

Caracterización serológica de *Escherichia coli* en cepas de origen humano

Jeniffer D. Fiallos López¹

María de Lourdes Enríquez de Madrid²

Armando Navarro Ocaña³

RESUMEN

E. coli es una bacteria muy versátil, es un patógeno causante de diarreas, y una característica básica de este tipo de patógenos, es la presencia de los factores que le permiten su persistencia en el ambiente externo. Al ser *E. coli* un habitante del intestino de mamíferos, esta bacteria ha adquirido mecanismos para vivir en ambos ambientes: en el exterior y en el interior de un hospedero. El objetivo principal del estudio fue describir los distintos serotipos de *E. coli* en cepas de un estudio anterior que provenían de niños menores de 3 años con un cuadro diarreico. Se describieron 55 serotipos distintos en 86 cepas de *E. coli* provenientes de deposiciones de niños menores de 3 años que fueron casos de diarrea. Este es el primer estudio que describe serotipos tan variados de *E. coli* de origen humano. Los serotipos encontrados concuerdan mucho con los estudios conjuntos realizados en cepas ambientales de *E. coli* de origen hídrico y alimentos. Además de aportar al conocimiento sobre este patógeno, la importancia de esta información es el hecho de saber que serotipos podrían estar causando las diarreas infantiles.

Palabras clave: *serotipos, diarrea, E. coli.*

¹ Autora: Estudiante de la Maestría en Enfermedades Infecciosas y Zoonóticas, UNAH
fjenifferdenisse@yahoo.com

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

³ Asesor: Departamento de Salud Pública, Universidad Autónoma de México

ABSTRACT

E. coli is a very versatile bacterium, it is a pathogen that causes diarrhea, and a basic characteristic of this type of pathogen is the presence of the factors that allow it to persist in the external environment. Since *E. coli* is an inhabitant of the intestine of mammals, this bacterium has acquired mechanisms to live in both environments: outside and inside a host. The main objective of the study was to describe the different *E. coli* serotypes in strains from a previous study that came from children under 3 years of age, suffering with diarrhea. 55 different serotypes were described in 86 strains of *E. coli* from stools of children under 3 years of age, that were documented as cases of diarrhea. This is the first study to describe such varied serotypes of *E. coli* of human origin. The serotypes found are very consistent with the joint studies carried out on environmental strains of *E. coli* of water and food origin. In addition to contributing to the knowledge about this pathogen, the importance of this information is the fact of knowing which serotypes could be causing infantile diarrhea.

Keywords: serotypes, diarrhea, *E. coli*.

INTRODUCCIÓN

El género *Escherichia* fue nombrado por el pediatra profesor alemán Theodor Escherich, quien aisló esta bacteria en 1885 durante su investigación sobre la microbiota en las deposiciones de niños y neonatos, y fue denominada inicialmente como *Bacterium coli commune* (la bacteria común del colon). Sus hallazgos lo llevaron a concluir que *Escherichia coli* coloniza el intestino de los neonatos dentro de las primeras horas de nacimiento, un evento que probablemente ocurre durante el parto, ya que estas cepas son serológicamente idénticas a las que se encuentran en la madre [Escherich, 1989]. Esta bacteria seguirá colonizando el resto de la vida con cepas que vienen y van del organismo. Estas cepas no patógenas coexisten en armonía con el hospedero en una relación simbiótica [Gomes, 2016]. Son habitantes ampliamente distribuidas en el intestino humano y otros animales de sangre caliente, al grado de ser considerados como el anaerobio facultativo predominante en el intestino que participa en el mantenimiento del equilibrio de la microbiota [Stanford T. Shulman, 2007].

E. coli es una bacteria Gram negativa perteneciente a la familia Enterobacteriaceae, anaeróbica facultativa con un tipo de metabolismo respiratorio fermentativo, puede ser no móvil o móvil por flagelos peritricos, lactosa positiva, lisina descarboxilasa negativo e indol positivo. *E. coli* puede crecer en presencia y ausencia de oxígeno; bajo condiciones anaerobias crecerá por la vía de la fermentación, produciendo ácidos mixtos y gas como producto final. También es capaz de crecer mediante respiración anaeróbica, ya que es capaz de utilizar nitrato (NO₃), dióxido de nitrógeno (NO₂) o fumarato como aceptores finales de electrones en el proceso de transporte. Debido a lo anterior expuesto, *E. coli* tiene la capacidad de adaptarse a su hábitat del intestino (anaeróbico) y fuera del intestino (aeróbico) [Savageau, 1983].

El grupo de bacterias *E. coli* incluye cepas comensales y patógenas. Un antecesor común evolucionó a cepas patógenas debido a la adquisición de elementos génicos móviles como plásmidos o islas de patogenicidad, así como la integración de bacteriófagos y transposones [Sujay Chattopadhyay, 2013].

La población de cepas comensales constituyen un reservorio importante de donde las cepas patógenas emergen continuamente. La habilidad de *E. coli* de existir como un comensal adaptado al humano, combinado con su tendencia natural de intercambio genético, su presencia ubicua, y la variación genética en reservorios aun no caracterizados, contribuyen a la aparición de nuevas cepas patógenas con potencial de resis-

tencia a drogas antimicrobianas. Muchos estudios demuestran que cepas patógenas de *E. coli* han derivado de cepas comensales por la adquisición de loci extra e intracromosomales, mutaciones pato-adaptativas y deleciones genómicas que integran la expresión de las características de patogenicidad [Gordon, 2013].

Uno de los hábitats más colonizado es el intestino humano y de animales de sangre caliente, en el cual se reporta una densidad de 10¹² organismos por gramo de heces, característica por la cual *E. coli* es empleada como indicador de contaminación fecal. La detección y enumeración de coliformes es indicador de calidad sanitaria del agua, alimentos y en general como indicador de la condición sanitaria en el ambiente de proceso de alimentos [Kelly, 2009]. Monitorear los niveles de contaminación de *E. coli* es importante, ya que su presencia indica la posibilidad de existencia de bacterias patógenas, incluyendo aquellos grupos de *E. coli* que han adquirido mecanismos de patogenicidad [Michael P. Doyle, 2006].

REVISIÓN LITERARIA

Históricamente, *E. coli* se ha clasificado mediante serología de los antígenos somáticos O (compuesto de complejos fosfolípido-polisacárido) y H (Hauch, flagelares) descritos por primera vez por Kauffmann en 1944. Los antígenos O son estables al calor, activos por calentamiento a 100°C o 121°C. Muchas reacciones cruzadas entre los antígenos O de *E. coli* han sido reportadas, lo que indica que a pesar del hecho de que los cultivos pertenecientes a ciertos grupos de antígenos O reaccionan específicamente, existen fuertes relaciones de antígeno O recíproco y unilateral entre los grupos de antígeno O [I. Orskov, 1984]. Se describieron ciertas relaciones antigénicas ocurrentes dentro de un grupo O tales como una variedad "a", "b-a", "c" en la que la letra "a" representa el factor común responsable de la reactividad cruzada, mientras que los factores específicos son b y c, respectivamente. Las variaciones "a, a, a, a", "b" y "a-a", "c" han sido identificadas en varios serogrupos como O111a, b, O111 a, c y otras asociadas con enfermedad diarreica [I. Orskov, 1977]. Los antígenos O pueden sufrir variaciones de liso (S) O+ a rugoso (R) O-, debido a mutaciones en genes para la síntesis de las cadenas de polisacárido O específicos o el núcleo basal. Los antígenos O- (cepas rugosas que han perdido su especificidad antigénica) autoaglutinan en solución salina y por lo tanto no pueden ser serotipados por los procedimientos usuales en el laboratorio [Stenutz, 2006]. Los antígenos flagelares H representan distintos determinantes serológicos encontrados en la flagelina, la proteína que constituye el flagelo de los organismos móviles [Ribeiro Tiba, 2011]. La mayoría

de los antígenos de *E. coli* H son específicos y muestran poca o ninguna reactividad cruzada significativa. Como los antígenos H ocurren en asociación con cualquiera de los grupos de antígeno O, la determinación de antígenos H es sumamente importante junto con la determinación de antígenos O (serotipos O:H) como marcadores de patogenicidad de muchas cepas de *E. coli* en enfermedades diarreicas y extraintestinales. Existen más de 180 serogrupos O y 53 flagelares que generan 10,000 posibles combinaciones.

MÉTODOS Y TÉCNICAS

Descripción de la muestra

Las cepas derivan de una investigación que se llevó a cabo en el Hospital de Especialidades del Instituto Hondureño de Seguridad Social, en el Hospital Escuela Universitario y en el Centro de Salud Alonso Suazo. La población estudiada fueron niños menores de tres años de edad, que acudieron con cuadro de diarrea aguda a los centros mencionados.

Los autores del estudio definieron un cuadro de diarrea aguda como la ocurrencia de tres o más evacuaciones líquidas o semilíquidas en las últimas 2 horas y con menos de catorce días de duración. Las muestras se recolectaron durante los meses del 2010 a junio del 2011 y de febrero a abril del año 2012, comprendiendo tanto la estación seca como la húmeda [Espinoza, 2013].

En el año de 2016 se realizó un proyecto de reactivación de las cepas crio conservadas para verificar la viabilidad y pureza de los aislamientos de este proyecto, con el propósito de continuar su caracterización de acuerdo a los otros patotipos diarreogénicos de *E. coli*. De este proceso se recuperaron un total de 86 cepas las cuales tenían fecha de conservación del 2012.

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). El procedimiento de cada antígeno se describe a continuación.

Antígeno somático (O)

La clasificación del antígeno somático se obtuvo inoculando por estría cerrada las cepas en agar soya tripticasa (TSA) en tubo con pico de flauta, se incubó a 37°C durante 18-24 horas. Al crecimiento bacteriano se le agregó 10 ml de solución salina al 0.9%. La suspensión bacteriana se colocó a vapor fluyente (100°C) durante una hora. Después de la ebullición, se agregaron 10 mL de formalina al 0.6%.

En tres placas de 96 pozos en fondo en U se distribuyeron 50 uL de cada uno de los 187 antisueros diluidos 1:100 utilizando un dispensador automático (Dynatech Laboratories, Quick Spense Controller). Posteriormente se agregaron 50 mL del antígeno somático preparado y las placas se incubaron a 50 °C durante 18-24 h.

Se procedió a la lectura y registro de aglutinación cualitativa de cada una de las tres placas por cepa. Una vez registradas las aglutinaciones se procedió a realizar diluciones seriada al doble iniciando con una dilución de 1:100 y finalizando en 1:2800. Al agregar el antígeno se incubaron de nuevo a 50 °C durante 18-24 h. Posterior a la incubación se registran y se determinaron los títulos, que se consideró como la última dilución del suero a la cual se registró una reacción de aglutinación. Finalmente, se estableció el serogrupo comparando el título del suero determinado con el antígeno O del cultivo con el título contra el suero con su antígeno homólogo. En el caso que se presente dos títulos similares se realizó el ensayo descrito anteriormente donde se emplean anti-sueros específicos iniciando con una dilución de 1:50 hasta 1:6400.

Antígeno flagelar (H)

La clasificación del antígeno flagelar se obtuvo al inocular el cultivo por picadura en agar semisólido en tubos de Craigies, estos se incubaron a 30°C durante un máximo de tres semanas y se revisaron cada tres días, hasta observar el crecimiento bacteriano en la superficie del agar. Cabe señalar que, si las cepas no presentaron movilidad en el agar semisólido, se registraron como no móviles (H-).

Una vez desarrollado el flagelo del cultivo se tomó un inóculo del agar semisólido y se sembró en caldo biotriptasa al 2.0% para después incubarlos a 30 °C durante 18-24 h. Al final de la incubación se le agregaron al tubo con biotriptasa aproximadamente 10 mL de formalina al 0.6%. Al igual que en los antígenos somáticos, se distribuyen en las microplacas serológicas con fondo en U 50 mL de cada uno de los 53 sueros (1:100) contra antígenos H y se agregaron 50 mL de antígeno flagelar de cada cepa para después incubar a 50 °C por 2 horas.

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 los distintos serotipos se generaron las frecuencias absolutas utilizando el software Excel 2016 mediante estadística descriptiva [Daniel, 2002].

Consideraciones éticas

Desde el proyecto inicial en el cual se recolectaron las muestras diarreicas de origen humano, los aislamientos obtenidos fueron anonimizados, es decir que no tienen ninguna información que lo pueda ligar con el paciente del cual se obtuvo la muestra, lo que significa que el uso de las cepas recolectadas en el laboratorio Teasdale-Corti no conlleva conflictos éticos y de interés. No obstante, el protocolo se sometió a revisión y aprobación al Comité de Ética de Investigación de la MEIZ.

RESULTADOS

Los resultados de las 86 cepas de origen humano se muestran en la tabla 1. Estos se han dividido en serotipos, de acuerdo a los grupos filogenéticos (ya que se realizó en manera conjunta pero no se explica ya que la información relevante son los serotipos presentes) en que se encuentran y la frecuencia de cada uno.

El serotipo más frecuente en las cepas de origen humano es O?:H- (n=6) y este se encuentra en dos grupos filogenéticos (A, D). El serotipo O113:H10 (n=5) según literatura [Rodríguez-Angeles, 2002] pertenece al patotipo STEC, pero como se discutió previamente existen cepas híbridas que pueden transportar uno o más factores de virulencia. En el caso de que los serotipos estén dentro de este patotipo se realiza una distinción entre EPEC y STEC. Cabe resaltar que los serotipos representan los 5 patotipos productores de diarrea y están presentes en el país.

El grupo filogenético más frecuente es el A con 42 % (n=36), le sigue el grupo B1 con 24 % (n=21), D con 14 % (n=12), B2 con 12 % (n=10). Los grupos filogenéticos con menor frecuencia son E 3 % (n=3), C 2 % (n=2), F 1 % (n=1) y U 1% (n=1) de una cepa que no se pudo determinar su grupo filogenético.

Tabla 1. Serotipos de *E. coli* aislada de heces diarreicas en niños menores de tres años

Serotipo	N	Grupo	Serotipo	N	Grupo	Serotipo	N	Grupo
dys6:H26	1	A	dys15:H10	2	B1	O8:H9	1	C
O?:H-	5		O109:H21	1		O20:H1	1	
O?:H10	2		O113:H10	1		O?:H-	1	D
O?:H4	2		O150:H8	2		O1:H?	1	
O?:H9	1		O159:H21	1		O15:H18	1	
O101:H9	2		O173:H51	5		O166:H15	1	
O128ab:H-	1		O23:H25	1		O23:H25	1	
O16:H48	1		O8:H16	1		O44:H18	1	
O171:H10	1		O8:H19	3		O73:H18	2	
O176:H10	1		O8:H31	1		O86:H2	2	
O20:H?/H-	1		O88:H8	2		O86:H18	1	
O20:H30	3		OR:H27	1		O86:H34	1	
O20:H41	1		O100:H31	1		O44:H-	1	E
O27:H6	2		O2:H6	2		O154:H45	1	
O6:H10	1	O25:H4	3	O169:H41	1			
O60:H-	2	O6:H1	3	O20:H18	1	F		
O65:H32	3	O91:H21	1	O166:H15	1	U		
O76:H45	1							
O92:H10	2							
O92:H33	2							
OR:H33	1							
Total:	36			31			19	86

Elaboración: fuente propia

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. 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.

Previamente se mencionaron aquellos serotipos comunes en cada fuente y se resaltaron los comunes en todas las fuentes. 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 este mismo estudio se describe el serotipo O111ab como ETEC, de acuerdo a nuestros resultados este serotipo (O111ab) de clasificó como EPEC. Según el estudio de Timm, en 2006 [Timm, 2006] existen otras variantes de este serogrupo (O159:H42) albergando factores de STEC (stx2) en heces de ganado vacuno en Brasil. Recientemente, en el 2016 Baranzoni [Baranzoni, 2016], describió el serotipo O159:H- como otro serotipo de STEC, en este estudio el serotipo O159:H21 es negativo para ambas toxinas Shiga en cepas provenientes de ganado porcino donde este patotipo es de importancia epidemiológica. 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.

CONCLUSIONES

Este es el primer estudio que describe serotipos tan variados de *E. coli* de origen humano. Los serotipos encontrados concuerdan mucho con los estudios conjuntos realizados en cepas ambientales de *E. coli* de origen hídrico y alimentos. La importan-

cia de esta información, además de aportar al conocimiento sobre este patógeno, es el hecho de saber que serotipos podrían estar causando las diarreas infantiles. Lo que deja la pregunta a futuras investigaciones es ¿Cuántos de estos serotipos de *E. coli* están causando las patologías intestinales?

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

- Baranzoni, GMF, Pina M.; Gangiredla, Jayanthi; Patel, Isha.(2016). Characterization of Shiga Toxin Subtypes and Virulence Genes in Porcine Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli*. *Frontiers in Microbiology* 7(547).
- Blanco, JG, E.A.; Espinosa, P.; Blanco, M.; Garabal, J.I.; Alonso, M.P. (1992). Enterotoxigenic and necrotizing *escherichia coli* in human diarrhoea in Spain. *European Journal of Epidemiology* 8(4):548-552.
- Daniel, WW. (2002). Bioestadística. *Base para el análisis de las ciencias de la salud*. editores L, editor. Mexico.
- Escherich, T. (1989). The intestinal bacteria of the neonate and breast-fed infant. *Reviews on Clinical Infectious diseases*(11):352-356.
- Espinoza, JdC. (2013). Caracterización fenotípica y molecular de aislamientos clínicos de *Escherichia coli enterotoxigenica* (ETEC) y enteropatógena (EPEC) en muestras fecales de niños menores de tres años en centros de salud de Tegucigalpa y Comayagua; Honduras C.A. [Academic]. Honduras; C.A.: Universidad Nacional Autónoma de Honduras.
- Gomes, TATE, W.P.; Scaletsky, I.C.A.; Guth, B.E.C.; Piazza, R.M.F; Ferreira, L.C.; Martinez, M.B. 2016. *Diarrheagenic Escherichia coli*. *Brazilian Journal of Microbiology*. 47:3-30.
- Gordon, DM. 2013. *Escherichia coli* Pathotypes and Principles of pathogenesis. In: Donnenberg MS, editor. *The ecology of Escherichia coli*. University of Maryland School of Medicine: Elsevier.
- I. Orskov, FO. 1984. Serotyping of *Escherichia coli*. *Methods in Microbiology* 14.
- I. Orskov, FO, K. Jann 1977. Serology, chemistry, and genetics of O and K antigens of *Escherichia coli*. *Bacteriology Reviews* 41:667-710.

- Kelly, BGVABDJ. 2009. Horizontal gene transfer of virulence determinants in selected bacterial foodborne pathogens. *Food and Chemical Toxicology* 47:969-977.
- Michael P. Doyle, BRC. 2006. *Antimicrobial resistance: Implications for the Food System: Mechanisms for emergence and dissemination of antimicrobial resistance*. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety .
- Peruski, LFK, Bradford A.; . 1999. Phenotypic Diversity of Enterotoxigenic *Escherichia coli* Strains from a Community-Based Study of Pediatric Diarrhea in Periurban Egypt. *Journal of Clinical Microbiology* 37(9):974–2978.
- Ribeiro Tiba, MFC, Marcelo. 2011. Identification of putative new *Escherichia coli* flagellar antigens from human origin using serology, PCR-RFLP and DNA sequencing methods. *Brazilian Journal of Infectious Diseases* 15(2):144-150.
- Rodriguez-Angeles, G. 2002. Diagnosis and main characteristics of *Escherichia coli* pathogenic groups. *Salud Publica Mexico*. 44:464-475.
- Savageau, MA. 1983. *Escherichia coli* habitats, cell types, and molecular mechanisms of gene control. *Nature* (46):732-744.
- Stanford T. Shulman, HCF, Ronald H Simis. 2007. *Theodor Escherich: The first pediatric infectious diseases physician* Infectious Diseases Society of America.
- Stenutz, RW, Andrej. 2006. The structures of *Escherichia coli* O-polysaccharide antigens. *Federation of European Microbiological Societies* (30):382-403.
- Sujay Chattopadhyay, EVS. 2013. *Escherichia coli* Pathotypes and Principles of pathogenesis. In: Donnenberg MS, editor. *Evolution of pathogenic Escherichia coli*. p 45-71.
- Timm, CDI, K.; Gomes, T.A.T; Vieira, M.M.; Guth, B.E.C; . 2006. Virulence markers and serotypes of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*, isolated from cattle in Rio Grande do Sul, Brazil. *Letters in Applied Microbiology*. 44:419-425.