

Caracterización molecular y serológica de *Escherichia coli* en Quesos artesanales de seis departamentos de Honduras

Jeniffer D. Fiallos López ¹

María de Lourdes Enríquez de Madrid ²

Brayan D. Montoya ³

Armando Navarro Ocaña ⁴

RESUMEN

Un estudio realizado durante el año 2015 donde se evaluó la calidad e inocuidad en quesos artesanales de seis departamentos de Honduras que están dentro de las regiones productoras de quesos del país. Los resultados de este estudio de calidad microbiología en este tipo de alimentos son algo alarmantes ya que el recuento de bacterias totales y coliformes fecales fueron superiores a 1×10^3 UFC/g lo cual supera los límites establecidos en reglamentos para este tipo de productos. Esto debido a malas prácticas de manufactura que puedan tener los pequeños y medianos productores. *Escherichia coli* es un patógeno que sirve como indicador de contaminación fecal en agua y alimentos. Esta bacteria ha evolucionado a ser un versátil patógeno intestinal que puede albergar varios genes de virulencia que crean lesiones en células intestinales. Objetivos: El objetivo principal fue clasificar molecularmente los patotipos y grupos filogenéticos de *E. coli* de cepas obtenidas a partir de muestras de quesos. Adicionalmente se logró la clasificación de las cepas en serotipos lo cual brinda más información y coincidencias epidemiológicas con otros estudios de otras fuentes. El estudio comprendió el año 2016 donde se realizó toda la parte experimental y 2017 se concluyó el análisis de todos los datos obtenidos. Resultados: Un total de 48 cepas obtenidas del estudio del 2015 donde un 86% (n=41) fueron obtenidas de queso semiseco, y el resto de ellas de queso fresco y seco. Un 58% (n=28) amplificaron para dos patotipos principales EPEC (en un 54%) y ETEC (46%). El grupo filogenético predominante fue el B1 con un 50% (n=24). Los serogrupos predominantes en las cepas fueron O6, O8, O159. Conclusiones: El saber que existen patotipos que albergan factores de virulencia causantes de patologías intestinales; en alimen-

¹ Autor: estudiante de la Maestría en Enfermedades Infecciosas y Zoonóticas, UNAH;jenifferdenisse@yahoo.com

² Co-autora: Instituto de Investigaciones en Microbiología, UNAH

³ Co-autor: Profesor de la Escuela de Microbiología. Facultad de Ciencias, UNAH

⁴ Asesor, Departamento de Salud Pública, Universidad Autónoma de México

tos de alto consumo como los quesos artesanales, es un problema de inocuidad alimentaria que debe tomarse en serio. Existen muchas preguntas que responder después de esta descripción de situación de un patógeno que puede causar brotes en cualquier momento.

Palabras clave: *E. coli*, grupos filogenéticos, patotipos, serotipos

ABSTRACT

In a study conducted in 2015, the quality and safety of artisanal cheeses from six departments of Honduras was evaluated (that are within the cheese producing regions of the country). The results of this microbiology quality study in this type of food are somewhat alarming since the total bacteria count and fecal coliforms were higher than 1×10^3 CFU / g (exceeding the limits established in regulations for this type of products). This is due to poor manufacturing practices that small and medium producers may have. *Escherichia coli* is a pathogen that serves as an indicator of fecal contamination in water and food. This bacterium has evolved to be a versatile intestinal pathogen that can harbor several virulence genes that create lesions in intestinal cells. The main objective was to classify molecularly the pathotypes and phylogenetic groups of *E. coli* from strains obtained from cheese samples. Additionally, the classification of strains in serotypes was achieved, which provided more information and epidemiological coincidences with other studies from other sources. The study comprised the year 2016 where the whole experimental part was carried out and 2017, the analysis of all the data obtained was concluded. A total of 48 strains obtained from the 2015 study where 86% ($n = 41$) were obtained from semi-dry cheese, and the rest from fresh and dry cheese. 58% ($n = 28$) amplified for two main EPEC pathotypes (in 54%) and ETEC (46%). The predominant phylogenetic group was B1 with 50% ($n = 24$). The predominant serogroups in the strains were O6, O8, O159. It can be concluded that there are pathotypes which harbor virulence factors that cause intestinal pathologies. In high-consumption foods such as artisan cheeses, it is a food safety problem that must be taken seriously. There are many questions to answer after this description of the situation of a pathogen that can cause outbreaks at any time.

Keywords: *E. coli*, phylogenetic groups, pathotypes, serotypes.

INTRODUCCIÓN

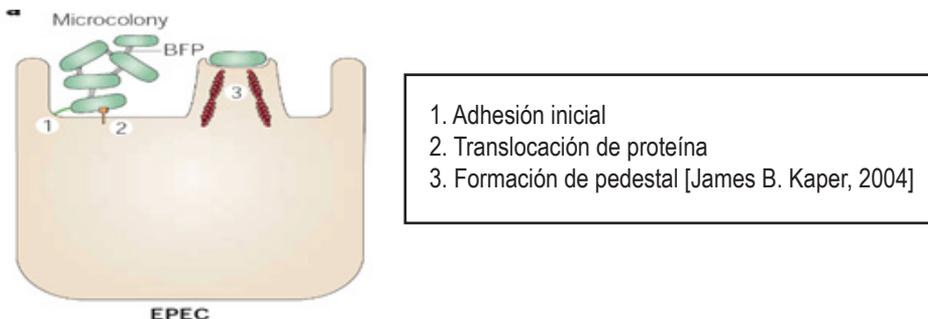
Las enfermedades transmitidas por alimentos como resultados del consumo de comida contaminada con *E. coli* diarreogénica, ha sido reconocido como uno de los problemas de salud más prevalente alrededor del mundo. Ciertos patotipos típicamente son transmitidos por agua o alimentos contaminados, sin embargo, esta prevalencia está restringida a brotes y estudios en ciertas regiones. Estas bacterias son afectadas por múltiples factores presente en comida, por ejemplo la temperatura, pH, actividad de agua, proceso de manufactura, y factores intrínsecos del microorganismo como ser el inóculo. Asegurando la calidad microbiológica de los alimentos es uno de los aspectos relacionados a salud pública. La iniciativa de One health (<http://www.onehealthinitiative.com>) considera que la producción de alimentos debe asegurar inocuidad alimentaria ya que envuelve el ambiente, humanos y animales. Es algo esencial que las enfermedades causadas por *E. coli* diarreogénica deben ser tomadas en cuenta sabiendo el concepto de la cadena alimenticia que con lleva a enfermedades transmitidas por alimentos y su epidemiología. En el año 2009 la FAO [FAO, 2009] publicó un resumen acerca de ETAS (Enfermedades transmitidas por alimentos y su impacto socioeconómico) donde publicaba los casos de 5 países centroamericanos (Costa Rica, El Salvador, Guatemala, Honduras y Nicaragua). En este resumen del 2009 se incluyen las enfermedades transmitidas por *E. coli* y otros patógenos intestinales como parásitos en los cinco países. “Es necesario destacar que en Honduras no existe un Sistema de Vigilancia de las enfermedades transmitidas por alimentos y que el informe de vigilancia pasiva rara vez contempla la identificación del agente causal y menos frecuente la identificación del alimento involucrado...”. El informe de la FAO realiza estimaciones de acuerdo a las estadísticas de casos de diarrea donde se identificó el agente causal. *E. coli* y sus patotipos causantes de diarrea se encuentran como código 5 de la clasificación estadística internacional de ETAS junto a *Clostridium sp*, *Campylobacter* y *Yersinia enterocolitica*. En las estimaciones que presentó Honduras en los distintos grupos etarios, ésta categoría presenta 300 casos anuales y 178 de ellos son en niños menores de un año. Se debe resaltar que, aunque no se conozca ni el alimento ni agente causal, es un problema al que debe prestarse atención. El siguiente estudio describe solamente un patógeno, el cual es considerado ubicuo y debido a esa característica un indicador de contaminación fecal en aguas y alimentos ya que está presente en el aparato digestivo de humanos y animales. Los quesos artesanales al ser un alimento de alto consumo y con alto riesgo de contaminación por malas prácticas de manufactura, además de su origen puede ser víctima de contaminación por *E. coli* altamente patógena.

REVISIÓN LITERARIA

E. coli enteropatógena (EPEC)

Las cepas de EPEC son causantes de diarrea y su transmisión es vía fecal-oral a causa de alimentos, agua o fómites actuando como vehículo. En adultos sanos, la diarrea inducida por EPEC puede ser iniciada con una dosis de 10⁸ a 10¹⁰ microorganismos, siendo esta dosis infecciosa menor en niños [Matthew A. Croxen, 2013]. Los serotipos de EPEC fueron los primeros en describirse y en 1987 la Organización Mundial de la Salud acordó que los serogrupos O26, O55, O86, O111, O114, O119; O125, O126, O127, O128, O142 y O158 serían los de búsqueda prioritaria al ser los causantes de enfermedad. [WHO, 1987]. En cuanto a la patogénesis de este patotipo; luego de un acoplamiento íntimo, las cepas borran las microvellosidades del hospedero, generando así características histopatológicas conocidas como efecto de adhesión y esfacelamiento (*attaching and effacing-A/E*). EPEC se distingue de otros patotipos como EAEC, EIEC y ETEC que no provocan este efecto de A/E [Gaytan, 2016]. Los elementos genéticos responsables de la producción de este efecto citopatológico están dentro de una gran isla de patogenicidad conocida como LEE (*locus of enterocyte effacement*). Además, las cepas EPEC son clasificadas como típicas o atípicas por la presencia o ausencia del factor de adherencia de EPEC (EPEC adherence factor, EAF), plásmido que codifica BFP (*bundle forming pili*) [Isabel C.A. Scaletsky, 1999].

Figura 1. Patogénesis EPEC

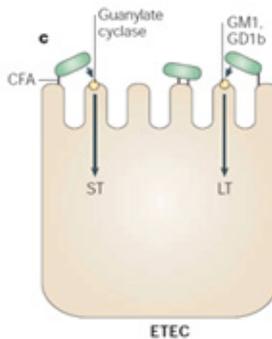


Tomado de: [James B. Kaper, 2004]. EPEC se adhiere a los enterocitos, pero destruye la arquitectura normal de las microvellosidades, induciendo las lesiones características de adhesión y esfacelamiento. El re-arreglo del citoesqueleto está acompañado de respuesta inflamatoria y diarrea.

E. coli enterotoxigénica (ETEC)

Este patotipo fue descubierto en el curso de una investigación clínica en Calcuta, India, durante 1950, con *Vibrio cholerae*, en la que los cultivos por esta bacteria resultaron negativos pero la sintomatología clínica era presuntiva de cólera por presentar una diarrea acuosa y deshidratación [Fleckenstein, 2013]. ETEC es un patotipo diverso de organismos diarreogénicos que comparten la habilidad de producir y eficientemente secretar enterotoxinas termo-lábiles (LT, heat-labile toxin); la cual presenta un mecanismo similar a la enterotoxina de *Vibrio cholerae*, y termo-estables (ST, *heat-stable toxin*) que contiene múltiples residuos de cisteína que le brinda estabilidad al ser expuestas al calor y ser poco inmunogénica [Dorsey; FC, 2006]. Ambas toxinas pueden expresarse juntas o solo una de estas y así ocasionar daño a células epiteliales y se ha considerado como el principal agente etiológico de la diarrea del viajero [C. Wenneras, 2004].

Figura 2. Patogénesis ETEC



Tomado de: [James B. Kaper, 2004]. ETEC se adhiere a los enterocitos e induce diarrea acuosa por la secreción de toxinas termo lábiles y/o termo estables.

Métodos y técnicas

Las cepas de *E. coli* provenían de un estudio realizado en el 2015 segundo estudio aportó 48 cepas de *E. coli* de quesos artesanales variados. Estos quesos fueron obtenidos de distintos departamentos de Honduras que pertenecen a las zonas productoras de lácteos artesanales, los cuales están organizados en tres regiones productoras. Los departamentos de la región centro oriental incluyen: Olancho, El Paraíso, Yoro y Atlántida. En la región occidental el departamento de Ocotepeque, y de la región sur o del Pacífico se obtuvieron del departamento de Valle [Montoya, 2015]. En el siguiente mapa se muestra el número de cepas aisladas por localidad.

Figura 3. Número de cepas de E. coli aisladas de quesos artesanales por departamento. Un total de 48 cepas fueron analizadas.



Tomado de: [James B. Kaper, 2004]. ETEC se adhiere a los enterocitos e induce diarrea acuosa por la secreción de toxinas termo lábiles y/o termo estables.

Fuente: Elaboración propia

Recolección de datos

Las fuentes primarias del estudio fueron las cepas bacterianas del Laboratorio Teasdale –Corti. Se utilizó una hoja de registro de cepario y una hoja de resultados única para cada cepa donde se registraba cada ítem importante como localidad, origen de cepa. La hoja de registro también contenía los resultados de cada una de las pruebas moleculares a realizarse, así como el serotipo de cada una de ellas junto con sus características bioquímicas estrictas de E. coli.

Análisis de laboratorio

Se realizó el procedimiento bacteriológico correspondiente para la reactivación y verificación de viabilidad y pureza de las cepas originarias de quesos artesanales para poder continuar con los demás procesos en los laboratorios. Durante el proyecto se emplearon varios laboratorios durante el proyecto ya el procesamiento bacteriológico y verificación de pureza y viabilidad se realizó en el Laboratorio Teasdale-Corti y algunos análisis moleculares en el Laboratorio de Biología Molecular de la Escuela de Microbiología. Adicionalmente el análisis de clasificación de serotipos de las cepas al

igual que su filogenia y factores de virulencia y algunos factores de colonización (principalmente de las cepas con serotipos de ETEC) en el Laboratorio de Patógenos Entéricos en el Departamento de Salud Pública de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Confirmación de identificación bioquímica

La pureza y viabilidad de las cepas se realizó en infusión corazón-cerebro y en placas de agar MacConkey, incubando las placas a 37°C durante 18-24h. Posteriormente se confirmó la identificación fenotípica mediante pruebas bioquímicas en las que se incluyeron agar Kligler, urea, SIM, caldo rojo de metilo y Voges Proskauer, caldo malonato-fenilalanina y ácido glucónico. Los resultados de identificación bioquímica también están anotados en el sistema de registro de manera física en bitácora de laboratorio y de manera digital en el formulario establecido.

Determinación antigénica de cepas de E. coli

La tipificación serológica se realizó utilizando 187 sueros (SERUNAM) contra los 187 antígenos somáticos (O) y 53 sueros contra los antígenos flagelares (H) del esquema antigénico de E. coli. Estos sueros se obtuvieron de conejos inmunizados con cepas de referencia de E. coli (NCTC- National Collection of Type Culture). Terminada la identificación bioquímica y serológica de las cepas, se clasificaron en serogrupos (los serotipos correspondientes a cada patotipo). En algunos casos un serotipo se encontró reportado por más de un patotipo, lo que se tomó en cuenta para aumentar las posibilidades de encontrar factores de virulencia correspondientes para cada uno. La serología sirve como un orientador del patotipo correspondiente ya que en la naturaleza pueden existir cepas híbridas que contienen uno o más factores de virulencia.

Caracterización molecular

Para la caracterización molecular de los distintos patotipos de E. coli se aplicó la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). La identificación se realizó mediante dos reacciones de PCR diferentes: en el primer PCR se amplificó un fragmento de la región que codifica para factores de virulencia propios de cada patotipo; por su parte, el segundo PCR permitió determinar la relación entre cepas al clasificarlas en ocho grupos filogenéticos mayores A, B1, B2, C, D, E, F, y clado 1, según lo descrito por Clermont en 2013. [Olivier Clermont, 2013]

Extracción de ácidos nucleicos

La caracterización de cepas se llevó a cabo en el Laboratorio de Patógenos Entéricos de la UNAM, y siguiendo sus procedimientos se utilizó el método de extracción descrito por Islam [Islam, 2006]. En el laboratorio de Biología Molecular en UNAH se utilizó el método descrito por Boom solamente para aquellas cepas control [R. Boom, 1990].

Amplificación de genes mediante Reacción en cadena de la polimerasa PCR

Se efectuaron varios protocolos de PCR para determinar la presencia de secuencias específicas en genes que codifican para factores de virulencia de dos patotipos diarreogénicos de *E. coli*: EPEC, ETEC (esto debido a los serotipos que presentaron las cepas de quesos artesanales). Los marcadores de virulencia a utilizar incluyeron, *eae* (gen estructural para la intimina en EPEC y EHEC), *bfpA* (gen estructural para BFP de las EPEC típicas) y *eaf*, *lt*, *sth* y *stx* (enterotoxinas de ETEC).

Este patotipo fue descubierto en el curso de una investigación clínica en Calcuta, India, durante 1950, con *Vibrio cholerae*, en la que los cultivos por esta bacteria resultaron negativos pero la sintomatología clínica era presuntiva de cólera por presentar una diarrea acuosa y deshidratación [Fleckenstein, 2013]. ETEC es un patotipo diverso de organismos diarreogénicos que comparten la habilidad de producir y eficientemente secretar enterotoxinas termo-lábiles (LT, heat-labile toxin); la cual presenta un mecanismo similar a la enterotoxina de *Vibrio cholerae*, y termo-estables (ST, heat-stable toxin) que contiene múltiples residuos de cisteína que le brinda estabilidad al ser expuestas al calor y ser poco inmunogénica [Dorsey; FC, 2006]. Ambas toxinas pueden expresarse juntas o solo una de estas y así ocasionar daño a células epiteliales y se ha considerado como el principal agente etiológico de la diarrea del viajero [C. Wenneras, 2004]. Los iniciadores, secuencias y cepas de referencia empleados se describen en la Tabla 1.

PCR grupos filogenéticos

La segunda reacción de PCR se efectuó para clasificar las cepas de *E. coli* en grupos filogenéticos. Se utilizó la técnica cuádruplex descrita por Clermont donde se pueden clasificar en 8 grupos filogenéticos con el uso de los genes *chuA*, *yjaA*, *TspE4.C2* *arpA* [Olivier Clermont, 2013]. Los iniciadores se describen en la Tabla 2.

Tabla 1. Iniciadores a utilizar en PCR para identificación de patotipos y factores de colonización de *Escherichia coli*.

Genes	Código	Secuencia de primers 5' a 3'	Peso de amplicón (pb)	Referencia	Cepa de referencia
<i>Eae</i>	SK1	CCCGAATTCGGCACSAGCATAAGC	864	[Schmidt, 1994]	87237 108287
	SK2	CCCGGATCCGTCTGCCAGTATTC			
<i>Bfp</i>	bfp-F	AATGGTGCTTGCGCTTGCTGC	326	[Gunzburg, 1995]	87237 E2348
	bfp-R	GCCGCTTTATCCAACCTGGTA			
<i>Eaf</i>	EAF-F	CAGGGTAAAAGAAAGATGATAA	397	[Franke, 1994]	87237 E2348
	EAF-R	TATGGGGACCATGTATTATCA			
<i>Lt</i>	LtA-F	ACGGCGTTACTATCCTCTC	273	[Rodas, 2009]	H-10407
	LtA-R	TGGTCTCGGTCAGATATGTG			
<i>Stp</i>	Stp-F	TCTTTCCCCTCTTTTAGTCAG	166	[Rodas, 2009]	
	Stp-R	ACAGGCAGGATTACAACAAAG			
<i>Sth</i>	Sth-F	CTTTCTGTATTATCTTTTTCACCTTT	181	[Chattopadhyay, 2012]	H-10407
	Sth-R	CACCCGGTACAAGCAGGATTAC			
<i>Cfa</i>	CFAI-F	GGTGAATGGCTCTGACCACA	479	[Bekal, 2003]	H-10407 115365
	CFAI-R	GTCATTACAAGATACTACT			
<i>cs1</i>	Cs1-F	GCTCACACCATCAACACCGTT	321		112114
	Cs1-R	CGTTGACTTAGTCAGGATAAT			
<i>cs3</i>	CS3-F	GGGCCACTCTAACCAAAGAA	401		112114
	CS3-R	CGGTAATTACCTGAAACTAAA			
<i>cs21</i>	CS21-F	ATGAGCCTGCTGGAAGTTATCATTG	608	[Mazariego-Espinosa, 2010]	9034* 115362
	CS21-R	TTAACGGCTACCTAAAGTAATTGAGTT			

Tabla 2. Iniciadores utilizados en PCR cuádruplex para identificación de grupos filogenéticos. [Olivier Clermont, 2013]

Genes	Código	Secuencia de primers 5' a 3'	Peso de amplicón (pb)	Referencia	Cepa de referencia
<i>chuA</i>	chuA-F	ATGGTACCGGACGAACCAAC	288	[Olivier Clermont, 2013]	K-12 116979 108287 ECOR 70
	chuA-R	TGCCGCCAGTACCAAAGACA			
<i>yjaA</i>	yjaA-F	CAAACGTGAAGTGTGAGGAG	211		
	yjaA-R	ATTGCGTTCCTCAACCTGTG			
<i>TspE4.C2</i>	TspE4-F	CACTATTCGTAAGGTCATCC	152		
	TspE4-R	AGTTTATCGCTGCGGGTCCG			
<i>arpA</i>	arpA-F	AACGCTATTCGCCAGCTTGC	400		
	arpA-R	TCTCCCCATACCGTACGCTA			
<i>arpA*</i>	ArpAgpC-F	AGTTTTATGCCAGTGCGAG	219		
	ArpAgpC-R	TCTGCGCCGGTCACGCC			
<i>trpA**</i>	TrpBA-F	CGGCGATAAAGACATCTTCAC	489		
	TrpBA-R	GCAACGCGCCTGGCGGAAG			

*Corresponde al primer ArpAgpC (Filo grupos A o C)

** Corresponde al primer trpBA usado como control interno.

Análisis bioestadístico

A partir de la base de datos generada con el registro de cepas y los resultados de las técnicas de caracterización molecular de las cepas de *E. coli* para identificar los patotipos y los grupos filogenéticos, se generaron las frecuencias absolutas utilizando el software Excel 2016 mediante estadística descriptiva [Daniel, 2002]. Las tablas se generaron en el programa Minitab 17 ® utilizando frecuencias absolutas.

Resultados

Los resultados de las 48 cepas de quesos artesanales se muestran en la tabla 3. Estos se han organizado en serotipos, de acuerdo a los grupos filogenéticos en que se encuentran y la frecuencia de cada uno.

Tabla 3. Serotipos de *E. coli* aislada de quesos artesanales

Serotipo	N	Grupo	Serotipo	N	Grupo	Serotipo	N	Grupo
O101:H9	1	A	49766:H10	2	B1	O6:H1	1	B2
O129:H30	3		O111ab:H2	1		O125ab:H37	1	
O176:H30	1		O124:H38	1		O6:H16	1	C
O20:H11	1		O129:H30	1		O8:H9	3	
O40:H4	2		O153:H12	1		O20:H21	1	CLADO 1
O41:H10	1		O159:H?	1		O159:H11	1	D
O69:H51	1		O159:H21	3		O102:H7	1	E
			O25:H21	1		O101:H9	1	U
			O6:H?	4		O159:H21	2	
			O6:H2	2		O6:H2	1	
		O6:H51	1	O8:H12	1			
		O6:H9	1					
		O8:H12	3					
		O8:H21	2					
TOTAL	10			24			14	48

En cuanto los grupos filogenéticos el de mayor frecuencia fue el grupo B1 con 50 % (n=24), seguido del grupo A con el 21 % (n=10). A continuación, el grupo C tuvo una frecuencia de 8 % (n=4) y el grupo B2 con un 4 % (n=2). Los grupos D, E y Clado 1

tuvieron una frecuencia de 2 % (n=1) cada uno. Un 11 % (n=5) de las cepas de origen de quesos artesanales no se pudieron agrupar en los demás grupos filogenéticos es decir se nombran U.

Es de hacer notar que, entre las cepas provenientes de quesos artesanales, el serogrupo O6 representó el 23 % (n=11). En este serogrupo se clasificaron seis diferentes serotipos, de la siguiente manera: el de mayor frecuencia es el O6: H?, con un 8 % (n=4) correspondientes al grupo B1. El serotipo O6:H2 se encontró en ambos grupos B1 y U; y los demás serotipos se encontraron en O6:H51; O6:H9 se encontró en el grupo B1 y los serotipos O6:H1 y O6 H16 en el grupo filogenético B2 y C, respectivamente.

El serogrupo O6 al igual que el O8 generalmente se encuentra en la literatura identificados con el patotipo ETEC. El serogrupo O8 en estas cepas es el segundo más frecuente con 19 % (n=9); los serotipos son O8:H12 de las cuales tres cepas pertenecen al grupo B1 y una con grupo desconocido (U). El segundo serotipo es O8:H9 con tres cepas en el grupo C, finalmente O8:H21 con dos cepas en el grupo B1. El 15 % (n=7) de las cepas pertenece al serogrupo O159 en el cual el serotipo O159:H21 es el frecuente con tres cepas en el grupo B1 junto con su variante no móvil haciendo un total de 4 cepas en este grupo. Las demás variantes de O159:H21 (n=2) no tienen un grupo definido (U) y O159:H11 (n=1) encontró en el grupo D. Los resultados de sus factores de virulencia se encuentran en la tabla 4 En la gráfica 1 se muestran los grupos filogenéticos de acuerdo a las cepas que contenían factores de los distintos patotipos.

De los resultados de la tabla anterior se realizó una gráfica con las frecuencias absolutas de las cepas que codificaron para EPEC y ETEC. La grafica se realizó tomando en cuenta solamente ambos patotipos y los grupos filogenéticos para poder visualizar mejor la distribución de ambos patotipos en los 7 grupos encontrados.

El 58 % (n=28) de las cepas de quesos artesanales presentaron factores de virulencia. La frecuencia de los patotipos se divide de la siguiente manera: el 54 % (n=15) presentaron factores de EPEC del cual el 32 % (n=9) son EPEC atípicas y el 21 % (n=6) son EPEC típicas. Las cepas del patotipo ETEC representan un 46 % (n=13) del total de cepas analizadas.

Se pueden denotar ciertos resultados en cuanto a sus serotipos; por ejemplo, O40:H4 se encontró en ambos patotipos (a-EPEC y ETEC) dentro del mismo grupo filogenético A. El caso anterior puede observarse en el serotipo O159:H21 el cual se encuentra

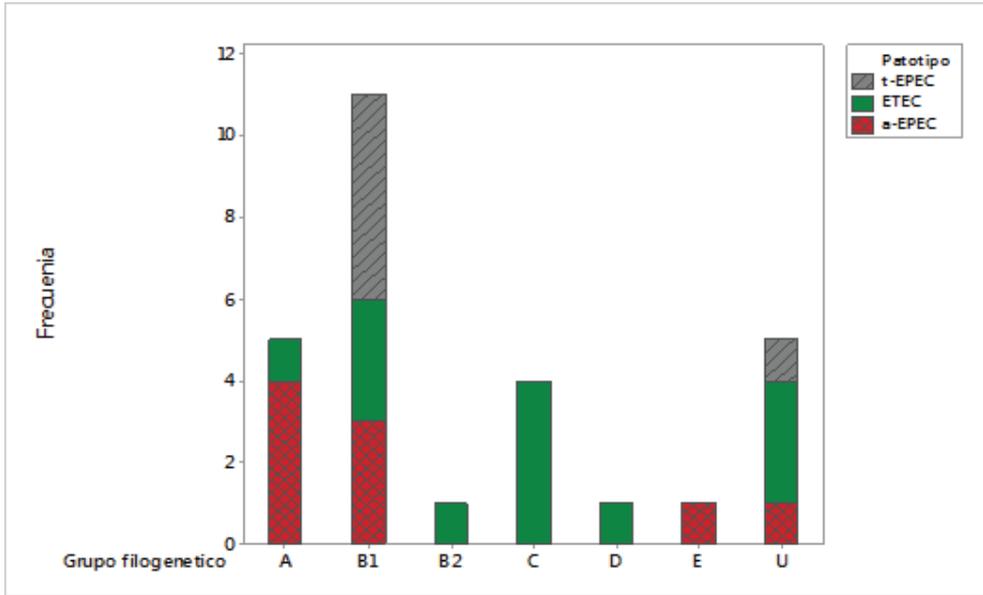
en el grupo B1 y U, siempre en ambos patotipos. Los demás serotipos O159: H? /HR y O159:H11 se encontraron en ETEC en los grupos B1 y D.

Tabla 3. Serotipos de E. coli aislada de quesos artesanales **Tabla 4. Resultados de factores de virulencia en cepas de quesos artesanales.**

Serotipo	N	Grupo	Patotipo	Gen	
O40:H4	1	A	a-EPEC	<i>eae+</i>	
O69:H51	1				
O129:H30	1				
O101:H9	2	A, U			
O111ab:H2	1	B1			
O159:H21	2				
O102:H7	1	E			
O6:H?	3	B1	t-EPEC	<i>eae+, bfp+</i>	
O8:H21	1				
O8:H12	2	B1,U			
O40:H4	1	A	ETEC	<i>lt+, sth+</i>	
O159:H?	1	B1			
O6:H9	1	B1			
O159:H21	2	B1,U			
O6:H1	1	B2			
O8:H9	3	C			
O6:H16	1	C			<i>lt+, sth+, cs1+, cs21+, cs3+</i>
O159:H11	1	D			<i>lt+, sth+</i>
O6:H2	1	U			<i>cfa+</i>
O159:H12	1	U			<i>lt+, sth+, cs1+, cs21+, cs3+</i>
Total	28				

En cuanto a los serogrupos mencionados en el análisis de la tabla 3. El serogrupo O8 con sus serotipos O8:H21(n=1) y O8:H12 (n=2), se encontraron en el mismo patotipo EPEC, siendo ambos EPEC típicas y del grupo B1 y una cepa de grupo U (desconocido). El serogrupo O6 presenta mayor diversidad ya que los serotipos O6:H9, O6:H1, O6:H16, O6:H2, pertenecientes a los grupos B1, B2, C, y U respectivamente, pertenecen al patotipo ETEC. El serotipo O6: H? se encontró en el grupo B1 y pertenece a las EPEC típicas.

Gráfica 1. Frecuencia de grupos filogenéticos de acuerdo a frecuencia de los distintos patotipos en cepas de quesos artesanales



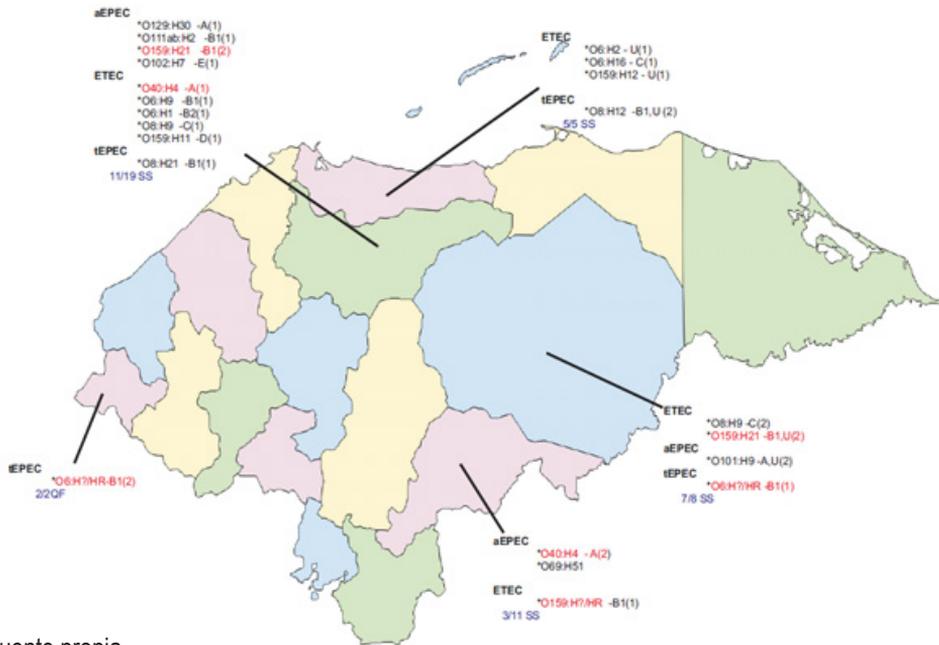
Fuente propia

Los hechos a resaltar de esta fuente son, que ninguna cepa amplificó el gen eaf de EPEC típicas, que solamente dos cepas de ETEC presentaron los factores de colonización o antígenos de superficie CS1, CS21 y CS3, las cuales son de los serotipos O6:H16 (este amplificó para cfa) y O159:H12. Ninguna cepa amplificó para la porción porcina de la toxina termoestable de ETEC. Ambas cepas mencionadas anteriormente provienen del departamento de Atlántida. estas cepas no amplificaron para alguna de las toxinas de STEC u otro factor de virulencia de los demás patotipos.

Anteriormente, en la descripción de la muestra se mencionó la distribución del tipo de estos quesos, siendo el tipo semiseco el que representó el 86 % (n=41) de las muestras, seguido de queso seco con 8 % (n=4) y queso fresco con 6 % (n=3). En cuanto a la proveniencia de las muestras, corresponden a las zonas productoras de acuerdo a la distribución de la Secretaria de Agricultura y Ganadería (SAG). La zona centro oriental representó el 90 % (n=43) de los quesos analizados; los aislamientos fueron divididos de la siguiente manera: El Paraíso representó el 23 % (n=11), Olancho 17 % (n=8), Atlántida el 10 % (n=5) y Yoro un 40 % (n=19). La región Occidental representada por el departamento de Ocotepeque con un 4 % (n=2). La región sur del país solamente esta representa por un 6 % existiendo tres aislamientos del departamento de Valle.

Para crear un análisis completo y recuperar la mayor información posible de estas cepas se analizó la distribución de patotipos en el país de acuerdo al origen departamental de cada una de ellas, y el tipo de queso del cual fueron obtenidas. El siguiente mapa (Figura 4) muestra la distribución de patotipos de quesos artesanales con sus serotipos.

Figura 4. Mapa de distribución espacial de patotipos de E. coli en quesos artesanales por departamento.



Fuente propia

Los resultados positivos se distribuyeron según el patotipo y en orden descendente (el patotipo con mayor frecuencia por departamento se menciona primero). Se describe el serotipo de la cepa que amplificó para los distintos factores, seguido de su grupo filogenético y entre paréntesis la frecuencia absoluta de cada serotipo. Destacando en color rojo aquellos serotipos comunes entre departamentos y en azul se destaca los resultados positivos del total de aislamientos por departamento. Las abreviaciones SS (queso semiseco) y QF (queso fresco) describe el tipo de queso donde se obtuvieron las cepas.

Se observó que, en ambas regiones, ETEC está presente en distinta proporción en cada departamento. El serotipo O40:H4 se encuentra en Yoro y El Paraíso como dos patotipos distintos a-EPEC y ETEC. Se pudo observar también que el serotipo O6: H? se encuentra como t-EPEC en el mismo grupo B1, pero en departamentos totalmente alejados uno de otro (Ocotepeque y Olancho), y adicionalmente en dos distintos tipos de quesos ya que las del departamento de Ocotepeque son de queso fresco. El serotipo O159:H21 y O159: H? se encuentra como ETEC en Olancho y El Paraíso y en el mismo grupo filogenético B1, pero se encontró como a-EPEC en Yoro. Las variantes de este serogrupo O159:H12 y O159:H11 se encuentran ambas en el patotipo ETEC en los departamentos de Yoro y Atlántida y sus grupos filogenéticos son distintos (U, D).

DISCUSIÓN

La serología es una herramienta empleada particularmente en laboratorios de referencia, ya que las posibilidades de someter cada cepa a 187 antisueros somáticos y a 56 flagelares, son muy pocas, por lo cual en la mayoría de los casos se recurre localmente a antisueros específicos para casos particulares tales como O157:H7, que es un patógeno reconocido en los últimos años por su impacto en salud pública por causar el Síndrome Urémico Hemolítico. En nuestro caso, la serología sirvió como una prueba orientadora para agrupar las cepas en patotipos según el resultado de la serología y, de esta manera someterlas a las pruebas moleculares correspondientes. La oportunidad de poder realizar la serología nos permitió conocer los serotipos circulantes en Honduras. No se encontró un estudio referente en el país donde la serología de *E. coli* se haya realizado con tanto detalle. Los resultados de serología además de brindar orientación para la realización de las pruebas moleculares, sirvió para informarnos acerca de los serotipos comunes en los distintos ambientes y departamentos en caso de las cepas de quesos artesanales. Al combinar toda la información de factores de patogenicidad y filogenia de las cepas con su serotipo vemos si estos se presentan en los distintos ambientes como cepas patógenas o como cepas que aún no adquieren estos factores y su relación filogenética.

Podemos considerar que clasificar en serotipos las cepas de *E. coli*, orienta la búsqueda de factores de virulencia pero que el diagnóstico molecular es indispensable para clasificar las cepas en los distintos grupos patógenos y que aún hay mucho por estudiar para comprender un patógeno tan ubicuo.

Al comparar los porcentajes obtenidos en nuestro estudio, con reportes publicados en 2017 por Torres, en general en América Latina los aislamientos más frecuentes en muestras humanas corresponden al patotipo ETEC [Torres, 2017].

Existen ambos (EPEC y ETEC) patotipos en cepas provenientes de quesos artesanales. Se debe resaltar que algunas cepas clasificadas como ETEC presentan factores de colonización; los cuales permiten al patógeno adherirse a superficies tal como las paredes del enterocito donde este causa efecto patológico.

El serotipo O159:H21 fue descrito por primera vez por Blanco en 1992[Blanco, 1992], aislado durante 1983 en un pequeño brote de diarrea en infantes de distintos hospitales de España, albergando solamente la toxina termolábil. Este serotipo y sus variantes (O159:H4, O159:H-) se ha considerado típico de ETEC, se ha reportado en Egipto como un serotipo que codifica una de dos toxinas, Lt+ o ST+ así como sucede en las cepas descritas en este estudio [Peruski, 1999]. En el presente informe este serotipo es clasificado como ambos EPEC y ETEC presentando factores de patogenicidad descritos para cada patotipo.

CONCLUSIONES

EPEC y ETEC son patotipos causantes de diarrea en diferentes grupos etarios y hospederos inmunocomprometidos. El hecho de encontrar factores de virulencia en cepas de origen alimentario es evidencia de que enfrentamos un potencial patógeno causante de ETAS.

Preguntas futuras

Si bien es cierto que se describe un solo fenómeno esto lleva a muchas preguntas a responder como ser: ¿Qué tan susceptible es la población a estos patotipos?, ¿Los grupos filogenéticos de estas cepas tienen un origen animal o humano?, Aunque solo se encontraron estos dos patotipos en una pequeña muestra y debido a él origen y reporte de otros patotipos ¿Existen otras regiones que presenten diferentes patotipos en otros alimentos? Claro está que las BPM deben ser implementadas y supervisadas rigurosamente, pero ¿De qué manera se podrían eliminar cepas patogénicas desde el origen de un producto?.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece al Instituto de Investigaciones en Microbiología de la Facultad de Ciencias de la UNAH y al Laboratorio de Patogénesis Bacteriana del Departamento de Salud Pública, Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México, que facilitaron el desarrollo de este trabajo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bekal, SB, Roland; Masson Luke; Prefontaine, Gabrielle; Fairbrother John; Harel, Josee. 2003. Rapid Identification of *Escherichia coli* pathotypes by virulence gene detection with DNA microarrays. *Journal of Clinical Microbiology* 41(5):21113-22125.
- C. Wenneras, VE. 2004. Prevalence of enterotoxigenic *Escherichia coli*-associated diarrhoea and carrier state in the developing world. *Journal Health of Population Nutrition* 22:370-382.
- Chattopadhyay, ST, Veronika; McVeigh, Annette; Kislela, Dagmara I, Dorl, Kathleen; Navarro, Armando; Sokurenko, Evgenl V.; Savarino, tephen J. 2012. Adaptive Evolution of Class 5 Fimbrial Genes in Enterotoxigenic *Escherichia coli* and Its Functional Consequences. *The Journal of Biological Chemistry* 287(9):6150-6158.
- Daniel, WW. 2002. *Bioestadística*. Base para el analisis de las ciencias de la salud. editores L, editor. Mexico.
- Dorsey; FC, F, J.F.; Flekenstein JM. 2006. Directed delivery of heat-labile enterotoxin by enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Cell Microbiology* 8(9):1516-1527.
- FAO. 2009. *Enfermedades transmitidas por alimentos y su impacto socioeconómico* Rosell C, editor. Roma: Organización de la Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación.
- Fleckenstein, JM. 2013. Enterotoxigenic *Escherichia coli*. In: Donnenberg MS, editor. *Escherichia coli* Pathotypes and Principles of pathogenesis. University of Maryland School of Medicine: Elsevier. p 183-201.
- Franke, JF, Sylvia; Schmidt, Herbert; Schwarzkopf, Andreas; Wiele, Lothar H.; Bajjer, Georg; Beutin, Lothar; Karch, Helge. 1994. Nucleotide Sequence Analysis of (EPEC) Adherence Factor Probe and Development of PCR for Rapid Detection of EPEC Harboring Virulence Plasmids. *Journal of Clinical Microbiology* 32(10):2460-2463.
- Gaytan, MM-S, Veronica; Soto, Eduardo; . 2016. Type Three Secretion System in Attaching and Effacing Pathogens. *Frontiers in cellular and infection Microbiology* 6(129).
- Gunzburg, tTT, Nadia G.; Riley, Lee W. 1995. Identification of Enteropathogenic *Escherichia coli* by PCR-based detection of the Bundle-Forming Pilus Gene. 33(5):1375-1377.
- Isabel C.A. Scaletsky, JSP, M.Z. Pedroso. 1999. Virulence properties of atypical EPEC strains. *Journal Of Medical Microbiology* 48:41-49.

- Islam, MAH, A.E.; Talukder, K.A.; Zwietering, M.A.; . 2006. Evaluation of Immunomagnetic separation and PCR for the detection of *Escherichia coli* O157 in animal feces and meats. *Journal of Food Protection* 69(12):2865-2869.
- James B. Kaper, JPN, Harry L.T. Mobley. 2004. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Microbiology Reviews* 2.
- Matthew A. Croxen, RJL, Roland Scholz. 2013. Recent Advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews* 26(4):822-880.
- Mazariego-Espinosa, KC, Ariadna; Ledesma, Maria A.; Ochoa, Sara A.; Xicohtencatl-Cortes, Juan. 2010. Longus, a Type IV pilus of Enterotoxigenic *Escherichia coli*, Is involved in adherence to intestinal epithelial cells *Journal of Bacteriology* 192(11):2791-2800.
- Montoya, TBD. 2015. Evaluacion de la calidad microbiologica de productos lacteos de seis departamentos de Honduras durante el periodo de enero a septiembre del 2015 [Academic]: Universidad Nacional Autonoma de Honduras. 86 p.
- Olivier Clermont, JC, Erick Denamur, David M. Gordon. 2013. The Clermont *Escherichia coli* Phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylo-groups. *Environmental Microbiology reports* 5(1):58-65.
- R. Boom, CJS, M.M.M. Salimans, C.L. Jansen. 1990. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *Journal of Clinical Microbiology* 28(3):495-503.
- Rodas, CI, Volga; Qadri, Firrausi; Wiklund, Gudrun; Svennerholm, Ann-Mari. 2009. Development of Multiplex PCR Assays for Detection of Enterotoxigenic *Escherichia coli* Colonization Factors and Toxins *Journal of Clinical Microbiology* 47(4):1218-1220.
- Schmidt, HPB. 1994. Differentiation in virulence patterns of *Escherichia coli* possessing *eae* genes. *Medical Microbiology and Immunology* 183:23-31.
- WHO. 1987. Manual for Laboratory investigations of acute enteric infections. World Health Organization-Programme for control of diarrheal diseases.