



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA
ESCUELA DE POSGRADO

**CARACTERIZACION MOLECULAR DE
FACTORES DE VIRULENCIA y
GENOTIPOS DE *Escherichia
coli* AISLADA EN LANGOSTINO
(*Litopenaeus vannamei*) Y CAMARONES
DE RIO (*Cryphiops caementarius*) EN
TERMINALES PESQUEROS DE LIMA
METROPOLITANA.**

TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE
MAESTRO EN SANIDAD ACUÍCOLA

MV. ANDRE SANCHEZ VILLANUEVA

LIMA – PERU

2018

Asesor de tesis: Dr. Marcos Enrique Serrano Martinez

Coasesor de tesis: Dr. Luis Llanco Albornoz

AGRADECIMIENTO

Al Dr. Enrique Serrano (UPCH) y al Dr. Luis Llanco (UPCH) por su apoyo y asesoría constante durante todo el proceso de elaboración de este trabajo. Su confianza y paciencia hicieron posible concretar este trabajo.

A mi madre Lily y padre Roberto como también a mi pareja Andrea por el apoyo incondicional que me han brindado durante todo este trayecto de la maestría .

FUENTE DE FINANCIAMIENTO

La realización de esta tesis para optar el grado de Magister en Sanidad Acuícola ha sido posible gracias al apoyo financiero brindado al Programa de Maestría en Sanidad Acuícola de la UPCH subvencionado por Cienciaactiva del CONCYTEC (Convenio de Gestión N° 230-2015 FONDECYT).

INDICE

Contenido

I.	Introducción.....	1
II.	Planteamiento de la investigación.....	3
	Planteamiento del Problema.....	3
III.	Marco teórico.....	4
	<i>Escherichia coli</i>	4
	Clasificación.....	5
	<i>E. coli</i> enteropatogénica (EPEC).....	6
	Factores de virulencia.....	6
	<i>E. coli</i> enterohemorrágica (EHEC).....	9
	Factores de virulencia.....	10
	<i>E. coli</i> enterotoxigénica (ETEC).....	13
	Factores de virulencia.....	13
	<i>E. coli</i> enteroagregativa (EAEC).....	16
	Factores de virulencia.....	16
	<i>E. coli</i> Enteroinvasiva (EIEC).....	18
	Factores de virulencia.....	18
	<i>E. coli</i> adherente difusa (DAEC).....	21
	Factores de virulencia.....	21
	<i>E. coli</i> en América Latina.....	23
	<i>E. coli</i> en Perú.....	24
	Alimentos implicados.....	27
	Diversidad genética de <i>E. coli</i>	30
IV.	Justificación del estudio.....	31
V.	Objetivos.....	32
	Objetivo general.....	32
	Objetivos específicos.....	32
VI.	Materiales y metodos.....	33
VII.	Resultados.....	39

VIII.	Discusión	46
IX.	Conclusiones	50
X.	Recomendaciones	51
XI.	Referencias bibliográficas	52

LISTA DE TABLAS

Tabla 1.Frecuencia de aislamiento de <i>E.coli</i> diarrogenicas en niños menores de 5 años	26
Tabla 2.Presencia de <i>E. coli</i> y <i>E. coli</i> diarreogénicas (DEC) en alimento y bebida ...	29

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1 .Primers utilizados en la detección de genes de virulencia de <i>E. coli</i>	36
Cuadro 2 . Frecuencia de aislamiento de <i>E. coli</i> por especie.	39
Cuadro 3 . Frecuencia de patotipos de <i>E. coli</i> y <i>E.colidiarreogénicas</i> por especie y procedencia.....	40

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Representación de zonas de colonización de las *E. coli* patogénicas.
.....4
- Figura 2.** Cultivo realizado en medio Hicrome agar. Colonias color azul, *E. coli*; colonias color rojo, *Klebsiella* spp.
.....39
- Figura 3.** Electroforesis del producto de PCR para la identificación de STEC de camarón de río y langostino. Línea 6, gen *stx2* (807 bp), líneas 12– 14 y 16, gen *stx1* (388 bp). MPM, marcador de peso molecular (MPM) 100 bp (Invitrogen).
.....41
- Figura 4.** Cepas control de *E.coli* productora de toxina shiga (STEC) Carril 3: Cepa control edl933 Stx1 (388 pb) Carril 5: Cepa control edl933 Stx2 (807 pb). MPM: Marcado de peso molecular 100 pb.....41
- Figura 5.** Dendograma del total de aislados de *E. coli* de camarón de río y langostinos procedentes de Villa María del Triunfo y Ventanilla. Leyenda: EC: *E. coli* ATCC 35218.....45

RESUMEN

Los principales Terminales Pesqueros de la región Lima comercializan el langostino y camarón de río, que son consumidos en la forma semicocida o cocida, alcanzando a afectar al consumidor si están contaminados con bacterias como *Escherichia coli*, seis son los patotipos que hacen parte del grupo diarrogénico de importancia para la salud pública siendo los más prevalentes *E. coli* enteropatógena (EPEC), enterotoxigénica (ETEC), enteroagregativa (EAEC) y enterohemorrágica (EHEC) o *E. coli* productora de toxinas shiga (STEC).

Por lo tanto, el objetivo de este estudio se enfocó en caracterizar molecularmente la diversidad genética y factores de virulencia de *E. coli* aisladas de langostino (*Litopenaus vannamei*) y camarón de río (*Cryphiops caementarius*) procedentes de los principales terminales pesqueros de Lima. Se obtuvo 97 muestras, siendo positivas en camarón el 92% (n=50) y en langostino 31.79% (n=47). Se identificó la presencia de genes codificantes de las toxinas Stx 1 (10%, n=47) y Stx2 (2%, n=50) en camarón y Stx 1 (2.1%, n=47) y Stx2 (2.1%, n=47) en langostino. Mediante la técnica de REP-PCR se determinó una similitud de 60% entre los aislados y la presencia de clones. Debido a la baja frecuencia de *E. coli* diarrogénicas detectada, se concluye que estas especies presentan bajo riesgo para los consumidores, entre los aislados existe elevada diversidad genética y algunos de ellos fueron clasificados como pertenecientes al patotipo STEC.

Palabras clave: *L. vannamei*, *C. caementarius*, *E. coli*, STEC, REP PCR.

ABSTRACT

The main fishing terminals of Lima region commercialize shrimp and rivershrimp, consumed in these mis-cooked or cooked form, with potential to affect consumers if are contaminated with bacteria such as *Escherichia coli*, diarrogenic bacteria classified in six pathotypes of high importance for public health being the most prevalent enteropathogenic *E. coli* (EPEC), enterotoxigenic (ETEC), enteroaggregative (EAEC) and enterohemorrhagic (EHEC) or shiga toxin-producing *E. coli* (STEC).

Therefore, objective of this study was to molecularly characterize genetic diversity and virulence factors of *E.coli* isolated from shrimp (*Litopenaus vannamei*) and rivershrimp (*Cryphiops caementarius*) from main fishing terminals of Lima. 97 samples were obtained, being positive in shrimp 92% (n = 50) and rivershrimp 31.79% (n = 47). Were identified presence of genes encoding toxins Stx 1 (10%) and Stx2 (2%) in rivershrimp and Stx 1 (2.1%) and Stx2 (2.1%) in shrimp. Using REP-PCR technique, similarity of 60% was found between isolates and presence of clones was detected. Due to low frequency of diarrogenic *E. coli* detected, it is concluded that these species present low risk to consumers, among isolates there is a high genetic diversity and some of them were classified as belonging to STEC pathotype.

Keywords: *L. vannamei*, *C. caementarius*, *E. coli*, STEC, REP PCR.

I. Introducción

En el Perú, la principal especie marina cultivada es *Litopenaus vannamei*, conocido comúnmente como langostino blanco, crustáceo que pasa su vida adulta en el mar y tiene hábitos detritívoros. Este se distribuye en las costas occidentales de América, desde México hasta el norte del Perú (FAO, 2016) mientras el camarón de río (*Cryphiops caementarius*), artrópodo que habita en aguas dulces, como ríos y riachuelos, de la costa occidental del Perú y Chile, siendo de importancia económica para la pesquería continental de la costa sur de nuestro país (Instituto del mar del Perú [IMARPE], 2013). Estas especies pueden tener importancia en la salud pública al ser identificadas como vehículos transmisores de *Escherichia coli* causadora de diarrea (Chakravarty *et al.*, 2015). Es variable la gravedad de síntomas que puede causar esta bacteria diarreogénica, clasificada en seis patotipos, cuatro de los cuales son más frecuentes: *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), enterohemorrágica (EHEC), enterotoxigénica (ETEC) y enteropatógena (EPEC), siendo su transmisión asociada a mala calidad del agua y alimentos contaminados ([FDA] U.S.A. Food and Drug Administration, 2016). El patotipo EHEC es el más letal y actúa mediante la producción de toxinas shiga (STEC), afectando generalmente a niños y adultos mayores ([CDC] Center for disease control and prevention, 2015). Adicionalmente, *E. coli* es considerada ubicua en alimentos de origen marino, siendo reportada en mercados municipales de ventas de crustáceos del Brasil donde se ha identificado la presencia de los tipos ETEC y EPEC (Barbosa *et al.*, 2016), mientras que en recursos hidrobiológicos, provenientes de mercados municipales en México, se halló los patotipos EPEC y EIEC (Canizales-Román *et al.*, 2013). En el Perú se tiene como primer lugar de reporte de *E. coli*

enterohemorrágica a la región de Tacna, detectada en un lactante y cuyo origen estuvo probablemente asociado a una escasa condición higiénico-sanitaria (Huapaya *et al.*, 2001). *E. coli* diarreogénica es un patógeno muy común de aislar en infantes con gastroenteritis, así como en niños sin diarrea, con prevalencias de 29% (n=557) y de 30% (n=195), respectivamente (Ochoa *et al.*, 2009).

II. Planteamiento de la investigación

Planteamiento del Problema.

E. coli es una bacteria que posee mucha importancia en la salud pública mundial, afectando principalmente a niños y adultos mayores que sufren severos cuadros de infección gastrointestinal que cursa con diarrea y deshidratación (CDC, 2015). Está bien documentado que los principales vehículos de transmisión alimenticios de esta bacteria son derivados de carne bovina y vegetales, mientras que los productos hidrobiológicos también pueden afectar al consumidor cuando son ingeridos crudos (Chakravarty *et al.*, 2015). Si bien en nuestro país existen reportes con respecto a la presencia de *E. coli* en algunos alimentos no existe información detallada con respecto a las características genéticas de esta bacteria procedente de productos hidrobiológicos que puedan servir para adoptar medidas terapéuticas o de prevención.

III. Marco teórico

Escherichia coli

El género *Escherichia* pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*, entre cuyas características está formada por bacilos rectos Gramnegativos, de tamaño medio (0.4-0.6 x 2-3 um), no formadores de esporas, anaerobios facultativos, inmóviles o móviles mediante flagelosperítricos, fermentador de D-glucosa (a menudo con producción de gas), catalasa positivos y oxidasa negativos (Koneman, 2006). Los

miembros de este género son clasificados en seis especies: *E.coli*, *E.blattae*, *E. fergusonii*, *E. vulneris*, *E. hermannii*, *E.albertii*, siendo *E.coli* la especie con más significación clínica (Huys *et al.*,2003). Descubierta en 1885 por el médico pediatra Theodor Escherich, quien la denominó inicialmente “ the common colon bacillus ” (denominado actualmente *E.coli*) (Shulman,Friedman y Sims,2007).

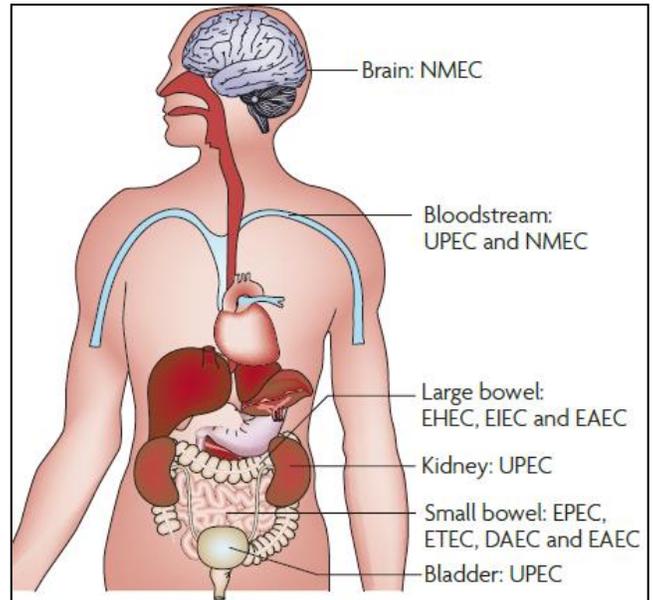


Fig.1. Representación de zonas de colonización de *E. coli* patogénicas. Fuente: Croxen y Finlay, 2010.

Clasificación

La especie *E.coli* es predominante en la microbiota del tubo digestivo de la mayor parte de los mamíferos, donde reside sin afectar la salud de sus hospederos (Koneman, 2006). Sin embargo, algunas cepas son patógenas y pueden causar infecciones entéricas o extraintestinales (fig.1), afectando más severamente a infantes y personas de la tercera edad (FDA, 2016), siendo su transmisión a través del agua o alimento contaminado, contacto con animales y personas con deficientes hábitos sanitarios (CDC, 2015). Las *E.coli* extraintestinales (ExPEC) son consideradas como patógenos oportunistas que generan diversas infecciones siendo las más reconocidas la uropatogénica (UPEC) (causante de cistitis y pielonefritis) y la causadora de meningitis neonatal (NMEC), que puede cruzar la barrera hematoencefalica; ambas pueden causar septicemia en el ser humano. Existe otro grupo denominado de *E.coli* diarreogénicas (DEC), clasificadas en seis patotipos: *E. coli* productora de toxina shiga (STEC) o también referida como enterohemorrágica (EHEC), enterotoxigénica (ETEC), enteropatogénica (EPEC), enteroagregativa (EAEC), enteroinvasiva (EIEC) y de adherencia difusa (DAEC), de las cuales, las cuatro primeras son las más prevalentes y están asociadas a alimento contaminado y mala calidad de agua (FDA, 2016).

***E. coli* enteropatógena (EPEC)**

Durante brotes esporádicos de enfermedad gastrointestinal, que se manifestaban en los años 40 del siglo pasado en el Reino Unido, se identificaron serológicamente cepas responsables de causar diarreas en niños (Yang y Wang, 2014). Posteriormente, en el año 1955, se denominó a estas cepas como enteropatógenas (Vadillo, Piriz y Mateos, 2002). Este patotipo es de muy rara presentación en países industrializados, pero es la principal causa de diarreas severas en niños en países de desarrollo (Thapar y Sanderson, 2004). Clínicamente es asociado a la presencia de vómitos, fiebre y diarrea acuosa sin sangrado, las cuales pueden manifestarse tras apenas 4 horas después de su ingestión. Posee dosis infectiva inferior en los niños, con respecto a los adultos, que corresponde de 10^8 - 10^{10} células. Además, puede afectar a animales de producción, perros, gatos y conejos (Yang y Wang, 2014).

Factores de virulencia

El mecanismo de infección mediado por EPEC se caracteriza por el efecto “attachment/effacement” (adhesión/borrado), iniciando su adherencia a la estructura externa de las células epiteliales del intestino, gracias a la expresión de los genes *eae*, *tir*, *esp* de la “patogenicity island” (PAI) (isla de patogenicidad) denominada “Locus of enterocyte effacement” (LEE) (Locus de borrado enterocítico) (McDaniel *et al.*, 1995). El gen *eae* es responsable de codificar la expresión de una proteína de membrana externa, denominada intimina, que regula su adherencia a las células epiteliales (Jerse *et al.*, 1990). Esta proteína cumple las funciones de unión al epitelio

intestinal, estimular la respuesta inmune Th1 y generar hiperplasia intestinal (Higgins *et al.*, 1999). El gen *tir* (receptor translocador de intimina), se inserta en la membrana celular del hospedero con la finalidad de facilitar su adhesión actuando como receptor para la intimina (Kenny *et al.*, 1997). En adición, la porción de Tir que es expuesta a las proteínas citoesqueléticas del citosol, se une inicialmente a una proteína adaptadora Nck, que recluta amino terminales de la familia de proteínas del síndrome de Wiskott-Aldrich (N-WASP) y del complejo de proteínas $\frac{2}{3}$ (Arp2/3) que reclutan filamentos generando la aparición del complejo pedestal característico (Kalman, 1999), favoreciendo a su vez la agregación de otras proteínas citoesqueléticas como vinculina, cortactina, talina y alfa actinina (Vallanace y Finlay,2000). Los genes *esp* (*E.coli* secreted proteins) codifican proteínas necesarias para la producción de la lesión de adhesión y borrado de las microvellosidades intestinales y la condensación de la actina del citoesqueleto celular, provocando la aparición de un pedestal en forma de copa sobre el que descansa la bacteria, como la proteína Espf, que además causa apoptosis de la mitocondria, su organelo blanco (Crane, McNamara y Onnenberg, 2001; Ma *et al.*,2006), inhibe la fagocitosis (Nougayrède y Donnenberg,2004) e induce la redistribución de las uniones estrechas asociadas a la proteína ocludina, causando pérdida de resistencia eléctrica trans-epitelial (McNamara *et al.*, 2001). La proteína EspB inhibe la unión de la miosina con la actina generando un defecto en la formación de las microvellosidades así como en la fagocitosis(Lizumi *et al.*,2007).

Adicionalmente, existen otras proteínas efectoras de importancia, destacando entre ellas la proteína Map (Mitochondrial-associated protein), que afecta la función y estructura mitocondrial, demostrándose que actúa como un factor de intercambio guanina-nucleotido para CDC42, regulando la dinámica de la actina (Huang *et al.*, 2009) para favorecer la filopodia (Kaper, Nataro y Mobley, 2004); otra proteína denominada linfostatina (LifA) cumple el rol de inhibir la activación linfocitaria (Klapproth *et al.*, 2000), la cual también está presente en la EHEC, donde es conocida como Efa (Nicholls, Grant y Robins-Browne, 2000).

Por último, las diferentes cepas de *Escherichia coli* enteropatógenas son clasificadas como típicas y atípicas, debido a que las primeras poseen el plásmido EAF (EPEC adherence factor), responsable de la codificación del “Bundle forming pilus” tipo IV (Bfp), que regula la adherencia interbacterial y posibilita la adhesión a la célula epitelial, además de contener el locus Per (plasmid-encoded regulator), que regula el operón bfp y la mayoría de genes del LEE por el Ler (LEE encoded regulator), en cambio las cepas atípicas contienen el LEE pero no así el plásmido EAF (Trabulsi, Keller y Tardelli, 2002).

***E. coli* enterohemorrágica (EHEC)**

La *Escherichia coli* enterohemorrágica es uno de los patotipos de mayor importancia en la salud pública, en especial el serotipo O157:H7, que causa una enteritis hemorrágica o el síndrome urémico/hemolítico, requiriendo una dosis infectiva menor a 10 UFC, sin embargo, se desconoce este cuadro en otros serotipos de la EHEC (Yang y Wang, 2014). La fuente de este patógeno es el intestino de rumiantes, particularmente bovinos, en los cuales no causa síntomas clínicos (Stromberg *et al.*, 2016), siendo ubicuo en el tejido mucoso linfoide del recto (Naylor *et al.*, 2003). Fue reconocido por primera vez en el año 1982 durante el brote de colitis hemorrágica en múltiples lugares de los Estados Unidos, asociado al consumo de hamburguesas semicrudas (Yang y Wang, 2014). En la mayoría de los casos por EHEC algunas personas no presentan alteración ni diarrea sanguinolenta mientras en otras genera una colitis hemorrágica o una diarrea sanguinolenta persistente de 5 a 7 días, siendo el 20 % de casos referido al síndrome urémico hemolítico (HUS) como el más común, caracterizado por generar un déficit de la formación urinaria como también en desarrollar una falla renal, ocurriendo principalmente en niños menores de 10 años (Yang y Wang, 2014). Las variedades responsables de brotes engloban a un reducido número de serotipos que adquieren mayor importancia clínica, después del serotipo O157:H7, son el O26:H11, O103:H2 y O111:H- (Vadillo, Piriz y Mateos, 2002). Otros serotipos frecuentemente aislados de pacientes humanos con colitis hemorrágica o síndrome urémico hemolítico son O91:H-, O113:H21, O118:H16, O128:H2, O145:H-, O145:H28 y O146:H21 (Vadillo, Piriz y Mateos, 2002).

Factores de virulencia

Lo más resaltante de EHEC es la capacidad de producir toxinas shiga, Stx1 y Stx2, denominadas también verocitotoxinas. La Stx1 es idéntica a la toxina shiga producida por *Shigella dysenteriae* tipo 1, mientras Stx2 posee 56% de homología con Stx1, con diferentes subtipos denotados por subfijos (Taylor, 2008). Todas las shiga toxinas están compuestas por cinco subunidades B y una sola subunidad A. La subunidad B reconoce a los glucolípidos de la célula eucariótica como receptores, que en humanos corresponde a la globotriaosilceramida (Gb3), expresada en el túbulo renal y células vasculares del riñón, cerebro, enterocitos y células de Paneth del intestino pero no en el epitelio intestinal (Lingwood, 1999; Schüller, 2007). La subunidad A es una N glicosidasa que escinde el ARN ribosómico, generando el bloqueo de la transcripción (síntesis de proteínas), siendo variante su citotoxicidad en diferentes tipos de células e inclusive en las etapas del ciclo celular, provocando en ocasiones la muerte (Williams *et al.*, 1999). En células endoteliales vasculares genera efectos procoagulantes que pueden ser importantes en la patogénesis de HUS (Morigi *et al.*, 2011). La Stx es producida en el colon del hospedero y puede transportarse por la corriente sanguínea hasta al riñón, generando daño e inflamación a nivel de células endoteliales y oclusión microvascular, a través tanto de su acción tóxica directa como por la inducción local de citocinas y quimiocinas (Andreoli *et al.*, 2002). El efecto más sobresaliente de esta toxina es la aparición del síndrome urémico hemolítico (HUS), caracterizado por anemia hemolítica, trombocitopenia y falla renal (Kaper, Nataro y Mobley, 2004). Dentro de las subdivisiones de la familia de Stx 2, la Stx2c es asociada al HUS, mientras otros subtipos como Stx2d, Stx2e y Stx2f no están

presentes aunque recientemente el subtipo Stx2d parece estar asociada al HUS, indicando que no requiere de los factores de virulencia causadores del "Adjunto y borrado" como otras EHEC lo requieren (Bielaszewska *et al.*, 2006). La Stx2e, responsable de la "enfermedad del edema en cerdos", es reconocida por la Gb4 de esta especie mientras Stx2f fue aisladas en aves, sin asociarse a algún cuadro clínico en estas (Taylor *et al.*, 2008). La inducción de la apoptosis es otra forma distinta de eliminar a la célula, en beneficio de *E.coli*, a través de la participación de algunas toxinas como los miembros pro apoptóticos que son Bax y Bad, inhibiendo el Bcl-2 (antiapoptótico) y que al afectar al citocromo c activan la cascada de la caspasa. En consecuencia, estas toxinas generan daño local en el colon, resultando en la aparición de diarrea sanguinolenta, colitis hemorrágica, necrosis y perforación intestinal (Jones *et al.*, 2000). Interesantemente, muchas cepas EHEC contienen islas de patogenicidad codificadoras de proteínas efectoras, similares a las de *E. coli* EPEC, que son excretadas mediante el sistema de secreción tipo III, lo que lleva a creer que el LEE de la cepa EHEC O157:H7 procede de la cepa EPEC O55, que adquirió los bacteriófagos codificadores de Stx (Reid *et al.*, 2000). Aunque existen más de 200 serotipos de *E. coli* productoras de Stx, gran parte de ellas no contienen la isla de patogenicidad LEE y la mayoría no están asociadas a enfermedades en humanos. Así, el término EHEC es reservado para denotar cepas Stx positivas, productoras de shiga toxina (STEC) o verotoxina (VTEC), que además contengan LEE, sin embargo, existen cepas STEC que pueden causar enfermedad (O103:H21), sugiriendo que existen otros factores de virulencia que no han sido caracterizados (Kaper, Nataro y

Mobley, 2004). En los estudios de Tatsuno *et al.*(2001) se estableció que hay factores de adhesión potenciales tanto en O157:H7 y otras EHEC, como la proteína ToxB, codificada por un plásmido, compartiendo esta proteína secuencias similares a las de la familia de toxinas de *Clostridium difficile* (Toxin 1 y toxin 2). Las proteínas LfA de EPEC (Klapproth *et al.*, 2000) y Efa-1 son implicadas como adhesinas en las cepas que no son la EHEC O157:H7 (Nicholls, Grant y Robins-Browne, 2000). Adicionalmente, el plásmido pO157 puede codificar la producción de las toxinas RTX (Repetidor de toxina) (similar a la hemolisina de la UPEC), serina proteasa (EspP), catalasa, proteína StcE y Hly (Burland *et al.*, 1998). Adicionalmente, la proteína StcE, otro factor de virulencia descubierto hace poco, escinde el inhibidor de esterasa C1 (C1-INH) de la vía de complemento contribuyendo potencialmente al daño tisular, edema intestinal y anomalías trombocíticas que son vistas en las infecciones por EHEC (Lathem *et al.*, 2002). Además, la proteína Hly permite a *E. coli* O157 utilizar la hemoglobina liberada como fuente de hierro, estimulando así su crecimiento en el intestino (Koneman, 2006).

***E. coli* enterotoxigénica (ETEC)**

Reconocida a finales de 1960s y comienzos de 1970s, es el mayor causante de diarrea en viajeros, niños y recién nacidos, así como animales domésticos, incluyendo terneros, a pesar de que en su fase adulta no les afecta (Yang y Wang, 2014). El agua y los alimentos contaminados han sido identificados como los vehículos transmisores en la mayoría de los brotes causados por esta bacteria y debido a que la dosis mínima infectiva es de aproximadamente 10^8 células se le asocia con deficientes condiciones sanitarias, siendo el hombre el reservorio natural (Yang y Wang, 2014). Las manifestaciones clínicas son muy similares al cuadro asociado al *Vibrio Cholera*, que corresponde a diarrea acuosa, náusea, contracción abdominal y fiebre baja (Qadri *et al.*, 2005).

Factores de virulencia

La colonización es regulada por la presencia de una o varias proteínas fimbriales o factores de colonización fibrilar (CFs) que les permite adherirse al epitelio intestinal siendo denominadas: CFA (Factor antígeno de colonización), CS (antígeno superficial de coli) o PCF (Putative factor of colonization) (Kaper, Nataro y Mobley, 2004).

Adicionalmente sus factores de virulencia más resaltantes son las enterotoxinas del ETEC clasificadas en dos: la enterotoxina termolábil (LTs) y la enterotoxina termoestable (STs), las cuales la bacteria puede liberar solo una o ambas al afectar al hospedero (Sánchez y Holmgren, 2005). Cabe resaltar que la LTs posee mucha similitud en cuanto a estructura y funcionalidad con la enterotoxina colérica

(CT), producida por *Vibrio cólera* (Sánchez y Holmgren, 2005), ya que ambas consisten de una subunidad A, responsable de la actividad enzimática, y otra subunidad B, que regula la unión de la holotoxina con la superficie celular de los gangliósidos GM1 y GD1b (Sánchez y Holmgren, 2005). Asimismo, la LT posee actividad ADP ribosil transferasa hacia la subunidad alfa de la proteína G estimuladora, que regula la adenilato ciclasa, activando esta de manera permanente y provocando el incremento de cAMP intracelular, activación del cAMP dependiente de quinasa y de los principales canales de cloro de células epiteliales CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) (Kaper, Nataro y Mobley, 2004), siendo esta última la causa de la producción de diarrea por el incremento de la secreción de cloro de las criptas intestinales (Sears y Kaper, 1996).

Por otra parte, las toxinas ST incluyen 2 clases, A y B, las cuales difieren tanto en estructura como en mecanismo de acción, siendo solo la clase STa asociada a enfermedades en humanos (Nataro y Kaper, 1998). El receptor principal de esta toxina es la guanilato ciclasa transmembrana, que después de ser estimulada, favorece el incremento intracelular de cGMP, activa el cGMP dependiente y/o cAMP independiente de Kinasas, resultando en un aumento neto de la secreción (Currie *et al.*, 1992).

La toxina STb, asociada a enfermedades en animales. Su principal efecto es elevar la concentración citosólica de Ca₂, estimular la liberación de prostaglandina E2 y serotonina, teniendo como efecto final el aumento de la secreción (Dubreuil, 1997).

Interesantemente, ETEC es un patógeno ubicuo en países en desarrollo, donde la prevalencia de cáncer de colon es baja (Pitari *et al.*, 2003) y ha sido sugerido que esto podría deberse, parcialmente, a que el STa suprime la proliferación de las células neoplásicas a través de la cascada de señalización de la guanilil ciclasa C (Pitari *et al.*, 2003).

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

Fue identificada por su propiedad de adherirse a las células “Human Epidermoid carcinoma strain #2” (HEp-2) en los años 80s (Yang y Wang, 2014). Este patotipo es el principal responsable de la diarrea aguda o persistente en niños y adultos alrededor del mundo (Croxen y Finlay, 2010). La dosis infectiva estimada es de 10^{10} células siendo el ser humano el reservorio natural (Yang y Wang, 2014). Los síntomas asociados a este tipo de *E. coli* son la presencia diarrea acuosa con mucosidad y presencia de baja fiebre o ausencia de ella (Pawlowski *et al.*, 2009).

Factores de virulencia

Se ha demostrado que el patotipo EAEC se adhiere a las células HEp-2 y a la mucosa intestinal gracias una estructura fimbrial denominada “aggregative adherence fimbriae” (AAFs) mediada por genes presentes en el denominado “plásmido de adherencia agregativa” (pAA) (Croxen y Finlay, 2010), relacionado a la familia “Dr” de adhesinas (Czeczulin *et al.*, 1997; Nataro *et al.*, 1992; Nataro *et al.*, 1994). Existen cuatro variantes identificados del AAF (AAF/I, AAF/II , AAF/III y Hda) (Harrington *et al.*, 2006 ; Boisen *et al.*, 2008), de las cuales se desconoce su receptor, aunque en el caso de de AAF/II se sospecha que se une a la fibronectina (Farfan *et al.*, 2008).

La adhesina AAF es favorecida por otra proteína llamada dispersina, que genera la pérdida de la carga superficial celular para potencializar su agregación, loque les permite a ambas asociarse al LPS a través de una interacción electrostática y de exponer la carga negativa de esta, permitiendo al AAF extenderse sobre la superficie colonizada en lugar de colapsar sobre ella (Croxen y Finlay,

2010),facilitando su extensión a través de mucosa intestinal o para penetrarla (Sheikh *et al.*, 2002). Por otro lado, el proceso inflamatorio es impulsado por la flagelina, que induce la liberación de la interleucina 8 (IL-8) y también estimula transmigración de neutrófilos a través del epitelio, generando una disrupción del tejido y secreción de fluidos (Steiner *et al.*, 2000).

Respecto a las toxinas liberadas como Pic,Pet,Shet 1 y East 1, que si bien no son asociados exclusivamente a la virulencia de EAEC ya que otros patogenos entéricos también lo poseen (Kaper,Nataro y Mobley, 2004), la mayoría de cepas de este patotiposon reguladas por un activador transcripcional llamado AggR, miembro de la familia AraC de los activadores transcripcionales (Nataro *et al.*, 1992). Interesantemente, Jiang *et al* (2002) indican que cuando algunos genes relacionados a virulencia en cepas EAEC son regulados por el regulón AggR, esto se traduce en un incremento de la concentración de IL-8 e IL-1 en las heces de pacientes con diarrea causada por este patotipo.

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

Este patotipo, inicialmente reconocido en el año 1971, se caracteriza por la habilidad de inducir su ingreso en células epiteliales y difundirse a través de ellas (Yang y Wang, 2014). Clínicamente es similar a *Shigella spp* por la manifestación de fiebre alta, contracciones severas en el abdomen, diarrea conteniendo mucus y sangrado. Posee dosis infectiva menor a 10^6 células, los síntomas ocurren dentro de las 12-72 horas, debido a la ingestión de alimento o agua contaminada y, como en el caso de los 2 patotipos anteriores, el humano es el reservorio principal ya que no hay evidencia en animales (Yang y Wang, 2014).

Factores de virulencia

La *E. coli* enteroinvasiva (EIEC) es el patotipo que más se diferencia del resto de las *E. coli*, por presentar una patogenia muy similar al de *Shigella ssp* (Ud-Din y Wahid, 2014), La infección inicial ocurre en el colon donde estas bacterias (*Shigella spp.* y EIEC) pueden pasar a través de las células micropegadas (células M), por transcitosis, hasta llegar a la submucosa, generando daño estructural causado por la inflamación, lo que permite a la bacteria poder acceder a la submucosa (Croxen y Finlay, 2010). Después de esto, al ser fagocitada por macrófagos, evade el fagosoma activando el inflamasoma, dependiente de caspasa -1, permitiendo así su liberación desde estas células inmunitarias permitiéndole extenderse hacia la submucosa (Schroeder y Hilbi, 2008). Posteriormente, puede invadir la zona basolateral de los colonocitos con el apoyo de efectores que son secretados por el sistema de secreción tipo III (T3SS) (codificado por los genes *mxi* y *spa* de origen plasmidial), cuyos

efectores como IpaC, activan quinasas SRC al sitio de contacto para reclutar el complejo ARP2/3, causar la polimerización de la actina y permitir el ingreso bacteriano (Mounier *et al.*, 2009). Una vez dentro del citoplasma de la célula epitelial, promueve su sobrevivencia al usar efectores que alteran el proceso de la célula hospedera (Croxen y Finlay, 2010), es así que para prevenir la alteración del epitelio intestinal, el IpaB regula la detención del ciclo celular mediante MAD2L2, que es un inhibidor de la anafase (Iwai, 2007), y OspE, que interactúa con la quinasa unida a integrina (ILK) para prevenir el desprendimiento de células epiteliales (Rasko *et al.*, 2008). Adicionalmente, evade la apoptosis a través de IpgD (Pendaries *et al.*, 2006), que puede estimular fosfoinositide 3-quinasa y activar las proteínas Akt, que regulan la supervivencia celular (Croxen y Finlay, 2010). Es así que para que pueda persistir dentro de los colonocitos, *Shigella* debe poseer la capacidad de evadir la inmunidad innata, empleando 4 efectores como el OspG, que se une a la proteína “ubiquitylated“ E2, previniendo la degradación de factor de inhibición nuclear –Kb (NF-kB) subunidad alfa (I κ B α) inhibiendo la activación NK-kb (Kim *et al.*, 2005). Adicionalmente, OspF es dirigida al núcleo, donde desfosforila el activador mitogénico de la proteína quinasa (MAPK o MAP quinasa) que es requerida para la transcripción de genes regulados por la NF-KB (Arbibe *et al.*, 2006). IpaH es dirigida al núcleo para interactuar con el factor de empalme involucrado en la expresión de las citosinas inflamatorias (Okuda *et al.*, 2005). El cuarto efector OspB, junto con el OspF, reducen los niveles de IL-8 mediante de factores de acogida que remodelan la cromatina (Zurawdki *et al.*, 2009).

Como Shiguella no posee flagelo, aprovecha los elementos presentes en el huésped para moverse en el citosol y diseminarse de célula a célula, siendo la proteína efector VirG de la membrana externa (también conocida como IcsA), que se localiza en un solo polo y recluta y activa N-WASP y el complejo ARP2 / 3 para polimerizar actina, permitiendo su crecimiento, que acaba empujando las bacterias a través de la célula (Egile *et al.*, 1999). La capacidad de VirA para estimular la desestabilización de los microtúbulos, desempeña un papel importante en la eficacia locomotriz de Shigella mediante el suministro de un canal que permite moverse a lo largo de la célula (Yoshida *et al.*, 2006).

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

Las cepas DAEC fueron reconocidas en 1984, por ser diferentes al resto de los patotipos debido a su patrón de adherencia difusiva, la cual abarca toda la superficie de la célula Hela y Hep-2; asimismo es controversial su papel ya que está presente tanto en niños con o sin diarrea (Riveros *et al.*, 2011; Giron *et al.*, 1991). Los estudios de Scaletsky *et al.* (2002) indicaron que en pacientes hasta los 12 meses de edad puede aislarse colonias de DAEC, en niños con y sin diarrea, siendo significativa la asociación de diarrea en infantes que son mayores de 12 meses de edad. Asimismo, Servin (2005) indica que la diarrea está asociada a este patotipo en niños de 18 meses a 5 años de edad, sugiriéndose que una razón de su manifestación se deba a casos de desarrollo inmunitario incompleto o por malnutrición infantil. Sin embargo, en adultos no es posible generar tales signos clínicos ante este patotipo (Tacket *et al.*, 1990).

Factores de virulencia

El patotipo DAEC posee la capacidad de adherirse mediante proteínas codificadas por una familia de operones, que incluyen tanto fimbrias (Dr y F1845) y adhesinas afimbriales (Afa), siendo designadas de manera conjunta como adhesinas Afa-Dr (Servin, 2005). Estas cepas están presentes en el intestino delgado, donde las adhesinas Afa-Dr interactúan con las microvellosidades, asociadas con el factor acelerador de la descomposición del complemento (DAF o también denominado CD55) que se encuentra tanto en la superficie intestinal como de las células epiteliales urinarias (Croxen y Finlay, 2010) y la proteína glicosilfosfatidilinositol (GPI), hallada en la superficie celular y encargada de proteger a las células ante una

alteración, mediante el sistema de complemento (Hasan *et al.*,2002; Peiffer *et al.*,1998). Este patotipo induce efectos citopáticos, característicos por el desarrollo de la extensión celular y daño de microvelosidades a través de la desorganización de los componentes del citoesqueleto debido a la activación de la cascada de señalización dependiente de CA²⁺ (Servin,2005), que envuelve a la bacteria adherente, para ello requiere la unión y agrupación de la fimbria con el receptor de DAF (Proteína Dr) (Bernet-Camardet *al.*, 1996). Adicionalmente,dicha unión también induce la secreción de IL-8 en los enterocitos, promoviendo la trans migración de los leucocitos polimorfonucleares (PMN) a través de la capa epitelial de la mucosa (Croxen y Finlay ,2010), generando mayor acumulación de moléculas DAF en la superficie apical de la célula, provocando una mayor adherencia e interacción con las células PMN mediada por la Afa – Dr que acelera la apoptosis de las células PMN y así disminuye la actividad fagocítica (Bétis *et al.*,2003;Brest *et al.*,2004), a su vez también interactúa con receptores de antígeno carcinoembriónicos (CEACAM) que se encuentran sobre las superficies de membranas, en particular en los lípidos (Servin, 2005). Esta interacción permite mejorar la activación del CDC42, conduciendo a la agregación de CEACAM sobre las bacterias adherentes y generando el borrado de microvelosidades, interrumpiendo la función de secreción y absorción, contribuyendo finalmente a la diarrea (Berger *et al.*,2004).A su vez, todos los miembros de la familia Dr (incluyendo UPEC como también la cepa DAEC C1845)causan este efecto (Bilge *et al.*,1989).

***E. coli* en América Latina**

Las *E. coli* diarreogénicas son patógenos de gran importancia clínica, afectando al 30-40% de niños menores de 5 años con diarreas agudas o persistentes (O’Ryan, Prado y Pickering,2005;OMS,2016). La presencia de cada patotipo es variable y puede ser atribuida a diferentes factores como edad, nivel socioeconómico, así como el tipo de estudio y metodología laboratorial, entre otros,siendo los grupos más comúnmente identificados a nivel de Latinoamérica ETEC y EPEC (Varela, Gomez-Duarte y Ochoa, 2010), de las cuales el de mayor significancia corresponde a la EPEC atípica, categoría emergente que se esta volviendo muy frecuente (Gomes *et al.*,2010).

Apenas cuatro países de nuestro continente han realizado estudios epidemiológicos sobre esta enfermedad, Argentina, Brazil,Chile y México(tabla 1), presumiéndose que la razón por la que los otros países no lo reporten sea a que cuentan con informacion limitada,inhabilidad de hacerse público, por el alto costo, idioma o falta de interés de las autoridades(Gomes *et al.*,2010).

***E. coli* en Perú**

En nuestro país, durante el periodo de 1996 al 2000, se registró una mortalidad de 186 178 niños menores de 5 años, correspondiendo a causas neonatales, pneumonia y diarrea 29%, 20% y 9 % respectivamente, siendo la región andina la que presentó mayor proporción con 97, 442 óbitos (52.4%) siendo Puno el departamento más afectado, seguido por la costa con 61 540 (33.1%) y la selva con 26 801 (14.4 %) (Huicho, Trelles y Gonzales, 2006). De acuerdo al Ministerio de la Salud (2016) las enfermedades diarreicas agudas (EDAS) siguen siendo una causa importante de morbilidad en la niñez en el país por la presencia de factores determinantes en una proporción importante de la población, indicando que esta existiendo una mayor incidencia de episodios EDA en temporada cálida, siendo el departamento de Lima con mayor episodios de afección, seguido de Arequipa. El desarrollo del cuadro diarreico, causado por múltiples patógenos, es dependiente de la localidad geográfica, edad del paciente, sistema de atención de salud, entre otros, afectando su gravedad (tabla 1), considerándose como los patógenos más relevantes en niños al norovirus, *Campylobacter* y *E. coli* diarreogénicas (Riveros y Ochoa, 2015). En el departamento de Lima, un estimado de 34% de los casos de diarrea infantil es atribuido al patógeno DEC (Varela, Gomez-Duarte y Ochoa, 2010). Hasta mediados de la década del 90, la identificación de los diferentes patotipos de DEC se realizaba por ELISA, cultivo celular, serotipaje, entre otros. El año 2001, Huapaya *et al.* reportaron en Tacna, utilizando técnicas moleculares, por primera vez el serotipo O157:H7, en un lactante de 11 meses de edad, que presentó un cuadro de diarrea disintérica, siendo sugerido que la causa de la infección fue la deficiente condición

higiénico sanitaria, causada por la ingesta de leche procedente de venta ambulatoria en baldes plásticos y/o por el mismo entorno familiar, que también sufría de diarrea.

Un multiplex real time-PCR fue diseñado para detectar simultáneamente los seis patotipos deDEC, en el Instituto de Medicina Tropical de la Universidad Peruana Cayetano Heredia, permitiendo disminuir la intensidad laboral de rutina de trabajo como también el costo (Guion *et al.*, 2008). Asimismo se identificó, en niños con problemas gastrointestinales y sin signos de diarrea, la presencia de *E.coli* diarreogénica (Ochoa *et al.*, 2011) (ver tabla 1), siendo las razones de la alta frecuencia de patógenos en niños asintomáticos, de acuerdo a Varela, Gomez-Duarte y Ochoa (2010), a una interacción compleja entre factores que incluyen el patógeno (heterogeneidad y diferencias en la expresión de genes de virulencia), hospedero (edad, niveles de anticuerpos maternos, factor nutricional y estatus inmunológico) y finalmente el factor ambiental, como la exposición constante a condiciones insalubres y de alta contaminación fecal.

Las EPEC son prevalentes en niños, siendo las más comunes las cepas atípicas (*eae+*, *bfp-*) en pacientes con diarrea (73%, n=74) y en muestras control (87 %, n=46), destacándose el serogrupo 055 (Contreras *et al.*, 2010).

Tabla 1. Frecuencia de aislamiento de E.coli diarrogenicas en niños menores de 5 años.

País	Paciente	N° muestra de diarrea	EPEC	ETEC	DAEC	EAEC	EIEC	STEC
PERÚ	Con diarrea	4243	8.5	6.9	4.8	9.9	0.6	0.8
	Sin diarrea	3760	10.9	4.7	2.3	10,4	0.6	0.5
BRASIL	Con diarrea	1020	10	3.7	0	11.1	0	0.5
	sin diarrea	187	5.9	3.2	0	8.6	0	1.1
ARGENTINA	con diarrea	112	6.2	8.9	0	8.9	6.2	6.2
MEXICO	con diarrea	174	2.9	8.6	0	0	1.7	12
	sin diarrea	30	0	0.6	0	0	0	0

Fuente: Ochoa *et al.*, 2011; Bueriset *et al.*, 2007; Medina *et al.*, 2010; Paniagua *et al.*, 2007

Alimentos implicados

En los estudios de Canizales-Roman *et al.* (2013), se determinó que los cuadros causados por *E. coli* diarreogénicas (DEC) con mayor frecuencia estuvieron asociados a productos lácteos (crema, suero de leche, leche, mantequilla, queso y yogurt), seguida por productos cárnicos (carne de mamíferos y aves de corral, salchichas, jamón y salchicha de cerdo) y productos hidrobiológicos (productos crudos, camarones sazonados, almejas, calamar, mariscos mixtos, rayas, ostras, pulpos y peces) (Tabla 2).

De acuerdo a Miget (1991) las enfermedades o infecciones asociadas al consumo de productos hidrobiológicos son principalmente atribuidas a productos contaminados por 3 de las razones siguientes:

- Patógenos presentes en el medio natural (*Clostridium botulinum* tipo E, *Vibrio cholerae*, *V. parahaemolyticus* y *V. vulnificus*),
- Microorganismos introducidos al ambiente acuático como resultado de desperdicios impropios del ser humano (*Clostridium perfringens*, *Staphylococcus*, *Erysipelothrix*, *Edwardsiella*, *Salmonella*, *Francisella* y *Vibrio* spp.).
- Microorganismos introducidos durante la manipulación del producto, principalmente por parte del personal del barco de cosecha; por procesos en planta, durante la conservación del alimento y por el consumidor (coliformes fecales como *E. coli*, *Staphylococcus* y *Salmonella*).

Esta última razón es importante debido que, en el caso de productos que tienen reducida o eliminada su carga inicial por precocción o cocción puedan constituir un riesgo potencial para la salud debido a la transferencia accidental por manipulación inadecuada de microorganismos que pueden multiplicarse sin dificultad (Durán y Marshall., 2005).

La presencia de *E. coli* puede variar de acuerdo al ecosistema y condiciones ambientales donde se ubique, es así que esta bacteria coliforme suele persistir más tiempo en aguas dulces que saladas, muy probablemente debido a influencias químicas, física y biológicas (Anderson, Whitlock y Harwood, 2005). En ese sentido, los resultados obtenidos por Chakravarty *et al.* (2015) en alimentos hidrobiológicos provenientes de agua dulce reportaron mayor número de *E. coli* en comparación con los de origen marino.

La prevalencia de patógenos en alimentos hidrobiológicos importados a los Estados Unidos, los cuales en su mayoría proceden de sistemas de cultivo, indican un rango de 0.6%, para *C. Jejuni* y *Salmonella* y 9.4%, para *E. coli*, variando estos porcentajes según el país de procedencia y siendo menos frecuente en países en desarrollo (Wang *et al.*, 2011).

En Brasil, los camarones más consumidos (*Farfantepenaeus brasiliensis*, *Litopenaeus schmitti* y *Xiphopenaeus kroyeri*), que son vendidos en los mercados locales, sirven de vehículo de bacterias patógenas importantes como ETEC y EPEC, destacando la importancia de esto para la salud pública (Barbosa *et al.*, 2016). Adicionalmente, en este mismo país, en centros de cultivos sobre de camarón

Litopenaus vannamei se obtuvo valores de recuento de número más probable (NMP) de <3 a 2.9×10^4 obteniendo mayor frecuencia de aislamiento la *Escherichia coli* (Parente *et al.*, 2011). Similarmente, en el estudio realizado en la India por Roy *et al.* (2013), en sistemas de cultivo de peneidos, se obtuvieron resultados positivos tanto para ETEC como EPEC, utilizando la técnica de PCR multiplex, pudiendo considerar estos productos como un riesgo para la salud pública, a pesar que en el sistema de cultivo no se presta mucha atención a la presencia de *E. coli*. Considerando que la presencia de bacterias coliformes en centros de cultivo es frecuente, existe una alta correlación entre la fuente de agua y su presencia en el camarón (Koonse *et al.*, 2005). En muestras de agua del sudeste de Queensland, Australia, se pudo identificar *E. coli* productoras de toxina shiga (STEC), considerándolas como un riesgo potencial para la salud ya que la dosis mínima que requiere para generar infección es de apenas 10-100 células (Ahmed *et al.*, 2015).

Tabla 1. Presencia de *E. coli* y *E. coli* diarreogénicas (DEC) en alimento y bebida.

Alimento implicado	<i>E. coli</i> (%)	<i>E. coli</i> diarreogénica				
		Total (%)	EPEC (%)	EAEC (%)	STEC (%)	ETEC (%)
Producto lácteo (n=669)	143 (21.3)	19 (2.84)	13 (68.42)	2 (10.52)	3 (15.78)	1 (5.26)
Producto cárnico (n=646)	110 (17)	12 (0.75)	10 (83.33)	2 (16.66)	0	0
Hidrobiológico (n=656)	71 (10.8)	13 (1.98)	11 (84.61)	2 (15.38)	0	0
Alimento preparado (n=1594)	70 (4.3)	12 (0.75)	10 (83.33)	0	2 (16.66)	0
Bebidas y hielos (n=1597)	15 (0.93)	0	0	0	0	0
total (n=5162)	409(7.92)	56 (1.08)	44 (78.57)	6 (10.71)	5 (8.92)	1 (1.78)

Fuente: Canizales-Román *et al* (2013)

Diversidad genética de *E. coli*

De acuerdo a Ussery *et al* (2004) el genoma bacteriano posee secuencias de ADN repetitivo que comprenden aproximadamente el 5% de su tamaño, variando su ubicación entre las regiones intergénicas en las diferentes especies microbianas (Versalovic y Lupski, 1998) y, aunque no está completamente establecida su funcionalidad, algunos investigadores sugieren que pueden participar en la síntesis o catabolismo del ARN/ADN o actuar como reguladores de la evolución del genoma (Tobes y Ramos, 2005; Schmidt y Anderson, 2006). Debido a estos antecedentes, se desarrolló una técnica basada en la reacción en cadena de la polimerasa (REP-PCR) para identificar los sitios de unión de elementos repetitivos adyacentes, permitiendo obtener una huella genética específica (fingerprint) de cada aislado microbiano (Ishii y Sadowsky, 2009; Rademaker *et al.*, 2008).

Aplicando esta técnica, Dombek *et al* (2000), consiguieron diferenciar aislados de *E. coli* de acuerdo a su procedencia, determinando cuáles eran originados en humanos y cuáles en animales.

Adicionalmente, en el estudio desarrollado por Sanath *et al.*, 2001, utilizando la técnica de RAPD PCR, reportaron elevada diversidad genética entre *E. coli* aisladas de productos hidrobiológicos (peces y moluscos); así mismo, fueron detectados los genes *stxHly_a*, siendo interesante que ninguna cepa fue positiva para rfb0157 (factor de virulencia de la O157:H7) por lo cual concluyeron que la presencia de STEC en alimentos de procedencia marina poseen serotipos distintos al de la cepa 0157.

IV. **Justificación del estudio.**

La venta local de los crustáceos en la región Lima ,los langostinos procede principalmente de centros de cultivos del norte de nuestro país y los camarones de río de la pesca artesanal procedente de Arequipa. Siendo estas especies de hábitos detritívoros ya que su consumo generalmente es en la forma cruda (cebiche), puede actuar como vehículo transmisor de *E. coli* entre otros patógenos. Esto hace necesaria la identificación de los factores de virulencia de bacteria causadora de diarrea, así como evaluar la diversidad genética existente entre aislados provenientes de los principales mercados pesqueros de la capital con el fin que los resultados obtenidos sean de utilidad en la adopción de medidas terapéutico-preventivas que disminuyan el impacto sobre las poblaciones sensibles.

V. Objetivos

Objetivo general

Caracterizar molecularmente la diversidad genética y los factores de virulencia de *Escherichia coli* aisladas de langostino (*Litopenaus vannamei*) y camarón de río (*Cryphiops caementarius*) procedentes de los principales terminales pesqueros de Lima.

Objetivos específicos

- Aislar e identificar bioquímicamente cepas de *Escherichia coli* presentes en langostino y camarón de río de mercados pesqueros de Ventanilla y Villa María del Triunfo.
- Identificar molecularmente la presencia de los genes que codifican la producción de algunos factores de virulencia en los aislados.
- Evaluar la diversidad genética de las *Escherichia coli* aisladas por la técnica de REP-PCR.

VI. Materiales y metodos

Lugar de estudio

El estudio microbiológico y molecular fue realizado en el Laboratorio de Parasitología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Peruana Cayetano Heredia.

Tipo de Estudio

El tipo de investigación es descriptiva y el diseño es un estudio observacional del tipo transversal.

Obtención de muestras

Las muestras evaluadas fueron procedentes de los mercados pesqueros de Ventanilla y Villa Maria del Triunfo de Lima-Metropolitana.

Tamaño de muestra.

El tamaño de muestra se fundamenta en el teorema de límite central, el cual nos sugiere un tamaño mínimo de 30 muestras. Este estudio trabajó, con 97 muestras en total, correspondiendo 50 para camarón de río (*Cryphiops caementarius*) y 47 para Langostino (*Litopenaus vannamei*). Las muestras se definen como cada 25 gr de homogeneizado por especie. De acuerdo a los objetivos del estudio este tamaño de muestra nos permitiría encontrar al menos 1 muestra positiva a *E.coli* patogénica. Las pruebas moleculares solo se trabajaron con las muestras donde se logró encontrar

E.coli denominándose en el trabajo como “aislados”. Las muestras obtenidas del terminal pesquero de Ventanilla fueron de 27 (obteniendo 30 aislados) para camarón y 26 muestras (solo se pudo obtener 4 aislados) para langostino. Para el terminal pesquero de Villa María del Triunfo se recolectó 23 muestras de camarón y 21 muestras de langostinos, obteniendo 30 y 24 aislados, respectivamente.

Análisis Microbiológico

Aislamiento e identificación de *E.coli*

Se realizó de acuerdo al manual analítico bacteriológico (BAM) de la FDA (2016), para esto se trabajó de manera independiente por especie en la forma que estas son comercializados en los mercados de Ventanilla y Villa María del Triunfo, retirándose el exoesqueleto y colocándose en un frasco estéril 25 g de la parte comestible que luego fue triturada junto con 225 ml de solución de peptona tamponada. Luego de aplicar el protocolo para la enumeración de coliformes fecales (número más probable, NMP) (FDA, 2016) se realizó el aislamiento de *E.coli* dado que sólo mediante esta técnica fue posible obtener algunas cepas de *E.coli* en langostino, donde su frecuencia de obtenciones baja, a diferencia del camarón de río. Para esto se realizaron diluciones decimales seriadas en caldo peptonado que luego fueron repicadas en solución Lauril Sulfato (LST) e incubadas a 37 °C por 24h. Cada tubo que presentó formación de gas en el medio LST fue transferido mediante una asa de siembra a tubos conteniendo medio EC e incubados a 44°C por 48h. Finalmente, se inoculó las muestras en agar Hicrome *E. coli* se incubó en condiciones aerobias a 44 ° C por

24/48 h. Las colonias de forma característica y de color azul dada por la fermentación de la β -glucuronidasa, que a la coloración Gram resultaron bacilos Gram negativos fueron replicadas en agar TSA. La identificación presuntiva se confirmó por un resultado positivo a las pruebas de Indol y catalasa (+) y negativo a oxidasa, mientras que la identificación definitiva a nivel de especie se llevó a cabo empleando pruebas bioquímicas convencionales (agar LÍA, KLIGER, CITRATO, SIM y UREA).

Análisis Molecular

Extracción de DNA

El DNA bacteriano fue extraído con el kit Wizard Genomic DNA purification según las indicaciones del fabricante.

Toxinotipaje de los *E. coli* aislados

La determinación de los genes que codifican la producción de las toxina shiga y genes de *E. coli* enteropatógena fue realizada por PCR según protocolos estandarizados por Canizales *et al.*, 2013; Vidal *et al.*, 2005; Furrer *et al.*, 1990; Jackson *et al.*, 1987a; Jackson *et al.*, 1987b; Ratchtrachenchai, Subpasu e. Ito, 1997; Yu y Kapper, 1992 y Ngeleka *et al.*, 2003 (Cuadro1). Las reacciones de amplificación de DNA fueron realizadas en volúmenes finales de 25 μ L conteniendo 2,5 μ L de 10 x buffer PCR, 1,5 μ L de $MgCl_2$ (1,5 mM), 1 μ L de dNTP (0,2 mM), 1 μ L de cada iniciador (0,4 mM), 0,25 μ L de Platinum Taq polimerase (0,5 U) (Invitrogen), y 1 μ L de DNA (10 ng). La reacción de amplificación fue realizada en el termociclador Gene

Amp PCR System 9700 (PE Applied Biosystems) programado para: 1 ciclo de 95 °C (3 min); seguido de 35 ciclos de 95 °C (1 min), 56 °C (1 min) y 72 °C (2 min); y 1 ciclo final de 72 °C (5 min). Todos los productos de PCR fueron analizados en electroforesis en gel de agarosa (1%), teñidos con bromuro de etidio (0,5 mg/mL) y fotografiados con transiluminador de luz UV con el sistema Kodak (EDAS, DC-120). Como marcador de peso molecular fue utilizado el 100 bp DNA Ladder (Invitrogen, Brasil).

Cuadro 1 . Primers utilizados en la detección de genes de virulencia de *E. coli*

Gen	Secuencia de Oligonucleótidos	Amplicón (bp)	Referencia
	→ 5' 3'		
<i>LT</i>	TTACGGCGTTACTATCCTCTCTA GGTCTCGGTCAGATATGTGATTC	275	Furreret <i>al.</i> (1990)
<i>STa</i>	TCCCCTCTTTTAGTCAGTCAACTG GCACAGGCAGGATTACAACAAAGT	163	Ngeleka <i>et al.</i> (2003)
<i>Aggr</i>	GTATACACAAAAGAAGGAAGC ACAGAATCGTCAGCATCAGC	254	Ratchtrachenchai, SubpasueIto,1997
<i>Aaf</i>	ATTCCCATGATGTCAAGCACTTC CACAGGCAACTGAAATAAGTCTGG	378	Vidal <i>et al.</i> (2005)
<i>bfp</i>	TTACTACCAGTCTGCGTCT ATGCCGCTTTATCCAACCTG	282	Canizales <i>et al.</i> (2013)

<i>Stx1</i>	AGA GCG ATG TTA CGG TTT G TTG CCC CCA GAG TGG ATG	388	Jackson <i>et al.</i> (1987a)
<i>Stx2</i>	TGG GTT TTT CTT CGG TAC C GAC ATT CTG CTT GAC TCT CTT	807	Jackson <i>et al.</i> (1987b)
<i>eae</i>	AGG CTT CGT CAC AGT TG CCA TCG TCA CCA GAG GA	570	Yu y Kaper(1992)

Determinación de los perfiles genéticos por REP-PCR.

La diversidad genética fue determinada mediante la técnica de REP-PCR, según el protocolo estandarizado por Versalovic *et al.* (1991), utilizando los iniciadores Eric1R (5'- ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC- 3') y Eric2 (5'- AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG -3'). Brevemente, la reacción de amplificación fue realizada en volumen final de 25 µL conteniendo 10X buffer PCR, MgCl₂(1,5 mM), dNTP (0,2 mM), cada iniciador (0,4 mM), Platinum Taq polimerase (0,5 U) y DNA (10 ng). Las reacciones de amplificación fueron realizadas, en duplicado, en termociclador Gene Amp PCR System 9700 (PE Applied Biosystems), programado para: 1 ciclo de 95°C (5 min); seguido de 35 ciclos de 94°C (1 min), 40 C° (1 min) y 65 °C (4 min); y 1 ciclo final de 65 °C (16 min). Cepas ATCC de *E.coli* y de otras bacterias fueron incluidas en los análisis. Los productos de PCR fueron analizados en gel de agarosa (1,5 %), teñidos con bromuro de etidio (0,5 mg/mL) y fotografiados con transiluminador de luz UV. Los marcadores de peso molecular 100 bp DNA ladder y 1 kb Plus DNA ladder (Invitrogen - Brasil) fueron utilizados en las corridas

electroforéticas. Los diferentes perfiles genéticos fueron analizados, construyéndose los respectivos dendrogramas con el programa NTSYS (Applied Biostatitics, Inc. versión 2.21), utilizándose los coeficientes de similaridad de Jaccard, Dice y Simple Matching (SM).

Plan de análisis de datos

Los datos fueron analizados mediante la prueba estadística del Ji – Cuadrado, empleando el programa estadístico WIN EPI.

VII. Resultados

El muestreo realizado en el camarón de río presentó mayor frecuencia de *E. coli* con un 92% en comparación con el langostino en 31.9% (ver cuadro 2). Donde todas las *Escherichia coli* fueron diferenciadas de otros coliformes por su alta actividad glucoronidasa en agar Hicrome, como se puede apreciar en la figura 2.

Cuadro 2. Frecuencia de aislamiento de *E. coli* por especie en Agosto, 2017

Especie	Total	Presencia <i>E. coli</i>	
		Positivo	%
Langostino	47	15	31.9 ^a
Camarón de río	50	46	92 ^b

^{a,b} Letras diferentes indican que las proporciones son estadísticamente diferentes

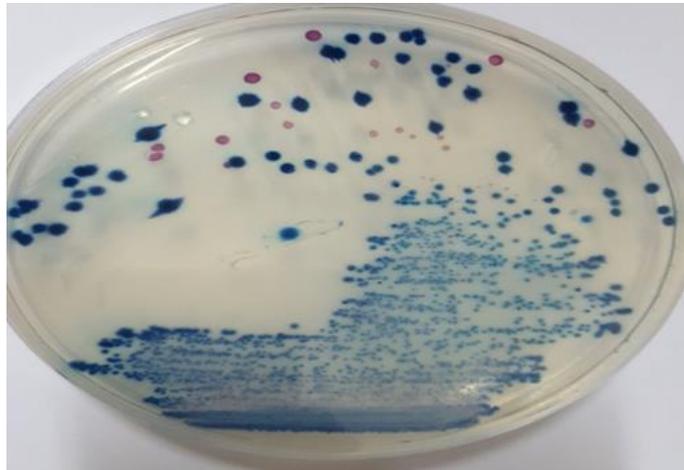


Figura 2. Cultivo realizado en medio Hicrome agar. Colonias color azul, *E. coli*; colonias color rojo, *Klebsiella*

Del total de muestras homogeneizadas (97), se encontró presuntivamente *E.colien* el 12% (n=50) del camarón de río y 4.25% (n=47) del langostino, hallándose mediante PCR solo los genes *stx1* y *stx2*, que los identifica como parte del patotipo STEC, sin poder identificarse los factores de virulencia de los patotipos EPEC(*eae*,*bfp*), ETEC(*STa* y *LT*) y EAEC(*Aaf* y *Aggr*) (cuadros 3). Respecto a la procedencia, considerando ambas especies, sólo se identificó el factor de virulencia *stx2* en el mercado de Villa María del Triunfo (VMT), mientras *stx1* fue detectado en ambos lugares de estudio. (Cuadro 3 y Figura 3).

Cuadro 3. Frecuencia de *E. coli* presuntivamente *E. Coli* diarreogénicas por especie y procedencia aisladas en Agosto ,2017.

Especie	Procedencia	<i>E. coli</i> (%)	Total (%)	<i>E. coli</i> diarreogénica							
				EPEC (%)		STEC (%)		ETEC (%)		EAEC (%)	
				<i>eae</i>	<i>stx1</i>	<i>stx2</i>	<i>sta</i>	<i>Lt</i>	<i>Aaf</i>	<i>Aggr</i>	
Camarón de río	VTM (n=23)	23 (100)	4 (17.3)	0	3 (12.9)	1 (4.3)	0	0	0	0	
	Ventanilla (n=27)	23 (85.2)	2 (7.4)	0	2 (7.4)	0	0	0	0	0	
	Total (n= 50)	46 (92)	6 (12)	0	5 (10)	1 (2)	0	0	0	0	
Langostino	VTM (n=21)	12 (57.1)	1 (4.7)	0	0	1 (4.7)	0	0	0	0	
	Ventanilla (n=26)	2 (7.7)	1 (3.9)	0	1 (3.9)	0	0	0	0	0	
	Total (n=47)	15 (31.9)	2 (4.25)	0	1 (2.12)	1 (2.12)	0	0	0	0	

VMT: Villa María del triunfo, EPEC: Enteropatogeno, STEC: *E.coli* productora de toxina shiga, ETEC: Enterotoxigenica , EAEC: Enteroagregativa.

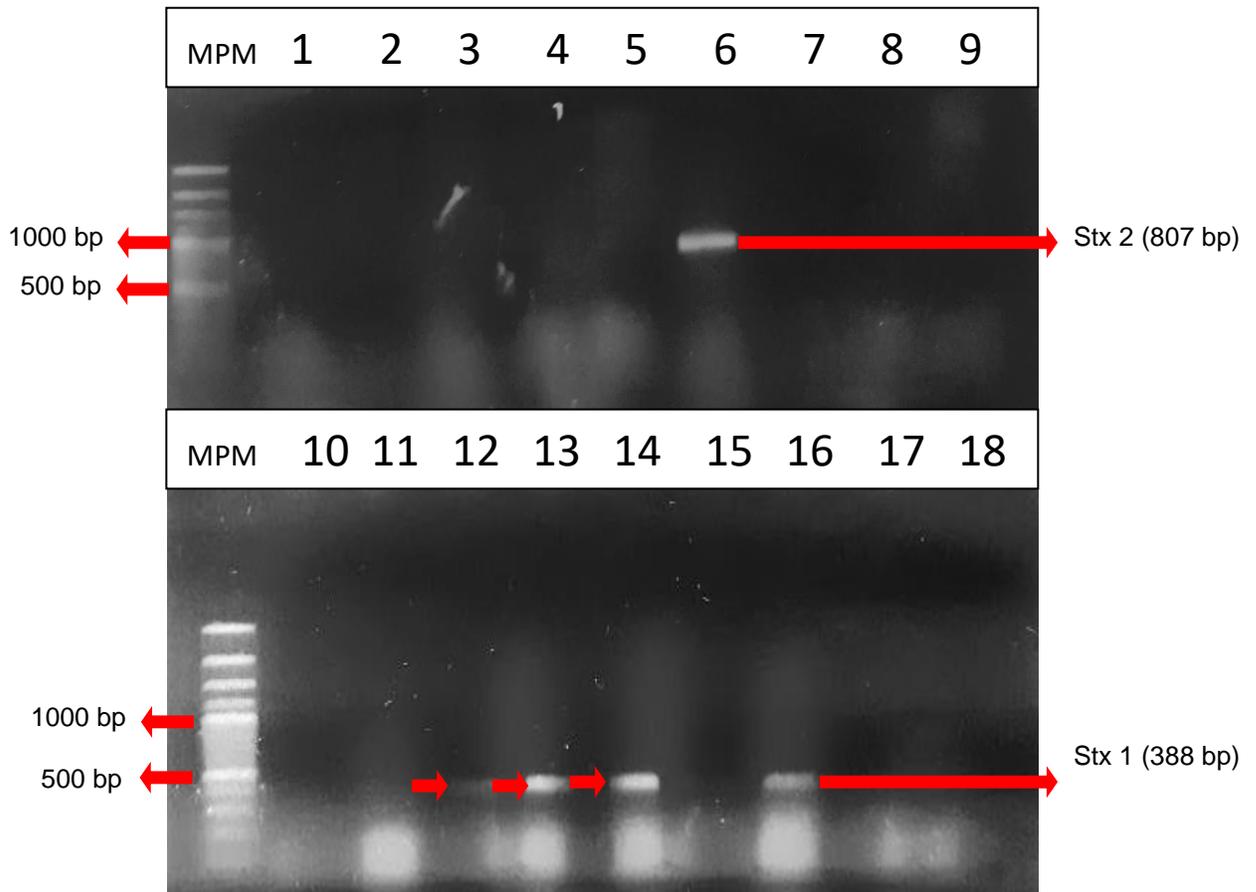


Fig. 3 Electroforesis del producto de PCR para la identificación de STEC de camarón de río y langostino. Línea 6, gen *stx2* (807 bp), líneas 12– 14 y 16, gen *stx1* (388 bp). MPM, marcador de peso molecular (MPM) 100 bp (Invitrogen).

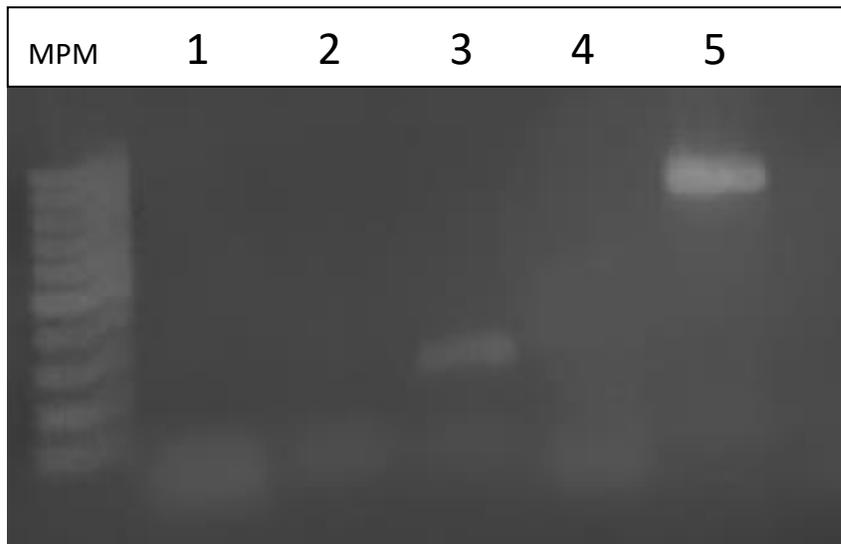


Fig. 4 Cepas control de *E.coli* productora de toxina shiga (STEC) Carril 3: Cepa control ed1933 Stx1 (388 pb) Carril 5: Cepa control ed1933 Stx2 (807 pb). MPM: Marcado de peso molecular 100 pb.

El análisis de diversidad genética de los 88 aislados de camarón de río y langostino, procedentes de ambos mercados pesqueros, agrupó a todos ellos en 36 clusters, con una similaridad de 60% (Fig 5).

El cluster I estuvo constituido por dos aislados provenientes de la misma especie pero de diferentes lugares (C1 col1V y C12 col1VMT). El cluster II solo incluyó a C1 col1julVMT, asimismo el cluster III con C2 col1julVMT.

El cluster IV contuvo 5 clones aislados del camarón de río de ambas procedencias (C10 col2V, C12 col2V, C13 col2V, C5 col2JulVMT y C11 col2VMT).

El cluster V posee dos grupos A y B, de los cuales el A contiene el subgrupo i, conformado por un aislado (C1 col2V), mientras el subgrupo ii presenta dos clones (C4 col1JulVMT y C4 col2JulVMT, positivos para *stx1*). Por otro lado, el grupo B está conformado por 2 subgrupos i e ii, el i contiene grupo 1 conformado por tres clones (C15 col2V, C2 col1VMT y C14 col2VMT) y el grupo 2 por dos clones (C19 col1V y C11 col1V). El subgrupo Bii presenta tres clones que proceden del camarón de río (C2), que fue diluido por 10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3} . El cluster VI solo contiene a C11 col2V.

El cluster VII contiene dos clones (C19 col2V y C8 col2V); el cluster VIII posee dos aislados, C7 col1JulVMT y C6 col2JulVMT, positivos para el gen *stx1*). El cluster IX está formado por dos grupos A y B, el A conformado por dos aislados, C2 col2V, clasificado como STEC por ser *stx1* + y C7 col1V, asimismo el grupo B posee dos aislados (C3 col2V y C6 col1V). Tanto el cluster X como XI poseen solo un aislado, C9 col1V y L7col2, respectivamente.

El cluster XII constituido por el grupo A, conformado por dos aislados (C8

col1JulVMT y C7 col1JulVMT), y el grupo B, que también posee dos aislados (C8 col1JulVMT y C8 col2JulVMT, albergando el gen *stx1*). El cluster XIII contiene dos aislados (C14 col1V y C5 col1V) mientras el cluster XIV solo tiene un miembro (C4 col2V).

El cluster XV solo contuvo al control positivo de *E.coli*, cepa ATCC35218. El cluster XVI esta constituido por el grupo A y B, de los cuales el grupo A contiene los subgrupos i y ii, presentando el i a un solo aislado (C16 col1V), mientras en el ii existen dos clones (C11 col1VMT y C10 col2VMT), en tanto el grupo B contiene dos clones (C2 col2JulVMT y C1 col2JulVMT). El cluster XVII conformado por dos grupos, siendo A constituido por dos aislados (C3 col1JulVMT y L5 col2) y el grupo B por otros dos (L6 col1 y L3*).

El cluster XVIII solo posee un aislado (C3 col2JulVMT) al igual que el cluster XIX (C3 col1VMT) y XX (C3 col2VMT). El cluster XXI contiene dos aislados (L7 col1 y L1 col1).

El cluster XXII esta conformado por el grupo A, con la presencia del aislado C4 col2VMT, mientras el grupo B contiene dos aislados (L1 col1 y L2 col1*); el cluster XXXIII presenta dos aislados (L5 col1 y L13*). El cluster XXIV esta conformado por dos grupos A y B, estando el A constituido por dos aislados (C9 col1VMT y L8 col2), en cambio el grupo B contiene solo el aislado L6 col2. El cluster XXV posee en el grupo A dos aislados (L17 col1V y L1 col2V), en cambio el grupo B solo posee el aislado L17 col2V.

El cluster XXVI esta conformado por el grupo A y B, en los cuales el A contiene al

subgrupo i conformado por dos aislados (L2 col2*, que posee el gen que codifica para la toxina *stx2* y L3 col1) y el subgrupo ii, formado por el aislado L4 col2, el grupo B contiene el subgrupo i el cual posee solo a L8 col2*, mientras el grupo ii incluye dos aislados (L8 col1 y L1 col2). El cluster XXVII está integrado por el grupo A, con dos clones que cargan el gen *stx1* (C6 col2V y L1 col1V), en cambio, el grupo B solo posee al aislado L8 col1*. El cluster XXVIII, conformado por dos grupos A y B, del cual el grupo A posee dos aislados (L3 col2 y L2 col1), mientras el grupo B solo posee a L4 col1. El cluster XXIX apenas posee un aislado (C8 col2VMT). El cluster XXX contiene a C2 col1V y C3 col1V. El cluster XXXI posee en el grupo A dos clones (C7 col2V y C8 col1V) y en el grupo B solo se incluye al aislado C9 col2V. El cluster XXXII contiene solamente a C7 col2JulVMT. Igualmente, el cluster XXXIII a C4 col1V. El cluster XXXIV presenta dos aislados que son el C5 col1JulVMT, que aloja al gen de la toxina *stx2* y C6 col1JulVMT. El cluster XXXV solo posee a C10 col1VMT y finalmente, el cluster XXXVI agrupa a los aislados L3 col2 y L1 col2*.

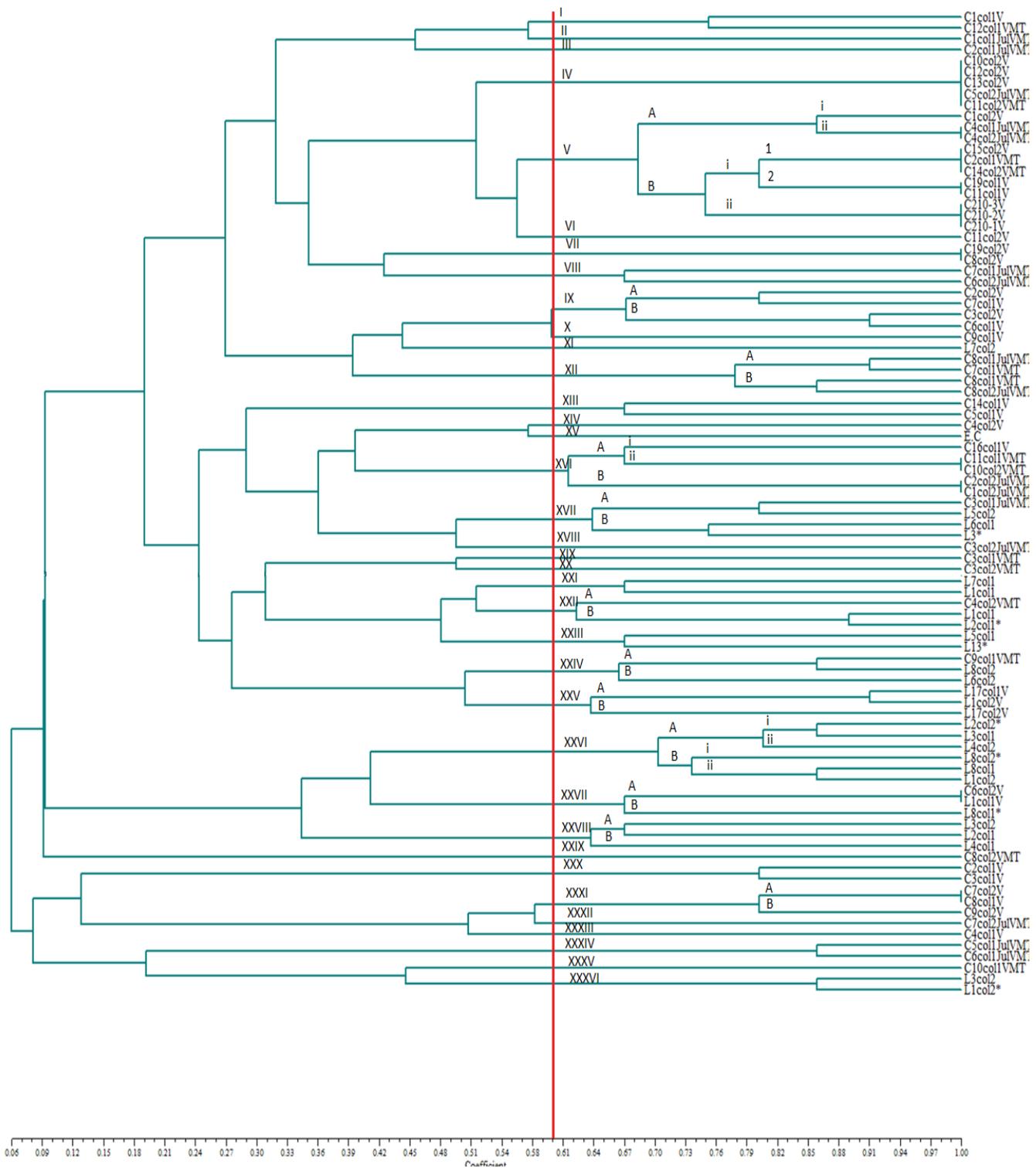


Fig. 5. Dendrograma del total de aislados de *E. coli* de camarón de río y langostinos procedentes de Villa María del Triunfo y Ventanilla. Leyenda: EC: *E. coli* ATCC 35218.

VIII. Discusión

Escherichia coli es un microorganismo Gram negativo, miembro de la familia Enterobacteriaceae presente frecuentemente en el tracto digestivo de los organismos de sangre caliente, donde actúan principalmente como comensales (OMS, 2017), contribuyendo con su hospedero en la síntesis de nutrientes esenciales como vitaminas o en la exclusión de bacterias patógenas por competición, sin embargo, el sobrecrecimiento de estas bacterias por defecto disfuncional del sistema digestivo puede ser perjudicial para la salud del huésped, generando inflamación localizada o daño en las mucosas (Batt, Rutgers y Sancak, 1996). Adicionalmente, al ser excretada esta bacteria del sistema digestivo puede mantenerse viable por tiempo variable, dependiendo de las condiciones medioambientales que encuentre, colocando en riesgo principalmente a niños y ancianos, que son los más susceptibles a infectarse (FDA, 2016). De acuerdo a Anderson, Whitlock y Harwood (2005), la viabilidad de *E. coli* en el agua depende de las condiciones fisicoquímicas de esta, indicando que estas enterobacterias sobreviven más tiempo en agua dulce que en agua salada. Reafirmando la idea anterior, en el estudio de Chakravarty *et al.* (2015) fue determinado que los productos hidrobiológicos provenientes de agua dulce reportan mayor cantidad de *E. coli* en comparación con las especies de origen marino.

Con estos antecedentes, era esperado que encontremos una mayor frecuencia de aislamiento de *E. coli* en el camarón de río (92%), especie de agua dulce, que en el langostino (31.9%), que habita en el ambiente marino, independientemente de que mercado provenga la muestra, ya que fue detectada en ambos lugares.

Si bien esta bacteria puede ser identificada a través del método convencional que sugiere la FDA, 2016, este estudio presenció en mayor ocasión la aparición de otras enterobacterias en el caso del langostino (*Litopenaeus vannamei*) por la cual la técnica empleada del número más probable (NMP) facilitó su aislamiento por enriquecer a las enterobacterias presentes en el estudio, el cual la *E. coli* pudo aislarse con mayor facilidad por el medio Hicrome *E. coli* por su alta capacidad fermentadora de glucoronidasa. Asimismo las razones de hallazgo de *E. coli* en este estudio cabe remarcar que la presencia de esta enterobacteria no es propia en la microbiota de los productos hidrobiológicos (Miget, 1991). Las razones se atribuyen al lugar de procedencia que son contaminadas a causa de desechos humanos, pésima calidad microbiológica del hielo empleado para su conservación o por manipulación sanitaria deficiente (Vieira, De Souza y Patel, 1997). En los estudios de Lanata et al (2014), realizados en zonas rurales del Perú, determinó la presencia de *E. coli* diarrogénicas en utensilios de cocina (23%) y en las propias manos (10%)

Por otro lado, en nuestro estudio realizado en camarón de río (*Cryphiops caementarius*) y langostinos (*Litopenaeus vannamei*) comercializados en los mercados pesqueros de Ventanilla y Villa María del Triunfo, de las 97 muestras analizadas, sólo se pudo detectar los factores de virulencia *stx1* (6.2%) y *stx2* (2%), que los clasifica como parte del patotipo STEC, resaltando que dentro de estos factores de virulencia existen subdivisiones que hacen a algunos patógenos en humanos, mientras otros no generan ninguna alteración ni diarrea (Yang y Wang, 2014; Bielaszewska et al., 2006). En comparación con otro estudio realizado en los mercados de la

India, Gupta, Ghataky Gill (2013), encontraron, a partir de 54 productos hidrobiológicos, que el 72.2% fueron positivos para *Stx1* y el 51.85% para *Stx2*, atribuyendo que la posible ruta de transmisión es zoonótica, ya que esta bacteria puede aislarse en gran medida a partir de distintos animales y aves, tanto de crianza como salvajes, siendo los rumiantes los principales reservorios naturales de estas, a diferencia de los demás patotipos como EPEC, ETEC y EAEC que son reservorios en humanos (Duffy, 2014; Canizales-Roman *et al*, 2013; Barbosa *et al*, 2016). Es por esto que los alimentos de origen bovino, como carne y productos lácteos, son los principales responsables de las infecciones por STEC (Gyles *et al.*, 1998). Siendo este patotipo de importancia en la salud pública mundial por la capacidad infectiva que algunos serotipos poseen como el O103:H21 y O157:H7 (Bielaszewska *et al*, 2006; OMS, 2017), ya que causa una severa colitis hemorrágica o infección extraintestinal, como el síndrome urémico hemolítico (HUS). Esto se debe a su capacidad de producir toxinas shiga, *Stx1* y *Stx2* en el colon que puede alcanzar al riñón mediante el flujo sanguíneo, generando una grave inflamación local por su acción tóxica directa (Andreoli *et al*, 2002). Las toxinas del STEC presentan una homología de 56 % a nivel de secuencias de aminoácidos (Jackson *et al.*, 1987), siendo la *Stx2* la que presenta más variantes antigénicas que afectan su actividad biológica y asociación a enfermedades (Baru e Inatsu, 2014), en cambio *Stx1* es idéntica a las toxinas shiga de *Shigella dysenteriae* tipo 1, con la diferencia que esta última adopta también propiedades enteroinvasivas, como el patotipo EIEC (Taylor, 2008). La ubicación de estos genes es cromosomal, probablemente originados desde fagos lambda integrados

y limitados por secuencias flanqueadoras, lo que indicaría que su origen se debe a la presencia de bacteriófagos y que su transferencia entre cepas *E. coli* no relacionadas es posible (Yang y Wang, 2014).

Secuencias repetitivas dispersas en el genoma, tanto de procariotas como eucariotas, sirven como herramienta para asegurar la diversidad genética entre miembros de la misma especie (Versalovic *et al.*, 1991). Para estudiar estas secuencias, existen técnicas alternativas al análisis de macrorestricción, que son fácilmente visualizadas en una corrida electroforética. Así, una de estas se basa en detectar el palíndromo extragénico repetitivo (REP), que representa espacios de DNA entre dos elementos repetitivos, como secuencias de inserción, y que pueden servir para tipar microorganismos (Versalovic *et al.*, 1991). En el presente estudio con aislados de *E. coli*, se obtuvo como resultado una elevada diversidad intraespecie y la identificación de clonalidad, demostrando que ambas especies estudiadas cargan múltiples subtipos de esta bacteria y que estos pueden ser asociados a sus respectivos hospederos (Mohapatra *et al.*, 2007).

Interesantemente, la técnica de REP-PCR identificó como clones a especies que poseen diferente carga genética, como es el caso de algunos aislados que a pesar de poseer los genes Stx 1 y 2 no pudieron ser diferenciados de otros que no cargan estos factores de virulencia. Esto se debe muy probablemente a que la técnica de tipaje está diseñada para identificar apenas las regiones repetitivas a lo largo del cromosoma y no a algún gen en particular.

IX. Conclusiones

- El camarón de río (*Cryphiops caementarius*) presentan una mayor frecuencia de aislamiento de *E.coli* en un 92 % (n=50) ,mientras el langostino (*Litopenaus vannamei*) con un 31.9% (n=47) en ambos mercados estudiados.
- En las especies *Litopenaus vannamei* se identificaron del patotipo STEC en 4.25 % (n=47) y *Chryphiops caementarius* en 12 %(n=50)de los terminales pesqueros de Lima-Metropolitana.
- Los *E. coli* aislados presentan elevada diversidad genética entre ellos,según la técnica REP- PCR.

X. **Recomendaciones**

- Estudiar la presencia de otros factores de virulencia y genes de resistencia a antimicrobianos de esta bacteria en otros lugares de expendio así como en restaurantes.
- Realizar ensayos en cultivo celular para confirmar si los aislados identificados como pertenecientes al patotipo STEC pueden causar efecto citotóxico.

XI. Referencias bibliográficas

1. Abe C., Knutton S., Pedroso M., Freymüller E., Gomes T. 2001. An enteroaggregative *Escherichia coli* strain of serotype O111: H12 damages and invades cultured T84 cells and human colonic mucosa. *FEMS microbiology letters*. 203(2): 199-205.
2. Ahmed W., Gyawali P., Toze S. 2015. Quantitative PCR measurements of *Escherichia coli* including shiga toxin-producing *E. coli* (STEC) in animal feces and environmental waters. *Environmental science & technology*. 49(5):3084-3090.
3. Anderson K., Whitlock J., Harwood V. 2005. Persistence and differential survival of fecal indicator bacteria in subtropical waters and sediments. *Applied and environmental microbiology*. 71(6), 3041-3048.
4. Andreoli S., Trachtman H., Acheson D., Siegler R., Obrig T. 2002. Hemolytic uremic syndrome: epidemiology, pathophysiology and therapy. *Pediatric Nephrology*. 17(4): 293-298.
5. Arbibe L., Kim D., Batsche E., Pedron T., Mateescu B., Muchardt C., Parsot C., Sansonetti P. 2006. An injected bacterial effector targets chromatin access for transcription factor NF- κ B to alter transcription of host genes involved in immune responses. *Nature immunology*. 8(1), ni1423.
6. Barbosa L., Ribeiro L., Lavezzo L., Barbosa M., Rossi G., do Amaral L. 2016. Detection of pathogenic *Escherichia coli* and microbiological quality of chilled shrimp sold in street markets. *Letters in Applied Microbiology*. 62(5): 372-378.

7. Baru, Inantsu. 2014. *Escherichia coli* O157. En Batt y Tortorello. *Encyclopedia of food microbiology*. USA: Elsevier (735-736 pp).
8. Batt R., Rutgers H., Sancak A. 1996. Enteric bacteria: Friend or foe?. *Journal of small animal practice*. 37(6), 261-267.
9. Benjamin P., Federman M., Wanke C. 1995. Characterization of an invasive phenotype associated with enteroaggregative *Escherichia coli*. *Infection and immunity*. 63(9): 3417-3421.
10. Berger C., Billker O., Meyer T., Servin A., Kansau I. 2004. Differential recognition of members of the carcinoembryonic antigen family by Afa/Dr adhesins of diffusely adhering *Escherichia coli* (Afa/Dr DAEC). *Molecular microbiology*. 52(4): 963-983.
11. Bernet-Camard M., Coconnier M., Hudault S., Servin A. 1996. Pathogenicity of the diffusely adhering strain *Escherichia coli* C1845: F1845 adhesin-decay accelerating factor interaction, brush border microvillus injury, and actin disassembly in cultured human intestinal epithelial cells. *Infection and immunity*. 64(6): 1918-1928.
12. Bétis F., Brest P., Hofman V., Guignot J., Kansau I., Rossi B., Servin A., Hofman P. 2003. Afa/Dr diffusely adhering *Escherichia coli* infection in T84 cell monolayers induces increased neutrophil transepithelial migration, which in turn promotes cytokine-dependent upregulation of decay-accelerating factor (CD55), the receptor for Afa/Dr adhesins. *Infection and immunity*. 71(4): 1774-1783.

13. Bielaszewska M., Friedrich A., Aldick T., Schürk-Bulgrin R., Karch H. 2006. Shiga toxin activatable by intestinal mucus in *Escherichia coli* isolated from humans: predictor for a severe clinical outcome. *Clinical infectious diseases*. 43(9): 1160-1167.
14. Bilge S., Clausen C., Lau W., Moseley S. 1989. Molecular characterization of a fimbrial adhesin, F1845, mediating diffuse adherence of diarrhea-associated *Escherichia coli* to HEp-2 cells. *Journal of Bacteriology*. 171(8): 4281-4289.
15. Boisen N., Struve C., Scheutz F., Krogfelt K., Nataro J. 2008. New adhesin of enteroaggregative *Escherichia coli* related to the Afa/Dr/AAF family. *Infection and immunity*. 76(7): 3281-3292.
16. Brest P., Bétis F., Cuburu N., Selva E., Herrant M., Servin A., Aurberger P., Hofman P. 2004. Increased rate of apoptosis and diminished phagocytic ability of human neutrophils infected with Afa/Dr diffusely adhering *Escherichia coli* strains. *Infection and immunity*. 72(10): 5741-5749.
17. Bueris V., Sircili M., Taddei C., dos Santos M., Franzolin M., Martinez M., Ferrer S., Barreto M., Trabulsi L. 2007. Detection of diarrheagenic *Escherichia coli* from children with and without diarrhea in Salvador, Bahia, Brazil. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 102(7): 839-844.
18. Burland V., Shao Y., Perna N., Plunkett G., Sofia H., Blattner F. 1998. The complete DNA sequence and analysis of the large virulence plasmid of *Escherichia coli* O157: H7. *Nucleic acids research*. 26(18): 4196-4204.

19. Canizalez-Roman A., Gonzales-Nuñez E., Vidal JE., Flores-Villaseñor H., León-Sicairos N. 2013. Prevalence and antibiotic resistance profiles of diarrheagenic *Escherichia coli* strains isolated from food items in northwestern Mexico. *International Journal of Food Microbiology*. 164(1):36-45
20. Chakravarty M., Ganesh P., Amaranth D., Shanthi Sudha B., Subhashini M. 2015. *Escherichia coli* – occurrence in the meat of shrimp, fish, chicken and mutton and its antibiotic resistance. *European Journal of Experimental Biology*. 5(7):41-48.
21. [CDC] Center for disease control and prevention. [internet][acceso 27 septiembre 2016]. Disponible en: <https://www.cdc.gov/ecoli/general/index.html>
22. Contreras C., Ochoa T., Lacher D., DebRoy C., Navarro A., Talledo M., Donnenberg M., Ecker L., Gil A., Lanata C., Cleary T. 2010. Allelic variability of critical virulence genes (*eae*, *bfpA* and *perA*) in typical and atypical enteropathogenic *Escherichia coli* in Peruvian children. *Journal of medical microbiology*. 59(1): 25-31.
23. Crane J., McNamara B., Donnenberg M. 2001. Role of EspF in host cell death induced by enteropathogenic *Escherichia coli*. *Cellular microbiology*. 3(4): 197-211.
24. Croxen M., Finlay B. 2010. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. *Nature reviews Microbiology*. 8(1): 26-38.

25. Currie M., Fok K., Kato J., Moore R., Hamra F., Duffin K., Smith C. 1992. Guanylin: an endogenous activator of intestinal guanylate cyclase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 89(3): 947-951.
26. Czczulin J., Balepur S., Hicks S., Phillips A., Hall R., Kothary M., Nataro J. 1997. Aggregative adherence fimbria II, a second fimbrial antigen mediating aggregative adherence in enteroaggregative *Escherichia coli*. *Infection and Immunity*. 65(10): 4135-4145.
27. Dombek P., Johnson L., Zimmerley S., Sadowsky M. 2000. Use of repetitive DNA sequences and the PCR to differentiate *Escherichia coli* isolates from human and animal sources. *Applied and Environmental Microbiology*. 66(6), 2572-2577.
28. Dubreuil J. 1997. *Escherichia coli* STb enterotoxin. *Microbiology*. 143(6): 1783-1795.
29. Duffy. Enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC), including Non-O157. En Batt y Tortorello, *Encyclopedia of food microbiology*. USA: Elsevier. 713-714 pp.
30. Duran G., Marshall D. 2005. Ready-to-eat shrimp as an international vehicle of antibiotic-resistant bacteria. *Journal of food protection*. 68(11): 2395-2401.
31. Egile C., Loisel T., Laurent V., Li R., Pantaloni D., Sansonetti P., Carlier M. 1999. Activation of the CDC42 effector N-WASP by the *Shigella flexneri* IcsA protein promotes actin nucleation by Arp2/3 complex and bacterial actin-based motility. *The Journal of cell biology*. 146(6): 1319-1332.

32. Farfan M., Inman K., Nataro J. 2008. The major pilin subunit of the AAF/II fimbriae from enteroaggregative *Escherichia coli* mediates binding to extracellular matrix proteins. *Infection and immunity*. 76(10): 4378-4384.
33. [FDA] U.S FOOD AND DRUG. Feng P., Weagan S., Jinneman K. 2013 [internet][acceso 27 septiembre 2016]. Disponible en:
http:
[//www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm070080.htm](http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm070080.htm)
34. Furrer B., Candrian U., Lüthy J. 1990. Detection and identification of *E. coli* producing heat-labile enterotoxin type I by enzymatic amplification of a specific DNA fragment. *Letters in applied microbiology*. 10(1): 31-34
35. Gil A., Lanata C., Hartinger S., Mausezahl D., Padilla M., Ochoa T., Lozada M., Pineda I., Verástegui H. 2014. Fecal contamination of food, water, hands, and kitchen utensils at the household level in rural areas of Peru. *Journal of Environmental Health*. 76(6): 102-106.
36. Girón J., Jones T., Millán-Velasco F., Castro-Muñoz E., Zárate L., Fry J., Frankel G., Moseley S., Baudry B., Kaper J., Schoolnik, G. Riley L. 1991. Diffuse-adhering *Escherichia coli* (DAEC) as a putative cause of diarrhea in Mayan children in Mexico. *Journal of Infectious Diseases*. 163(3): 507-513.
37. Gomes, T., Ibarra C., Navarro-García F., Palermo M., Prado V., Rivas M., Torres A. 2010. Future of *Escherichia coli* Research in Latin America. *Pathogenic Escherichia coli in Latin America*. 256-261 pp.

38. Guion C., Ochoa T., Walker C., Barletta F., Cleary T. 2008. Detection of diarrheagenic *Escherichia coli* by use of melting-curve analysis and real-time multiplex PCR. *Journal of clinical microbiology*. 46(5): 1752-1757.
39. Gupta B., Ghatak S., Gill J. 2013. Incidence and virulence properties of *E. coli* isolated from fresh fish and ready-to-eat fish products. *Veterinary World*. 6(1).
40. Gyles C., Johnson R., Gao A., Ziebell K., Pierard D., Aleksic S., Boerlin P. 1998. Association of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* Hemolysin with Serotypes of Shiga-Like-Toxin-Producing *Escherichia coli* of Human and Bovine Origins. *Applied and Environmental Microbiology*. 64(11): 4134-4141.
41. Harrington S., Dudley E., Nataro J. 2006. Pathogenesis of enteroaggregative *Escherichia coli* infection. *FEMS microbiology letters*. 254(1): 12-18.
42. Hasan R., Pawelczyk E., Urvil P., Venkatarajan M., Goluszko P., Kur J., Selvarangan R., Nowicki S., Braun W., Nowicki B. 2002. Structure-function analysis of decay-accelerating factor: identification of residues important for binding of the *Escherichia coli* Dr adhesin and complement regulation. *Infection and immunity*. 70(8): 4485-4493.
43. Henderson I., Czczulin J., Eslava C., Noriega F., Nataro J. 1999. Characterization of Pic, a Secreted Protease of *Shigella flexneri* and Enteroaggregative *Escherichia coli*. *Infection and immunity*. 67(11): 5587-5596.
44. Hicks S., Candy D., Phillips A. 1996. Adhesion of enteroaggregative *Escherichia coli* to pediatric intestinal mucosa in vitro. *Infection and Immunity*. 64(11): 4751-4760.

- 45.Higgins L., Frankel G., Connerton I., Gonçalves N., Dougan G., MacDonald T. 1999. Role of bacterial intimin in colonic hyperplasia and inflammation. *Science*. 285(5427): 588-591.
- 46.Huang Z., Sutton S., Wallenfang A., Orchard R., Wu X., Feng Y., Alto N. 2009. Structural insights into host GTPase isoform selection by a family of bacterial GEF mimics.*Nature structural and molecular biology*.16(8): 853-860.
- 47.Huapaya B., Huguet J., Suárez V., Torres de Yón Y., Montoya Y., Salazar E., Sakuray S., Tejada C., Gambirazo C., Gómez J. 2001. Primer aislamiento de *Escherichia coli* O157: H7 enterohemorrágica en el Perú.*Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*.18(1-2): 38-39.
- 48.Huicho L., Trelles M., Gonzales F. 2006. National and sub-national under-five mortality profiles in Peru: a basis for informed policy decisions.*BMC public health*.6(1): 173.
- 49.Huys G., Cnockaert M., Janda J., Swings J. 2003. *Escherichia albertii* sp. nov., a diarrhoeagenic species isolated from stool specimens of Bangladeshi children.*International journal of systematic and evolutionary microbiology*.53(3): 807-810.
- 50.Ishii S., Sadowsky MJ. 2009. Applications of the rep-PCR DNA fingerprinting technique study microbial diversity, ecology and evolution. *Environ Microbiol*. 11:733-740.
- 51.Jackson M., Neill R., O'Brien A., Holmes R., Newland J. 1987. Nucleotide sequence analysis and comparison of the structural genes for Shiga-like toxin I

- and Shiga-like toxin II encoded by bacteriophages from *Escherichia coli* 933. *FEMS Microbiology Letters*. 44(1): 109-114.
52. Jackson M., Newland J., Holmes R., O'Brien A. 1987. Nucleotide sequence analysis of the structural genes for Shiga-like toxin I encoded by bacteriophage 933J from *Escherichia coli*. *Microbial pathogenesis*. 2(2):147-153.
53. Jerse A., Yu J., Tall B., Kaper J. 1990. A genetic locus of enteropathogenic *Escherichia coli* necessary for the production of attaching and effacing lesions on tissue culture cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 87(20): 7839-7843.
54. Jiang Z., Greenberg D., Nataro J., Steffen R., DuPont H. 2002. Rate of occurrence and pathogenic effect of enteroaggregative *Escherichia coli* virulence factors in international travelers. *Journal of clinical microbiology*. 40(11): 4185-4190.
55. Jones N., Islur A., Haq R., Mascarenhas M., Karmali M., Perdue M., Sherman P. 2000. *Escherichia coli* Shiga toxins induce apoptosis in epithelial cells that is regulated by the Bcl-2 family. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*. 278(5): G811-G819.
56. Kalman D., Weiner O., Goosney D., Sedat J., Finlay B., Abo A., Bishop J. 1999. Enteropathogenic *E. coli* acts through WASP and Arp2/3 complex to form actin pedestals. *Nature cell biology*. 1(6): 389-391.
57. Kaper J., Nataro J., Mobley H. 2004. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology*. 2(2): 123-140.

- 58.Kenny B., DeVinney R., Stein M., Reinscheid D., Frey E., Finlay B. 1997. Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) transfers its receptor for intimate adherence into mammalian cells. *Cell*. 91(4): 511-520.
- 59.Kim D., Lenzen G., Page A., Legrain P., Sansonetti P., Parsot C. 2005. The *Shigella flexneri* effector OspG interferes with innate immune responses by targeting ubiquitin-conjugating enzymes.*Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*.102(39): 14046-14051.
- 60.Klapproth J., Scaletsky I., McNamara B., Lai L., Malstrom C., James S., DonnenbergM. 2000. A large toxin from pathogenic *Escherichia coli* strains that inhibits lymphocyte activation. *Infection and immunity*. 68(4): 2148-2155.
- 61.Koneman E., Allen S. 2006. Diagnóstico microbiológico texto y atlas en color. USA: Medica panamericana S.A.
- 62.Koonse B., Burkhardt III W., Chirtel S., Hoskin G. 2005. Salmonella and the sanitary quality of aquacultured shrimp.*Journal of food protection*.68(12): 2527-2532.
- 63.Lathem W., Grys T., Witowski S., Torres A., Kaper J., Tarr P., Welch R. 2002. StcE, a metalloprotease secreted by *Escherichia coli* O157: H7, specifically cleaves C1 esterase inhibitor. *Molecular microbiology*. 45(2): 277-288.
- 64.Lingwood C. 1999. Verotoxin/globotriaosyl ceramide recognition: angiopathy, angiogenesis and antineoplasia.*Bioscience Reports*.19(5): 345-354.
- 65.Lizumi Y., Sagara H., Kabe Y., Azuma M., Kume K., Ogawa M., Handa H. 2007. The enteropathogenic *E. coli* effector EspB facilitates microvillus effacing and

- antiphagocytosis by inhibiting myosin function. *Cell host & microbe*. 2(6): 383-392.
66. Ma C., Wickham M., Guttman J., Deng W., Walker J., Madsen K., Vallance B. 2006. *Citrobacter rodentium* infection causes both mitochondrial dysfunction and intestinal epithelial barrier disruption in vivo: role of mitochondrial associated protein (Map). *Cellular microbiology*. 8(10): 1669-1686.
67. McDaniel T., Jarvis K., Sonnenberg M., Kaper J. 1995. A genetic locus of enterocyte effacement conserved among diverse enterobacterial pathogens. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 92(5): 1664-1668.
68. McNamara B., Koutsouris A., O'Connell C., Nougayrède J., Sonnenberg M., Hecht G. 2001. Translocated EspF protein from enteropathogenic *Escherichia coli* disrupts host intestinal barrier function. *The Journal of clinical investigation*. 107(5): 621-629.
69. Medina M., Esquivel P., Lifschitz V., Medina, M., Löscher L., Merino L. 2010. Detección de *Escherichia coli* diarreogénicos en niños de barrios humildes de Corrientes, Argentina. *Revista Cubana de Medicina Tropical*. 62(1): 56-65.
70. Miget R. 1991. Microbiology of crustacean processing: shrimp, crawfish, and prawns. In *Microbiology of marine food products*. Springer, Boston, MA: 65-87.
71. [MINSA]. Ministerio de salud . [internet][acceso 25 diciembre 2017].

Disponible en:

<http://www.dge.gob.pe/portal/docs/vigilancia/boletines/2016/02.pdf>

72. Mohapatra B., Broersma K., Mazumder A. 2007. Comparison of five rep-PCR genomic fingerprinting methods for differentiation of fecal *Escherichia coli* from humans, poultry and wild birds. *FEMS microbiology letters*. 277(1): 98-106.
73. Morigi M., Galbusera M., Binda E., Imberti B., Gastoldi S., Remuzzi A., Remuzzi G. 2001. Verotoxin-1-induced up-regulation of adhesive molecules renders microvascular endothelial cells thrombogenic at high shear stress. *Blood*. 98(6): 1828-1835.
74. Mounier J., Popoff M., Enninga J., Frame M., Sansonetti P., Van Nhieu G. 2009. The IpaC carboxyterminal effector domain mediates Src-dependent actin polymerization during *Shigella* invasion of epithelial cells. *PLoS pathogens*. 5(1): e1000271.
75. Muza-Moons M., Koutsouris A., Hecht G. 2003. Disruption of cell polarity by enteropathogenic *Escherichia coli* enables basolateral membrane proteins to migrate apically and to potentiate physiological consequences. *Infection and immunity*. 71(12): 7069-7078.
76. Nataro J., Deng Y., Maneval D., German A., Martin W., Levine M. 1992. Aggregative adherence fimbriae I of enteroaggregative *Escherichia coli* mediate adherence to HEp-2 cells and hemagglutination of human erythrocytes. *Infection and Immunity*. 60(6): 2297-2304.
77. Nataro J., Yikang D., Yingkang D., Walker K. 1994. AggR, a transcriptional activator of aggregative adherence fimbria I expression in enteroaggregative *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*. 176(15): 4691-4699.

78. Nataro J., Kaper J. 1998 a. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clinical microbiology reviews*. 11(1): 142-201.
79. Nataro J., Steiner T., Guerrant R. 1998 b. Enteroaggregative *Escherichia coli*. *Emerging infectious diseases*. 4(2): 251.
80. Navarro-García F., Eslava C., Villaseca J., López-Revilla R., Czeczulin J., Srinivas S., Cravioto A. 1998. In vitro effects of a high-molecular-weight heat-labile enterotoxin from enteroaggregative *Escherichia coli*. *Infection and immunity*. 66(7): 3149-3154.
81. Naylor S., Low J., Besser T., Mahajan A., Gunn G., Pearce M., Gally D. 2003. Lymphoid follicle-dense mucosa at the terminal rectum is the principal site of colonization of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157: H7 in the bovine host. *Infection and immunity*. 71(3): 1505-1512.
82. Ngeleka M., Pritchard J., Appleyard G., Middleton D., Fairbrother J. 2003. Isolation and association of *Escherichia coli* AIDA-I/STb, rather than EAST1 pathotype, with diarrhea in piglets and antibiotic sensitivity of isolates. *Journal of veterinary diagnostic investigation*. 15(3): 242-252.
83. Nicholls L., Grant T., Robins-Browne R. 2000. Identification of a novel genetic locus that is required for in vitro adhesion of a clinical isolate of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* to epithelial cells. *Molecular microbiology*. 35(2): 275-288.

84. Noriega F., Liao F., Formal S., Fasano A., Levine M. 1995. Prevalence of Shigella enterotoxin 1 among Shigella clinical isolates of diverse serotypes. *Journal of Infectious Diseases*. 172(5): 1408-1410.
85. Nougayrède J., Sonnenberg M. 2004. Enteropathogenic *Escherichia coli* EspF is targeted to mitochondria and is required to initiate the mitochondrial death pathway. *Cellular microbiology*. 6(11): 1097-1111.
86. Ochoa T., Ecker L., Barletta F., Mispireta M., Gil A., Contreras C., Molina M., Amemiya I., Verastegui H., Hall E., Cleary T., Lanata C. 2009. Age-related susceptibility to infection with diarrheagenic *Escherichia coli* among infants from Periurban areas in Lima, Peru. *Clinical Infectious Diseases*. 49(11): 1694-1702.
87. Ochoa T., Mercado E., Durand D., Rivera F., Mosquito S., Contreras C., Riveros M., Lluque A., Barletta F., Prada A., Ruiz, J. 2011. Frecuencia y patotipos de *Escherichia coli* diarrogénicas en niños peruanos con y sin diarrea. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*. 28(1): 13-20.
88. Okuda J., Toyotome T., Kataoka N., Ohno M., Abe H., Shimura Y., Sasakawa C. 2005. Shigella effector IpaH9. 8 binds to a splicing factor U2AF 35 to modulate host immune responses. *Biochemical and biophysical research communications*. 333(2): 531-539.
89. Olive D., Bean P. 1999. Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. *Journal of clinical microbiology*. 37(6): 1661-1669.
90. [OMS] Organización Mundial de la salud . [internet][acceso 25 diciembre 2017]. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs125/es/>

91. [OMS] Organización Mundial de la Salud.[internet][acceso 25 diciembre 2017].
Disponibile en : <http://www.who.int/topics/early-child-development/en/>
- 92.O’Ryan M., Prado V., Pickering L. 2005. A millennium update on pediatric diarrheal illness in the developing world. In *Seminars in pediatric infectious diseases*. 16(2):125-136.
- 93.Paniagua-Contreras G., Monroy-Pérez E., Vaca-Pacheco S. 2007. Fenotipos de resistencia a antibióticos en cepas de *Escherichia coli* diarreogénicas detectadas en infantes mediante reacción en cadena de la polimerasa multiplex.*Rev. Med. Hosp. Gen. Mex.*70: 158-167.
- 94.Parente L., Costa R., Vieira G., dos Reis E., Hofer E., Fonteles A., dos Fernandes Vieira R. 2011. Bactérias entéricas presentes em amostras de água e camarão marinho *Litopenaeus vannamei* oriundos de fazendas de cultivo no Estado do Ceará, Brasil.*Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*.48(1): 46-53.
- 95.Pawlowski S., Warren C., Guerrant R. 2009. Diagnosis and treatment of acute or persistent diarrhea.*Gastroenterology*.136(6): 1874-1886.
- 96.Peiffer I., Servin A., Bernet-Camard M. 1998. Piracy of decay-accelerating factor (CD55) signal transduction by the diffusely adhering strain *Escherichia coli* C1845 promotes cytoskeletal F-actin rearrangements in cultured human intestinal INT407 cells.*Infection and immunity*.66(9): 4036-4042.
- 97.Pendaries C., Tronchère H., Arbibe L., Mounier J., Gozani O., Cantley L., Fry M., Gaits-Lacovoni F., Sansonetti P., Payraastre B. 2006. PtdIns (5) P activates the

- host cell PI3-kinase/Akt pathway during *Shigella flexneri* infection. *The EMBO journal*.25(5): 1024-1034.
- 98.Pitari G., Zingman L., Hodgson D., Alekseev A., Kazerounian S., Bienengraeber M., Waldman S. 2003. Bacterial enterotoxins are associated with resistance to colon cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 100(5): 2695-2699.
- 99.Qadri F., Svennerholm A., Faruque A., Sack R. 2005. Enterotoxigenic *Escherichia coli* in developing countries: epidemiology, microbiology, clinical features, treatment, and prevention. *Clinical microbiology reviews*.18(3): 465-483.
- 100.Rademaker J., Louws F., Versalovic J., De Bruijn J. 2008. Characterization of the diversity of ecologically important microbes by rep-PCR genomic fingerprinting. In *Molecular Microbial Ecology Manual*. Kowalchuck, G.A., de Bruijn, F.J., Head, I.M., Akkermans, A.D.L., and van Elsas, J.D. (eds). Dordrecht, the Netherlands: Springer, pp. 611–644.
- 101.Rasko D., Rosovitz M., Myers G., Mongodin, E., Fricke W., Gajer, P., Crabtree J., Sebahia M., Thomson N., Chaudhuri R., Henderson I., Sperandio V., Ravel J. 2008. The pangenome structure of *Escherichia coli*: comparative genomic analysis of *E. coli* commensal and pathogenic isolates. *Journal of bacteriology*.190(20): 6881-6893.
- 102.Ratchtrachenchai O., Subpasu S., Ito K. 1997. Investigation on enteroaggregative *Escherichia coli* infection by multiplex PCR. *Bull. Dep. Med. Sci.* 39:211–220.

- 103.Reid S., Herbelin C., Bumbaugh A., Selander R., Whittam T. 2000. Parallel evolution of virulence in pathogenic *Escherichia coli*. *Nature*. 406(6791): 64-67.
- 104.Riveros M., Barletta F., Cabello M., Durand D., Mercado E., Contreras C., Ochoa T. 2011. Patrones de adherencia de cepas de *Escherichia coli* difusamente adherente (DAEC) provenientes de niños con y sin diarrea.*Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*.28(1): 21-28.
- 105.Riveros M., Ochoa T. 2015. Enteropatógenos de importancia en salud pública.*Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*.32(1): 157-164.
- 106.Roy D., Biswas B., Islam H., Ahmed M., Rasheduzzaman M., Sarower M. 2013. Rapid identification of enterovirulent *Escherichia coli* strains using polymerase chain reaction from shrimp farms.*Pakistan Journal of Biological Sciences*. 16(21): 1260-1269.
- 107.Sanath Kumar H., Otta S., Karunasagar I.,Karunasagar I. 2001. Detection of Shiga-toxigenic *Escherichia coli* (STEC) in fresh seafood and meat marketed in Mangalore, India by PCR.*Letters in Applied Microbiology*. 33(5):334-338.
- 108.Sánchez J., Holmgren J. 2005. Virulence factors, pathogenesis and vaccine protection in cholera and ETEC diarrhea.*Current opinion in immunology*.17(4): 388-398.
- 109.[SANIPES].Organismo nacional de sanidad pesquera.2001.Análisis microbiológico, Manual de metodos de ensayo para mariscos y agua. [internet][acceso 27 septiembre 2016]. Disponible en:

http://www.sanipes.gob.pe/procedimientos/7_ManualSANIPESactualizada.pdf

- 110.Sansonetti P. 2002. Host–pathogen interactions: the seduction of molecular cross talk.*Gut*.50(suppl 3): iii2-iii8.
- 111.Savarino S., Fasano A., Watson J., Martin B., Levine M., Guandalini S., Guerry P. 1993. Enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1 represents another subfamily of *E. coli* heat-stable toxin.*Proceedings of the National Academy of Sciences*. 90(7): 3093-3097.
- 112.Scaletsky I., Fabbriotti S., Carvalho R., Nunes C., Maranhao H., Morais M., Fagundes-Neto U. 2002. Diffusely adherent *Escherichia coli* as a cause of acute diarrhea in young children in Northeast Brazil: a case-control study.*Journal of clinical microbiology*.40(2): 645-648.
- 113.Sears C., Kaper J. 1996. Enteric bacterial toxins: mechanisms of action and linkage to intestinal secretion. *Microbiological reviews*. 60(1): 167.
- 114.Servin A. 2005. Pathogenesis of Afa/Dr diffusely adhering *Escherichia coli*.*Clinical microbiology reviews*.18(2): 264-292.
- 115.Schmidt A., Anderson L. 2006. Repetitive DNA elements as mediators of genomic change in response to environmental cues. *Biol Rev* 81: 531–543.
- 116.Schroeder G., Hilbi H. 2008. Molecular pathogenesis of *Shigella* spp.: controlling host cell signaling, invasion, and death by type III secretion.*Clinical microbiology reviews*.21(1): 134-156.

- 117.Schüller S., Heuschkel R., Torrente F., Kaper J., Phillips A. 2007. Shiga toxin binding in normal and inflamed human intestinal mucosa.*Microbes and infection*.9(1): 35-39.
- 118.Sheikh J., Czczulin J., Harrington S., Hicks S., Henderson I., Le Bouguéne C., Nataro J. 2002. A novel dispersin protein in enteroaggregative *Escherichia coli*.*The Journal of clinical investigation*.110(9): 1329-1337.
- 119.Shulman S., Friedmann H., Sims R. 2007. Theodor Escherich: the first pediatric infectious diseases physician?.*Clinical infectious diseases*.45(8): 1025-1029.
- 120.Steiner T., Nataro J., Poteet-Smith C., Smith J., Guerrant R. 2000. Enteroaggregative *Escherichia coli* expresses a novel flagellin that causes IL-8 release from intestinal epithelial cells.*The Journal of clinical investigation*.105(12): 1769-1777.
- 121.Stromberg Z., Lewis G., Aly S., Lehenbauer T., Bosilevac J., Cernicchiaro N., Moxley R. 2016. Prevalence and level of enterohemorrhagic *Escherichia coli* in culled dairy cows at harvest.*Journal of food protection*.79(3): 421-431.
- 122.Tacket C., Moseley S., Kay B., Losonsky G., Levine M. 1990. Challenge studies in volunteers using *Escherichia coli* strains with diffuse adherence to HEp-2 cells.*Journal of Infectious Diseases*.162(2): 550-552.
- 123.Tatsuno I., Horie M., Abe H., Miki T., Makino K., Shinagawa H., Sasakawa C. 2001. toxB Gene on pO157 of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157: H7 Is Required for Full Epithelial Cell Adherence Phenotype. *Infection and immunity*. 69(11): 6660-6669.

124. Taylor, C. 2008. Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* and *Shigella dysenteriae* type 1-induced haemolytic uraemic syndrome. *Pediatric nephrology*.23(9): 1425.
125. Thapar N., Sanderson I. 2004. Diarrhoea in children: an interface between developing and developed countries. *The Lancet*.363(9409): 641-653.
126. Tobes R., Ramos J. 2005. REP code: defining bacterial identity in extragenic space. *Environ Microbiol*. 7: 225–228.
127. Trabulsi L., Keller R., Gomes T. 2002. Typical and atypical Enteropathogenic *Escherichia coli*. (Synopsis). *Emerging infectious diseases*. 8(5): 508-514.
128. Ud-Din A., Wahid S. 2014. Relationship among *Shigella* spp. and enteroinvasive *Escherichia coli* (EIEC) and their differentiation. *Brazilian Journal of Microbiology*.45(4): 1131-1138.
129. Ussery D., Binnewies T., Gouveia-Oliveira R., Jarmer H., Hallin P. 2004. Genome update: DNA repeats in bacterial genomes. *Microbiology*. 150: 3519–3521.
130. Vadillo Machota S., Piriz Duran S., Mateos Yanes E. 2002. *Manual de microbiologia veterinaria*. España: McGRAW-HILL.
131. Vallanace B., Finlay B. 2000. Exploitation of host cells by enteropathogenic *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 97(16): 8799-8806.
132. Varela G., Gómez-Duarte O., Ochoa T. 2010. Diarrheagenic *Escherichia coli* in children from Uruguay, Colombia and Peru. *Pathogenic Escherichia coli in Latin America*.1: 209-222.

133. Versalovic J., Koeuth T., Lupski R. 1991. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Research*. 19(24):6823-6831.
134. Versalovic J., Lupski R. 1998. Interspersed repetitive sequences in bacterial genomes. In *Bacterial Genomics: Physical Structure and Analysis*. de Bruijn, F.J., Lupski, J.R., Weinstock, G.M. (eds). New York, NY, USA: Chapman & Hall, pp. 38–48.
135. Vial P., Robins-Browne R., Lior H., Prado V., Kaper J., Nataro J., Levine M. 1988. Characterization of enteroadherent-aggregative *Escherichia coli*, a putative agent of diarrheal disease. *Journal of Infectious Diseases*. 158(1): 70-79.
136. Vidal M., Kruger E., Durán C., Lagos R., Levine M., Prado V., Toro C., Vidal R. 2005. Single multiplex PCR assay to identify simultaneously the six categories of diarrheagenic *Escherichia coli* associated with enteric infections. *Journal of clinical microbiology*. 43(10): 5362-5365.
137. Vieira R., de Souza O., Patel T. 1997. Bacteriological quality of ice used in Mucuripe Market, Fortaleza, Brazil. *Food Control*. 8(2): 83-85.
138. Wang F., Jiang L., Yang Q., Han F., Chen S., Pu S., Ge B. 2011. Prevalence and antimicrobial susceptibility of major foodborne pathogens in imported seafood. *Journal of Food Protection*. 74(9):1451-1461.
139. Williams J., Boyd B., Nutikka A., Lingwood C., Foster D., Milford D., Taylor C. 1999. A comparison of the effects of verocytotoxin-1 on primary human renal cell cultures. *Toxicology letters*. 105(1): 47-57.

140. Yang, Wang. 2014. Pathogenic *E.coli*. En C. Batt, M.-I. Tortorello, *Encyclopedia of food microbiology*. USA: Elsevier:695-700
141. Yoshida S., Handa Y., Suzuki T., Ogawa M., Suzuki M., Tamai A., Abe A., Katayama E., Sasakawa, C. 2006. Microtubule-severing activity of *Shigella* is pivotal for intercellular spreading. *Science*.314(5801): 985-989.
142. Yu J., Kaper J. 1992. Cloning and characterization of the eae gene of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157: H7. *Molecular microbiology*.6(3): 411-417.
143. Zurawski D., Mumy K., Faherty C., McCormick B., Maurelli A. 2009. *Shigella flexneri* type III secretion system effectors OspB and OspF target the nucleus to downregulate the host inflammatory response via interactions with retinoblastoma protein. *Mol. Microbiol.* 71: 350–368.
144. Zychlinsky A., Prevost M., Sansonetti P. 1992. *Shigella flexneri* induces apoptosis in infected macrophages. *Nature*.358(6382): 167-169.