

Caracterización molecular y serológica de *Escherichia coli* de origen hídrico de dos zonas geográficas de Honduras

Jeniffer D. Fiallos López ¹

María de Lourdes Enríquez de Madrid ²

Armando Navarro Ocaña ³

RESUMEN

Un estudio publicado en el año 2016 por parte de la escuela de Biología sobre la variación espacial y temporal de la diversidad y abundancia del fitoplancton del Lago de Yojoa en un año hidrológico 2014-2015 tuvo una parte alterna donde se evaluó la calidad microbiológica de las muestras de agua obtenidas del mismo. Los análisis de agua confirmaron la presencia de coliformes fecales con crecimiento a 44°C. El objetivo principal fue clasificar molecularmente los patotipos y grupos filogenéticos de *E. coli* de cepas obtenidas a partir de muestras de fuentes de agua. 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. Un total de 32 cepas fueron analizadas. El 47 % (n=15) fueron cepas obtenidas de un estudio de aguas en Francisco Morazán (se unieron al estudio debido a su origen hídrico). El 53 % (n=17) corresponden a las cepas obtenidas del Lago de Yojoa. La filogenia de estas cepas es variada ya que se lograron ubicar en 7 de 8 grupos filogenéticos de los cuales se puede discriminar mediante la técnica utilizada. Del total de cepas analizadas un 75 % (n=24) amplificó para distintos factores de virulencia. El 50 % (n=16) lo representa las cepas originarias del Lago de Yojoa y el 25 % (n=8) las cepas de Francisco Morazán. El 63 % (n=15) corresponde al patotipo EPEC, el cual se divide de la siguiente manera: 17 % (n=4) corresponde a EPEC atípicas y el 46 % (n=11) a EPEC típicas. Existen serotipos comunes en ambas fuentes hídricas además de cepas productoras de toxinas. La existencia de un patotipo enteroagregativo de *E. coli* que por primera vez se registra en Honduras y tiene la capacidad de la creación de biofilms en superficies acuáticas. La existencia de cepas que albergan factores de virulencia en ambientes acuáticos es un hecho que puede ser un potencial problema de salud pública en aquellas

¹ Autor, Estudiante de la Maestría en Enfermedades Infecciosas y Zoonóticas, UNAH

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

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

poblaciones vulnerables y expuestas a estas fuentes hídricas. Se debe indagar más acerca del hecho que estas cepas son o no potenciales patógenos para el humano o benéficos para el ambiente y nicho ecológico en el que se encuentran.

Palabras clave: *Calidad de agua, filogenia, patotipos.*

ABSTRACT

A study published in 2016 by the school of Biology on the spatial and temporal variation of the diversity and abundance of the phytoplankton of Lake Yojoa in a hydrological year 2014-2015 had an alternate part where the microbiological quality of the water samples were obtained from it. Water analysis confirmed the presence of fecal coliforms with growth at 44 ° C. The main objective was to classify molecularly the pathotypes and phylogenetic groups of *E. coli* from strains obtained from samples of water sources. 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 32 strains were analyzed. 47% (n = 15) were strains obtained from a water study in Francisco Morazán (they joined the study due to its water source). 53% (n = 17) corresponds to the strains obtained from Lake Yojoa. The phylogeny of these strains is varied since they were able to locate in 7 of 8 phylogenetic groups of which can be discriminated by the technique used. Of the total of strains analyzed, 75% (n = 24) amplified for different virulence factors. 50% (n = 16) represents the original strains of Lake Yojoa and 25% (n = 8) the strains of Francisco Morazán. 63% (n = 15) corresponds to the EPEC pathotype, which is divided as follows: 17% (n = 4) corresponds to atypical EPEC and 46% (n = 11) to typical EPEC. There are common serotypes in both water sources as well as toxin-producing strains. The existence of an enteroagregative pathotype of *E. coli* that for the first time is registered in Honduras and has the capacity to create biofilms on aquatic surfaces. The existence of strains that harbor virulence factors in aquatic environments is a fact that can be a potential public health problem in vulnerable populations exposed to these water sources. More must be inquired about the fact that these strains are or are not potential pathogens for the human or beneficial for the environment and ecological niche in which they are found.

Keywords: *Water quality, phylogeny, pathotypes.*

INTRODUCCIÓN

La calidad del agua se refiere a las características químicas, físicas o biológicas del agua. La calidad del agua es una medida de la condición del agua en relación con su impacto en una o más especies acuáticas como peces y ranas o en usos humanos, ya sea para consumo o uso recreativo. Los estándares más comunes que se utilizan para evaluar la calidad del agua se relacionan con la salud de los ecosistemas, la seguridad del contacto humano y el agua potable. La presencia de *E. coli* en el agua es una fuerte indicación de una reciente contaminación de aguas residuales o contaminación de residuos animales. Las fuentes de contaminación fecales de humanos y animales representan un grave riesgo para la salud debido a la alta probabilidad de la existencia de agentes patógenos. El ganado vacuno, cerdos y gallinas pueden acarrear patógenos causantes de enfermedades transmisibles al humano. Existen 6 variantes patogénicas de *E. coli* (conocidos como patotipos) que pueden causar diarrea y reciben su nombre por el tipo de lesiones histopatológicas en los enterocitos. Para fines prácticos solamente se describen tres variantes patogénicas que se encontraron en fuentes acuáticas en el país.

REVISIÓN LITERARIA

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

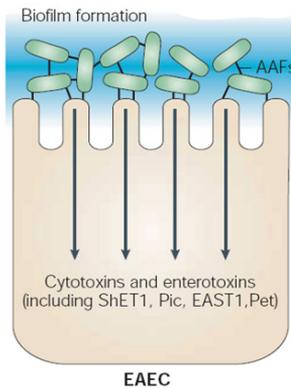
EAEC es un patotipo definido como *E. coli* que no secreta las toxinas termolábiles y termoestables de ETEC y manifiesta característica de adherencia agregativa (AA) en cultivos de células HEp-2, siendo éste el estándar de oro para su diagnóstico. EAEC es poco entendida epidemiológicamente y no existe evidencia de un reservorio animal para esta bacteria, pero se han descrito brotes asociados a alimentos y agua contaminada [N. Boisen, 2012].

Las diferencias entre cepas patógenas de EAEC de las que no lo son, se desconocen en su totalidad, pero estudios recientes de patogénesis han sugerido tres estados generales de infección: 1) adherencia a la mucosa intestinal por virtud de una fimbria de adherencia agregativa (AAF-aggregative adherence fimbriae, en inglés) y otros factores de virulencia; 2) estimulación de la producción de moco, formando un biofilm o biopelícula en la superficie de la mucosa intestinal; y 3) toxicidad a la mucosa, manifestada por la liberación de citoquinas, exfoliación celular, secreción

intestinal e inducción de inflamación en la mucosa [N. Boisen, 2012]. En la figura 7 se ilustra el efecto citopatológico de EAEC.

El factor de virulencia más estudiado de EAEC es AggR; éste es un regulón que controla la expresión de factores de adherencia, una proteína de capa superficial y un largo grupo de genes codificados en el cromosoma de EAEC. AggR es el regulador maestro de los genes de virulencia incluyendo AAF, los cuales son la principal adhesión a la mucosa [Nadia Boisen, 2013].

Figura 1. Patogénesis EAEC



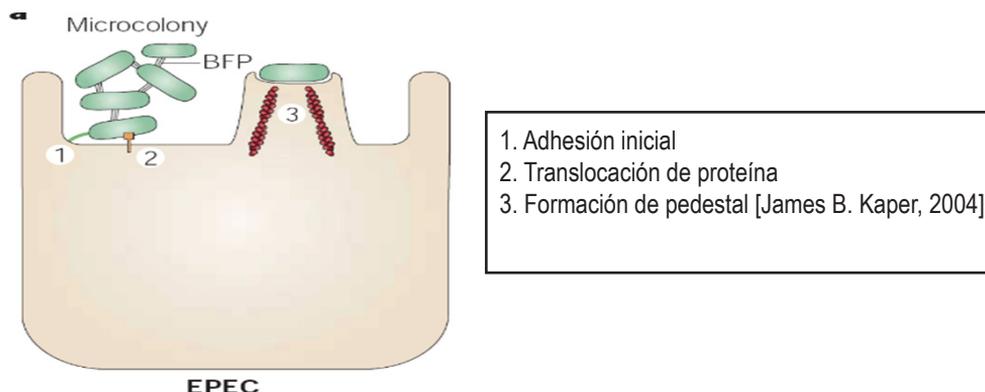
Tomado de: [James B. Kaper, 2004]. EAEC se adhiere al epitelio del intestino grueso y delgado en un biofilm grueso y elabora enterotoxinas secretoras y citotoxinas.

***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 10^8 a 10^{10} 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 2. Patogénesis EPEC

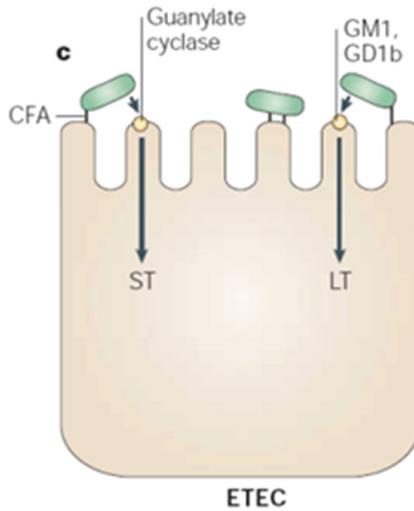


Tomado de: [James B. Kaper, 2004]. EPEC se adhiere a los enterocitos, pero destruye la arquitectura normal de las microvellosidades, induciendo las lesiones características de adhesión y esfacelamiento. El re-arreglo del citoesqueleto está acompañado de respuesta inflamatoria y diarrea.

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 3. Patogénesis ETEC.



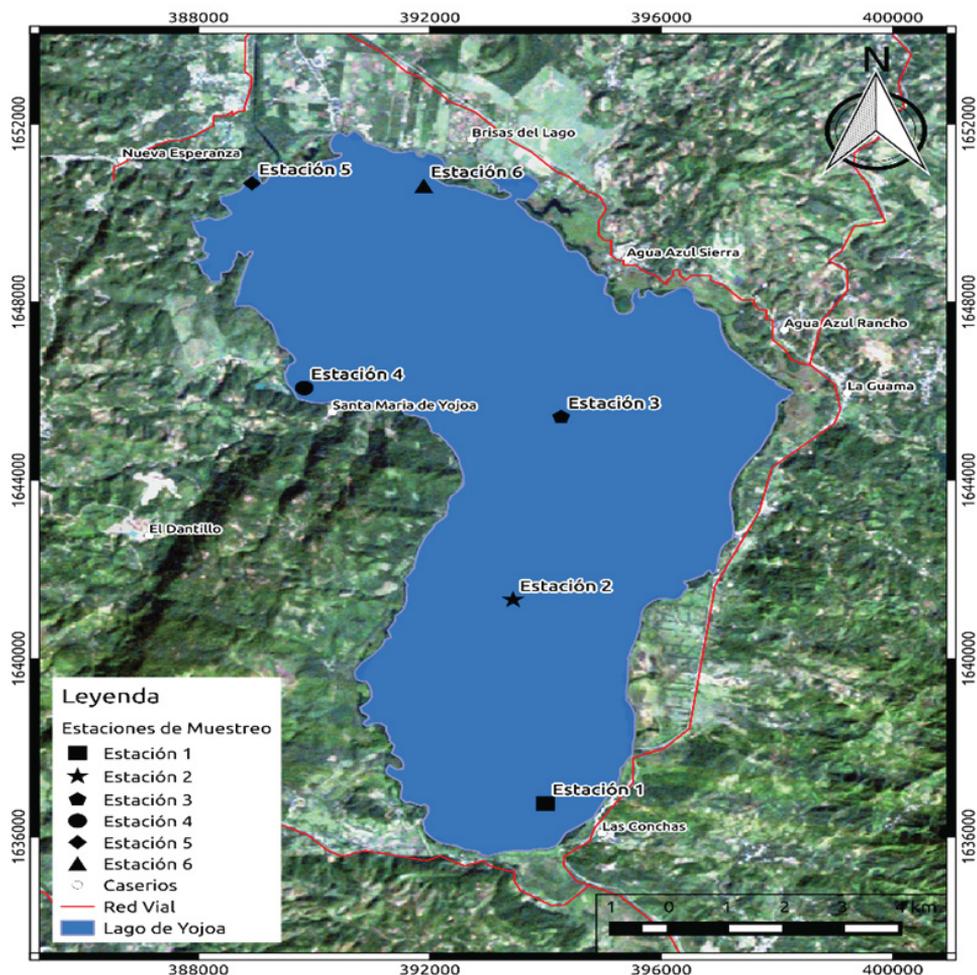
Tomado de: [James B. Kaper, 2004]. ETEC se adhiere a los enterocitos e induce diarrea acuosa por la secreción de toxinas termo lábiles y/o termo estables.

MÉTODOS Y TÉCNICAS

Se analizaron 32 cepas provenientes de diferentes fuentes hídricas: 15 cepas de un proyecto sobre la calidad bacteriológica del agua en diferentes sistemas de abastecimiento del departamento de Francisco Morazán en el año 2012; realizado en colaboración con el Instituto Hondureño de Ciencias de la Tierra-UNAH, a partir de aguas superficiales y subterráneas. Las 17 cepas restantes se obtuvieron del estudio “Variación estacional de la diversidad y abundancia del fitoplancton con énfasis en cianobacterias tóxicas en el lago de Yojoa durante el año 2015”. El objetivo de ambos estudios fue evaluar la calidad bacteriológica de esas fuentes de agua en función de los usos a los que se destina, mediante la determinación de los coliformes totales y fecales en cada punto de muestreo.

En el segundo estudio, correspondiente al Lago de Yojoa, se realizaron 6 jornadas bimensuales durante un año entre 2014 y 2015, que resultaron en tres muestreos en época seca y tres en época lluviosa. Se ubicaron seis estaciones de muestreo las cuales se identifican en el siguiente mapa

Figura 4. Mapa del lago de Yojoa con las estaciones de monitoreo, mayo de 2014 a marzo de 2015



Tomado de: [Hernández Oviedo, 2016]

Recolección de datos

Las fuentes primarias del estudio fueron las cepas de *E. coli* de la colección 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 fuentes hídricas para poder proceder a los demás procesos en los laboratorios. Como este fue un proyecto colaborativo, se analizaron las muestras en varios laboratorios, 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) se realizaron 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, 2006].

Amplificación de genes mediante Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Se realizaron 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, EAEC (esto debido a los serotipos que presentaron las cepas de origen hídrico). 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*, *AggR* (activador transcripcional de AAFs de EAEC), *lt*, *stx* y *stx2* (enterotoxinas de ETEC). Los iniciadores, secuencias y cepas de referencia empleados se describen en la Tabla 1.

PCR para identificación de 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].

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	CCCGAATTCGGCACAGCATAAGC	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	TCTTTCCCCTCTTTAGTCAG	166	[Rodas, 2009]	
	Stp-R	ACAGGCAGGATTACAACAAAG			
<i>Sth</i>	Sth-F	CTTTCTGTATTATCTTTTTACCTTT	181	[Chattopadhyay, 2012]	H-10407
	Sth-R	CACCCGGTACAAGCAGGATTAC			
<i>Cfa</i>	CFAI-F	GGTGCAATGGCTCTGACCACA	479	[Bekal, 2003]	H-10407 115365
	CFAI-R	GTCATTACAAGAGATACTACT			
<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 ^a 115362
	CS21-R	TTAACGGCTACCTAAAGTAATTGAGTT			
<i>AggR</i>	aggR-F	CTAATTGTACAATCGATGTA	308	[Czeczulin, 1999]	49766
	AggR-R	ATGAAGTAATTCTTGAAT			

Tabla 2. Iniciadores utilizados en PCR cuádruplex para identificación de grupos filogenéticos

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	AGTTTTATGCCAGTGCAG	219		
	ArpAgpC-R	TCTGCGCCGGTACGCCC			
<i>trpA**</i>	TrpBA-F	CGGCGATAAAGACATCTTAC	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

Calidad microbiológica del Lago de Yojoa

Utilizando un sistema de registro obtenido de cada cepa se logró tener más información de las cepas provenientes del Lago de Yojoa. El procedimiento microbiológico utilizado para determinar la presencia de coliformes totales y fecales es el derivado del Standard methods. Los resultados de este análisis microbiológico de agua se muestran en la tabla 3. Anteriormente se mencionaba que los coliformes son mesofílicos cuya característica les permite tener crecimiento en temperaturas distintas. El total de cepas recolectadas en el Lago de Yojoa fueron coliformes fecales teniendo un crecimiento a 44°C, aunque cada una de ellas tuvo un conteo de coliformes totales distintos. En caso de la obtención de las muestras de agua, no se realizó un sexto muestro por lo cual no hubo cepas del mismo. Los resultados de las 32 cepas de origen hídrico se muestran en la tabla 4. Estos se han dividido en serotipos, de acuerdo a los grupos filogenéticos en que se encuentran y la frecuencia de cada uno.

Un total de 32 cepas fueron analizadas. El 47 % (n=15) fueron cepas obtenidas de un estudio de aguas en Francisco Morazán. El 53 % (n=17) corresponde a las cepas obtenidas del Lago de Yojoa. La filogenia de estas cepas es variada ya que se lograron ubicar en 7 de 8 grupos filogenéticos de los cuales se puede discriminar mediante la técnica utilizada. El serotipo O3:H7 y O3:H2 se ubican en clado 1 o 2. Se denota otra limitación de esta técnica ya que una cepa que presenta esta clasificación (arpA-, chuA-, yjaA+, TspE-) no se puede diferenciar en cada uno de los clados sea este 1 o 2 u otro clado. Los grupos A y B representó el 63 % (n=20), teniendo cada uno el 31 % (n=10) del total de cepas. El 25 % (n=8) lo representó los grupos B2, D, clado 1 o 2 y U; cada uno con el 6 % (n=2) del total de cepas analizadas. El grupo E representa el 9 % (n=3) y el grupo C el 3 % (n=1).

Tabla 3. Resultados de calidad microbiológica de cepas de Lago de Yojoa

			Coliformes totales	Coliformes fecales
Código de cepa	Muestreo	Estación	Recuento a 37°C	Crecimiento a 44°C
CA-2	I/30-5-14	2	22 UFC/100ml	+
CA-3	I/30-5-14	3	10UFC/100ml	+
CA-4	I/30-5-14	4	10UFC/100ml	+
CA-7	II/12-7-14	1	10UFC/100ml	+
CA-9	II/12-7-14	3	10UFC/100ml	+
CA-12	II/12-7-14	6	10UFC/100ml	+
CA-13	III/27-9-14	1	1600UFC/100ml	+
CA-16	III/27-9-14	4	4000ufc/100ml	+
CA-17	III/27-9-14	5	25000UFC/100ml	+
CA-18	III/27-9-14	6	8000UFC/100ml	+
CA-19	IV/1-11-14	1	incontables/100ml	+
CA-22	IV/1-11-14	4	770UFC/100ml	+
CA-23	IV/1-11-14	5	110UFC/100ml	+
CA-24	IV/1-11-14	6	230UFC/100ml	+
CA-25	V/24-1-15	1	12UFC/100ml	+
CA-26	V/24-1-15	3	3UFC/100ml	+
CA-27	V/24-1-15	4	1UFC/100ml	+

Tabla 4. Serotipos de *E. coli* aislada de fuentes de agua.

Serotipo	N	Grupo
O111ab:H-	1	A
O184:H11	1	
O3:H2	1	
O40:H-	1	
O40:H10	1	
O6:H16	4	
O9:H10	1	
O111ab:H-	5	B1
O111ab:H2	1	
O159:H21	1	
O175:H28	2	
O40:H10	1	
O127:H6	2	B2
O8:H9	1	C
O129:H15	1	D
O159:H21	1	
O38:H39	2	E
O129:H15	1	
O128ab:H2	2	U
O3:H2	1	CLADO 1 O 2
O3:H?	1	
TOTAL	32	

Los serotipos frecuentes son O111ab con un 22 % (n=7), con sus variantes no móviles y una cepa con antígeno flagelar H2; estos se ubican en los grupos A y B1 pertenecientes al patotipo EPEC en la literatura. El segundo serotipo más frecuente es el O6:H16 con un 13 % (n=4) perteneciente al grupo A y representante del patotipo ETEC. En tercer lugar, el serotipo O3 y su variante no móvil representó el 9 % (n=3), estos se encuentran en grupo A y Clado 1 o 2, este serotipo se ha reportado como miembro del patotipo EAEC. Los resultados de patogenicidad de estas cepas de fuentes de agua se describen a continuación en la tabla 5. En la gráfica 3 se muestran los grupos filogenéticos de acuerdo a las cepas que contenían factores de los distintos patotipos.

En el Lago de Yojoa se encontraron 7 serotipos distintos representativos de EPEC y ETEC. Los serogrupos encontrados fueron O111ab con sus variantes flagelares H-, H2; serogrupo O6, O8, O159. La importancia de identificar serotipos en el ambiente es saber cuales están presentes para luego rastrearlos en posteriores investigaciones para luego saber si estos tienen importancia clínica en la población donde se aislaron.

Tabla 5. Resultados de factores de virulencia en cepas de origen hídrico

Serotipo	N	Grupo	Patotipo	Gen
O111ab:H-	1	A	a-EPEC	<i>eae+</i>
O159:H21	1	B1		
O127:H6	1	B2		
O129:H15	1	D		
O9:H10	1	A	t-EPEC	<i>eae+,bfp+</i>
O40:H10	1			
O127:H6	1	B2		
O111ab:H-	5	B1		EPEC
O111ab:H2	1			
O128ab:H2	2	U		
O6:H16	4	A	ETEC	
O8:H9	1	C		<i>lt+,sth+,cs21+</i>
O159:H21	1	D		<i>lt+,sth+</i>
O3:H2	1	A	EAEC	<i>aggR+</i>
O3:H2	1	CLADO 1 O 2		
O3:H?	1	CLADO 1 O 2		
Total	24			

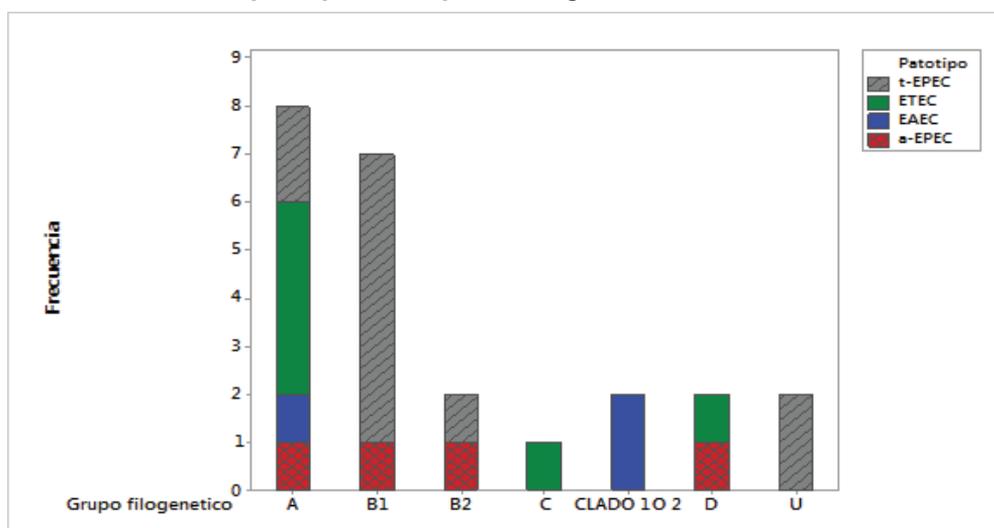
Del total de cepas analizadas un 75 % (n=24) amplificó para distintos factores de virulencia. El 50 % (n=16) lo representa las cepas originarias del Lago de Yojoa y el 25 % (n=8) las cepas de Francisco Morazán. El 63 % (n=15) corresponde al patotipo EPEC, el cual se divide de la siguiente manera: 17 % (n=4) corresponde a EPEC atípicas y el 46 % (n=11) a EPEC típicas.

En esta fuente se resalta el hecho de que la mayoría de cepas típicas de EPEC amplificaron para el factor de adherencia de EPEC (*eaf+*). El siguiente patotipo representado es ETEC el cual con un 25 % (n=6) está presente en aguas de los dos puntos

geográficos. En ETEC se destaca que en esta fuente todas presentaron ambas toxinas, y la mayoría de las cepas presentaron los factores de colonización principales como cfa (4 cepas) y los antígenos de superficie CS1, CS21 y CS3. En última instancia se encuentra EAEC con un 13 % (n=3), el cual se encuentra en ambas localidades.

En la siguiente grafica podemos ver la distribución de los tres patotipos encontrados en cada uno de los siete grupos filogenéticos encontrados.

Gráfica 1. Frecuencia de grupos filogenéticos de acuerdo a frecuencia de los distintos patotipos en cepas de origen hídrico.



En cuanto a la filogenia de las cepas que presentaron factores de virulencia, el 33% (n=8) está representado por los grupos B2, D, clado 1 o 2, y U con 2 cepas en cada grupo. El otro 33% (n=8) está representado por el grupo A y el 29% (n=7) lo representa el grupo B1. El grupo filogenético con menor frecuencia es el C con el 4% (n=1).

Los serotipos a destacar en esta fuente son O111ab:H-, el cual es uno de los más frecuentes (6 cepas) y estos se encuentran en dos grupos filogenéticos (A, B1) y su otra variante de serotipo O111ab:H2 en el grupo B1. Las cepas de este serotipo se encuentran el patotipo EPEC, pero difieren en típicas y atípicas.

El serotipo O40:H10, fue identificado en dos cepas una de ellas presentó factores de

virulencia coincidentes con el patotipo EPEC típico del grupo filogenético A y la otra que no presentó factores de virulencia se ubicó en el grupo filogenético B1.

Las dos cepas del serotipo O128ab:H2 originarias del Lago de Yojoa, las cuales no se diferenciaron en un grupo filogenético (U), se destacaron como miembros de EPEC típicas. El serotipo O3:H2 y sus variantes no móviles mencionadas anteriormente concuerda con el patotipo EAEC, pero aquí se diferencian en grupo filogenético ya que están en grupo A y clado 1 o 2. La localidad de EAEC es Francisco Morazán.

Un serotipo notorio es O159:H21 el cual se presentó como una EPEC atípica del grupo B1 localizada en Francisco Morazán. La segunda cepa con el serotipo O159:H21 es una ETEC del grupo D localizada en el Lago de Yojoa, se destaca que presenta ambas LT+/STH+.

Lamentablemente se desconocen algunos datos de origen (localidad y si las aguas eran subterráneas o superficiales) de las cepas provenientes de Francisco Morazán y no se puede crear una distribución ilustrativa de aquellas cepas positivas y sus patotipos, al contrario que las cepas del Lago de Yojoa, de las cuales se puede crear una distribución de acuerdo a muestreo, estación y época del año. A continuación, se muestra la distribución de patotipos por estación y época del año (Figura 5). Se toman en cuenta solamente 5 muestreos ya que del sexto muestreo no se obtuvieron cepas.

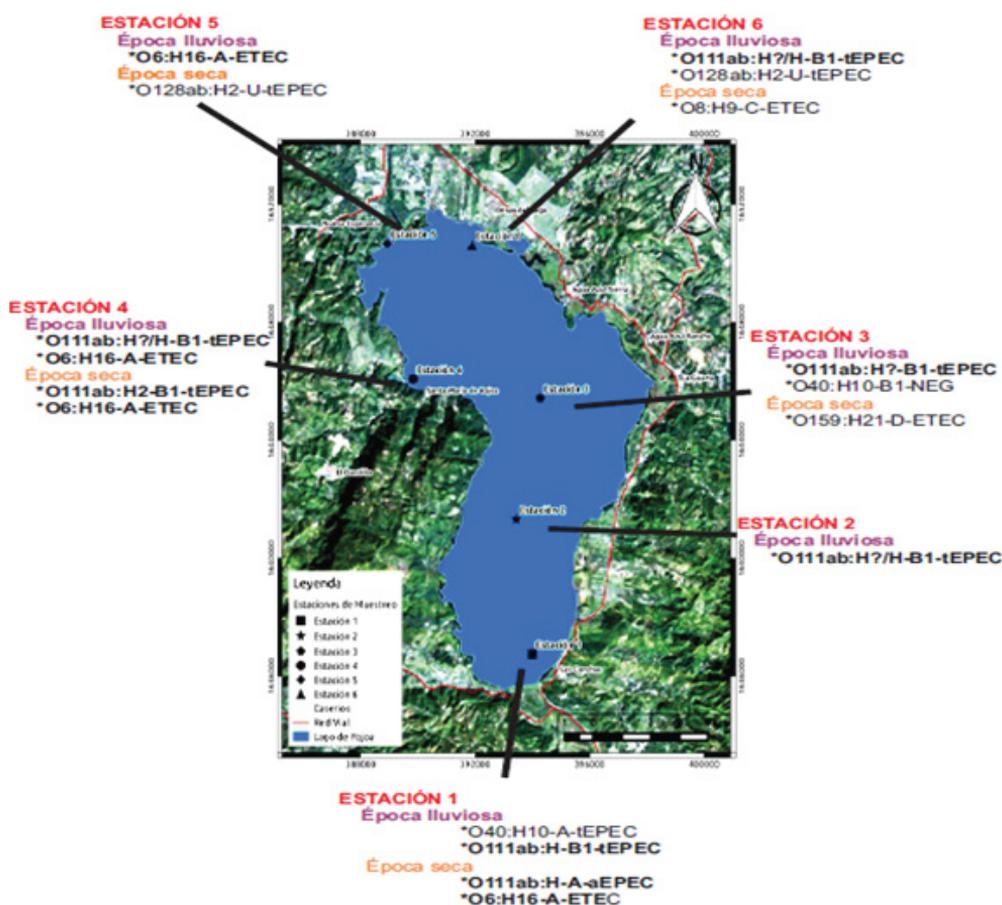
Durante la época lluviosa se obtuvieron 10 cepas de las cuales 7 corresponden a EPEC típicas, 2 cepas a ETEC y 1 fue negativa. En época seca se obtuvieron 7 cepas de las cuales 3 se distinguieron como EPEC (1 a-EPEC y 2 t-EPEC) y 4 como ETEC. Se observó que ambos patotipos están en ambas estaciones en distintas proporciones. En época lluviosa EPEC es más frecuente y ETEC lo es en época seca. Se puede observar que el serogrupo O111ab se encuentra en 5 de 6 estaciones y en las dos épocas del año como EPEC típicas y atípicas. Así como lo muestra la siguiente grafica se cumple la estacionalidad de ambos patotipos donde EPEC (sean típicas o atípicas) está en ambas épocas y ETEC en época seca o inicio de la misma. Se debe resaltar que, aunque no se asocia con la temperaturas (superficiales y ambientales) obtenida por Oviedo y colaboradores; la diferencia entre épocas y patotipos se evidencia.

El serotipo O6:H16 representante del patotipo ETEC se encuentra en las estaciones 1, 4 y 5. El comportamiento de O6:H16 es notable ya que en época lluviosa se observa en estación 5; ambas épocas del año en la estación 4, y época seca en la estación 1. El serotipo O40:H10 se observó en época lluviosa en las estaciones 1 y 3 pero

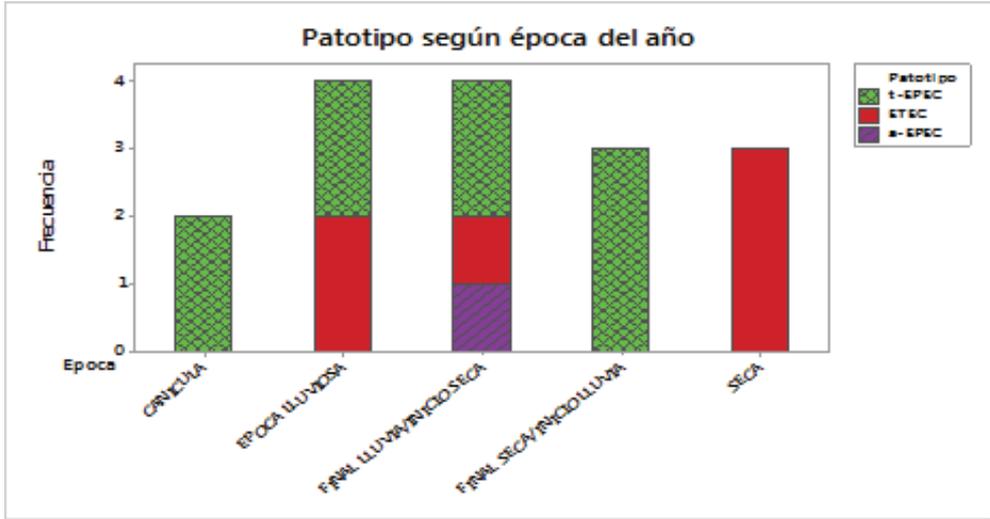
como ya se había mencionado anteriormente tiene diferente filogenia y uno de ellos se encuentra negativo para EPEC.

En cuanto a la filogenia de las 17 cepas del Lago de Yojoa se observa que el grupo filogenético B1 es el más frecuente. En la siguiente grafica se muestra la frecuencia absoluta de cada cepa junto a su patotipo y su distribución en los cinco grupos encontrados.

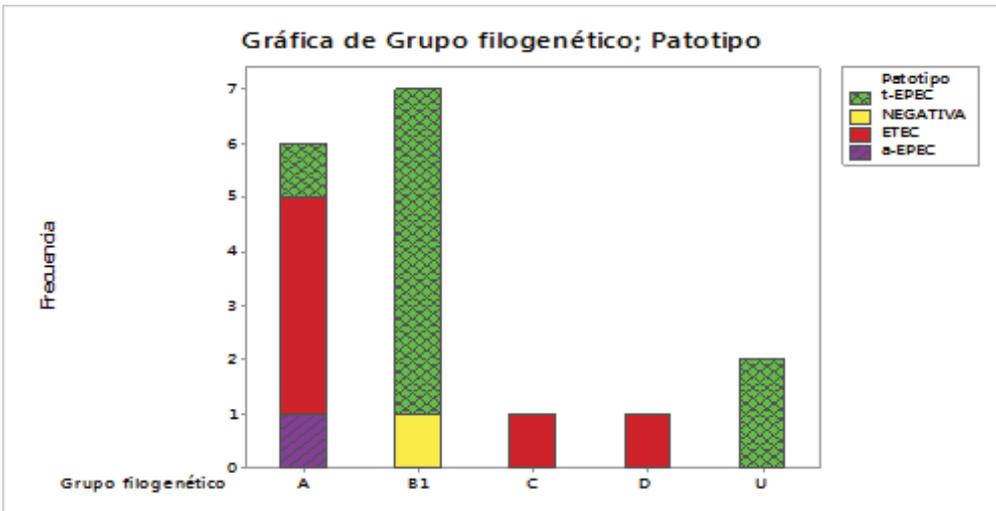
Figura 5. Distribución espacial de patotipos de E. coli por estación en el Lago de Yojoa



Gráfica 2. Estacionalidad de cepas EPEC y ETEC en el lago de Yojoa



Gráfica 3. Grupos filogenéticos de cepas de Lago de Yojoa



En resumen, se observó con frecuencia el grupo filogenético B1 en la época lluviosa, a excepción de las estaciones 4 que está en ambas estaciones. Se observó que en época seca los grupos filogenéticos fluctúan entre los grupos C, D y cepas U, a excepción de la estación 4, y uno donde prevalece el grupo A y B1.

DISCUSIÓN

El agua de consumo es un recurso que cada vez y con mayor frecuencia es sometido a vigilancia, en vista de que sus fuentes son susceptibles de ser contaminadas y durante el almacenamiento y uso doméstico es igualmente fácil de ser contaminada por los manipuladores, por lo que se constituye en el vehículo transmisor de enfermedades de origen hídrico. En este estudio se evaluaron cepas aisladas de diferentes fuentes de agua, encontrándose que tanto en aguas recreacionales, como es el caso de las cepas aisladas en el lago de Yojoa, como en las fuentes superficiales y profundas destinadas para consumo humano, se identificaron los patotipos EPEC, ETEC y EAEC. Esto es congruente por lo descrito por Martínez y colaboradores [Martínez-Nazaret, 2015] en su estudio llevado a cabo en Venezuela en el año 2015 donde EPEC se identificó en un 16.90 % y EAEC en un 6.50 % de un total de 77 cepas de agua marina de playas de interés turístico. Este dato evidencia el riesgo de la contaminación hídrica para la salud pública, ya que la sola presencia de *E. coli* como indicador de contaminación en las fuentes de agua y además la existencia entre estos indicadores de patotipos diarreogénicos, es indicativo de la influencia antropogénica en estos ambientes [Martínez-Nazaret, 2015].

Otras conclusiones escritas por Ingle nos orientan un poco en la explicación de la presencia de clados en la formación de biopelículas y su relación con virulencia en nichos con diferente temperatura [Ingle J., 2011]. Según este autor, las cepas pertenecientes a los clados de *Escherichia* son capaces de adaptarse a los ambientes con distinta temperatura y existe la hipótesis que estos pueden adaptarse mejor con pocos nutrientes. Ya que no sabemos en qué clado específico caben las dos cepas acuáticas presentes en el lago (Clado 1 o 2 u otro) estas son un ejemplo de intercambio de genes en un ambiente de temperatura fluctuante (ya que son EAEC) donde el intercambio de genes por la capacidad de producir biopelícula en el agua puede ser una explicación.

Entre las cepas EPEC se observa que a-EPEC es más frecuente que t-EPEC, a excepción de las fuentes hídricas donde se ve mayor frecuencia de las cepas EPEC típicas que albergan el factor de adherencia de EPEC (eaf+). En algunos casos, los aislados de EPEC han perdido probablemente su plásmido EAF ancestral y han adquirido otro plásmido EAF procedentes de un linaje diferente de *E. coli*. Además, los plásmidos EAF se han sometido modificaciones genéticas, incluida la recombinación de los genes *bfp* y otros genes en el plásmido [Hazen, 2015]. Muchos estudios llevados a cabo los últimos 20 años revelan que ha decrecido la frecuencia de t-EPEC

mientras que han aumentado la frecuencia de a-EPEC en países en desarrollo [Hernandes, 2009] [Ochoa, 2008].

En cuanto a grupo filogenéticos se encuentra el estudio de Ratajczak del 2010, [Ratajczak, 2010], el cual habla acerca de filogenia y su influencia de las condiciones hidrológicas en las poblaciones de *E. coli* en cuencas de agua. Sin embargo, no realizan una comparación con patotipos. La filogenia de estas cepas también difieren en estacionalidad ya que según Ratajczak los grupos B1 y A están sobre representados en las muestras de agua fresca en periodos de lluvia, y los grupos B2 y D son raros en este tipo de muestras [Ratajczak, 2010].

Carlos en su investigación [Carlos, 2010] sugiere que la prevalencia del grupo filogenético B1 en cepas pueden ser en su mayoría de origen animal provenientes de ganado vacuno, caprino y ovino. Aquí surgen más interrogantes ya que en casi todas las fuentes analizadas y principalmente agua y alimento el grupo filogenético B1 es el más frecuente. Recordemos que en los quesos artesanales se cumple y claro está su origen animal o de ganado vacuno. En el caso de las cepas del Lago de Yojoa se debe investigar ya que es evidente las actividades de ganadería alrededor, pero se debe profundizar más acerca de la contaminación fecal en este recurso hídrico ya que podría no ser solamente por actividad ganadera.

Hernández Oviedo y colaboradores [Hernández Oviedo, 2016] describen las temperaturas ambientales y de superficie de agua en el lago de Yojoa, en cada muestreo realizando un promedio de las temperaturas máximas y mínimas. No obstante, ETEC apareció cuando inicia la época lluviosa y existe un aumento de temperatura ambiental aproximado de cuatro grados Celsius entre el muestreo 2 y 3. Así como antes se ha resaltado ETEC es predominante en las cepas encontradas en épocas secas. Aunque sean pocas las cepas recolectadas se logra distinguir una tendencia en las distintas cepas del lago de Yojoa.

El hecho de que hay movimiento hídrico natural al igual que biológico dentro del lago podría explicar la distribución espacial de los distintos serotipos de las cepas en las distintas estaciones de muestreo de esta importante fuente hídrica del país. El saneamiento de los establecimientos y comunidades alrededor se desconoce; es de entender las múltiples fuentes de contaminación a que el Lago de Yojoa está expuesto, dado las diversas actividades agrícolas, comerciales, turísticas y mineras a que se dedican las comunidades adyacentes.

CONCLUSIONES

Las cepas ambientales pueden o no ser dañinas, pero al albergar factores de virulencia se pueden describir como patógenas potenciales y causantes de diarreas a la población susceptible. Las cepas circulantes en el Lago de Yojoa así como en Francisco Morazán deben ser monitorizadas ya que en este estudio se pudo obtener su serotipo y estos pueden ser un inicio de su búsqueda y vigilancia. Existe otro tópico interesante ya que al tener estas cepas la capacidad de formar nichos acuáticos; o biofilms (biopelícula) en las superficies, pueden coexistir con otros microorganismos como algas y plantas.

Preguntas futuras

Retomando el punto anterior de la coexistencia de varios microorganismos en nichos acuáticos ¿Podrían estas cepas productoras de toxinas tener algún beneficio al ambiente acuático? ¿La población en las cercanías de estas fuentes hídricas son susceptibles a estas cepas o ya están de alguna manera inmunizadas? ¿El origen principal de la contaminación de estas fuentes son los animales ya que estas cepas presentan filogenia que puede probarlo?

AGRADECIMIENTOS

Se agradece al Instituto de Investigaciones en Microbiología de la Facultad de Ciencias de la UNAH, la Dirección de Investigación Científica y Posgrado 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.
- Carlos, CP, Mathias M; Stoppe, Nancy C; Hachich, Elayse M. . 2010. *Escherichia coli* phylo-

- genetic* group determination and its application in the identification of major animal source of fecal contamination. *BMC Microbiology* 10(161).
- Czeczulin, JRW, Thomas S.; Henderson, Ian R.; Navarro-Garcia, Fernando; Nataro, James P. 1999. Phylogenetic Analysis of Enteroaggregative and Diffusely Adherent *Escherichia coli*. *Infection and Immunity* 67(6):2692-2699.
- Chattopadhyay, ST, Veronika; McVeigh, Annette; Kislela, Dagmara I, Dorl, Kathleen; Navarro, Armando; Sokurenko, Evgenl V.; Savarino, tephenn 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 análisis de las ciencias de la salud. editores L, editor. Mexico.
- Franke, JF, Sylvia; Schmidt, Herbert; Schwarzkopf, Andreas; Wiele, Lothar H.; Baijer, Georg; Beutin, Lothar; Karch, Helge. 1994. Nucleotide Sequence Analysis of Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) Adherence Factor Probe and Development of PCR for Rapid Detection of EPEC Harboring Virulence Plasmids. *Journal of Clinical Microbiology* 32(10):2460-2463.
- Gunzburg, tTT, Nadia G.;Riley, Lee W. 1995. Identification of Enteropathogenic *Escherichia coli* by PCR-based detection of the Bundle-Formig Pilus Gene. *Journal of Clinical Microbiology* 33(5):1375-1377.
- Hazen, THK, JAMES B.; Nataro, James P.; Rasko, David A. . 2015. Comparative Genomics Provides Insight into the Diversity of the Attaching and Effacing *Escherichia coli* Virulence Plasmids. *Infection and Immunity* 83(10):4103-4117.
- Hernández Oviedo, AIM, Mirna; Henriquez, Lourdes; Garay, Marcela 2016. Variación espacial y temporal de la diversidad y abundancia del fitoplancton del lago de Yojoa en un año hidrológico 2014-2015. *Revista Ciencia y Tecnología* 19:40-77.
- Hernandes, RE, WP; Vieira MAM; Gomes TAT. 2009. An Overview of atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. *federation of European Microbiological Societies Letters* 297:137-149.
- Ingle J., DO, Clermont; Skurnik, David; Denamur, Erick; Walk, Seth T.; Gordon, David M. 2011. Biofilm Formation by and Thermal Niche and Virulence Characteristics of *Escherichia* spp. *Environmental Microbiology* 77(8):2695-2700.
- 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.
- Martinez-Nazaret, REvDb, Luz B; Castillo, Lena K. 2015. *Escherichia coli* diarreogénicas procedentes de aguas marinas recreacionales caracterizadas por reacción en cadena de la polimerasa. *FCV-LUZ XXV(4):248-254*.
- Mazariego-Espinosa, KC, Ariadnna; 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.
- Ochoa, TB, F. ; Contreras, C. Mercado, E. 2008. New insights into the epidemiology of enteropathogenic *Escherichia coli* infection. *Tropical Medical Hygiene* 102:852-856.

- 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.
- Ratajczak, ML, Emile; Berthe, Theirry; Clermont, Olivier; Pawlak, Barbara; Denamur, Erick; Petit, Fabienne. 2010. Influence of hydrological conditions on the *Escherichia coli* population structure in the water of a creek on a rural watershed. *BMC Microbiology* 10(222).
- Rodas, CI, Volga; Qadri, Firrdausi; 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.