprofloxacino. ....	40
<b>Figura 5.</b> Patrones PFGE de 31 aislados EPEC provenientes desde perros, gatos y humanos. Dendrograma realizado con el programa BioNumerics, método UPGMA, coeficiente Dice 1%, Estandar: Salmonella entérica subsp. enterica serovar Braenderup. ....	43

## Resumen

*Escherichia coli* es una bacteria comensal de la microbiota intestinal de mamíferos, sin embargo, grupos patógenos pueden causar enfermedades diarreicas. Este grupo se ha identificado como *Escherichia coli* diarregénica (DEC) y es responsable del 30-40% de las enfermedades diarreicas, afectando principalmente a niños menores de 5 años. Una amplia gama de animales pueden ser reservorio de DEC, sin embargo, el rol de mascotas aún es desconocido. El objetivo del presente estudio fue evaluar el potencial patogénico de cepas de *Escherichia coli* diarregénica aisladas desde heces de perros, gatos y humanos, y analizar su relación genética. Se analizaron 320 muestras de heces provenientes desde humanos diarreicos, 230 de heces de perros sanos y 181 de heces de gatos sanos. La presencia de factores de virulencia fue determinada mediante la reacción en cadena de la polimerasa múltiple (mPCR). Además, se realizaron ensayos de formación de biopelículas y susceptibilidad antimicrobiana en los aislados DEC para evaluar su potencial patogénico. Finalmente, se determinó la relación clonal entre los aislados a través de Electroforesis por campo pulsado (PFGE). La tasa de aislamiento de DEC desde humanos sintomáticos fue de un 4,9%, en perros de 5,2% y en gatos de 9,9%, siendo EPEC el patotipo más prevalente en los tres hospederos. El 82,6% de los aislados formaron biopelículas, mientras que el 80,4% de los aislados presentó resistencia antimicrobiana. Ampicilina fue el antibiótico al que se presentó mayor resistencia, y 40,0% de los aislados presentó multiresistencia antimicrobiana. Finalmente, se identificó una alta diversidad con un Índice de Simpson de 0,96. Como conclusión, perros y gatos podrían ser reservorios de DEC, principalmente, EPEC potencialmente patógenas para los humanos, por lo que se debe seguir estudiando el rol de estas mascotas en la transmisión de estos patógenos.

## Abstract

*Escherichia coli* is a commensal bacterium of the mammalian intestinal microbiota; however, pathogenic groups can cause diarrheal diseases. This group has been identified as diarrheagenic *Escherichia coli* (DEC), and it is responsible for 30-40% of diarrheal diseases, mainly affecting children under five years. A wide range of animals can be reservoirs for DEC; however, the role of pets is still unknown. This study aimed to evaluate the pathogenic potential of diarrheagenic *Escherichia coli* isolated from dogs, cats, and human feces and analyze their genetic relationship. Samples from 320 diarrheic humans, 230 healthy dogs, and 181 healthy cats were analyzed. The presence of virulence factors was determined by the multiplex polymerase chain reaction (mPCR). In addition, DEC isolates were evaluated for biofilm formation and antimicrobial susceptibility assays to assess their pathogenic potential. Finally, the phylogenetic relationship among isolates was determined through PulsedField Electrophoresis (PFGE). DEC isolation rate from symptomatic humans was 4.9%, 5.2% in dogs, and 9.9% in cats; EPEC was the most prevalent pathotype in all the hosts. Most isolates (82.6%) formed biofilms, while 80.4% presented antimicrobial resistance. Ampicillin was the antibiotic with the highest resistance rate, and 40.0% of the isolates were multi-drug resistant. Finally, high diversity was identified among isolates, with a Simpson Index of 0.96. In conclusion, dogs and cats could be reservoirs of DEC, mainly EPEC, potentially pathogenic for humans; therefore, the role of these pets in the human transmission of these pathogens needs to be studied further.

# 1. Introducción

A nivel mundial, las enfermedades diarreicas son unas de las principales causas de morbilidad y mortalidad en la población infantil, provocando alrededor de 1,700 millones de episodios diarreicos al año, siendo los niños menores de cinco años los más afectados (OMS, 2017). En Latinoamérica, las enfermedades diarreicas agudas (EDA) son un problema de salud pública que afecta tanto a niños como adultos (Herrera-Benavente, 2018), identificando a *Escherichia coli* como una de las principales causas de diarrea de origen bacteriano (Farfán-García *et al.*, 2016).

*Escherichia coli* es un bacilo Gramnegativo, ubicuo, comensal de la microbiota intestinal de humanos y animales, y es uno de los primeros colonizadores del tracto gastrointestinal a las pocas horas del nacimiento. Sin embargo, algunas *E. coli* han adquirido factores de virulencia que le confieren atributos para causar un amplio espectro de enfermedades. Dentro de las *E. coli* patógenas, se encuentran las *E. coli* diarreogénicas (DEC). Se han descrito seis patotipos responsables de causar enfermedades entéricas/diarreicas en humanos, algunos de los cuales se han identificado tanto en animales sintomáticos como asintomáticos (Croxen *et al.*, 2013; Kaper *et al.*, 2004).

Si bien la literatura describe una amplia gama de animales como posibles reservorios de DEC (Croxen *et al.*, 2013), pocos estudios han explorado el potencial patogénico de cepas aisladas desde perros y gatos, por lo cual aún se desconoce el rol que cumplen estas mascotas en su transmisión a la población humana. Por esta razón, el presente estudio propone identificar y aislar DEC desde heces de perros, gatos y humanos para estudiar la relación entre los aislados y estimar la diversidad genética entre cepas desde diversos hospederos. Este estudio promoverá el conocimiento de si perros y gatos podrían ser reservorios de cepas de *Escherichia coli* potencialmente patógena y que están asociadas a infecciones humanas.

## 2. Revisión bibliográfica

### 2.1 Características generales y clasificación de *Escherichia coli*.

*Escherichia coli* es un bacilo Gramnegativo perteneciente a la familia Enterobacteriaceae, comensal de la microbiota intestinal de animales y humanos, siendo el principal organismo anaeróbico facultativo presente en el tracto intestinal de estos individuos, habitando inofensivamente en la capa mucosa de colon de mamíferos (Gomes *et al.*, 2016; Kaper *et al.*, 2004). Generalmente, *E. coli* posee flagelos periféricos, los que permiten su movilidad. Presenta un metabolismo fermentativo y respiratorio, comportándose como organismo oxidasa negativa. Por otra parte, corresponde a una bacteria no exigente, que prolifera fácilmente en medios simples de cultivo, ya que es capaz de utilizar glucosa y lactosa como fuentes de energía. Además, *E. coli* puede proliferar en presencia o ausencia de oxígeno, preferentemente a 37°C (Croxen *et al.*, 2013). También se caracteriza por su elevada plasticidad genética, describiéndose la existencia de clones de *E. coli* capaces de adquirir genes de virulencia. Estas características permiten que *Escherichia coli* presente gran versatilidad, siendo capaz de adaptarse a diferentes nichos, tanto intestinal como extraintestinal, pudiendo causar un amplio espectro de enfermedades. Debido a la elevada plasticidad genómica de esta bacteria para adquirir o perder genes, *E. coli* se ha clasificado en cinco grupos filogenéticos: A, B1, B2, D y E, con el fin de predecir el riesgo para la salud humana (Croxen *et al.*, 2013). La evidencia sugiere que organismos pertenecientes a un mismo grupo filogenético comparten características genotípicas, fenotípicas, nichos ecológicos y capacidad para causar enfermedades (Tenailon *et al.*, 2010).

Según el sitio de infección, *E. coli* patógena se clasifica en dos grandes grupos: *E. coli* diarreogénica (DEC) y *E. coli* extraintestinal (ExPEC) (Croxen *et al.*, 2013; Gomes *et al.*, 2016; Kaper *et al.*, 2004).

Como causa de infecciones entéricas, se han identificado cepas de *E. coli* con diferentes mecanismos patogénicos, asociados a la presencia de genes de virulencia específicos codificados por elementos genéticos móviles. Los grupos de cepas pertenecientes a una única especie que causen la misma enfermedad utilizando un conjunto en común de factores de virulencia se conocen como “patotipo”. Actualmente, dentro de las DEC se han descrito seis patotipos: *E. coli* enteropatógena (EPEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC) y *E. coli* de adherencia difusa (DAEC) (Croxen *et al.*, 2013; Gomes *et al.*, 2016; ISP 2012; Kaper *et al.*, 2004).

### **2.3 Patotipos de *Escherichia coli* diarreogénica: mecanismos de patogenicidad, transmisión y reservorios.**

#### **2.2.1 *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC)**

Se define a EPEC como aquellas cepas capaces de causar diarrea, producir una lesión histopatológica característica en la superficie de células epiteliales intestinales conocida como lesión de adherencia y borrado (A/E) y la incapacidad de producir toxinas Shiga, toxina termolábil (LT) y toxina termoestable (ST) (Gomes *et al.*, 2016). En base a la presencia o ausencia del plásmido asociado al factor de adherencia *E. coli* (pEAF), EPEC se clasifica en dos subtipos: típica (tEPEC) cuando presenta pEAF y atípica (aEPEC) cuando carece de este (Torres, 2017).

#### **a) Mecanismo patogénico**

La infección intestinal originada por EPEC altera la actividad fisiológica del enterocito, ya que aumenta la secreción de electrolitos hacia espacio extracelular, aumenta la permeabilidad de las uniones intra e intercelulares y se produce un cambio estructural en la región apical del enterocito, lo cual lleva a la pérdida de

la capacidad absorbente del enterocito, por lo cual se acumulan solutos a nivel de lumen intestinal, culminando con una diarrea acuosa (Farfán-García *et al.*, 2016)  
La alteración que sufre la célula intestinal ocurre mediante un mecanismo que consiste en tres eventos que ocurren simultáneamente:

1. Adherencia inicial al enterocito, la cual es superficial y no íntima. En el caso de tEPEC, está mediada principalmente por un pili tipo IV, denominada pili formador de bucles (BFP). BFP es codificado por el gen *bfpA*, el cual corresponde al primer gen del operón de 14 genes *bfp* contenido en el plásmido asociado al factor de adherencia *E. coli* (pEAF). Sin embargo, se describen otros factores capaces de contribuir a la adherencia de la bacteria a la superficie del epitelio intestinal del hospedero, por lo cual, si bien aEPEC no presenta pEAF, se describe que la presencia de estos factores como, por ejemplo, el factor inhibidor de linfocitos (LifA) codificado por el gen *lifA*, localizado en la isla de patogenicidad O122, contribuye a la adherencia de la bacteria a células epiteliales en ausencia de BFP.
2. Transducción de señales intracelulares mediada por un sistema secretor tipo III (T3SS), codificada en la isla de patogenicidad denominado “locus de borrado de enterocitos” (LEE). T3SS transloca diversas proteínas efectoras a la célula huésped, principalmente componentes del translocón (EspA, EspB y EspD), cuyos eventos de señalización generan diversas alteraciones en el epitelio intestinal.
3. Adhesión bacteriana íntima a las células epiteliales, generando la lesión A/E. Esta última fase está mediada por la unión de la proteína íntima, codificada por el gen *eae*, al receptor de íntima translocado (Tir), donde tanto el gen de la íntima como el de Tir (*tir*) se localizan en el LEE.

La unión entre intimina y Tir, genera la polimerización de actina alterando la morfología del citoesqueleto formando pedestales ricos en actina en donde aloja la bacteria, dañando microvellosidades intestinales las cuales pierden su funcionalidad (Farfán-García *et al.*, 2016). Lo anterior descrito, sumado a la capacidad de este organismo para inducir inflamación de la submucosa, conduce a la pérdida de la superficie de absorción, culminando en una diarrea secretora aguda (Croxen *et al.*, 2013; Gomes *et al.*, 2016; Poolman, 2017).

#### b) Transmisión y reservorios

La transmisión de EPEC se produce vía oro-fecal mediante contacto directo, fómites, secreciones y rara vez mediante consumo de alimentos y agua contaminadas. Los reservorios descritos para cepas de tEPEC comprende principalmente humanos, siendo las fuentes más comunes niños sintomáticos y asintomáticos y adultos asintomáticos, rara vez es encontrado en animales, mientras que cepas de aEPEC han sido aisladas desde humanos y diversas especies animales, sanos y diarreicos (Croxen *et al.*, 2013; Gomes *et al.*, 2016; Hu *et al.*, 2015).

#### **2.2.2 *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC)**

Se denomina *E. coli* productora de toxinas Shiga (STEC) o productora de Verotoxinas (VTEC) a cepas que poseen genes de toxina Shiga 1 y/o 2 (stx1 y/o stx2). Tanto Stx1 como Stx2, son codificados en prófagos que están integrados en el cromosoma. Estas toxinas son fundamentales para la patogenia del Síndrome hemolítico urémico (SHU), sin embargo, Stx2 está asociada con mayor frecuencia a cuadros severos (Croxen *et al.*, 2013).

Las infecciones por STEC son de gran importancia debido a su carácter zoonótico. Abarca una amplia gama de manifestaciones clínicas, desde diarreas

leves hasta manifestaciones más graves como colitis hemorrágica (CH) y síndrome hemolítico urémico (SHU) (Gomes *et al.*, 2016). Aquellas cepas capaces de producir CH y SHU se agrupan en el subconjunto EHEC, el cual se caracteriza por la presencia de factores de virulencia específicos que permiten la adhesión de estas bacterias al epitelio intestinal (Croxen *et al.*, 2013; Robins-Browne *et al.*, 2016).

El serogrupo más común identificado es O157, siendo el serotipo O157:H7 el de mayor importancia a nivel mundial debido a su alto impacto a la salud pública (ISP, 2017). Sin embargo, la identificación de serogrupos no O157 que cursan con enfermedades severas en humanos ha incrementado significativamente (Kanayama *et al.*, 2015; Torres, 2017). Dentro de los serogrupos no O157 comúnmente identificados en infecciones humanas se encuentra O26, O45, O103, O111, O121 y O145, conocidos como “Big Six” (Croxen *et al.*, 2013).

#### b) Mecanismo patogénico

El gen *eae*, ubicado en la isla de patogenicidad LEE, codifica la producción de intimina y del receptor transmembrana de intimina (Tir). Este receptor es traslocado por el sistema de secreción tipo 3 (T3SS) a la membrana de células de colon e íleon, permitiendo la unión de la proteína intimina a la membrana de la célula huésped. Luego de esta unión, mediante el T3SS se inyectan proteínas efectoras produciendo lesiones A/E, al igual que EPEC. Existen cepas de STEC LEE negativo, las cuales presentan otros factores de adherencia que aportan a la patogenicidad de la bacteria (Croxen *et al.*, 2013). Una vez que la bacteria se adhiere a la mucosa intestinal, STEC secreta toxinas Shiga (Stx), las cuales ingresan al torrente sanguíneo. La subunidad B de la toxina se une a la superficie de células endoteliales que expresan receptores gangliósido globotriaosilceramida (Gb3), estos receptores endocitan la toxina al interior de la

célula endotelial, en donde la subunidad A de la toxina altera la subunidad 28S ribosomal, induciendo a la inhibición de la síntesis proteica, culminando en apoptosis celular, lo cual conlleva a una microtrombosis del endotelio vascular en órganos blancos, principalmente intestino, riñón y sistema nervioso central (Croxen *et al.*, 2013; Gómez-Duarte, 2014; Newell *et al.*, 2018; Nguyen *et al.*, 2012).

### c) Transmisión y reservorios

La transmisión puede ser vía oro-fecal mediante el consumo de alimentos contaminados, cruzada o persona a persona, estimándose una dosis infectante de 10 organismos por ingestión (<100 UFC/g). Además, el contacto directo con animales portadores o sus heces, es una importante ruta de exposición a STEC (Croxen *et al.*, 2013; ISP, 2017). En Estados Unidos se reportó que, en humanos, un 14% de las enfermedades adquiridas causadas por patógenos entéricos se atribuía al contacto directo con animales, siendo STEC O157 y no O157 algunos de los patógenos involucrados (Hale *et al.*, 2012).

El mayor reservorio de STEC es el ganado bovino. La bacteria coloniza la unión recto-anal en estos animales, sitio impermeable a los efectos de las toxinas Shiga, contribuyendo a la persistencia y transmisión de este patógeno (Nguyen *et al.*, 2012). Además, se ha identificado STEC en otras especies, como porcinos, ovinos y caninos (Croxen *et al.*, 2013; Newell *et al.*, 2018).

### **2.2.3 *Escherichia coli* enterotoxigénica (ETEC)**

ETEC se define como aquel patotipo que comprende microorganismos capaces de producir al menos una de las dos enterotoxinas caracterizadas hasta el día de hoy, denominadas toxina termolábil (LT) y termoestable (ST), además de portar factores de colonización (CFs) que permiten la adherencia al epitelio intestinal

(Croxen *et al.*, 2013). Es el principal patógeno bacteriano responsable de diarrea infecciosa aguda en adultos que viajan desde países industrializados a países en desarrollo, también conocida como “diarrea del viajero”. Además, es el principal agente causal de enfermedades diarreicas en niños menores de 5 años, siendo el segundo patógeno asociado a tasas de alta mortalidad y morbilidad en este grupo etario, por lo cual, es considerado un importante patógeno bacteriano responsable de diarrea infantil (Croxen *et al.*, 2013; Gómez-Duarte, 2014).

#### b) Mecanismo patogénico

Inicialmente, ETEC se une a células epiteliales que recubren la mucosa del intestino delgado mediante la interacción de ciertos factores que promueven la colonización en este sitio. Estos factores, codificados por operones, pueden presentarse como estructuras fimbriales, no fimbriales, helicoidales o fibrilares, siendo conocidos como factores de colonización (CFs), identificándose alrededor de 22 CFs antigénicamente distintos (Croxen *et al.*, 2013). Una vez colonizado el intestino delgado, ETEC secreta y libera sus principales moléculas efectoras, las cuales son enterotoxinas codificadas por plásmidos, produciendo toxina termolábil (LT) y/o toxina termoestable (ST). LT es una holotoxina estructural y funcionalmente similar a la toxina del cólera, codificado en un plásmido de virulencia denominado *Ent*. Se clasifica en dos familias principales, LTI (común en humanos; se clasifica en LTh y LTp) y LTII, diferenciándose en la afinidad al hospedador y en la secuencia genética. LT está conformada por cinco subunidades B, las cuales se unen preferentemente a gangliósidos GM1 y GD1b de las células epiteliales del intestino delgado. Además, existe una subunidad A, que comprende dos dominios principales; el dominio A1, responsable de la toxicidad, y el dominio A2, responsable de anclar la subunidad A al centro de la subunidad B. La subunidad A y la subunidad B son codificados por el gen *eltA* y *eltB*, respectivamente, formando una sola unidad transcripcional contenida en el

operón *eltAB*. La secreción de LT, la cual depende del gen *leoA*, generalmente ocurre mediante vesículas. Una vez secretada la toxina, la subunidad B se une a los receptores de la célula diana, endocitando a LT, donde el péptido A1 de la subunidad A es el responsable de activar la adenilato ciclasa celular aumentando los niveles intracelulares de cAMP, lo que conlleva a la activación de la proteína quinasa A, la cual a su vez fosforila al regulador transmembrana de la fibrosis quística (CFTR), resultando en la activación del canal de cloro (Cl<sup>-</sup>). Esto promueve la salida de Cl<sup>-</sup> a la luz intestinal, en conjunto con la disminución de Na<sup>+</sup> y absorción de agua, lo que culmina en una diarrea acuosa característica de ETEC. Por otra parte, ST corresponde a pequeños péptidos ricos en cisteína, clasificándose en dos variantes según su fenotipo: STa (STI), identificado en humanos, la cual a su vez presenta dos variedades ST-Ia (STp, aislado principalmente en porcinos) y ST-Ib (STh, aislado principalmente en humanos), y STb (STII) identificado principalmente en animales. ST se produce como proteína precursora, esta se activa y se exporta al periplasma bacteriano, posteriormente exportándose a través de la membrana externa de *E. coli* mediante la proteína TolC hacia el lumen del intestino delgado, en donde la toxina se une reversiblemente al dominio extracelular de guanilato ciclasa (GC-C) de las células epiteliales, activando el dominio catalítico de GC-C, resultando la acumulación intracelular de cGMP, lo cual estimula la secreción de Cl<sup>-</sup> e inhibe la absorción de NaCl, manifestándose como una diarrea osmótica. Es decir, LT y ST, separados o combinados, inducen a un desbalance celular de agua y electrolitos contribuyendo a la patogénesis de ETEC (Croxen *et al.*, 2013; Gomes *et al.*, 2016; Gómez-Duarte, 2014).

#### b) Transmisión y reservorios

Infecciones por ETEC se transmiten vía oro-fecal, por consumo de agua o alimentos contaminados, sin embargo, la dosis de ETEC que causa la

enfermedad en personas sanas es relativamente alto, alrededor de  $1 \times 10^6$  a  $1 \times 10^8$  organismos (Croxen *et al.*, 2013). Se ha descrito que los humanos son reservorios de ETEC, aunque existen reportes de presencia de ETEC en animales sanos (CDC, 2014; Ibrahim *et al.*, 2015).

#### **2.2.4 *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC)**

Se define a EAEC como cepas capaces de inducir un patrón de adherencia agregativa (AA) en células epiteliales y no presentar marcadores genéticos de otros patotipos de DEC como EPEC, ETEC, EHEC y EIEC. Se clasifica en típica (tEAEC) y atípica (aEAEC) según presencia o ausencia de gen *aggR*, respectivamente (Croxen *et al.*, 2013; Gomes *et al.*, 2016; Gómez-Duarte, 2014). Sin embargo, el año 2011 se reportó un brote masivo de diarrea y SHU en Europa causado por una cepa de EAEC que adquirió el fago que codifica Stx2, denominándose *E. coli* enteroagregativa productor de toxinas Shiga (STEAECE), correspondiente al serotipo O104:H4 (Croxen *et al.*, 2013). EAEC produce diarrea acuosa autolimitante en la mayoría de los casos, identificándose tanto en niños como adultos en países en desarrollo y países industrializados. Al igual que ETEC, es una causa importante de la diarrea del viajero (Gomes *et al.*, 2016; Gómez-Duarte, 2014). La identificación de este patotipo como causa de diarrea en niños en países en desarrollo, ha ido en aumento. Además, se ha asociado a diarrea persistente e incluso muerte (Torres, 2017).

##### a) Mecanismo patogénico

La patogenia ocurre en tres etapas, la primera etapa corresponde a la adherencia inicial del agente a la superficie de la mucosa intestinal, el cual está mediado por el plásmido de virulencia pAA que codifica para fimbrias de adherencia agregada (AAF) necesarias para la adhesión y el gen regulador de transcripción que

promueve la expresión de factores de virulencia (*aagR*). Este plásmido es el encargado de producir la lesión AA. La segunda etapa consiste en la formación de biofilms principalmente en colon. Esta etapa está asociado a distintos genes, siendo el más estudiado el gen *aatA*. La formación de biofilms contribuye a la secreción de autotransportadores de serina proteasa de Enterobacterias (SPATEs), las cuales producen vesiculación de microvellosidades, abertura de criptas, extrusión de células epiteliales e incremento de la secreción de Cl<sup>-</sup>. La última etapa culmina con la inflamación de la mucosa intestinal, la cual se produce por reclutamiento de neutrófilos (Gomes *et al.*, 2016; Hebbelstrup *et al.*, 2014).

#### a) Transmisión y reservorios

La transmisión de EAEC es vía oro-fecal, mediante el consumo de alimentos y/o agua contaminados. Se describe al humano como reservorio de EAEC, recuperando cepas desde individuos aparentemente sanos, aunque también se reporta presencia de EAEC en animales diarreicos y sanos (Hebbelstrup *et al.*, 2014; Puño-Sarmiento *et al.*, 2013; Torres, 2017).

### **2.2.5 *Escherichia coli* enteroinvasiva (EIEC)**

Es un patógeno intracelular facultativo capaz de invadir la mucosa colónica que se caracteriza por estar estrechamente relacionado con *Shigella spp.* compartiendo características genéticas, bioquímicas y patogénicas, incluso considerando ambos patógenos como un único patotipo. Sin embargo, EIEC se diferencia de *Shigella* porque la primera presenta menor virulencia y expresa una reducida expresión de genes de virulencia. Por este motivo, si bien EIEC puede causar disentería bacilar o “Shigellosis” (enfermedad que se caracteriza por calambres abdominales, fiebre y diarrea sanguinolenta), EIEC generalmente se

asocia a episodios de menor severidad, como diarrea acuosa, la cual es indistinguible de las diarreas causadas por otros patotipos de DEC. También se describe como causa de colitis inflamatoria invasiva (Croxen *et al.*, 2013; Hosseini *et al.*, 2016; Kaper *et al.*, 2004).

#### a) Mecanismo patogénico

La patogenicidad de EIEC está determinada principalmente por dos elementos: i) el plásmido pInV, el cual porta genes que codifican el complejo TSS3, chaperonas (IpgA, IpgC, IpgE y Spa15), reguladores transcripcionales (VirF, VirB y MxiE), translocadores (IpaB, IpaC e IpaD) y alrededor de 25 proteínas efectoras; y ii) el cromosoma, que codifica para 5 a 7 sustratos dependientes del TSS3 de la familia IpaH y otros componentes independientes de TSS3. Estos factores de virulencia permiten a la bacteria penetrar células diana mediante vacuolas endocíticas, las cuales se lisan al interior de la célula epitelial, liberando la bacteria y multiplicándose a nivel intracelular, moviéndose en el citoplasma mediante microfilamentos de actina y extendiéndose a células epiteliales adyacentes, concluyendo en la destrucción celular (Croxen *et al.*, 2013; Kaper *et al.*, 2004; Torres, 2017).

#### b) Transmisión y reservorios

La transmisión de este patotipo de *E. coli* es vía oro-fecal mediante el consumo de agua y alimentos contaminados o contacto directo entre personas. Se describe al humano como único reservorio, ya que no se ha identificado animales como fuente de infección (Croxen *et al.*, 2013; Pasqua *et al.*, 2017).

### **2.2.6 *Escherichia coli* adherente difusa (DAEC)**

Las cepas de este patotipo se caracterizan por la formación de patrones de adherencia difusa lo que permiten la adhesión de la bacteria a la totalidad de la superficie de las células epiteliales, causando diarrea aguda en niños inmunológicamente deprimidos o desnutridos (Croxen *et al.*, 2013; ISP, 2012).

#### a) Mecanismo patogénico

La patogenicidad está dada por la adhesión de la bacteria a la superficie de las células epiteliales, esta adhesión esta mediada por adhesinas Afa/Dr, siendo las más comunes F1845 y Dr, las cuales se unen a DAF, una proteína que se expresa en gran parte de la superficie apical de las células epiteliales, induciendo a un reordenamiento del citoesqueleto y desamblando la actina F y la proteína vilina, resultando lesiones en los ribetes del epitelio intestinal, culminando en diarrea acuosa (Croxen *et al.*, 2013; Kaper *et al.*, 2004; Servin, 2014).

#### b) Transmisión y reservorios

Tanto la transmisión como posibles reservorios aún no están claramente definidos. Sin embargo, se reporta que DAEC se ha aislado desde individuos clínicamente sanos (Croxen *et al.*, 2013).

### **2.3 Potencial patogénico de *E. coli* diarreogénica**

Las enfermedades infecciosas causadas por DEC ocurren cuando el agente patógeno logra: a) colonizar el sitio de la mucosa, b) evadir las defensas del hospedero, c) multiplicarse y d) causar daño en el hospedero (Kaper *et al.*, 2004).

Para ello, las bacterias poseen distintos mecanismos de virulencia los cuales permiten que la bacteria se adapte al ambiente del hospedero y se establezca exitosamente como patógeno, siendo los principales mecanismos involucrados adherencia, invasión y citotoxicidad celular (Housseiny *et al.*, 2010; Kaper *et al.*, 2004).

La adherencia es una etapa inicial crítica en el inicio de una infección causada por DEC, la cual está dada por factores específicos de adherencia que permiten la colonización de esta bacteria a sitios que normalmente son inhabitables, identificándose distintos patrones de adherencia (Clements *et al.*, 2012). La invasión es una etapa en que la bacteria ingresa al interior de la célula blanco logrando sobrevivir y replicarse (Kaper *et al.*, 2004). También, existen bacterias capaces de secretar toxinas que alteran procesos fundamentales de las células eucariotas, causando daño y muerte de la célula hospedera. Estos mecanismos están dados por diversos factores de virulencia, permitiendo a la bacteria llevar a cabo distintas estrategias involucradas en el daño celular del hospedero dando origen a enfermedades (Housseiny *et al.*, 2010; Kaper *et al.*, 2004).

Por otra parte, se reportan mecanismos asociados a la persistencia de *E. coli* diarreogénica en el hospedero, por ejemplo, la formación de biopelículas (Culler *et al.*, 2014; Schiebel *et al.*, 2017; Sharma *et al.*, 2016). Las biopelículas son comunidades microbianas que habitan en una matriz polimérica extracelular de producción propia, conformada por exopolisacáridos (EPS), proteínas y ácidos nucleicos adheridos a superficies bióticas o abióticas. La formación de biopelículas de *Escherichia coli* es un proceso complejo que implica varias etapas: adhesión inicial, desarrollo temprano, maduración y dispersión (Schiebel *et al.*, 2017; Sharma *et al.*, 2016). La adhesión inicial o adherencia reversible puede ocurrir en superficies abióticas como metal, vidrio y plástico, y en superficies bióticas como epitelio y tejido celular. Esta etapa depende de factores

ambientales como temperatura, pH y fuerzas iónicas, y de propiedades de la bacteria, entre las que destaca la presencia de flagelo, el cual contribuye a la interacción entre *E. coli* y la superficie promoviendo el primer contacto para la adhesión. Luego ocurre el desarrollo temprano de biopelículas, la cual es una etapa íntima e irreversible en donde la síntesis del flagelo es reprimida a medida que ocurre la unión célula-superficie. Una vez que *E. coli* se adhiere firmemente a la superficie, comienza la etapa de maduración en donde las bacterias comienzan a agregarse mediante interacción célula-célula, y a su vez producen la matriz extracelular (MEC) proporcionando una estructura tridimensional a las biopelículas. Sumado a lo anterior, se describe que las biopelículas secretan sustancias autoinducidas capaces de ayudar a las bacterias que habitan en la matriz a secretar factores de virulencia, modular la respuesta inmune del huésped y acumular cambios genéticos. Finalmente, la etapa de dispersión comprende al desprendimiento de bacterias desde las biopelículas maduras con el objetivo de colonizar nuevas superficies (Sharma *et al.*, 2016). Por lo tanto, la formación de biopelículas es un mecanismo que contribuye a la sobrevivencia de bacterias promoviendo su persistencia tanto en el ambiente como en el organismo (Schiebel *et al.*, 2017).

Diferentes estudios han asociado bacterias formadoras de biopelículas a enfermedades crónicas, siendo una de estas la asociación entre *E. coli* enteroinvasiva (EIEC) y Enfermedades Intestinales Inflammatorias (IBD) (Chandra *et al.*, 2019; von Rosenvinge *et al.*, 2013), describiéndose que la formación de biopelículas conlleva a la expresión de componentes como curli, celulosa, pili tipo 1 y flagelina, implicados en la modulación del potencial inflamatorio de EIEC, estimulando la respuesta inmunitaria de la mucosa intestinal y modulando la función de la barrera epitelial mediante la interacción con los receptores tipo Toll (TLR), los receptores tipo NOD (NLR) y moléculas de adhesión celular relacionadas con el antígeno carcinoembrionario (CEACAM), proporcionando

mecanismos que contribuyen a la inflamación intestinal (Ellermann y Sartor, 2018). Por otro lado, también se ha descrito que la fuerte formación de biopelícula tiene un papel crucial en la patogénesis de EPEC (Slater *et al.*, 2018), la cual está mediada por Quorum-sensing (QS), el cual corresponde a un mecanismo de comunicación bacteriana que comprende la producción y detección de autoinductores (IA) (Sturbelle *et al.*, 2015). Dicho mecanismo, codificado por el gen supresor del inhibidor de división (*SdiA*), se potencia gracias a la presencia de estructuras fimbrias curli, fimbrias tipo I y celulosa codificado por los genes *csgA*, *fimA* y *bcsA*, respectivamente (Ruano-Gallego *et al.*, 2021). También se ha reportado que la asociación entre la secreción de IA desde biopelículas formadas por ETEC y la presencia de hormonas catecolaminas en el tracto gastrointestinal, aumentan la tasa de crecimiento de ETEC y la expresión de factores de virulencia (fimbrias F4 y LT), promoviendo su patogenicidad (Sturbelle *et al.*, 2015).

Otro mecanismo asociado a la persistencia de DEC es la resistencia antimicrobiana (RAM), dificultando el tratamiento de enfermedades causadas por estas bacterias. La RAM se define como la capacidad de un microorganismo para resistir la actividad bacteriostática y/o bactericida de un antimicrobiano, de modo que los tratamientos estándares se vuelven ineficaces, contribuyendo a la persistencia y propagación de microorganismos resistentes a antimicrobianos (Colosi *et al.*, 2020; Verraes *et al.*, 2013). Se describen cuatro mecanismos principales de resistencia antimicrobiana; 1) Limitación de la absorción de un fármaco; 2) Modificación del objetivo de un fármaco; 3) Inactivación de una droga; 4) Salida de una droga (Reygaert, 2018). Sin embargo, también se describe que las biopelículas podrían contribuir a la resistencia bacteriana frente al uso de antimicrobianos (Cepas *et al.*, 2019; Sharma *et al.*, 2016). Esto ocurre dado que las biopelículas protegen a las bacterias contra la penetración y acumulación de diversas sustancias nocivas, entre ellas, antibióticos en concentraciones eficaces, ya que la consistencia espesa y pegajosa de la matriz de la biopelícula

(contiene polisacáridos y proteínas) dificulta que los agentes antimicrobianos lleguen a las bacterias; por esta razón se necesitan concentraciones más altas para lograr el efecto deseado del antimicrobiano se necesitan concentraciones más altas. Sumado a esto, bacterias en la biopelícula tienden a ser sésiles, es decir, tienen una lenta tasa de metabolismo y división celular, por lo que los antimicrobianos que se dirigen a bacterias en crecimiento y división tienen poco efecto (Reygaert, 2018). Por otra parte, el uso indiscriminado de antimicrobianos tanto en clínica humana como veterinaria ha contribuido a la aparición de cepas multi-resistentes (MDR), las cuales se definen como cepas resistentes a dos o más familias antimicrobianas (Kumar y Khan, 2015). Estudios recientes han detectado resistencia de *E. coli* a diversos antimicrobianos, reportándose resistencia a la mayoría de las familias, como  $\beta$ -lactámicos, quinolonas y fluoroquinolonas, aminoglucósidos, tetraciclinas, fenicoles, sulfonamidas y trimetoprim, demostrándose una mayor resistencia a amoxicilina tanto en mascotas como en humanos (Poirel *et al.*, 2018; Puvača y de Llanos Frutos, 2021). En base a lo expuesto, la resistencia antimicrobiana se considera una amenaza para la salud humana, animal y el medio ambiente, motivo por el cual su estudio se ha abordado desde un enfoque de “Una Salud”, con la finalidad de diseñar nuevas estrategias para combatir este problema.

#### **2.4 Situación epidemiológica de DEC en Chile y el mundo**

A nivel mundial, la mayoría de los casos de diarrea originados por *E. coli* se deben al patotipo ETEC, sin embargo, otros patotipos como EPEC y, recientemente, EAEC, también han causado enfermedades significantes que afecta a la población (Torres, 2017). EPEC es el principal agente causal de diarrea en niños que habitan países en desarrollo como Chile, Brasil, Perú e Irán, causando un 5 a 10% de las diarreas. Además, tEPEC es la principal causa de diarrea endémica en niños menores a un año, originando entre un 30-40% de las diarreas infantiles.

Por otro lado, aEPEC se asocia tanto a diarrea aguda como persistente, siendo detectada en países en desarrollo y ciudades industrializadas, afectando a individuos de todas las edades (Gomes *et al.*, 2016; Hu *et al.*, 2015). En cuanto a ETEC, se reporta que este patotipo causa entre 280-400 millones de episodios diarreicos en niños menores de 5 años, de los cuales 325,000 resultan en muerte (Croxen *et al.*, 2013). Los individuos más susceptibles son niños de países en desarrollo o sectores que carecen de condiciones higiénicas, presentando una pobre salud pública. La incidencia de infecciones por ETEC en países en desarrollo decrece en niños de 5 años en adelante, a medida que la inmunidad natural se desarrolla luego de varios episodios de la enfermedad (Croxen *et al.*, 2013; Fleckenstein *et al.*, 2013). Estudios epidemiológicos reportan que cepas productoras de LT son aislados con mayor frecuencia desde individuos sanos, lo cual se asocia a la baja prevalencia de factores de colonización (CFs) (10%) en cepas de ETEC productoras de LT, en relación con cepas productoras de ST y LT/ST, las cuales presentan una prevalencia de CFs de un 60% y son identificados en individuos que cursan con diarrea. Por otra parte, los CFs presentes en animales son distintos a los presentes en humanos, por lo que, debido a la especificidad de estas adhesinas, las cepas de ETEC animal normalmente no infectan a humanos (Qadri *et al.*, 2005). Respecto a EHEC, el serotipo O157:H7 es una de las causas de infecciones adquiridas por alimentos más importante a nivel mundial, sin embargo, en países como Estados Unidos, se reporta una disminución en la incidencia de confirmación de este serogrupo. En contraste, se ha reportado un incremento en los casos de enfermedades causados por serogrupos no O157 a nivel mundial (Torres, 2017). EAEC es un patógeno emergente que afecta a niños y adultos a nivel mundial, causando diarrea persistente en niños en zonas donde la bacteria es endémica. Origina alta morbilidad en niños menores de 5 años, y causa diarrea persistente en pacientes infectados con el virus de inmunodeficiencia humana (VIH). Además, es uno de los agentes causales de diarrea del viajero (Croxen *et al.*, 2013; Gomes *et al.*,

2016; Torres, 2017). Por otra parte, EIEC afecta a individuos de cualquier grupo etario, causando ocasionalmente disentería, sin embargo, los casos reportados de EIEC están sub-representados debido a que individuos infectados pueden cursar con signos clínicos leves e incluso ser asintomáticos. Esto favorece la persistencia de la bacteria, ya que los individuos colonizados siguen excretando el patógeno, comportándose como una constante fuente de infección. En las últimas décadas, solo unos pocos casos de EIEC se han asociado a enfermedad en América Central, América del Sur, África y Asia (Croxen *et al.*, 2013; Pasqua *et al.*, 2017). DAEC se ha identificado en niños que cursan con diarrea en países como Chile, Brasil, Perú, México y Estados Unidos, afectando principalmente a niños menores de 5 años generando diarrea acuosa. Por otra parte, hasta el momento no existen reportes de afecciones en adultos (Croxen *et al.*, 2013; ISP, 2012).

En Chile, existen pocos estudios respecto a la situación epidemiológica de DEC, sin embargo, se identifica a aEPEC, ETEC y EHEC como los patotipos más frecuentemente identificados (Torres, 2017). Por otra parte, Vidal *et al.* (2005) encontraron EPEC en un 10.6% de niños menores de nueve años que cursaban con diarrea entre el año 2004-2005, presentando mayor prevalencia las cepas aEPEC (Vidal *et al.*, 2005). Mientras que durante el periodo 2010 – 2016, de un total de 2,196 cepas de origen, un 27.6% fue positiva a STEC, provenientes principalmente de la Región metropolitana, siendo el grupo etario más frecuentemente afectado niños entre 1 a 9 años, y los serotipos más frecuentes fueron O157:H7, O26:H11 y O26:H<sup>-</sup> (ISP, 2017).

## 2.5 *Escherichia coli* diarreogénica en perros y gatos

Se han identificado diversas fuentes de *E. coli* diarreogénica, siendo las heces humanas la fuente más frecuente de cepas de DEC, ya sea por transmisión directa de la mano a la boca o por el consumo de alimentos y agua contaminada (Croxen *et al.*, 2013). Además, se ha identificado las heces de animales como una fuente secundaria de infección humana para algunas cepas de DEC, principalmente de EHEC, sin embargo, estudios recientes se han enfocado en determinar el rol de los animales como reservorios de cepas patógenas de DEC, sobre todo el rol de animales de compañía como perros y gatos.

En animales, *Escherichia coli* es una de las principales causas de diarrea (Poirel *et al.*, 2018), identificándose frecuentemente el patotipo EPEC en perros y gatos diarreicos y asintomáticos (Goffaux *et al.*, 2000; Krause *et al.*, 2005; Puño-Sarmiento *et al.*, 2013). EPEC se ha asociado a mortalidad en gatitos (Watson *et al.*, 2017), mientras que en perros ha sido asociado a diarrea aguda y crónica (Sancak *et al.*, 2004). Por otra parte, estudios han determinado que gatos domésticos diarreicos y no diarreicos constituyen un reservorio natural de EPEC (Morato *et al.*, 2009).

También se ha identificado que cepas de aEPEC aisladas desde cachorros diarreicos son potencialmente zoonóticas (Arais *et al.*, 2018). En cuanto a STEC, este patotipo ha sido aislada desde caninos y felinos sanos (Zotta *et al.*, 2015). ETEC se ha identificado principalmente en perros sanos (Ibrahim *et al.*, 2015). Sin embargo, existen escasos estudios que determinen el potencial patogénico de cepas de DEC aisladas desde perros y gatos, y que determinen la relación existente entre cepas aisladas desde estas especies y humanos. Para estudiar esta relación, es necesario caracterizar y tipificar DEC aisladas desde estas mascotas.

## 2.6 Herramientas de caracterización y tipificación de DEC

La subtipificación de *E. coli* a través de la serotipificación ha sido de gran importancia, ya que ha permitido identificar que algunos serotipos están más asociados a enfermedad que otros (Fratamico *et al.*, 2016). Esta técnica de microbiología tradicional se realiza determinando los antígenos presentes en la superficie de la bacteria, los cuales corresponden principalmente a los antígenos O, el cual está determinado por la porción de polisacáridos del lipopolisacárido (LPS), y H, determinado por las proteínas flagelares. Cabe destacar que *E. coli* consta del antígeno K, el cual está determinado por el polisacárido capsular, sin embargo, este antígeno no se detecta rutinariamente. También existen otros antígenos que se utilizan para caracterizar cepas, por ejemplo, el antígeno F o fimbrial, el cual cobra importancia en la caracterización de *Escherichia coli* enterotoxigénica de origen animal. En base a lo anterior, se reporta la existencia de 182 antígenos O y 53 antígenos H, resultando un número considerable de posibles combinaciones (Croxen *et al.*, 2013; Fratamico *et al.*, 2016; Gyles y Fairbrother, 2010). Sin embargo, con el fin de investigar el origen de brotes de enfermedades, es que se ha incursionado en el desarrollo de técnicas moleculares de subtipificación como, por ejemplo, la Electroforesis en Campo Pulsado (PFGE). Esta técnica corresponde al “gold standard” de subtipificación, ya que es altamente discriminatoria. Se ha utilizado para reconocer brotes de infección, detectar transmisión cruzada de patógenos, identificar la fuente de infección y la identificación de cepas virulentas. Mediante el análisis de los patrones de PFGE, se han podido determinar las similitudes genéticas entre los aislamientos, logrando establecer la existencia de relación clonal entre cepas (Bernal *et al.*, 2013).

En Chile, existen pocos estudios respecto a la identificación de los patotipos de *E. coli* diarreogénicas, y los reportes existentes están principalmente basados en

humanos. Sin embargo, según la información descrita en la literatura, animales de compañía podrían jugar un importante rol como reservorios zoonóticos de cepas de DEC. Es por esta razón que este estudio propone evaluar el potencial patogénico y clonalidad de cepas DEC aisladas desde heces de perros, gatos y humanos.

### **3. Hipótesis**

Perros y gatos son reservorios de cepas de *Escherichia coli* diarreogénica potencialmente patógenas asociadas a infección humana.

### **4. Objetivo General**

Evaluar el potencial patogénico de cepas de *Escherichia coli* diarreogénica aisladas desde heces de perros, gatos y humanos, y analizar su relación genética.

### **5. Objetivos específicos**

1. Identificar cepas de *Escherichia coli* diarreogénica desde heces de perros, gatos y humanos.
2. Caracterizar fenotípicamente cepas de *Escherichia coli* diarreogénica mediante ensayos de formación de biopelículas y resistencia antimicrobiana.
3. Determinar la relación clonal entre cepas de *Escherichia coli* diarreogénica aisladas desde heces de perros, gatos y humanos.

## 6. Materiales y Métodos

**Objetivo específico 1: Identificar cepas de *Escherichia coli* diarreogénica desde heces de perros, gatos y humanos.**

### a) Selección de muestras

Las muestras de perros y gatos fueron facilitadas por el Laboratorio de Diagnóstico de Agentes Infecciosos de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile, y correspondían a una alícuota de caldo Trypticase de Soya en la que se incubó una muestra fecal obtenida por tórula anal. Las muestras provenían desde individuos clínicamente sanos residentes en la ciudad de Santiago, Región Metropolitana, los cuales no estaban bajo la administración de antimicrobianos. En total se analizaron 230 muestras de perros y 181 muestras de gatos.

Las muestras provenientes de humanos fueron donadas por el Hospital Naval de Valparaíso, y consistían en el material bacteriano (desarrollado en placas de agar MacConkey) suspendido en suero fisiológico con 20% de glicerol. El material bacteriano provenía desde deposiciones de individuos que estaban cursando con cuadros diarreicos contando con un total de 326 muestras.

### b) Extracción de ADN

Las muestras provenientes desde perros y gatos se sembraron por agotamiento en placas de Agar MacConkey (Difco®), las cuales se incubaron a 37°C por 18-24 horas. Luego, se resembraron en placas de Agar Trypticase de Soya (Difco®) y se incubaron a 37°C por 18-24 horas. Se tomó material bacteriano desde la zona de crecimiento confluyente y se resuspendió en 1.000 µL de suero fisiológico. La extracción de ADN se realizó mediante la técnica de hervido (10 minutos a 100°C y recuperación del sobrenadante luego de centrifugado a 10.000 rpm) y se guardaron 400 µl del sobrenadante a -20°C. En cuanto a las muestras

provenientes desde humanos, estas se sometieron a cuatro lavados con suero fisiológico (NaCl 0,9%) antes de realizar la extracción de ADN desde las placas de agar MacConkey, con la técnica del hervido.

Finalmente, la detección de los genes de virulencia asociado a los patotipos de DEC se realizó mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

#### c) Tamizaje de las muestras

Para el tamizaje, la identificación de EPEC, EHEC, DAEC, EIEC y EAEC se realizó mediante la detección de diez genes de virulencia (Tabla 1), a través de la técnica de PCR múltiple descrita por Vidal *et al.* (2005). La reacción se realizó en un volumen final de 25  $\mu$ L compuesto por: 12,5  $\mu$ L de GoTaq® Green Master Mix 2X (Promega, Wisconsin USA; 400  $\mu$ M dATP, 400  $\mu$ M dGTP, 400  $\mu$ M dCTP, 400  $\mu$ M dTTP, 3 mM MgCl<sub>2</sub> y 2X Green GoTaq® reacción buffer), 1 pmol de cada primer (10 primers distintos) y 1,5  $\mu$ L de ADN templado, completando el volumen final con agua libre de nucleasas. Como control negativo se utilizó agua libre de nucleasas y como control positivo ADN de cepas EHEC, EPEC, ETEC, EIEC, EAEC y DAEC donadas por el Prof. Roberto Vidal de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile. El programa de amplificación consistió en una denaturación inicial a 94°C por 90 segundos, seguido de 35 ciclos de denaturación a 94°C por 60 segundos, alineamiento a 60°C por 60 segundos y una etapa de elongación a 72°C por 60 segundos, finalizando con una etapa de elongación final a 72 °C por 10 minutos.

Los productos de PCR se visualizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1,5% teñido con el reactivo GelRed® (Nucleic Acid Gel Stain, 10,000X; Biotium). Las condiciones de corrida fueron 100 V por 30 minutos, y se utilizó un marcador de tamaño molecular de 100pb (AccuRuler 100 pb plus DNA RTU Ladder,

MAESTROGEN). Los amplicones se verificaron bajo luz ultravioleta basándose en el tamaño del producto amplificado indicado por Vidal *et al.* (2005) (Tabla 1).

**Tabla 1.** Secuencia de partidores para la detección de genes de DEC mediante PCR múltiple y tamaño de amplicones.

Gen	Partidor	Secuencia 5´- 3´	Tamaño del amplicón (pb)
<b>stx1</b>	<i>stx1</i> F	CAGTTAATGTGGTGGCGAAGG	348
	<i>stx1</i> R	CACCAGACAATGTAACCGCTG	
<b>stx2</b>	<i>stx2</i> F	ATCCTATTCCCAGGAGTTTACG	584
	<i>stx2</i> R	GCGTCATCGTATACACAGGAGC	
<b>eae</b>	<i>eae</i> F	TCAATGCAGTTCCGTTATCAGTT	482
	<i>eae</i> R	GTAAAGTCCGTTACCCCAACCTG	
<b>bfp</b>	<i>bfp</i> F	GGAAGTCAAATTCATGGGGGTAT	300
	<i>bfp</i> R	GGAATCAGACGCAGACTGGTAGT	
<b>stII</b>	<i>stII</i> F	AAAGGAGAGCTTCGTACATTTT	129
	<i>stII</i> R	AATGTCCGTCTTGCGTTAGGAC	
<b>lt</b>	<i>lt</i> F	GCACACGGAGCTCCTCAGTC	218
	<i>lt</i> R	TCCTTCATCCTTTCAATGGCTTT	
<b>virF</b>	<i>virF</i> F	AGCTCAGGCAATGAAACTTTGAC	618
	<i>virF</i> R	TGGGCTTGATATTCCGATAAGTC	
<b>ipaH</b>	<i>ipaH</i> F	CTCGGCACGTTTTAATAGTCTGG	933
	<i>ipaH</i> R	GTGGAGAGCTGAAGTTTCTCTGC	

<b>daaE</b>	<i>daaE</i> F	GAACGTTGGTTAATGTGGGGTAA	542
	<i>daaE</i> R	TATTCACCGGTCGGTTATCAGT	
<b>aafII</b>	<i>aafII</i> F	CACAGGCAACTGAAATAAGTCTGG	378
	<i>aafII</i> R	ATTCCCATGATGTCAAGCACTTC	

Debido a que no fue posible la amplificación de los genes *stII* y *lt* asociados al patotipo ETEC con la técnica propuesta por Vidal *et al.* (2005), la identificación de este patotipo se realizó utilizando la PCR descrita por Nguyen *et al.* (2011) (Tabla 2). La reacción de PCR se realizó en un volumen final de 25 µl compuesto por: 12.5 µL de GoTaq® Green Master Mix 2X (Promega), 6 pmol de los partidores *lt*-F y *lt*-R, 5 pmol de los partidores *st*-F y *st*-R y 3 µl de ADN templado. El total del volumen se completó con agua libre de nucleasas. Como control negativo se utilizó agua libre de nucleasas, y como control positivo la cepa ETEC utilizada en la técnica descrita anteriormente. El programa de amplificación consistió en una denaturación inicial a 94°C por 6 minutos, seguido de 35 ciclos, donde cada ciclo consideró una denaturación a 94°C por 50 segundos, alineamiento a 57°C por 40 segundos y elongación a 72°C por 50 segundos. El programa finalizó con una etapa de elongación final a 72°C por 5 minutos. Los productos de PCR se visualizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1.8% teñido con el reactivo GelRed®. Las condiciones de corrida fueron 100 V por 30 minutos, utilizando un marcador de tamaño molecular de 100pb (MAESTROGEN). Los amplicones se identificaron bajo luz ultravioleta basándose en el tamaño del producto amplificado indicado por Nguyen *et al.* (2011) (Tabla 2).

**Tabla 2.** Secuencia primarios para la detección de genes de ETEC mediante PCR múltiple y tamaño de amplicones

Gen	Partidor	Secuencia 5'-3'	Tamaño del amplicón (pb)
<i>lt</i>	<i>lt</i> -F	ATTTACGGCGTTACTATCCTC	281
	<i>lt</i> -R	TTTTGGTCTCGGTCAGATATG	
<i>st</i>	<i>st</i> -F	GCTAATGTTGGCAATTTTTCTTC	190
	<i>st</i> -R	AGGATTACAACAAAGTTCACAGCAGTAA	

#### d) Aislamiento de DEC

A partir de cada muestra positiva al tamizaje, se seleccionarán 20 colonias provenientes desde placas de Agar MacConkey y se resembraron en placas de Agar Tripticasa de Soya. Posteriormente, se realizó la extracción de ADN a cada colonia de manera individual mediante la técnica de hervido, y se realizó la PCR anteriormente descrita para confirmar la presencia de los genes de virulencia asociados a DEC. Las cepas positivas a uno o más genes de virulencia asociados a los patotipos de DEC utilizados en este estudio se guardaron a -80°C en caldo Tripticasa de Soya con glicerol al 20% para análisis posteriores. Los aislados se confirmaron como *Escherichia coli* a través de PCR mediante la identificación del gen *uspA* (Chen y Griffiths, 1998). La reacción de PCR incluyó 0,3 µM de cada uno de los primarios *E. coli* (Tabla 3), 10 µL de GoTaq (GoTaq® Green Master mix, 2X, Promega; Madison Wisconsin, EEUU), 5 µL de agua libre de nucleasas y 1 µL de ADN de muestra para una reacción final de 17 µL.

**Tabla 3.** Secuencia de partidor para la detección del gen *uspA* y tamaño de amplicones

Gen	Partidor	Secuencia 5'-3'	Tamaño del amplicón (pb)
<i>uspA</i>	<i>uspA-F</i>	CCGATACGCTGCCAATCAGT	884
	<i>uspA-R</i>	ACGCAGACCGTAGGCCAGAT	

e) Análisis de resultados

El análisis de resultados se realizó de forma descriptiva. Los datos se tabularon en la plataforma Excel, y se describió la frecuencia del perfil genético de los aislados de DEC en cada especie estudiada.

**Objetivo específico 2: Caracterizar fenotípicamente cepas de *Escherichia coli* diarreogénica mediante ensayos de formación de biopelículas y resistencia antimicrobiana.**

2. Ensayo de formación de biopelículas

Se detectó y cuantificó la capacidad de formación de biopelículas en superficies abióticas de cepas DEC mediante la técnica descrita por Uhlich *et al.* (2006) con algunas modificaciones. Se tomó una colonia característica de *E. coli* desde placa agar MacConkey y se inoculó en caldo Luria Bertani (LB), el cual se incubó a 37°C por 18-24 horas. Posteriormente se ajustó la densidad óptica (OD) de los cultivos a  $OD_{600nm}=0,5$  mediante espectrofotometría y se añadió 200 µL de suspensión bacteriana a pocillos de las microplacas de poliestireno (96 pocillos) utilizando tres pocillos por aislado (ensayo en triplicado técnico). Las microplacas se incubaron a 37°C por 24 horas. Luego, se eliminó el sobrenadante de los

pocillos y las placas se lavaron agregando 200  $\mu$ L de agua destilada a cada pocillo, este procedimiento se realizó tres veces. Las bacterias adheridas se fijaron con 250  $\mu$ L de metanol por 15 minutos a temperatura ambiente, luego se eliminó el contenido y se dejó secar por 10 minutos. Finalmente, se realizó la tinción con 200  $\mu$ L de solución cristal violeta 1% (p/v) y se incubó por 15 minutos a temperatura ambiente, se lavó tres veces con 200  $\mu$ L de agua destilada y se disolvió el colorante unido a la biopelícula con etanol 95%. El ensayo se realizó 3 veces (replicas biológicas).

La cuantificación de biopelículas se realizó mediante el método colorimétrico de microtitulación en placa, basado en la medición de la absorbancia de la película teñida con cristal violeta con una  $OD_{620nm}$  de cada pocillo usando el lector de placas de ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA).

Las cepas se agruparon en cuatro categorías según la densidad óptica de corte obtenida a partir de los pocillos control negativo (ODc) (LB sin sembrar) (Stepanovic *et al.*, 2007) (Tabla 4). Como control positivo se utilizó la cepa de referencia *E. coli* ATCC 35150.

El análisis estadístico se realizó mediante la herramienta bioinformática R. Se determinó la asociación entre formación de biopelículas/hospedero y asociación entre formación de biopelículas/patotipo utilizando la prueba exacta de Fisher. Las diferencias se consideraron significativas cuando  $p < 0,05$ .

**Tabla 4.** Categorías de formación de biopelículas según densidad óptica

Categoría de formación de biopelículas	Densidad óptica (OD)
No formadoras	OD cepas $\leq$ ODc
Débil	ODc $\leq$ OD cepa $\leq$ 2 x ODc
Moderada	2 x ODc $\leq$ OD cepa $\leq$ 4 x ODc
Fuerte	OD cepa $>$ 4 x ODc

## 2. Resistencia Antimicrobiana

Mediante la técnica de difusión en disco Kirby-Bauer (Patel, 2015) se determinó la susceptibilidad *in vitro* de los aislados de DEC a quince antibióticos utilizados tanto en animales como en humanos. En primer lugar, se preparó el inóculo desde colonias provenientes de un cultivo puro de 16-18 horas de incubación en agar tripticasa de soya (TSA). Se realizó una suspensión de cada cultivo y se ajustó la  $OD_{620nm}=0,8$ , mediante espectrofotometría. Luego se inocularon las placas de agar Mueller Hinton (MHA) para cada cultivo con un hisopo estéril. Se utilizaron sensidiscos de amoxicilina-clavulánico (AMC) 20/10  $\mu$ g, ciprofloxacino (CIP) 5  $\mu$ g, gentamicina (GE) 10  $\mu$ g, ampicilina (AM) 10  $\mu$ g, tetraciclina (TE) 30  $\mu$ g, trimetropim-sulfametoxazol (STX) 1.25/23.75  $\mu$ g, maropinem (MRP) 10  $\mu$ g, cloranfenicol (C) 30  $\mu$ g y ceftiofur (CT) 30  $\mu$ g, ceftriaxona (CTR) 30  $\mu$ g, cefoxitin (FOX) 30  $\mu$ g, estreptomycin (SF) 10  $\mu$ g, azitromicina (AZT) 15  $\mu$ g, ácido nalidíxico (W) 30  $\mu$ g y sulfisoxazole (SSS) 250  $\mu$ g.

Para la técnica se utilizó como cepa control *E. coli* ATCC 25922. La lectura e interpretación de los resultados de la sensibilidad antimicrobiana se realizó mediante la medición en milímetros de los halos de inhibición siguiendo las

pautas indicadas en el Manual M100 S25 y VET08 ED4 del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (Patel, 2015).

La sensibilidad antimicrobiana se clasificó en tres categorías: sensible (S), intermedia (I) y resistente (R). Según estos resultados, las cepas de DEC se agruparon en cepas susceptibles (sensibles) y cepas que presentaron susceptibilidad reducida (intermedia y resistente). Los resultados se analizaron descriptivamente utilizando la herramienta Excel. Además, se determinó la asociación entre multiresistencia y hospederos (perros, gatos y humanos) mediante la prueba exacta de Fisher a través de la herramienta estadística R.

**Objetivo específico 3: Determinar la relación clonal entre cepas de *Escherichia coli* diarreogénica aisladas desde perros, gatos y humanos.**

Dado que EPEC fue el patotipo predominante en perros, gatos y humanos, sumado al impacto que genera este patotipo en estas especies, se determinó si los aislados provenientes de mascotas estaban relacionadas con los de humanos mediante Electroforesis de campo pulsado (PFGE) utilizando la enzima de restricción XbaI, permitiendo relacionar cepas con características iguales en diferentes hospederos.

La técnica de PFGE, se llevó a cabo de acuerdo con el protocolo disponible por el Centro de Control y Prevención de Enfermedades (CDC) para *E. coli* no O157:H7 productora de toxina Shiga (CDC, 2017).

En primer lugar, se preparó la suspensión celular, ajustando la concentración bacteriana a una  $OD_{610nm}=0,8-1$ , posteriormente se procedió a la preparación y moldeado de los plugs preparando un total de 4 plugs por muestra. La lisis celular en plugs de agarosa se realizó utilizando una master mix de lisis (50 mM Tris: 50mM EDTA; pH 8 + sarcosina 1% + 0,1 mg/mL de Proteinasa K), los plugs se incubaron en un baño de agua a 54°C con agitación constante (175 rpm) por 2 h.

Luego de la incubación se procedió a los lavados de los plugs y posteriormente se realizó la digestión restrictiva del ADN utilizando la enzima de restricción *Xba*I (Thermo Scientific®) incubándose a 37°C por 2 h. Transcurrido este tiempo, se procedió a preparar el gel de agarosa de bajo punto de fusión (Seakem Gold 1%) con los plugs y se realizó la corrida del gel utilizando CHEF III Pulsed-Field System (Bio-Rad) en buffer TBE 0.5% (Tris 45 mM, ácido bórico 45 mM, EDTA 1 mM; pH 8.0). Los parámetros se establecieron con el tiempo de conmutación inicial en 2,2 s, el tiempo de conmutación final en 54,2 s, un voltaje de 6V y una duración de 19 h. Como control estándar para normalizar las bandas se utilizó *Salmonella serotipo Braenderup* H9812.

La visualización de las bandas se realizó mediante la tinción del gel con GelRed® y la documentación se realizó a través de fotografías archivadas en formato *tiff*. Las imágenes de archivo fueron procesadas por el software BioNumerics (Applied Maths BVBA, Kortrijk, Bélgica), el cual ofrece una plataforma integrada para el análisis de fingerprints mediante motores de base de datos, permitiendo almacenar información epidemiológica e imágenes del gel e identificando las similitudes de patrones dactilares obtenidas por PFGE. Para ello, esta herramienta corrige las distorsiones que ocurren durante la electroforesis mediante la normalización de los patrones de PFGE entre diferentes geles. El análisis de fingerprints para determinar la similitud de los patrones PFGE se realizó mediante el coeficiente de Dice, el cual corresponde a un estadístico que se basa en la comparación de bandas en posiciones específicas utilizando la teoría de la probabilidad para determinar si dichas bandas son similares o distintas. El cálculo del coeficiente Dice se realizó con un índice de tolerancia de 1%, definido como el desplazamiento máximo permitido de la longitud del patrón entre dos bandas, y que considera la coincidencia de dichas bandas.

La construcción del dendrograma se realizó mediante el método UPGMA; este es un algoritmo de agrupación jerárquica que se basa en la búsqueda de la

distancia más pequeña en la matriz de distancias genéticas y el agrupamiento de las unidades que la conforman como una sola unidad taxonómica independiente. Una vez identificadas estas distancias, se calculan los promedios de la nueva unidad contra las restantes generando una nueva matriz y se repite el proceso hasta que todas las unidades quedan unidas. Los aislamientos se consideraron relacionados genéticamente cuando presentaron un índice de similitud igual o mayor a un 85% (Yokoyama y Uchimura, 2006).

Por último, se cuantificó la diversidad de EPEC mediante el Índice de diversidad de Simpson, el cual refleja la probabilidad de que dos organismos muestreados pertenezcan a un mismo filotipo. La puntuación del índice de Simpson varía entre 0 y 1, en donde una puntuación más cercana a 1 indica una mayor diversidad (Bent y Forney, 2008). Para ello este índice se calcula de la siguiente forma:

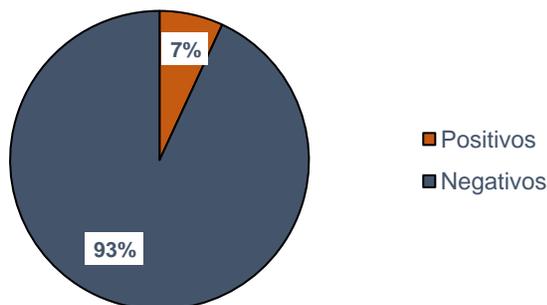
$$D = 1 - \frac{1}{N(N-1)} \sum_{j=1}^S n_j(n_j-1)$$

En donde  $N$  corresponde al número total de cepas,  $s$  el número de diferentes tipos y  $n_j$  la frecuencia de  $j$ -ésimo tipo.

## 7. Resultados

### Objetivo específico 1: Identificar cepas de *Escherichia coli* diarreogénica desde heces de perros, gatos y humanos.

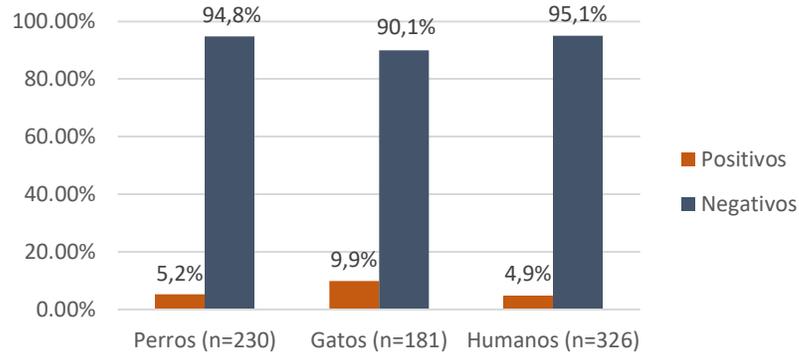
De un total de 737 muestras de heces analizadas provenientes de perros (n=230), gatos (n=181) y humanos (n=326), 13,0% (96/737) fueron sospechosas a patotipos de *E. coli* diarreogénicas. Un 9,1% (21/230) de las muestras provenientes desde perros fueron sospechosas a DEC, mientras que en el caso de los gatos se obtuvo un 13,3% (24/181) de muestras sospechosas. En el caso de las muestras provenientes de humanos un 15,6% (51/326) fueron sospechosas a DEC. Las muestras sospechosas, fueron sometidas a PCR confirmatorio obteniendo finalmente un total de 46 (6,2%) aislados que fueron positivos a genes de virulencia en estudio y confirmadas como *E. coli* diarreogénica (Figura 1).



**Figura 1.** Porcentaje de muestras con aislados confirmados de *E. coli* diarreogénica obtenidos desde heces de perros, gatos y humanos (n= 737)

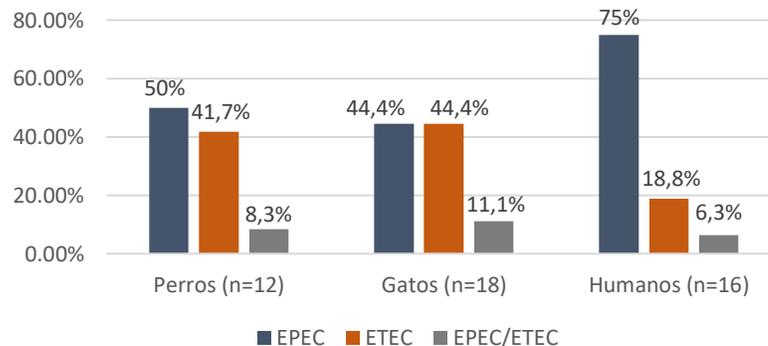
De 230 muestras de perros analizadas, 5,2% (12/230) fueron confirmados como positivos a genes de virulencia asociados a DEC, mientras que, de 181 muestras de gatos, un 9,9% (18/181) fue DEC. En el caso de las muestras provenientes de humanos, de 326 muestras analizadas, un 4,9% (16/326) fueron confirmadas

como DEC (Figura 2). Cabe destacar que de cada muestra se seleccionó un aislado, obteniendo 12 aislados desde perros, 18 aislados desde gatos y 16 aislados desde humanos.



**Figura 2.** Aislados de *E. coli* diarreogénica confirmados por especie.

Respecto a los patotipos aislados, se identificaron solo dos: EPEC y ETEC. Un 32,6% (15/46) correspondiente a ETEC, un 58,7% (27/46) correspondiente a EPEC y un 8,7% (4/46) correspondiente a EPEC/ETEC. Se identificó ambos patotipos en todas las especies. En perros, se identificaron 6/12 aislados EPEC, 5/12 aislados ETEC y 1/12 aislado EPEC/ETEC. En gatos se identificaron 8/18 aislados EPEC, 8/18 aislados ETEC y 2/18 aislados EPEC/ETEC. En humanos se identificaron 12/16 aislados EPEC, 3/16 aislados ETEC y 1/16 aislado EPEC/ETEC (Figura 3).



**Figura 3.** Porcentaje de muestras positivas a patotipos de *E. coli* diarreogénica identificados en perros, gatos y humanos.

En base a esta información se crearon perfiles de virulencia según la presencia de genes asociados a aEPEC (*eae+*, *bfp-*), tEPEC (*eae+*, *bfp+*), ETEC (*It+*) y ETEC/EPEC (*eae+*, *It+*) obteniéndose cuatro perfiles distintos. Se obtuvo que un 6,5% (3/46) de los aislados fueron positivos al gen *eae* y *bfp* considerándose como EPEC típico (tEPEC), mientras que un 50% (23/46) fue positivo solo al gen *eae* considerándose como EPEC atípico (aEPEC). Un 34,9% (16/46) fue positivo al gen *It*, y un 8,7% (4/46) de los aislados fue positivo al gen *eae* y *It*. El perfil de virulencia que se presentó con mayor frecuencia fue el que presentaba solo el gen *eae*, predominando tanto en perros como en humanos, mientras que en gatos el perfil predominante se caracterizó por la presencia del gen *It*. Por otra parte, no se detectó la presencia del gen *st* en los aislados estudiados (Tabla 5).

**Tabla 5.** Perfil de virulencia identificados de aislados DEC provenientes de perros, gatos y humanos.

Perfil	Patotipo	Especies %(n)			Total
		Perros	Gatos	Humanos	
<i>eae+</i> , <i>bfp+</i>	tEPEC	0,0% (0)	16,7% (3)	0,0% (0)	<b>6,5% (3)</b>
<i>eae+</i> , <i>bfp-</i>	aEPEC	50,0% (6)	27,8% (5)	75,0% (12)	<b>50,0% (23)</b>
<i>It+</i> , <i>st-</i>	ETEC	41,7% (5)	44,4% (8)	18,8% (3)	<b>34,8% (16)</b>
<i>It+</i> , <i>eae+</i>	ETEC, EPEC	8,3% (1)	11,1% (2)	6,3% (1)	<b>8,7% (4)</b>
<b>Total</b>		<b>100 % (12)</b>	<b>100% (18)</b>	<b>100% (16)</b>	<b>100% (46)</b>

### **Objetivo específico 2: Caracterizar fenotípicamente cepas de *Escherichia coli* diarreogénica mediante ensayos de formación de biopelículas y resistencia antimicrobiana**

Los 46 aislados de *E. coli* diarreogénica confirmados en el objetivo 1 fueron sometidos a pruebas fenotípicas para determinar la capacidad de formación de biopelículas y resistencia antimicrobiana, mediante ensayo en microplacas y técnica de difusión en disco, respectivamente.

## 2. Ensayo de formación de biopelículas

El 82,6% (38/46) de los aislados obtenidos fueron capaces de formar biopelículas sobre placas de poliestireno a 37°C, mientras que un 17,4% (8/46) de los aislados no formaron biopelículas bajo estas condiciones. De los aislados que fueron capaces de formar biopelículas, un 78,3% (36/46) formaron biopelículas débiles, y solo un 4,3% (2/46) formaron biopelículas moderadas (Tabla 6).

Todos los aislados provenientes de humanos fueron capaces de formar biopelículas. En cuanto a los aislados provenientes desde perros un 91,7% (11/12) formaron biopelículas débiles, mientras que de los aislados provenientes desde gatos un 61,1% (11/18) fueron capaces de formar biopelículas débiles (Tabla 6).

**Tabla 6.** Categorización de aislados DEC según capacidad de formación de biopelículas y distribución según hospedero

Hospedero	<sup>1</sup> Formación de biopelículas a 37°C n (%)				<sup>2</sup> p-value (Test exacto de Fisher)
	NF	D	M	F	
Canino	1 (8,3%)	11 (91,7%)	0 (0%)	0 (0%)	
Felino	7 (38,9%)	11 (61,1%)	0 (0%)	0 (0%)	0,005837
Humano	0 (0%)	14 (87,5%)	2 (12,5%)	0 (0%)	
<b>Total</b>	8 (17,4%)	36 (78,3%)	2 (4,3%)	0 (0,0%)	

<sup>1</sup>Categorías de formación de biopelículas: No formadoras (NF), Débiles (D), Moderada (M), Fuerte (F). <sup>2</sup>Diferencias significativas p<0.05 (Test exacto de Fisher)

Se identificó asociación entre la variable “hospedero” y “formación de biopelículas” ( $p < 0,05$ ), si la formación de biopelículas depende del hospedero en estudio. Se determinó que las cepas provenientes desde humanos tenían una mayor capacidad de formación de biopelículas a 37°C a diferencia de las cepas provenientes de gatos (Tabla 6). Por otra parte, no se evidenció una relación significativa entre la producción de biopelículas a 37°C, y el patotipo del aislado

en estudio, resultando que ambas variables eran independientes entre sí ( $p > 0,05$ ) (Tabla 7).

**Tabla 7.** Distribución de aislados de *E. coli* diarreogénica formadoras de biopelículas asociado a patotipo

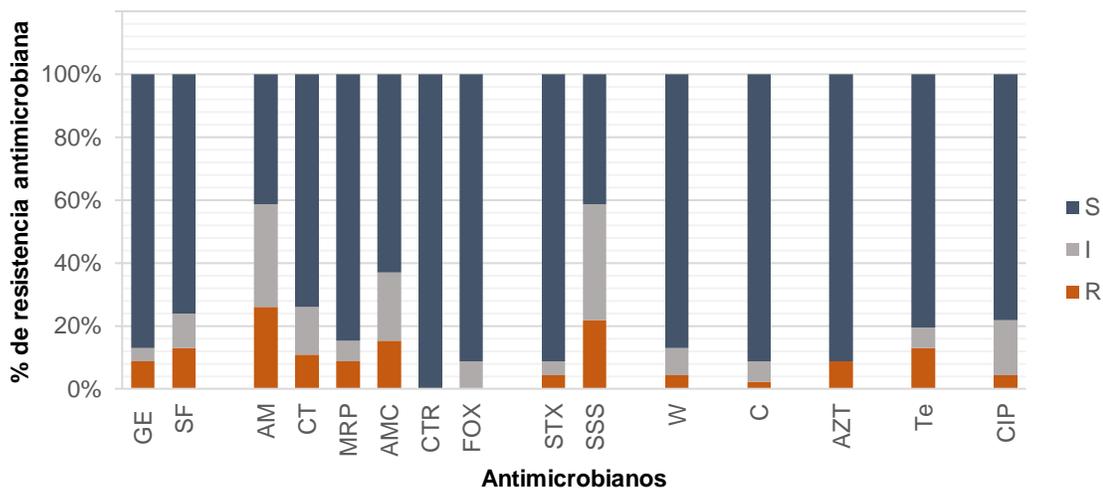
Patotipo	<sup>1</sup> Formación de biopelículas a 37°C n (%)				<sup>2</sup> p-value (Test exacto de Fisher)
	NF	D	M	F	
<b>EPEC</b>	4 (13,3%)	24 (80%)	2 (6,7%)	0 (0%)	0,3808
<b>ETEC</b>	5 (25%)	15 (75%)	0 (0%)	0 (0%)	
<b>Total</b>	9 (18%)	39 (78%)	2 (4%)	0 (0%)	

<sup>1</sup>Categorías de formación de biopelículas: No formadoras (NF), Débiles (D), Moderada (M), Fuerte (F). <sup>2</sup>Diferencias significativas  $p < 0.05$  (Test exacto de Fisher)

## 2. Perfil de resistencia antimicrobiana

De los 46 aislados obtenidos, la mayor frecuencia de resistencia se registró para ampicilina (58,7%), sulfizoxazol (56,5%) y amoxicilina/ácido clavulánico (39,1%). Por otra parte, todos los aislados fueron susceptibles a ceftriaxona (Figura 4).

En perros y humanos se presentó resistencia principalmente a ampicilina, mientras que en gatos se identificó mayor resistencia a sulfizoxazol. Sin embargo, en humanos, dentro de los antimicrobianos a los cuál hubo mayor resistencia, se encontraba ceftiofur, el cual corresponde a una cefalosporina de uso exclusivamente veterinario. En general, los aislados provenientes de perros, gatos y humanos presentaron una mayor resistencia a la familia de los  $\beta$ -lactámicos (Tabla 8).



**Figura 4.** Distribución de resistencia antimicrobiana de aislados EPEC y ETEC provenientes de perros, gatos y humanos. GE, gentamicina; SF, estreptomicina; AM, ampicilina; CT, ceftiofur; MRP, meropenem; AMC, amoxicilina/ac. Clavulánico; CTR, ceftriaxona; FOX, cefoxitin; STX, trimetropim/sulfametoxazol; SSS, sulfizoxazol; W, ácido nalidíxico; C, cloranfenicol; AZT, azitromicina; TE, tetraciclina; CIP, ciprofloxacino.

**Tabla 8.** Distribución de resistencia antimicrobiana de los 46 aislados de *E. coli* diarrogénica

Antibiótico	Aislados por especie			Total (n=46)
	Canino (n=12)	Felino (n=18)	Humano (n=16)	
Ampicilina	9 (75,0%)	6 (33,3%)	12 (75,0%)	27 (58,7%)
Sulfizoxazol	8 (66,7%)	7 (38,9%)	11 (68,8%)	26 (56,5%)
Amoxicilina/ácido clavulánico	9 (75,0%)	4 (22,2%)	5 (31,3%)	18 (39,1%)
Ceftiofur	5 (41,7%)	2 (11,1%)	5 (31,3%)	12 (26,1%)
Estreptomicina	6 (50,0%)	2 (11,1%)	3 (18,8%)	11 (23,9%)
Ciprofloxacino	4 (33,3%)	2 (11,1%)	4 (25,0%)	10 (21,7%)
Tetraciclina	4 (33,3%)	3 (16,7%)	2 (12,5%)	9 (19,6%)
Meropenem	3 (25,0%)	2 (11,1%)	2 (12,5%)	7 (15,2%)
Ácido nalidíxico	3 (25,0%)	2 (11,1%)	1 (6,3%)	6 (13,0%)
Gentamicina	1 (8,3%)	4 (22,2%)	1 (6,3%)	6 (13,0%)
Azitromicina	2 (16,7%)	1 (5,6%)	1 (6,3%)	4 (8,7%)
Cefoxitin	2 (16,7%)	1 (5,6%)	1 (6,3%)	4 (8,7%)
Cloranfenicol	3 (25,0%)	0 (0%)	1 (6,3%)	4 (8,7%)
Trimetropim/Sulfametoxazol	1 (8,3%)	1 (5,6%)	2 (12,5%)	4 (8,7%)
Ceftriaxona	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)

En cuanto a aislados multiresistentes, se detectó 37% (17/46) de aislados resistentes a 3 o más familias de antibióticos. En los aislados provenientes de perros un 50% (6/12) fueron multiresistentes, en los aislados provenientes de gatos se registró un 28% (5/18) y en los de humanos un 38% (6/16). De los aislados provenientes de perros, un 16,7% (2/12) presentó resistencia a las 7 familias. Se determinaron diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ) de multiresistencia antimicrobiana entre las tres especies en estudio, es decir, la multiresistencia de DEC estaría asociado a la especie del hospedero, identificándose mayor multiresistencia en perros (Tabla 9).

**Tabla 9.** Patrones de multiresistencia en aislados de *E. coli* diarreogénica provenientes de perros, gatos y humanos.

Hospedero	N° de aislados resistentes a familias de antibióticos (0-7) <sup>1</sup>								N° de aislados MRD	% de aislados MRD	p-value (Test exacto de Fisher) <sup>2</sup>
	0	1	2	3	4	5	6	7			
<b>Canino (n=12)</b>	1	1	4	3	0	0	1	2	6	50%	
<b>Felino (n=18)</b>	8	0	5	2	2	1	0	0	5	28%	0,007025
<b>Humano (n=16)</b>	0	5	5	4	1	0	1	0	6	38%	

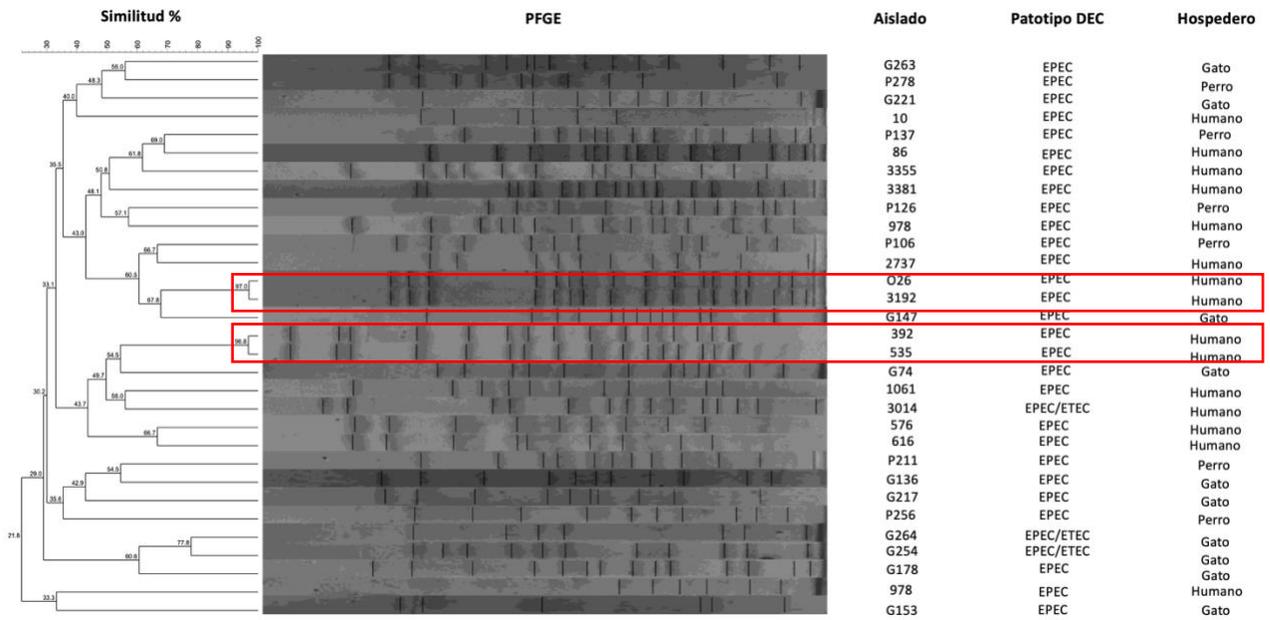
<sup>1</sup>Familias de antibióticos: Betalactámicos; Aminoglucósidos, Macrólidos, Tetraciclinas, Sulfonamida, Quinolona, Anfenicol.

<sup>2</sup>Diferencias significativas  $p < 0.05$  (Test exacto de Fisher).

**Objetivo específico 3: Determinar la relación clonal entre cepas de *Escherichia coli* diarreogénica aisladas desde perros, gatos y humanos.**

En el presente estudio se determinó la relación clonal de 31 aislados mediante Electroforesis de campo pulsado (PFGE) utilizando la enzima de restricción XbaI.

Los resultados se analizaron con un índice de similitud de Dice  $\geq 85\%$ , con lo cual se obtuvo que los aislados O26 y 3192, las cuales provenían de humanos, presentaron un porcentaje de similitud del 97%, mientras que los aislados 392 y 535, también provenientes de humanos, presentaron un porcentaje de similitud del 96.8%, evidenciando una estrecha relación clonal entre estos aislados (Figura 5). En base a esto, se obtuvo un total de 29 clústers, y no se observó relación clonal entre aislados provenientes de animales y humanos. Por otra parte, se obtuvo un Índice de Diversidad de Simpson de 0,96, lo cual indica una elevada diversidad genética entre los aislados EPEC estudiados.



**Figura 5.** Patrones PFGE de 31 aislados EPEC provenientes desde perros, gatos y humanos. Dendrograma realizado con el programa BioNumerics, método UPGMA, coeficiente Dice 1%, Estandar: *Salmonella entérica subsp. enterica serovar Braenderup*.

## 8. Discusión

*Escherichia coli* diarreogénica (DEC) es una de las principales causas de trastornos gastrointestinales en el mundo, y un importante desafío para la salud pública. DEC es responsable del 30-40% de los episodios de diarrea aguda en niños menores de 5 años en países en desarrollo, y una importante causa de casos esporádicos y brotes de diarrea a nivel mundial (Saka *et al.*, 2019). Los patotipos de DEC asociados a morbilidad y mortalidad en el mundo son *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* adherente difusa. (DAEC) *E. coli* enteropatógena (EPEC) y *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) (Croxen *et al.*, 2013). En base a estos antecedentes, la identificación de fuentes de infección y reservorios ha sido fundamental para determinar la epidemiología de DEC, reportándose al ganado vacuno, caprino, porcino, entre otros animales como reservorios de DEC (Puño-Sarmiento *et al.*, 2013; Croxen *et al.*, 2013). Sin embargo, el rol de mascotas de compañía como perros y gatos en la transmisión de estas bacterias patógenas a los seres humanos, aún se desconoce.

En el presente estudio, se obtuvo 13,0% de muestras sospechosas a DEC desde heces de perros, gatos y humanos. Sin embargo, el tamizaje se realizó a partir de cultivos mixtos, es decir, cultivos conformados por más de una especie bacteriana. Esto implica que la detección de los genes de virulencia en una muestra no era suficiente para confirmar la presencia de DEC, ya que estos genes pueden estar presentes en otras especies bacterianas, como es el caso de los genes que codifican para Stx, los cuales están presentes en *Shigella dysenteriae* (Melton-Celsa, 2014). Por otra parte, a partir de un cultivo mixto, se podría identificar la combinación de genes requeridos para identificar DEC, pero estos podrían provenir desde distintos organismos, obteniendo falsos positivos que sobreestimen la presencia del patógeno. Por lo tanto, luego del tamizaje, es necesario confirmar la presencia de DEC a través de PCR en cultivos puros. Sin

embargo, este paso podría significar la subestimación de la prevalencia de DEC, ya que al seleccionar un número limitado de colonias (20), es posible que el organismo blanco no sea seleccionado, sobre todo en el caso de estar en baja concentración en la muestra.

La tasa de aislamiento de DEC desde humanos sintomáticos fue de un 4.9%. Esta tasa difiere con lo reportado en otras partes del mundo, en donde suelen ser mayores. Por ejemplo, en un estudio realizado en Perú, la tasa de aislamiento de DEC desde niños sintomáticos y asintomáticos fue de 43% (Acosta *et al.*, 2016), mientras que en India se ha reportado una tasa de aislamiento de 21% desde pacientes diarreicos (Thakur *et al.*, 2018). Además, a nivel mundial, la prevalencia de *E. coli* diarreogénica como causa de diarreas está bien informada, abarcando entre un 30-40% de los casos (Tobías *et al.*, 2015; Zhu *et al.*, 2016). Esta diferencia podría estar dada por factores como el grupo etario, ya que DEC afecta principalmente a niños menores de 5 años, o por factores relacionados a la zona geográfica y condiciones sanitarias. Sin embargo, para el presente estudio, datos como la edad, sexo y estado inmunológico de los pacientes fueron desconocidos, motivo por el cual no es posible de identificar qué factores estarían involucrados en la diferencia con los reportes de la literatura.

En el caso de perros, la tasa de aislamiento fue de 5,2%, mientras que en gatos fue de un 9,9%. Esto discrepa con los resultados de otros autores, en donde la tasa de aislamiento fue entre un 18-21% (Coura *et al.*, 2018; Puño-Sarmiento *et al.*, 2013; Watson *et al.*, 2017). Esta discrepancia podría deberse a que las muestras de aquellos estudios provenían desde individuos diarreicos y clínicamente sanos, pero en nuestro estudio las muestras provenían solo desde animales clínicamente sanos. Cabe destacar que si bien se ha aislado DEC en mascotas sanas y diarreicas, se ha reportado una mayor tasa de aislamiento desde individuos que están cursando con episodios de diarrea, e incluso se ha

asociado a mortalidad en gatitos y diarrea en perros (Nakazato *et al.*, 2004; Puño-Sarmiento *et al.*, 2013; Watson *et al.*, 2017).

En nuestro estudio, los patotipos identificados fueron EPEC y ETEC, siendo EPEC el patotipo más prevalente en los tres hospederos. Esto concuerda con lo reportado por otros autores, en donde EPEC, ETEC y EHEC han sido los patotipos reportados con mayor frecuencia en Chile (Torres, 2017; Vidal *et al.*, 2005). En países como México, Brasil, Libia y Tanzania, EPEC y ETEC han sido los patotipos identificados con mayor frecuencia en personas con diarrea (Canizalez-Roman *et al.*, 2016). Sin embargo, se ha reportado un aumento considerable en la identificación del patotipo EAEC en individuos con diarrea (Araujo *et al.*, 2007; Moreno *et al.*, 2010) y sin diarrea (Acosta *et al.*, 2016; Ochoa *et al.*, 2011; Tobias *et al.*, 2015).

En perros y gatos, EPEC es el patotipo que se identifica con mayor frecuencia en la mayoría de los estudios, tanto en individuos diarreicos como sanos (Almeida *et al.*, 2012; Nakazato *et al.*, 2004; Puño-Sarmiento *et al.*, 2013). En contraste, los humanos son el principal reservorio de EPEC atípica (aEPEC; *eae+*, *bfp-*) (Gomes *et al.*, 2016). El presente estudio identificó EPEC típica (tEPEC) en gatos, lo cual coincide con estudios de otros autores donde se reportó la presencia del gen *bfp* en muestras de heces provenientes desde gatos clínicamente sanos, sugiriendo que cepas de tEPEC también pueden ser aisladas desde estos animales (Goffaux *et al.*, 2000; Krause *et al.*, 2005).

ETEC fue el segundo patotipo más prevalente en este estudio, el cual se ha visto implicado como la mayor causa de “diarrea del viajero” (Thakur *et al.*, 2018). En perros, ETEC se ha asociado a diarrea en perros jóvenes, mientras que en gatos no es aislado con frecuencia (Beutin, 1999). En contraste, el presente estudio identificó ETEC en perros y gatos clínicamente sanos, reportando una tasa de aislamiento de un 34,8%, y el perfil de virulencia *lt+/st-* fue el único reportado en las tres especies en estudio.

Un hallazgo interesante, fue la detección de aislados del patotipo híbrido EPEC-ETEC en perros, gatos y humanos. Este híbrido albergaba genes de virulencia tanto para aEPEC como para ETEC, mostrando un perfil de virulencia *eae+/lt+*. La identificación de este híbrido se ha reportado en estudios realizados por otros autores en Nigeria e India, (Dutta *et al.*, 2015; Saka *et al.*, 2019). La elevada plasticidad de *E. coli* permite la adquisición de genes de virulencia mediante la transferencia horizontal de genes (HGT) entre grupos de DEC, y explicaría la aparición de estos híbridos. Un claro ejemplo de este suceso fue lo ocurrido en Alemania el año 2011, donde se reportó el primer patotipo híbrido de EHEC (EAEC/EHEC), el cual correspondió a una cepa hipervirulenta responsable de un brote de diarrea que afectó a 4.321 individuos, de los cuales 900 evolucionaron a SHU, terminando en la muerte de más de 50 individuos. Finalmente se evidenció que esta cepa correspondía a una EAEC que adquirió el plásmido que codifica la toxina Stx2, asignándole un nuevo patotipo conocido como *Escherichia coli* enteroagregativa productora de toxinas Shiga (Bielaszewska *et al.*, 2011; Clements *et al.*, 2012; Grad *et al.*, 2012). Por otra parte, en perros y gatos no se ha reportado la presencia de este híbrido previamente, en consecuencia, nuestros resultados sería el primer reporte.

Este estudio evaluó la capacidad de formación de biopelículas de DEC, la cual corresponde a un importante mecanismo para la supervivencia bacteriana y que contribuye a la colonización y enfermedad en el tracto intestinal (Saldaña *et al.*, 2009). Para llevar a cabo este objetivo, se utilizó el método de cuantificación de biopelículas a través de microtitulación en placas de poliestireno con tinción cristal violeta a 37°C y se clasificó la capacidad de formación en cuatro categorías: no formadoras, débil, moderada y fuerte. En base a esto, se obtuvo que un 82,6% de los aislados fueron capaces de formar biopelículas, mayoritariamente de formación débil. Las biopelículas se han estudiado en cepas de *E. coli* K-12 (van Houdt y Michiels, 2005) y patotipos diarreogénicos de *E. coli*, principalmente EAEC (Culler *et al.*, 2014; Hinthong *et al.*, 2015). Sin embargo,

existen pocos reportes sobre la capacidad de EPEC para formar biopelículas. Respecto a este patotipo, se ha reportado que la cepa aEPEC del serotipo O55:H7 tiene una alta capacidad para formar biopelículas en la superficie de poliestireno a 26°C (Weiss-Muszkat *et al.*, 2010), y se ha demostrado la capacidad de formación de biopelículas de EPEC a 26°C y 37°C (Culler *et al.*, 2014; Weiss-Muszkat *et al.*, 2010). La temperatura es un factor relevante en la formación biopelículas de EPEC, demostrándose una mayor expresión de fimbrias curli con un aumento de biopelículas a 37°C (Culler *et al.*, 2018). Por otra parte, se ha reportado que la formación de biopelículas es más fuerte en DEC que provienen desde perros con diarreas en comparación con perros sanos (Karahutová *et al.*, 2021). Esto podría explicar porque las cepas formadoras de biopelículas de este estudio eran formadoras débiles de biopelículas. Además, el presente estudio evidenció una asociación entre la capacidad de formación de biopelículas y la especie del hospedero, identificándose que las cepas provenientes desde humanos enfermos tenían una mayor capacidad de formación de biopelículas, sin embargo, cepas provenientes desde animales clínicamente sanos mostraron menor capacidad para formar biopelículas.

Si bien, no es recomendado tratar las infecciones producidas por DEC con antimicrobianos, si es de interés comprender la susceptibilidad antimicrobiana de estos patógenos, más aun comprendiendo que *E. coli* puede actuar como reservorio de genes de resistencia antimicrobiana. Por esta razón, se analizó la resistencia de DEC frente a 15 antimicrobianos: amoxicilina-ácido clavulánico, ciprofloxacino, gentamicina, ampicilina, tetraciclina, trimetropim-sulfametoxazol, maropinem, cloranfenicol, ceftiofur, ceftriaxona, cefoxitin, estreptomina, azitromicina, ácido nalidíxico y sulfisoxazole, representando a 7 familias de antimicrobianos. Estos antimicrobianos fueron seleccionados debido a su amplio uso en la medicina humana y veterinaria, y a que son utilizados para el tratamiento de infecciones causadas por bacterias Gramnegativas (Puvača y De Llano, 2021). Para ello, se evaluó la resistencia fenotípica de los aislados de DEC

mediante la técnica de difusión en disco. Nuestros resultados, mostraron que el 80,4% de las cepas presentó resistencia al menos a uno de los antimicrobianos en estudio, siendo el antibiótico al que se presentó mayor resistencia, la ampicilina. Esta elevada resistencia concuerda con lo descrito en otros estudios, en donde la mayor resistencia se registró para ampicilina. Por ejemplo, Thakur *et al.*, 2018, en un estudio realizado en pacientes con diarrea en India, reportó que el patotipo EPEC fue el que presentó mayor resistencia, mostrando elevados niveles de resistencia antimicrobiana frente a ampicilina, mientras que países como Perú y Brasil, también se ha reportado elevadas tasas de resistencia a ampicilina (Mandal *et al.*, 2017; Ochoa *et al.*, 2009), mientras que en un estudio realizado en Europa en animales de compañía, se reportó una elevada resistencia de *E. coli* a ampicilina en animales sanos (Karahutová *et al.*, 2021). Estos hallazgos podrían deberse a inadecuadas prácticas de prescripción de antimicrobianos frente al tratamiento de infecciones, lo cual contribuiría a la aparición de resistencia antimicrobiana. Un estudio realizado por Robbins *et al.*, (2020) reportó que los antibióticos más recetados en emergencias y cuidados intensivos en pequeños animales fueron amoxicilina, metronidazol y ampicilina, siendo una de las razones más comunes de prescripción antimicrobiana, las enfermedades gastrointestinales.

Por otra parte, en nuestro estudio se evidenció un 100% de susceptibilidad a ceftriaxona. Este resultado coincide con la baja resistencia a ceftriaxona que se ha reportado en otros estudios, incluso Puvača y De Llanos 2021, quienes describen la situación de resistencia antimicrobiana de *E. coli* en humanos y mascotas, reportaron una baja resistencia a ceftriaxona (Puvača y De Llanos, 2021). Esto podría deberse a que ceftriaxona corresponde a una cefalosporina de tercera generación, motivo por el cual se tiende a utilizar como último recurso para el tratamiento de infecciones tanto en medicina humana como veterinaria.

En humanos, nuestro estudio reportó una baja tasa de resistencia a trimetropim-sulfametoxazol, donde un 12,5% de las cepas presentaron resistencia a este antimicrobiano, a diferencia de lo descrito en países como Taiwán, Vietnam, China, Tailandia y Nigeria, donde este antimicrobiano fue uno de los que presentó mayor tasa de resistencia (Huang *et al.*, 2016; Nguyen *et al.*, 2005; Saka *et al.*, 2019; Yang *et al.*, 2009). Esto podría deberse a que en estos países trimetropim-sulfametoxazol es un antimicrobiano comúnmente utilizado para tratar la diarrea y otras enfermedades pediátricas (Saka *et al.*, 2019). Además, se postula que la resistencia puede variar según ubicación geográfica, manejo agrícola y niveles y tipos de antibióticos utilizados en la población (Guan *et al.*, 2002).

En este estudio, se obtuvo una elevada tasa de resistencia a ceftiofur en cepas de DEC provenientes desde humanos, representando el 31,3% de resistencia antimicrobiana en este hospedero. Este resultado es de alto impacto, ya que ceftiofur corresponde a una cefalosporina de tercera generación que se usa exclusivamente en medicina veterinaria principalmente en porcinos, bovino y aves. Por lo tanto, este resultado sugiere que los humanos están expuestos a cepas de *E. coli* portadoras de genes que se transfieren horizontalmente y que confieren resistencia extendida a cefalosporinas, siendo fuentes de origen animal, importantes reservorios de estas cepas. Por otro lado, se describe que antimicrobianos de una misma familia están sujetos a resistencia cruzada, lo cual se traduce a que bacterias pueden presentar resistencia a más de un antimicrobiano de una misma familia a la vez (Périchon *et al.*, 2019). Además, el ácido nalidíxico inusualmente se utiliza en medicina veterinaria, sin embargo, se evidenció resistencia de cepas DEC provenientes desde perros y gatos a este antimicrobiano, lo cual también ha sido reportado en otro estudio. Esto podría sugerir la transferencia de genes de resistencia desde *E. coli* humana hacia *E. coli* de perros y gatos, representando un peligro para la salud pública (Puño-Sarmiento *et al.*, 2013).

En el presente estudio, el 50% de las cepas DEC resistentes a los antimicrobianos provenientes de humanos presentaba resistencia a tres o más familias de antimicrobianos, lo cual es mayor a lo reportado en otros estudios. Por ejemplo, en un estudio realizado en niños con diarrea en Nigeria, se reportó un 7,1% de aislados DEC multiresistentes (Saka *et al.*, 2019). En un estudio realizado en Estados Unidos en niños que cursaban con diarrea aguda se reportó un 24,3% de multiresistencia (Imdad *et al.*, 2018), mientras que en India se reportó un 32% de aislados DEC multiresistentes provenientes desde niños diarreicos en áreas rurales (Seidman *et al.*, 2009). La elevada presentación de multiresistencia es una situación preocupante para la salud pública, ya que compromete los protocolos de tratamiento empírico y el manejo clínico de pacientes con síntomas gastrointestinales severos y prolongados, sumado a que cepas de *E. coli* suelen portar genes de resistencia en elementos genéticos móviles, facilitando la propagación de la RAM a otras bacterias entéricas (Baker *et al.*, 2018).

En este estudio, reportamos una mayor tasa de multiresistencia en perros, en comparación a las otras dos especies en estudio, incluso identificándose dos cepas que fueron multiresistentes a todas las familias de antimicrobianos en estudio. Este resultado sugeriría un incorrecto uso de antimicrobianos en medicina veterinaria y, un posible intercambio de cepas resistentes que puede existir entre mascotas y sus dueños, destacando la importancia de entender la interacción entre mascotas y propietarios y la transmisión de cepas resistentes entre hospederos.

EPEC es la principal causa de enfermedades diarreicas y brotes en lactantes, presentando una elevada tasa de morbilidad y mortalidad en niños menores de seis meses, y si bien, la prevalencia de este patotipo en los países desarrollados ha disminuido en las últimas décadas, continúa siendo uno de los principales problemas de salud pública en países en desarrollo (Pakbin *et al.*, 2021). En el

presente estudio, EPEC fue el patotipo con mayor tasa de aislamiento en perros, gatos y humanos, motivo por el cual se decidió estudiar la relación clonal entre cepas EPEC provenientes desde éstas tres fuentes. Para ello, se empleó Electroforesis en campo pulsado (PFGE), el cual corresponde a una técnica de tipificación molecular epidemiológica, considerado como una técnica “gold standard” (Swaminathan *et al.*, 2001). Mediante el PFGE, identificamos un alto grado de diversidad genética entre los aislados, observando 29 clúster de un total de 31 cepas EPEC. De estas 31 cepas, se evidenciaron 2 clúster con un alto porcentaje de similitud, los cuales estaban conformados por EPEC provenientes de humanos. Este hallazgo podría sugerir que las cepas que presentaron relación clonal, podrían eventualmente ser parte de un brote asociado al consumo de un alimento o agua contaminada. En la literatura, se ha reportado la contaminación de alimentos y aguas con DEC. Por ejemplo, en un colegio de Corea del Sur se reportó un brote de infección por EPEC asociado al consumo de agua y alimentos contaminados (Lim *et al.*, 2020). Mientras que, Taric *et al.*, 2021 identificó la presencia de EPEC, ETEC y EHEC en aguas destinadas para en consumo en Pakistán. Esta evidencia sugiere que patotipos de DEC potencialmente virulentos, se distribuyen en alimentos y agua, siendo considerado un problema de salud pública, motivo por el cual es de vital importancia seguir investigando el rol de estas fuentes en la transmisión de patotipos DEC a la población humana.

Por otra parte, no se evidenció relación clonal entre cepas provenientes desde humanos y animales, lo cual se podría explicar debido a la procedencia geográfica de las muestras de mascotas, las cuales provenían de Santiago, mientras que las de humanos provenían de Valparaíso. Este factor probablemente influyó en los resultados, por lo que sería más significativo estudiar la relación clonal y patogenicidad desde cepas DEC que provengan desde dueños y sus mascotas. Nuestros resultados difieren con lo descrito por Moura *et al.*, 2009 quien describió una estrecha relación clonal entre cepas EPEC

provenientes de humanos y animales, sugiriendo que los animales podrían jugar un rol como reservorios y fuentes de infección de EPEC para humanos.

Finalmente, si bien no logramos identificar una estrecha relación entre cepas DEC provenientes de mascotas y humanos, si logramos identificar la presencia de estos patotipos en mascotas sanas y que además presentan resistencia a antimicrobianos de uso convencional y de uso exclusivamente humano, lo cual nos indica que debemos seguir en búsqueda del rol que cumplen estas mascotas como en la transmisión de estos patógenos al humano y viceversa, ya que en un problema que concierne a la salud pública, involucrando a la salud humana, animal y el medio ambiente.

## 9. Conclusión

En el presente estudio, se identificó EPEC y ETEC en mascotas sanas y humanos diarreicos, siendo el patotipo EPEC predominante en perros, gatos y humanos. Se determinó la capacidad de formar biopelículas de estos aislados, además de que presentaron resistencia antimicrobiana e incluso identificándose una elevada tasa de multiresistencia antibióticos de uso humano y veterinario. En base a estos resultados, si bien se evidenció una elevada diversidad genética entre los aislados EPEC, podemos concluir que mascotas como perros y gatos, pueden actuar como posibles reservorios de EPEC potencialmente patógenos, por lo cual aceptamos la hipótesis de este estudio. Por otra parte, estos resultados tendrían una mayor significancia si además se incluyera mascotas que cursen con diarrea y sus respectivos dueños.

En Chile, este es el primer estudio que reporta la presencia de DEC en perros y gatos, identificando EPEC como el patotipo más frecuente, al igual que en humanos. Además, se reportó la resistencia antimicrobiana de cepas DEC, identificando un elevado porcentaje de resistencia a ampicilina tanto en animales como humanos.

Por otra parte, existen escasos estudios que evalúen el rol de perros y gatos como posibles fuentes de infección por DEC en humanos. Y aunque en nuestro estudio no se identificó una relación entre cepas provenientes de humanos y mascotas, si es necesario entender la presencia de EPEC potencialmente patógenos en mascotas sanas y enfermas y su rol como fuente de transmisión para sus dueños, por lo que, el papel de perros y gatos como portadores de EPEC debe considerarse como un recurso de investigación en brotes causados por este patotipo.

## 10. Bibliografía

- **ACOSTA GJ, VIGO NI, DURAND D, RIVEROS M, ARANGO S, ZAMBRUNI M, OCHOA TJ.** (2016) Diarrheagenic *Escherichia coli*: Prevalence and Pathotype Distribution in Children from Peruvian Rural Communities. *Am J Trop Med Hyg.* 2016 Sep 7;95(3):574-9. doi: 10.4269/ajtmh.16-0220. Epub . PMID: 27382080; PMCID: PMC5014262.
- **ALMEIDA, P. M., ARAIS, L. R., ANDRADE, J. R., PRADO, E. H., IRINO, K., & CERQUEIRA, A.** (2012). Characterization of atypical Enteropathogenic *Escherichia coli* (aEPEC) isolated from dogs. *Veterinary microbiology*, 158(3-4), 420–424. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2012.02.021>
- **ARAIS, L. R., BARBOSA, A. V., ANDRADE, J. R. C., GOMES, T. A. T., ASENSI, M. D., AIRES, C. A. M., & CERQUEIRA, A. M. F.** (2018). Zoonotic potential of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* (aEPEC) isolated from puppies with diarrhea in Brazil. *Vet Microbiol*, 227, 45-51. doi: 10.1016/j.vetmic.2018.10.023
- **ARAUJO JM, TABARELLI GF, ARANDA KS, FABBRICOTTI SH, MENDES CMF, FAGUNDES-NETO U, SCALETSKY IC.** (2007). Typical enteroaggregative and atypical enteropathogenic types of *Escherichia coli* are the most prevalent diarrhea-associated pathotypes among Brazilian children. *J Clin Microbiol* 45: 3396–3399.
- **BAKER KS, DALLMAN TJ, FIELD N, CHILDS T, MITCHELL H ET AL.** (2018) Horizontal antimicrobial resistance transfer drives epidemics of multiple *Shigella* species. *Nat Commun*; 9:1462
- **BENT, S. J., & FORNEY, L. J.** (2008). The tragedy of the uncommon: understanding limitations in the analysis of microbial diversity. *The ISME journal*, 2(7), 689–695. <https://doi.org/10.1038/ismej.2008.44>
- **BEUTIN, L.** (1999). *Escherichia coli* as a pathogen in dogs and cats. *Vet. Res.* 30, 285–298.

- **BIELASZEWSKA, M.; MELLMANN, A.; ZHANG, W.; KÖCK, R.; FRUTH, A.; BAUWENS, A.; PETERS, G.; KARCH, H.** (2011) Characterization of the *Escherichia coli* strain associated with an outbreak of hemolytic uremic syndrome in Germany: A microbiological study. *Lancet Infect. Dis.*, 11, 671–676.
- **CANIZALEZ-ROMAN, A., FLORES-VILLASEÑOR, H. M., GONZALEZ-NUÑEZ, E., VELAZQUEZ-ROMAN, J., VIDAL, J. E., MURO-AMADOR, S., ALAPIZCO-CASTRO, G., DÍAZ-QUIÑONEZ, J. A., & LEÓN-SICAIROS, N.** (2016). Surveillance of Diarrheagenic *Escherichia coli* Strains Isolated from Diarrhea Cases from Children, Adults and Elderly at Northwest of Mexico. *Frontiers in microbiology*, 7, 1924. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01924>
- **CARDOSO BERNAL, A. M., RAMÓN RODRÍGUEZ, L. F., POUTOU PIÑALES, R. A., CARRASCAL CAMACHO, A. K., & ZAMBRANO-MORENO, D. C.** (2013). Electroforesis en Gel de Campo Pulsado (PFGE) para la diferenciación molecular de *Listeria monocytogenes*. *Universitas Scientiarum*, 18(2), 203-222. Retrieved from <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=49927848008>
- **CDC.** (2014). Enterotoxigenic *E. coli* (ETEC). Retrieved from <https://www.cdc.gov/ecoli/etec.html>
- **CDC.** (2017). Standard Operating Procedure for PulseNet PFGE of *Escherichia coli* O157:H7, *Escherichia coli* non-O157 (STEC), *Salmonella* serotypes, *Shigella sonnei* and *Shigella flexneri*. Retrieved from <http://www.cdc.gov/pulsenet/pathogens/index.html>
- **CEPAS, V., LOPEZ, Y., MUNOZ, E., ROLO, D., ARDANUY, C., MARTI, S., SOTO, S. M.** (2019). Relationship Between Biofilm Formation and Antimicrobial Resistance in Gram-Negative Bacteria. *Microb Drug Resist*, 25(1), 72-79. doi:10.1089/mdr.2018.0027
- **CHANDRA N, SRIVASTAVA A, KUMAR S.** (2019) Bacterial biofilms in human gastrointestinal tract: An intricate balance between health and inflammatory bowel diseases. *World J Pharmacol*; 8(3): 26-40

- **CLEMENTS, A., YOUNG, J. C., CONSTANTINOU, N., & FRANKEL, G.** (2012). Infection strategies of enteric pathogenic *Escherichia coli*. Gut microbes, 3(2), 71-87. doi:10.4161/gmic.19182
- **COURA, F. M., DINIZ, A. N., OLIVEIRA JUNIOR, C. A., LAGE, A. P., LOBATO, F. C. F., HEINEMANN, M. B., & SILVA, R. O. S.** (2018). Detection of virulence genes and the phylogenetic groups of *Escherichia coli* isolated from dogs in Brazil. Ciência Rural, 48(2). doi:10.1590/0103-8478cr20170478
- **CROXEN, M. A., LAW, R. J., SCHOLZ, R., KEENEY, K. M., WLODARSKA, M., & FINLAY, B.** (2013). Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli*. Clin Microbiol Rev, 26(4), 822-880. doi:10.1128/cmr.00022-13
- **CULLER, H. F., COUTO, S., HIGA, J. S., RUIZ, R. M., YANG, M. J., BUERIS, V., FRANZOLIN, M. R., & SIRCILI, M. P.** (2018). Role of SdiA on Biofilm Formation by Atypical Enteropathogenic *Escherichia coli*. Genes, 9(5), 253. <https://doi.org/10.3390/genes9050253>
- **CULLER, H. F., MOTA, C. M., ABE, C. M., ELIAS, W. P., SIRCILI, M. P., & FRANZOLIN, M. R.** (2014). Atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strains form biofilm on abiotic surfaces regardless of their adherence pattern on cultured epithelial cells. BioMed research international, 2014, 845147-845147. doi:10.1155/2014/845147
- **DONNENBERG, M. S., & NATARO, J. P.** (1995). Methods for studying adhesion of diarrheagenic *Escherichia coli*. Methods Enzymol, 253, 324-336.
- **DUTTA S, PAZHANIA GP, NATARO JP, RAMAMURTHY T.** (2015) Heterogenic virulence in a diarrheagenic *Escherichia coli*: evidence for an EPEC expressing heat-labile toxin of ETEC. Int J Med Microbiol. 305:47–54. doi: 10.1016/j.ijmm.2014.10.006
- **EL-HOUSSEINY, G. S., ABOULWAFI, M. M., & HASSOUNA, N. A.** (2010). Adherence, Invasion and Cytotoxicity of Some Bacterial Pathogens. Journal of American Science, 6(10), 260-268.

- **ELLERMANN, M., & SARTOR, R. B.** (2018). Intestinal bacterial biofilms modulate mucosal immune responses. *Journal of immunological sciences*, 2(2), 13–18.
- **FARFÁN-GARCÍA, A. E., ARIZA-ROJAS, S. C., VARGAS-CÁRDENAS, F. A., & VARGAS-REMOLINA, L. V.** (2016). Mecanismos de virulencia de *Escherichia coli* enteropatógena. *Revista chilena de infectología*, 33, 438-450.
- **FLECKENSTEIN, J. M., MUNSON, G. M., & RASKO, D. A.** (2013). Enterotoxigenic *Escherichia coli*: Orchestrated host engagement. *Gut microbes*, 4(5), 392-396. doi:10.4161/gmic.25861
- **FRATAMICO, P. M., DEBROY, C., LIU, Y., NEEDLEMAN, D. S., BARANZONI, G. M., & FENG, P.** (2016). Advances in Molecular Serotyping and Subtyping of *Escherichia coli*. *Frontiers in Microbiology*, 7, 644. Retrieved from <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2016.00644>
- **GOFFAUX, F., CHINA, B., JANSSEN, L., & MAINIL, J.** (2000). Genotypic characterization of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) isolated in Belgium from dogs and cats. *Research in Microbiology*, 151(10), 865-871. doi: [https://doi.org/10.1016/S0923-2508\(00\)01153-0](https://doi.org/10.1016/S0923-2508(00)01153-0)
- **GOMES, T. A., ELIAS, W. P., SCALETSKY, I. C., GUTH, B. E., RODRIGUES, J. F., PIAZZA, R. M., MARTINEZ, M. B.** (2016). Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Braz J Microbiol*, 47 Suppl 1(Suppl 1), 3-30. doi: 10.1016/j.bjm.2016.10.015
- **GÓMEZ-DUARTE, O. G.** (2014). Acute diarrheal disease caused by enteropathogenic *Escherichia coli* in Colombia. *Rev Chilena Infectol*, 31(5), 577-586. doi:10.4067/s0716-10182014000500010
- **GRAD, Y. H., LIPSITCH, M., FELDGARDEN, M., ARACHCHI, H. M., CERQUEIRA, G. C., FITZGERALD, M., HANAGE, W. P.** (2012). Genomic epidemiology of the *Escherichia coli* O104:H4 outbreaks in Europe, 2011. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109(8), 3065-3070. doi:10.1073/pnas.1121491109

- **GUAN S, XU R, CHEN S, ODUMERU J, GYLES C.** (2002) Development of a procedure for discriminating among *Escherichia coli* isolates from animal and human sources. *Appl Environ Microbiol.* 68:2690-8
- **Gyles, C. L., & Fairbrother, J. M.** (2010). *Escherichia Coli.* Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals. doi:10.1002/9780470958209.ch15  
10.1002/9780470958209.ch15
- **HALE, C. R., SCALLAN, E., CRONQUIST, A. B., DUNN, J., SMITH, K., ROBINSON, T., CLOGHER, P.** (2012). Estimates of enteric illness attributable to contact with animals and their environments in the United States. *Clin Infect Dis*, 54 Suppl 5, S472-479. doi:10.1093/cid/cis051
- **HEBBELSTRUP JENSEN, B., OLSEN, K. E., STRUVE, C., KROGFELT, K. A., & PETERSEN, A. M.** (2014). Epidemiology and clinical manifestations of enteroaggregative *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev*, 27(3), 614-630. doi:10.1128/cmr.00112-13
- **HERNANDES, R. T., ELIAS, W. P., VIEIRA, M. A. M., & GOMES, T. A. T.** (2009). An overview of atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. *FEMS Microbiology Letters*, 297(2), 137-149. doi:10.1111/j.1574-6968.2009.01664.x
- **Herrera-Benavente IF, C.-G. A., Mascareñas-de los Santos AH.** (2018). Impacto de las enfermedades diarreicas agudas en América Latina Justificación del establecimiento de un Comité de Enfermedades Diarreicas en SLIPE. *Rev Latin Infect Pediatr*, 31(1), 8-16. Retrieved from <https://www.medigraphic.com/pdfs/infectologia/lip-2018/lip181c.pdf>
- **HINTHONG, W., INDRAWATTANA, N., PITAKSAJJAKUL, P., PIPATTANABOON, C., KONGNGOEN, T., THARNPOOPHASIAM, P., & WORAKHUNPISET, S.** (2015). Effect of Temperature on Fimbrial Gene Expression and Adherence of Enteroaggregative *Escherichia coli*. *International journal of environmental research and public health*, 12(8), 8631–8643. <https://doi.org/10.3390/ijerph120808631>

- **HOSSEINI NAVE, H., MANSOURI, S., TAATI MOGHADAM, M., & MORADI, M.** (2016). Virulence Gene Profile and Multilocus Variable-Number Tandem-Repeat Analysis (MLVA) of Enteroinvasive *Escherichia coli* (EIEC) Isolates From Patients With Diarrhea in Kerman, Iran. *Jundishapur J Microbiol*, 9(6), e33529. doi:10.5812/jjm.33529
- **HU, J., & TORRES, A. G.** (2015). Enteropathogenic *Escherichia coli*: foe or innocent bystander *Clin Microbiol Infect*, 21(8), 729-734. doi: 10.1016/j.cmi.2015.01.015
- **IBRAHIM, M., BADDOUR, M., & YOUNIS, K.** (2015). Detection of Diarrheagenic *Escherichia Coli* in Pet Animals and Its Antibiotic Resistance in Alexandria Governorate (Vol. 45).
- **IMDAD A, FOSTER MA, IQBAL J, FONNESBECK C, PAYNE DC, ZHANG C, ET AL.** (2012) Diarrheagenic *Escherichia coli* and acute gastroenteritis in children in Davidson County, Tennessee, United States: a case-control study. *Pediatr Infect Dis J.* (2018) 37:543–8. doi: 10.1097/INF.0000000000001908
- **ISP.** Vigilancia de *Escherichia coli* diarreogénica. Boletín Instituto de Salud Pública de Chile. Retrieved from [www.ispch.cl/sites/default/files/documento/2012/06/BOLETIN%2010.pdf](http://www.ispch.cl/sites/default/files/documento/2012/06/BOLETIN%2010.pdf)
- **ISP.** (2017). Vigilancia de laboratorio de *E. coli* productora de Toxina Shiga. Chile. 2010–2016. Boletín Instituto de Salud Pública de Chile. Retrieved from <http://www.ispch.cl/sites/default/files/BoletinSTEC-14082017B.pdf>
- **KANAYAMA, A., YAHATA, Y., ARIMA, Y., TAKAHASHI, T., SAITOH, T., KANOU, K., OISHI, K.** (2015). Enterohemorrhagic *Escherichia coli* outbreaks related to childcare facilities in Japan, 2010-2013. *BMC infectious diseases*, 15, 539-539. doi:10.1186/s12879-015-1259-3
- **KAPER, J. B., NATARO, J. P., & MOBLEY, H. L. T.** (2004). Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology*, 2, 123. doi: 10.1038/nrmicro818

- **KARAHUTOVÁ L, MANDELÍK R, BUJŇÁKOVÁ D.** (2021) Antibiotic Resistant and Biofilm-Associated *Escherichia coli* Isolates from Diarrheic and Healthy Dogs. *Microorganisms*. 9(6):1334. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9061334>
- **KRAUSE, G., ZIMMERMANN, S., & BEUTIN, L.** (2005). Investigation of domestic animals and pets as a reservoir for intimin- (eae) gene positive *Escherichia coli* types. *Veterinary Microbiology*, 106(1), 87-95. [doi.org/10.1016/j.vetmic.2004.11.012](https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2004.11.012)
- **KUMAR, V. A., & KHAN, S.** (2015). Defining multidrug resistance in Gramnegative bacilli. *The Indian journal of medical research*, 141(4), 491-491. [doi:10.4103/0971-5916.159318](https://doi.org/10.4103/0971-5916.159318)
- **LETOURNEAU, J., LEVESQUE, C., BERTHIAUME, F., JACQUES, M., & MOUREZ, M.** (2011). In vitro assay of bacterial adhesion onto mammalian epithelial cells. *J Vis Exp* (51). [doi:10.3791/2783](https://doi.org/10.3791/2783)
- **LIM, M. A., KIM, J. Y., ACHARYA, D., BAJGAIN, B. B., PARK, J. H., YOO, S. J., & LEE, K.** (2020). A Diarrhoeagenic Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) Infection Outbreak That Occurred among Elementary School Children in Gyeongsangbuk-Do Province of South Korea Was Associated with Consumption of Water-Contaminated Food Items. *International journal of environmental research and public health*, 17(9), 3149. <https://doi.org/10.3390/ijerph17093149>
- **MANDAL A, SENGUPTA A, KUMAR A, SINGH UK, JAISWAL AK, DAS P, ET AL.** (2017) Molecular epidemiology of extended-spectrum beta-Lactamase-producing *Escherichia coli* pathotypes in diarrheal children from low socioeconomic status communities in Bihar, India: emergence of the CTX-M type. *Infect Dic* 2017. <https://doi.org/10.1177/1178633617739018>.
- **MORATO, E. P., LEOMIL, L., BEUTIN, L., KRAUSE, G., MOURA, R. A., & PESTANA DE CASTRO, A. F.** (2009). Domestic Cats Constitute a Natural

Reservoir of Human Enteropathogenic *Escherichia coli* Types. Zoonoses and Public Health, 56(5), 229-237. doi:10.1111/j.1863-2378.2008.01190.x

- **MOREIRA, C. G., PALMER, K., WHITELEY, M., SIRCILI, M. P., TRABULSI, L. R., CASTRO, A. F., & SPERANDIO, V.** (2006). Bundle-forming pili and EspA are involved in biofilm formation by enteropathogenic *Escherichia coli*. J Bacteriol, 188(11), 3952-3961. doi:10.1128/jb.00177-06
- **MORENO AC, FERNANDES FILHO A, GOMES TAT, RAMOS STS, MONTEMOR KPG, TAVARES VC, SANTOS FILHO L, IRINO K, MARTINEZ MB.** (2010). Etiology of childhood diarrhea in the northeast of Brazil: significant emergent diarrheal pathogens. Diagn Microbiol Infect Dis 66: 50–57.
- **MOURA RA, SIRCILI MP, LEOMIL L, MATTÉ MH, TRABULSI LR, ELIAS WP, IRINO K, PESTANA DE CASTRO AF.** (2009) Clonal relationship among atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strains isolated from different animal species and humans. Appl Environ Microbiol. Dec;75(23):7399-408. doi: 10.1128/AEM.00636-09. Epub 2009 Oct 2. PMID: 19801470; PMCID: PMC2786407.
- **NAKAZATO, G., GYLES, C., ZIEBELL, K., KELLER, R., TRABULSI, L. R., GOMES, T. A., IRINO, K., DA SILVEIRA, W. D., & PESTANA DE CASTRO, A. F.** (2004). Attaching and effacing *Escherichia coli* isolated from dogs in Brazil: characteristics and serotypic relationship to human enteropathogenic *E. coli* (EPEC). Veterinary microbiology, 101(4), 269–277. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2004.04.009>
- **NEWELL, D. G., & LA RAGIONE, R. M.** (2018). Enterohaemorrhagic and other Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC): Where are we now regarding diagnostics and control strategies Transboundary and Emerging Diseases, 65(S1), 49-71. doi:10.1111/tbed.12789
- **NGUYEN TV, LE PV, LE CH, WEINTRAUB A.** (2005) Antibiotic resistance in diarrheagenic *Escherichia coli* and Shigella strains isolated from children in Hanoi, Vietnam. Antimicrobial agents and chemotherapy. 49:816-819.

- **NGUYEN, T. D., VO, T. T., & VU-KHAC, H.** (2011). Virulence factors in *Escherichia coli* isolated from calves with diarrhea in Vietnam. *J Vet Sci*, 12(2), 159-164. doi:10.4142/jvs.2011.12.2.159
- **NGUYEN, Y., & SPERANDIO, V.** (2012). Enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC) pathogenesis. *Front Cell Infect Microbiol*, 2, 90. doi:10.3389/fcimb.2012.00090
- **OCHOA TJ, RUIZ J, MOLINA M, DEL VALLE LJ, VARGAS M, GIL AI, ET AL.** (2009) High frequency of antimicrobial drug resistance of diarrheagenic *Escherichia coli* in infants in Peru. *Am J Trop Med Hyg.* 81(2):296–301.
- **OCHOA TJ, MERCADO EH, DURAND D, RIVERA FP, MOSQUITO S, CONTRERAS C, RIVEROS M, LLUQUE A, BARLETTA F, PRADA A, RUIZ J.** (2011). Frequency and pathotypes of diarrheagenic *Escherichia coli* in Peruvian children with and without diarrhea. *Rev Peru Med Exp Salud Publica* 28: 13–20.
- **OMS** (2017). Enfermedades diarreicas. Retrieved from <http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/diarrhoeal-disease>
- **PAKBIN B, BRÜCK WM, ROSSEN JWA.** (2021) Virulence Factors of Enteric Pathogenic *Escherichia coli*: A Review. *Int J Mol Sci.* Sep 14;22(18):9922. doi: 10.3390/ijms22189922. PMID: 34576083; PMCID: PMC8468683.
- **PASQUA, M., MICHELACCI, V., DI MARTINO, M. L., TOZZOLI, R., GROSSI, M., COLONNA, B., PROSEDA, G.** (2017). The Intriguing Evolutionary Journey of Enteroinvasive *E. coli* (EIEC) toward Pathogenicity. *Frontiers in Microbiology*, 8, 2390. Retrieved from <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2017.02390>
- **PATEL JB, C. F., BRADFORD PA, ET AL.** (2015). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Twenty-Fifth Informational Supplement. In (Vol. 3, pp. 1-240.): CLSI.

- **PÉRICHON, B., COURVALIN, P., & STRATTON, C. W.** (2015). Antibiotic Resistance. Reference Module in Biomedical Sciences. doi:10.1016/b978-0-12-801238-3.02385-0
- **POIREL, L., MADEC, J.-Y., LUPO, A., SCHINK, A.-K., KIEFFER, N., NORDMANN, P., & SCHWARZ, S.** (2018). Antimicrobial Resistance in *Escherichia coli*. *Microbiology spectrum*, 6(4). doi:10.1128/microbiolspec.ARBA-0026-2017
- **POOLMAN, J. T.** (2017). *Escherichia coli*. In S. R. Quah (Ed.), *International Encyclopedia of Public Health (Second Edition)* (pp. 585-593). Oxford: Academic Press.
- **PUÑO-SARMIENTO, J., MEDEIROS, L., CHICONI, C., MARTINS, F., PELAYO, J., ROCHA, S., NAKAZATO, G.** (2013). Detection of diarrheagenic *Escherichia coli* strains isolated from dogs and cats in Brazil. *Veterinary Microbiology*, 166(3), 676-680. Doi doi.org/10.1016/j.vetmic.2013.07.007
- **PUVAČA, N.; DE LLANOS FRUTOS, R.** (2021) Antimicrobial Resistance in *Escherichia coli* Strains Isolated from Humans and Pet Animals. *Antibiotics*, 10, 69. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10010069>
- **QADRI, F., SVENNERHOLM, A. M., FARUQUE, A. S., & SACK, R. B.** (2005). Enterotoxigenic *Escherichia coli* in developing countries: epidemiology, microbiology, clinical features, treatment, and prevention. *Clin Microbiol Rev*, 18(3), 465-483. doi:10.1128/cmr.18.3.465-483.2005.
- **REYGAERT W. C.** (2018). An overview of the antimicrobial resistance mechanisms of bacteria. *AIMS microbiology*, 4(3), 482–501. <https://doi.org/10.3934/microbiol.2018.3.482>
- **RIVAS, M., MILIWEBSKY, E., & DEZA, N.** (2017). Diagnóstico y caracterización de *Escherichia coli* O157 productor de toxina Shiga a partir de especímenes clínicos. Departamento Bacteriología. Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas.

- **ROBBINS, S.N.; GOGGS, R.; LHERMIE, G.; PAUL, D.F.L.; MENARD, J.** (2020) Antimicrobial Prescribing Practices in Small Animal Emergency and Critical Care. *Front. Vet. Sci.* 7, 110.
- **ROBINS-BROWNE, R. M., HOLT, K. E., INGLE, D. J., HOCKING, D. M., YANG, J., & TAUSCHEK, M.** (2016). Are *Escherichia coli* Pathotypes Still Relevant in the Era of Whole-Genome Sequencing *Front Cell Infect Microbiol*, 6,141.Retrievedfrom <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fcimb.2016.00141>
- **RUANO-GALLEGO, D.; SANCHEZ-GARRIDO, J.; KOZIK, Z.; NÚÑEZ-BERRUECO, E.; CEPEDA-MOLERO, M.; MULLINEAUX-SANDERS, C.; CLARK, J.N.-B.; SLATER, S.L.; WAGNER, N.; GLEGOLA-MADEJSKA, I.** (2021). Type III secretion system effectors form robust and flexible intracellular virulence networks. *Science*, 371, 6534
- **SALDAÑA, Z., XICOHTENCATL-CORTES, J., AVELINO, F., PHILLIPS, A. D., KAPER, J. B., PUENTE, J. L., & GIRÓN, J. A.** (2009). Synergistic role of curli and cellulose in cell adherence and biofilm formation of attaching and effacing *Escherichia coli* and identification of Fis as a negative regulator of curli. *Environmental microbiology*, 11(4), 992–1006. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2008.01824.x>
- **SANCAK, A. A., RUTGERS, H. C., HART, C. A., & BATT, R. M.** (2004). Prevalence of enteropathic *Escherichia coli* in dogs with acute and chronic diarrhoea. *Veterinary Record*, 154(4), 101. doi:10.1136/vr.154.4.101
- **SAKA HK, DABO NT, MUHAMMAD B, GARCÍA-SOTO S, UGARTE-RUIZ M, ALVAREZ J.** (2019) Diarrheagenic *Escherichia coli* Pathotypes from Children Younger Than 5 Years in Kano State, Nigeria. *Front Public Health*. Nov 27;7:348. doi: 10.3389/fpubh.2019.00348.
- **SCALETSKY, I. C., PEDROSO, M. Z., OLIVA, C. A., CARVALHO, R. L., MORAIS, M. B., & FAGUNDES-NETO, U.** (1999). A localized adherence-like pattern as a second pattern of adherence of classic enteropathogenic

*Escherichia coli* to HEp-2 cells that is associated with infantile diarrhea. Infection and immunity, 67(7), 3410-3415. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10377120>

- **SCHIEBEL, J., BÖHM, A., NITSCHKE, J., BURDUKIEWICZ, M., WEINREICH, J., ALI, A., SCHIERACK, P.** (2017). Genotypic and Phenotypic Characteristics Associated with Biofilm Formation by Human Clinical *Escherichia coli* Isolates of Different Pathotypes. Applied and Environmental Microbiology, 83(24), e01660-01617. doi:10.1128/AEM.01660-17
- **SEIDMAN JC, ANITHA KP, KANUNGO R, BOURGEOIS AL, COLES CL.** (2009) Factores de riesgo de *E. coli* resistente a los antibióticos en niños de una zona rural. Epidemiol Infect. 137: 879–88. doi: 10.1017 / S0950268808001519
- **SERVIN, A. L.** (2014). Pathogenesis of human diffusely adhering *Escherichia coli* expressing Afa/Dr adhesins (Afa/Dr DAEC): current insights and future challenges. Clin Microbiol Rev, 27(4), 823-869. doi:10.1128/cmr.00036-14
- **SHARMA, G., SHARMA, S., SHARMA, P., CHANDOLA, D., DANG, S., GUPTA, S., & GABRANI, R.** (2016). *Escherichia coli* biofilm: development and therapeutic strategies. J Appl Microbiol, 121(2), 309-319. doi:10.1111/jam.13078
- **SLATER, S.L.; SÅGFORS, A.M.; POLLARD, D.J.; RUANO-GALLEGO, D.; FRANKEL, G.** (2018). The type III secretion system of pathogenic *Escherichia coli*. In *Escherichia coli*, a Versatile Pathogen; Current Topics in Microbiology and Immunology; Springer: Cham, Switzerland; Volume 416, pp. 51–72.
- **STEPANOVIC, S., VUKOVIC, D., HOLA, V., DI BONAVENTURA, G., DJUKIC, S., CIRKOVIC, I., & RUZICKA, F.** (2007). Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. Apmis, 115(8), 891-899. doi: 10.1111/j.1600-0463.2007.apm\_630.x

- **STURBELLE, R. T., AVILA, L. F. DA C. DE, ROOS, T. B., BORCHARDT, J. L., DE CÁSSIA DOS SANTOS DA CONCEIÇÃO, R., DELLAGOSTIN, O. A., & LEITE, F. P. L.** (2015). The role of quorum sensing in *Escherichia coli* (ETEC) virulence factors. *Veterinary Microbiology*, 180(3-4), 245–252. doi:10.1016/j.vetmic.2015.08.01
- **SWAMINATHAN B, BARRETT TJ, HUNTER SB, TAUXE RV, FORCE CDCPT.** (2001) PulseNet: the molecular subtyping network for foodborne bacterial disease surveillance, United States. *Emerg Infect Dis.*7(3):382–9.
- **TARIQ S, TABASSUM S, ASLAM S, SILLANPAA M, AL-QAHTANI WH, ALI S.** (2021) Detection of Virulence Genes and Biofilm Forming Capacity of Diarrheagenic *E. coli* Isolated from Different Water Sources. *Coatings*. 11(12):1544. <https://doi.org/10.3390/coatings11121544>
- **THAKUR N, JAIN S, CHANGOTRA H, SHRIVASTAVA R, KUMAR Y, GROVER N, VASHISTT J.** (2018) Molecular characterization of diarrheagenic *Escherichia coli* pathotypes: Association of virulent genes, serogroups, and antibiotic resistance among moderate-to-severe diarrhea patients. *J Clin Lab Anal.* Jun;32(5):e22388. doi: 10.1002/jcla.22388.
- **TENAILLON, O., SKURNIK, D., PICARD, B., & DENAMUR, E.** (2010). The population genetics of commensal *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology*, 8, 207. doi:10.1038/nrmicro2298
- **TOBIAS J, KASSEM E, RUBINSTEIN U, ET AL.** (2015) Involvement of main diarrheagenic *Escherichia coli*, with emphasis on enteroaggregative *E. coli*, in severe non- epidemic pediatric diarrhea in a high- income country. *BMC Infect Dis.*;15:79
- **TORRES, A. G.** (2017). *Escherichia coli* diseases in Latin America—a ‘One Health’ multidisciplinary approach. *Pathogens and Disease*, 75(2), ftx012-ftx012. doi:10.1093/femspd/ftx012

- **VAN HOUDT R, MICHIELS CW.** (2005) Role of bacterial cell surface structures in *Escherichia coli* biofilm formation. *Research in Microbiology*.156(5-6):626–633. [
- **VIDAL, M., KRUGER, E., DURÁN, C., LAGOS, R., LEVINE, M., PRADO, V., VIDAL, R.** (2005). Single multiplex PCR assay to identify simultaneously the six categories of diarrheagenic *Escherichia coli* associated with enteric infections. *J Clin Microbiol*, 43(10), 5362-5365. doi:10.1128/jcm.43.10.5362-5365.2005
- **VON ROSENVINGE, E. C., O'MAY, G. A., MACFARLANE, S., MACFARLANE, G. T., & SHIRTLIFF, M. E.** (2013). Microbial biofilms and gastrointestinal diseases. *Pathogens and diseases*, 67(1), 25–38. <https://doi.org/10.1111/2049-632X.12020>
- **WATSON, V. E., JACOB, M. E., FLOWERS, J. R., STRONG, S. J., DEBROY, C., & GOOKIN, J. L.** (2017). Association of Atypical Enteropathogenic with Diarrhea and Related Mortality in Kittens. *J Clin Microbiol*, 55(9), 2719. doi:10.1128/JCM.00403-17
- **WEISS-MUSZKAT M, SHAKH D, ZHOU Y, ET AL.** (2010) Biofilm formation by and multicellular behavior of *Escherichia coli* O55:H7, an atypical enteropathogenic strain. *Applied and Environmental Microbiology*. 76(5):1545–1554.
- **YANG CM, LIN MF, LIN CH, HUANG YT, HSU CT, LIOU ML.** (2009) Characterization of antimicrobial resistance patterns and integrons in human fecal *Escherichia coli* in Taiwan. *Japanese journal of infectious diseases*.62:177-181.
- **YOKOYAMA, E., & UCHIMURA, M.** (2006). Optimal settings of fingerprint-type analysing computer software for the analysis of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* pulsed-field gel electrophoresis patterns. *Epidemiology and infection*, 134(5), 1004–1014. <https://doi.org/10.1017/S0950268806006145>

- **ZOTTA, C. M., SILVINA, L., HOLLMANN, P., & LANFRANCONI, V.** (2015). Animales Domésticos Como Reservorio De *Escherichia coli* Productor De Toxina Shiga En Mar del Plata. Journal of the Selva Andina Research Society, 6(1), 2-9. Retrieved from <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=361336202003>
- **ZHU XH, TIAN L, CHENG ZJ, ET AL.** ( 2016) Viral and bacterial etiology of acute diarrhea among children under 5 Years of Age in Wuhan, China. Chinese Med J.;129:1939.