



UNIVERSIDAD
DE LOS ANDES
MÉRIDA-VENEZUELA

Universidad de Los Andes

Facultad de Farmacia y Bioanálisis

Postgrado en Microbiología mención Clínica

Mérida-Venezuela



**Diversidad fenotípica y genética de *Escherichia coli* aisladas
de productos lácteos procesados artesanalmente y
comercializados en Mérida, Venezuela**

www.bdigital.ula.ve

SERBIULA
Tullo Febrás Cordero

DONACION

Autora

Lcda. Leidys Iveray Guillén Paredes

Tutora

Prof^a. María del Carmen Araque G.

Julio, 2014



UNIVERSIDAD
DE LOS ANDES
MÉRIDA-VENEZUELA

Universidad de Los Andes
Facultad de Farmacia y Bioanálisis
Postgrado en Microbiología mención Clínica
Mérida-Venezuela



**Diversidad fenotípica y genética de *Escherichia coli* aisladas
de productos lácteos procesados artesanalmente y
comercializados en Mérida, Venezuela**

Trabajo de grado como requisito parcial para optar al título de
Magister Scientiae en Microbiología mención Clínica

Autora

Lcda. Leidys Iveray Guillén Paredes

Tutora

Prof^a. María del Carmen Araque G.

Julio, 2014

Diversidad fenotípica y genética de *Escherichia coli* aisladas de productos lácteos procesados artesanalmente y comercializados en Mérida, Venezuela

Autora: Leidys I. Guillén P.

Tutora: María del C. Araque

RESUMEN

Objetivo. Caracterizar fenotípica y genéticamente cepas de *Escherichia coli* aisladas de productos lácteos procesados artesanalmente y comercializados en el área urbana del estado Mérida, Venezuela.

Materiales y métodos. Se analizaron 45 cepas de *E. coli* provenientes de productos lácteos artesanales (crema de leche, cuajada y requesón). Estas cepas se aislaron según la norma de la Comisión Venezolana de Normas Industriales (COVENIN) y la identificación microbiológica se llevó a cabo por metodologías convencionales. La susceptibilidad antimicrobiana se determinó mediante la técnica de difusión del disco y los fenotipos con susceptibilidad intermedia o resistente fueron confirmados por concentración inhibitoria mínima (CIM). El grupo filogenético, la detección de 6 factores de virulencia (*fimH*, *kpsMTII*, *papAH*, PAI, *fyuA* y *usp*) y los genes *bla*_{TEM} se realizaron mediante amplificación por PCR y la tipificación de las cepas por Rep-PCR.

Resultados. El 73,3% (33/45) de las cepas fueron susceptibles a todos los antibióticos probados y el 24,4% (11/45) presentó resistencia a ampicilina mediada por *bla*_{TEM-1}. La mayoría de las cepas resistentes fueron aisladas de requesón. El 82,2% de las cepas fueron ubicadas en el filogrupo A. El gen de virulencia más frecuente fue *fimH* (97,8%), seguido por *fyuA* (68,9%), *kpsMTII* (57,8%), *papAH* (44,4%) y *usp* (22,2%). La tipificación por Rep-PCR de las cepas demostró una estructura poblacional heterogénea.

Conclusión. La caracterización molecular de estas cepas demostró que no están relacionadas clonalmente y en su mayoría se distribuyeron entre los filogrupos correspondientes a cepas comensales con al menos un factor de virulencia. Este estudio revela la necesidad de intensificar los controles higiénico-sanitarios en todas las etapas de la manufactura artesanal del producto, así como la implementación de medidas que permitan la vigilancia epidemiológica de cepas bacterianas potencialmente patógenas presentes en los productos y derivados lácteos no pasteurizados de fabricación artesanal que se expendan en la ciudad de Mérida, Venezuela.

Palabras clave: *Escherichia coli*, grupos filogenéticos, caracterización molecular, productos lácteos.

Gracias a esas personas importantes en mi vida, que siempre estuvieron listas para brindarme toda su ayuda, por motivarme y darme la mano cuando sentía que el camino se terminaba, ahora me toca regresar un poquito de todo lo inmenso que me han otorgado. Con todo mi cariño esta tesis se las dedico a ustedes: A mis padres y hermanos.

AGRADECIMIENTOS

A Dios Todopoderoso y a la Santísima Virgen, por llenarme de bendiciones e iluminar el camino que recorro día a día.

A mi tutora Dra. María del Carmen Araque, por asesorarme y acompañarme en este camino que hoy culmina en el presente trabajo, por compartir sus conocimientos y enseñanzas e inspirar en mí mucha admiración. Muchísimas Gracias!

Al personal del Laboratorio de Microbiología Molecular de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Universidad de Los Andes, especialmente a la Lcda. Beatriz Millán por su disposición, apoyo, orientación, enseñanza y colaboración activa en el desarrollo de la parte experimental del estudio.

Al Consejo de Desarrollo Científico Humanístico, Tecnológico y de las Artes de La Universidad de Los Andes (CDCHTA-ULA) Proyecto N° FA-541-13-03-EM y al Fondo Nacional de Ciencia y Tecnología (FONACIT) Proyecto N° 2012002321, por el financiamiento aportado y fortalecimiento del Laboratorio de Microbiología Molecular de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela.

A los profesores del postgrado, por compartir sus conocimientos y ser parte fundamental en mi formación académica y profesional.

A mi amiga y compañera de postgrado Yinec, por su amistad y apoyo incondicional. Gracias!

ÍNDICE GENERAL

Índice de Tablas	viii
Índice de Figuras	ix
Introducción	1
Marco teórico	
1. <i>Escherichia coli</i>	
1.1 Características generales.....	4
1.2 Hábitat.....	5
1.3 Estructura antigénica.....	6
1.4 Filogenia.....	8
1.4.1 <i>E. coli</i> comensal.....	9
1.4.2 <i>E. coli</i> patógena intestinal.....	9
1.4.3 <i>E. coli</i> patógena extraintestinal.....	12
1.5 Factores de virulencia.....	13
2. <i>E. coli</i> como productor de Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETAs).....	17
3. Importancia clínica y epidemiológica de <i>E. coli</i> O157.....	19
4. Mecanismos de resistencia antimicrobiana en <i>E. coli</i>	23
4.1 Antibióticos β – lactámicos.....	24
4.2 Resistencia a los β – lactámicos.....	26
4.3 β -lactamasas de espectro extendido (BLEE).....	27
4.4 Tipos de β – lactamasas de espectro extendido (BLEE).....	30
4.4.1 TEM.....	30
4.4.2 SHV.....	30
4.4.3 CTX-M.....	31
4.5 β -lactamasa Amp-C.....	33
5. Impacto epidemiológico de <i>E. coli</i> productora de BLEE (TEM, SHV, CTX-M) transmitida por alimentos.....	33

6. Técnicas para la tipificación de cepas de <i>E. coli</i> e importancia en estudios epidemiológicos.....	36
6.1 Amplificación al azar de ADN polimórfico (RAPD).....	37
6.2 Amplificación de elementos repetitivos (REP-PCR).....	39
6.3 Análisis del polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción (PCR-RFLP).....	40
6.4 Electroforesis en gel de campo pulsante (PFGE).....	41
Hipótesis	43
Objetivos	
Objetivo general.....	44
Objetivos específicos.....	44
Materiales y Métodos	
1. Recolección de los productos lácteos.....	46
2. Aislamiento e identificación de las cepas de <i>E. coli</i>	46
3. Pruebas de susceptibilidad antimicrobiana.....	49
4. Extracción del ADN.....	49
5. Detección de genes que codifican β -lactamasas.....	50
6. Determinación de los grupos filogenéticos de <i>E. coli</i>	51
7. Detección genética de genes de virulencia.....	51
8. Tipificación de <i>E. coli</i> por Rep-PCR.....	53
Resultados	55
Discusión	68
Conclusión	75
Recomendaciones	76
Referencias bibliográficas	77
Anexos	93

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Principales factores de virulencia asociados con los distintos patotipos de <i>E. coli</i> patógena intestinal.....	15
Tabla 2. Principales factores de virulencia de <i>E. coli</i> causantes de infecciones extraintestinales.....	16
Tabla 3. Principales genes de virulencia de <i>E. coli</i> causantes de infecciones extraintestinales.....	17
Tabla 4. Brotes asociados a <i>E. coli</i> O157:H7.....	20
Tabla 5. Principales mecanismos de resistencia estudiados en <i>E. coli</i>	25
Tabla 6. Clasificación de las β -lactamasas bacterianas.....	29
Tabla 7. Iniciadores empleados en las amplificaciones por PCRs.....	54
Tabla 8. Susceptibilidad de 45 cepas de <i>E. coli</i> frente a doce agentes antimicrobianos.....	56
Tabla 9. Distribución de los grupos filogenéticos y presencia de factores de virulencia de <i>E. coli</i> de acuerdo al tipo de producto lácteo analizado.....	61
Tabla 10. Distribución de los fenotipos de susceptibilidad de acuerdo con los grupos filogenéticos y factores de virulencia presentes en las cepas de <i>E. coli</i>	62
Tabla 11. Distribución de los marcadores de resistencia de acuerdo a los factores de virulencia presentes en las 12 cepas de <i>E. coli</i> con fenotipo intermedio/resistente.....	63
Tabla 12. Relación de los perfiles de virulencia con los filogrupos y origen de las 33 cepas de <i>E. coli</i> con fenotipo sensible.....	64
Tabla 13. Características fenotípicas y genéticas de las 12 cepas de <i>E. coli</i> con fenotipo intermedio/resistentes aisladas de los productos lácteos analizados.....	66

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Microfotografía electrónica de <i>E. coli</i>	5
Figura 2. Principales antígenos de superficie (O, K, H y F) y algunos factores de virulencia de <i>E. coli</i>	7
Figura 3. Árbol dicotómico interpretativo de los diferentes grupo filogenéticos de <i>E. coli</i> en función de la presencia de los genes <i>chuA</i> , <i>yjaA</i> y del fragmento TspE4.C2.....	8
Figura 4. Diferentes mecanismos de patogenicidad de los patotipos intestinales de <i>E. coli</i>	11
Figura 5. Mecanismos de resistencia a los antibióticos β -lactámicos	27
Figura 6. Etapas de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)....	38
Figura 7. Esquema de la distribución de electrodos en el sistema PFGE.....	42
Figura 8. Representación esquemática de la recolección y aislamiento de las cepas de <i>E. coli</i>	48
Figura 9. a) Distribución general de los grupos filogenéticos de <i>E. coli</i> aisladas de productos lácteos procesados artesanalmente. b) Gel electroforético representativo de la amplificación por PCR de los genes <i>chuA</i> , <i>yjaA</i> y el fragmento génico TspE4.C2 en las cepas de <i>E. coli</i> aisladas de productos lácteos artesanales.....	57
Figura 10. Distribución del perfil filogenético de <i>E. coli</i> de acuerdo al producto lácteo procesado.....	58
Figura 11. a) Distribución general de los factores de virulencia en los productos lácteos estudiados. b) Gel electroforético representativo de la amplificación por PCR de los genes <i>fimH</i> , <i>kpsMTII</i> , <i>fyuA</i> , <i>papAH</i> y <i>usp</i> en las cepas de <i>E. coli</i> aisladas de productos lácteos artesanales.....	59
Figura 12. Distribución y frecuencia de los factores de virulencia de	

acuerdo al tipo de producto lácteo.....	60
Figura 13. Diversidad clonal y características fenotípicas y genéticas	
de las 45 cepas de <i>E. coli</i> aisladas de productos lácteos.....	67

www.bdigital.ula.ve

INTRODUCCIÓN

La Organización Mundial de la Salud (OMS), denomina a las enfermedades transmitidas por alimentos (ETAs) como uno de los problemas de salud más relevantes en el ámbito mundial. Cada año, la OMS recibe informes sobre la ocurrencia de cientos de casos de ETAs en todo el mundo, siendo los más frecuentes los ocasionados por alimentos que sufrieron contaminación biológica, destacándose *Escherichia coli* como uno de los microorganismos gramnegativos más frecuentemente asociados a las ETAs (World Health Organization, 1997).

E. coli se encuentra normalmente en el intestino humano y de animales, incluyendo las aves, formando parte de la microbiota normal. Dicho microorganismo presenta una gran diversidad de cepas, agrupadas en función de su patogenia: *E. coli* comensal, *E. coli* patógena intestinal y *E. coli* patógena extraintestinal (ExPEC, del inglés *Extraintestinal Pathogenic Escherichia coli*); y clasificadas en 4 grupos filogenéticos: A, B1, B2 y D. Esta clasificación se fundamenta en las variaciones alélicas de genes codificantes de enzimas, detectadas mediante técnicas como *multilocus enzyme electrophoresis* (MLEE). Sin embargo, en la actualidad la caracterización del grupo filogenético de una cepa puede determinarse por pruebas rápidas y sencillas como la amplificación por PCR-múltiple, de los genes *chuA*, *yjaA* y el fragmento TspE4.C2 (Herzer y cols., 1990; Nataro y Kaper, 1998; Clermont y cols., 2000; Russo y Johnson, 2000; Maynard y cols., 2004; Yang y cols., 2004; Fairbrother y

Nadeu, 2006; Sousa, 2006; Smith y cols., 2007; Koneman y cols., 2008; Hannaoui y cols., 2009).

La capacidad de *E. coli* de producir infección se debe a que genéticamente está dotada de diversos factores de virulencia que hacen posible la producción de enfermedades tanto intestinales como extraintestinales. Entre dichos factores se incluyen: fimbrias, adhesinas, sideróforos, toxinas, entre otros (Blanco y cols., 1995; Johnson, 2002; Soto, 2006; Ananias y Yano, 2008).

Otro aspecto que incrementa la frecuencia de las ETAs producidas por *E. coli*, es la aparición de cepas con capacidad de resistir a la acción de potentes antimicrobianos. Este fenómeno se debe al uso indiscriminado de los antibióticos, tanto en animales como en el hombre, así como la utilización de los biocidas en el saneamiento de la industria de alimentos, lo cual ha favorecido la selección, circulación y transmisión de cepas de *E. coli* multirresistentes. Por consiguiente, la cadena alimentaria, especialmente en su fase primaria o inicial, ha jugado un papel preponderante en la diseminación de genes de resistencia en la población bacteriana, encontrándose la capacidad en estas cepas de expresar entre otros mecanismos, la producción de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) (Molina y cols., 2010).

En Venezuela, son escasos los estudios que relacionan la carga de factores de virulencia y los marcadores de resistencia en los procesos de colonización e infección de patógenos bacterianos encontrados en alimentos. En este

contexto y desde el punto de vista clínico-epidemiológico, se considera importante caracterizar fenotípica y genéticamente las cepas de *E. coli* aisladas de productos lácteos procesados artesanalmente y comercializados en el área urbana del estado Mérida, Venezuela.

www.bdigital.ula.ve

MARCO TEÓRICO

1. *Escherichia coli*

1.1 Características generales

Desde el punto de vista taxonómico, *E. coli* pertenece al Reino *Protista*, Phylum *Proteobacteria*, Clase *Gammaproteobacteria*, Orden *Enterobacteriales*, Familia *Enterobacteriaceae* y al género *Escherichia*, el cual comprende cinco especies distintas: *E. coli*, *E. hermanni*, *E. fergusonii*, *E. vulneris* y *E. blattae*. La especie *E. coli*, es la única de las cinco con significación clínica (Ingledew y Poole, 1984; Blanco y cols., 2002; Von Baum y Marre, 2005).

Esta especie bacteriana corresponde a un bacilo gramnegativo recto de 1,1-1,5 μm de diámetro x 2,0-6,0 μm de largo, que se dispone individual o en pares, es móvil por flagelos peritricos, aunque en algunos casos se muestran inmóviles (Figura 1) (Ingledew y Poole, 1984; Fotadar y cols., 2005). Son bacterias quimioheterótrofas facultativas en los metabolismos fermentativos y respiratorios, no forman esporas, están desprovistas de oxidasa, producen catalasa y β -galactosidasa, producen ácido y gas a partir de glucosa, lactosa y otros carbohidratos y normalmente reducen los nitratos a nitritos (Blanco y cols., 2002). Generan indol a partir del triptófano, descarboxilan la lisina, siendo negativa a la reacción de Vorges Proskauer, ureasa, fenilalanina desaminasa y citrato. Además, se desarrolla en agar sangre, formando colonias grandes,

secas, con hemólisis variable. Su temperatura óptima de crecimiento es de 37°C con un rango que va entre 15 °C y 45 °C, el pH óptimo es de 7 tolerando grandes variaciones (Sneath y cols., 1984; Koneman y cols., 2008).

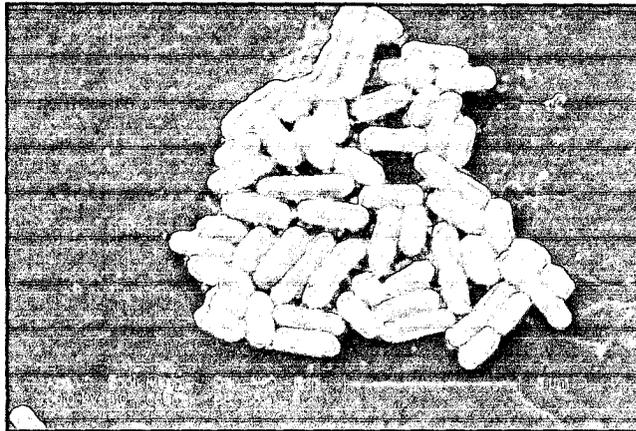


Figura 1. Microfotografía electrónica de *E. coli*. Fuente: Rogers, 2011.

www.bdigital.ula.ve

1.2 Hábitat

Este microorganismo se encuentra normalmente en el intestino humano y de animales formando parte de la microbiota normal (Yang y cols., 2004; Fairbrother y Nadeau, 2006). El intestino humano es colonizado por *E. coli* en las primeras 40 horas tras el nacimiento, siendo la bacteria ingerida en agua y alimentos u obtenida directamente por contacto entre individuos y el recién nacido. La bacteria se adhiere al moco que recubre el intestino grueso y una vez establecida la colonización, una misma cepa puede persistir indefinidamente, en forma inofensiva e incluso beneficiosa para el hospedador, debido a la producción de vitamina K y al impedimento del establecimiento de otras

bacterias patógenas en el intestino (Bentley y Meganathan, 1982; Hudault y cols., 2001; Todar, 2008).

Además, *E. coli* por ser eliminada al exterior por las heces, se puede encontrar en el medio ambiente, ya que es capaz de sobrevivir algunos días en el agua y los alimentos, de manera que su aislamiento es un indicador de contaminación fecal reciente (Blanco y cols, 2002; Todar, 2008).

1.3 Estructura antigénica

La estructura antigénica de *E. coli* se serotifica sobre la base de sus antígenos de superficie: O (somático), H (flagelar) y K (capsular) (Figura 2) (Koneman y cols., 2008). Kauffman, desarrolló un esquema de serotipificación para determinar el grupo patógeno al que pertenecen, dicho esquema continuamente varía y actualmente tiene 176 antígenos somáticos (O), 112 flagelares (H) y 60 capsulares (K). El antígeno "O" es el responsable del serogrupo; la determinación del antígeno somático y flagelar (O:H) indica el serotipo, el cual en ocasiones se asocia con un cuadro clínico en particular (Rodríguez, 2002).

El antígeno "O" se encuentra localizado en la pared celular constituyendo parte del complejo lipopolisacárido, y no puede distinguirse de la fracción antigénica de la endotoxina. Es termoestable, resiste el calentamiento a 100 o 121 °C, y representa el primer grupo de antígenos que deben determinarse

cuando se trata de serotipificar una cepa de *E. coli*, mientras que el antígeno “H” o flagelar, es de naturaleza proteica termolábil y no todas las cepas de *E. coli* lo poseen (Edward y Ewing, 1972; Orskov, 1973).

Por otra parte, el antígeno “K” se encuentra rodeando a la célula a manera de envoltura, o bien, como cápsula rudimentaria (existe una excepción, el antígeno K88, de naturaleza proteica que existe en forma de pelos o fimbrias). Se conocen 3 variedades de antígenos K con base en algunas características físicas y se les denomina L, B y A. Es termolábil e inhibe la aglutinación con sueros específicos anti O, ya sea de células vivas o formalinizadas. El antígeno K debe ser eliminado por calor cuando se trata de determinar el serogrupo al cual pertenece una cepa particular de *E. coli* (Edward y Ewing, 1972; Orskov, 1973).

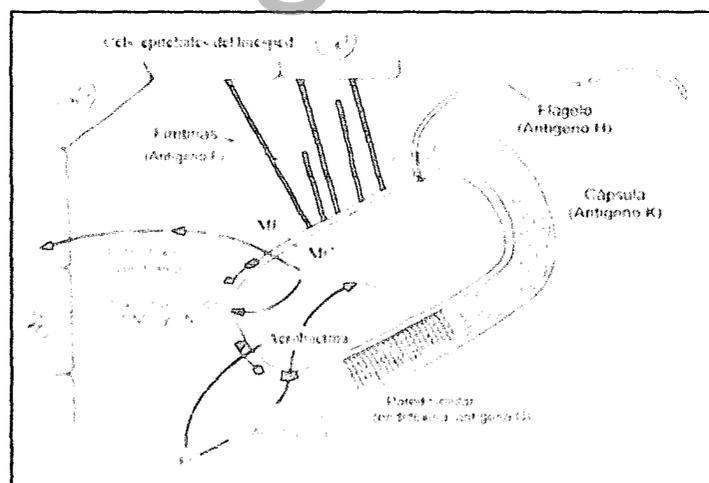


Figura 2. Principales antígenos de superficie (O, K, H y F) y algunos factores de virulencia de *E. coli*. Fuente: Johnson, 1991.

1.4 Filogenia

Durante muchos años la filogenia de *E. coli* se basó en función de la variación alélica de genes codificantes de enzimas detectadas por *multilocus enzyme electrophoresis* (MLEE), los cuales revelaron 4 grupos filogenéticos principales, designados como A, B1, B2 y D (Herzer y cols., 1990; Soto y cols., 2006). Hoy en día, la caracterización del grupo filogenético de una cepa se hace por medio de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR-múltiple), usando marcadores filogenéticos específicos de cada grupo, como el gen *chuA* (necesario para el transporte del grupo hemo de *E. coli* O157:H7 enterohemorrágica), *yjaA* (identificado en el genoma de *E. coli* K-12, con función desconocida), y un fragmento de ADN con función indeterminada, llamado TspE4.C2 (Figura 3) (Clermont y cols., 2000).

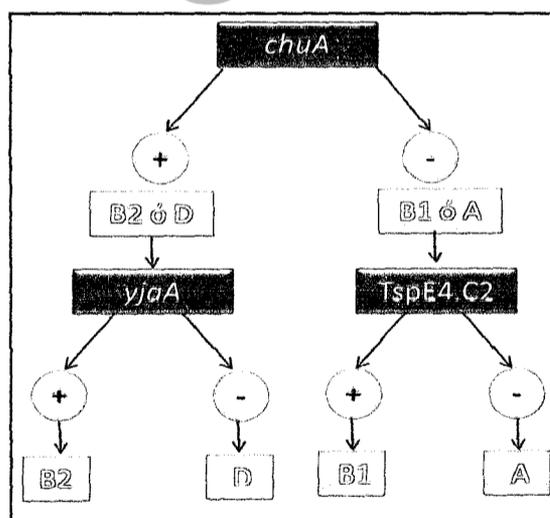


Figura 3. Árbol dicotómico interpretativo de los diferentes grupos filogenéticos de *E. coli* en función de la presencia de los genes *chuA*, *yjaA* y del fragmento TspE4.C2. Fuente: Clermont y cols., 2000.

Por otra parte, las cepas de *E. coli* con base en su patogenia, se pueden clasificar en los siguientes grupos: *E. coli* comensal, *E. coli* patógena intestinal y *E. coli* patógena extraintestinal (ExPEC).

1.4.1 *E. coli* comensal

Las cepas de *E. coli* comensales constituyen gran parte de la microbiota del intestino de humanos sanos, mamíferos y aves. Son cepas perfectamente adaptadas a la coexistencia con el hospedador, raramente son patógenas y no desarrollan en este sintomatología, excepto en casos de inmunosupresión. Típicamente pertenecen a los grupos filogenéticos A y B1, y se caracterizan por carecer de muchos de los determinantes de virulencia que están presentes en las cepas patógenas (Russo y Johnson, 2000).

1.4.2 *E. coli* patógena intestinal

Las cepas patógenas intestinales de *E. coli* causan infección en una gran variedad de hospedadores, la entrada de la bacteria puede ser por vía oral a través de alimentos y, tras colonizar el intestino causan la infección. Se incluyen en los grupos filogenéticos A, B1 y D o en linajes no clasificados (Russo y Johnson, 2000). En la actualidad, se han definido seis clases de patotipos de *E. coli* que causan enfermedades intestinales en humanos, aunque existe en algunos casos, cierta superposición entre ciertos patotipos

diarreicos (Figura 4). No obstante, cada patotipo posee una única combinación de determinantes de virulencia que dan lugar a mecanismos de patogenia bien diferenciados. Según la fisiopatogenia se han clasificado en los siguientes grupos:

- ✓ ***E. coli* enterohemorrágica (EHEC):** se caracterizan por sintetizar una potente citotoxina (toxina Shiga).

- ✓ ***E. coli* enteropatogénica (EPEC):** producen una histopatología característica, mediante una fuerte adherencia (AE) a la membrana de las células epiteliales intestinales. Presenta plásmidos EAF (*EPEC adherente factor*) que codifican para adhesinas tipo BFP (*bundle forming pilus*), la presencia de fimbrias tipo 1, la producción de una toxina termoestable de bajo peso molecular, llamada EAST1 (*enteroaggregative E. coli heatstable enterotoxin 1*), y en ocasiones pueden presentar una proteína de membrana externa llamada intimina, codificada en el gen *eae*.

- ✓ ***E. coli* enterotoxigénica (ETEC):** estas cepas son productoras de toxinas termoestables (STa y STb) y termosensibles (LT-I y LT-II), además de una variedad de factores de colonización intestinal.

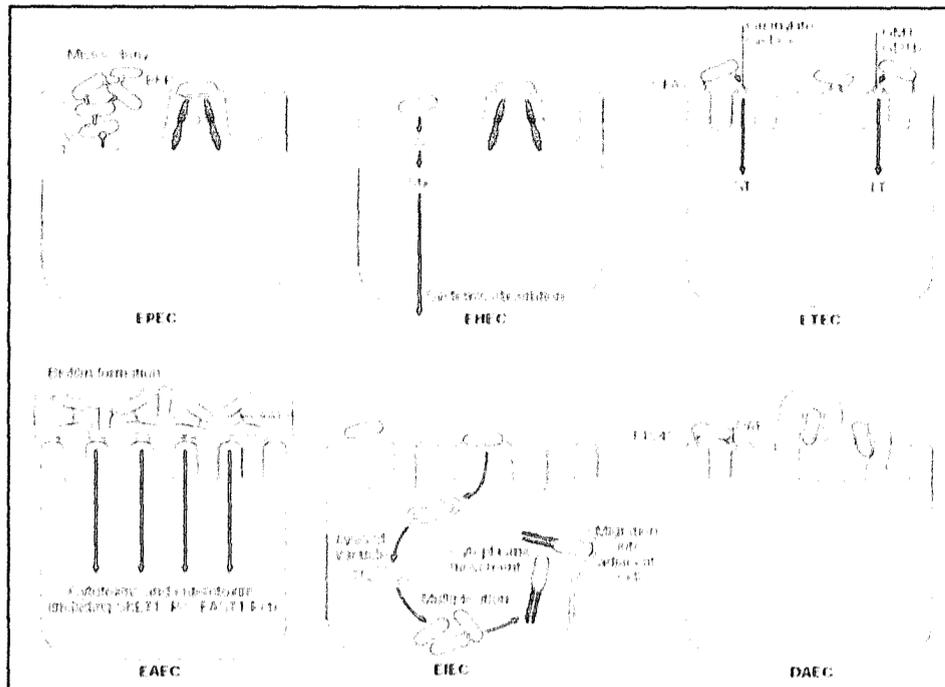


Figura 4. Diferentes mecanismos de patogenicidad de los patotipos intestinales de *E. coli*.

(EPEC: *E. coli* enteropatogénica, EHEC: *E. coli* enterohemorrágica, ETEC: *E. coli* enterotoxigénica, EAEC: *E. coli* enteroagregativa, EIEC: *E. coli* enteroinvasiva, DAEC: *E. coli* difusiva adherente). Fuente: Kaper y cols., 2004.

- ✓ ***E. coli* enteroinvasiva (EIEC):** presentan un complicado mecanismo de patogenia que comienza con la invasión de células epiteliales y su posterior expansión a los tejidos adyacentes, provocando una fuerte reacción inflamatoria y ulceración.
- ✓ ***E. coli* enteroagregativa (EAEC):** se caracteriza por su patrón de agregación y adherencia a las células epiteliales y por la producción de la toxina EAST-1.

- ✓ ***E. coli* difusiva adherente (DAEC):** estas cepas tienen un patrón de adherencia difusa en cultivos de células epiteliales, lo cual se debe principalmente a la familia de adhesinas Afa/Dr. Estas bacterias son capaces de activar la señal en cascada de transducción en células epiteliales, lo cual puede dañar la funcionalidad de las enzimas localizadas en las microvellosidades (Nataro y Kaper, 1998; Sousa, 2006; Koneman y cols., 2008; Hannaoui y cols., 2009; Heymann, 2011).

1.4.3 *E. coli* patógena extraintestinal (ExPEC)

Son cepas que pueden causar infecciones extraintestinales en zonas anatómicas concretas o bien en órganos localizados. Dada la creciente importancia de este tipo de cepas Russo y Johnson propusieron en el año 2000, designarlas con el acrónimo “ExPEC” (*Extraintestinal Pathogenic Escherichia coli*).

Numerosos estudios demuestran que las cepas ExPEC pertenecen a los grupos filogenéticos B2 y también aunque en menor frecuencia, al grupo D. Designaciones más restrictivas son utilizadas para patotipos causantes de síndromes específicos, tales como:

- ✓ **UPEC (*Uropathogenic Escherichia coli*):** principal causante de las infecciones en el tracto urinario. Estas cepas presentan múltiples adhesinas y toxinas específicas. Varios estudios señalan que existe

una relación entre la pérdida de factores de virulencia y la resistencia a las quinolonas y a las fluoroquinolonas (Soto y cols., 2006).

- ✓ **BMEC (*Bacterial meningitis Escherichia coli*):** es el principal agente de la meningitis en recién nacidos. Este patotipo puede atravesar la barrera hematoencefálica, provocando un proceso de inflamación de las meninges (Russo y Johnson, 2000; Maynard y cols., 2004, Sousa, 2006; Smith y cols., 2007).

1.5 Factores de virulencia

Los factores de virulencia, son todas las estructuras o productos bacterianos que intervienen en el proceso infeccioso. La capacidad de las cepas patógenas de *E. coli* para causar los distintos tipos de enfermedades intestinales y extraintestinales procede de la expresión de múltiples factores de virulencia incluyendo: fimbrias, adhesinas, sideróforos, toxinas, entre otros. Estos factores no son necesarios para la replicación vegetativa, como tampoco para el simple comensalismo, pero contribuyen al aumento de la eficacia en la colonización de superficies específicas del hospedador, evasión de la respuesta inmunológica, o daño directo a sus células y tejidos, lo que resulta en el establecimiento de la enfermedad (Blanco y cols., 1995; Johnson, 2002; Soto, 2006; Ananias y Yano; 2008).

Los genes responsables de los factores de virulencia se encuentran en el cromosoma bacteriano o agrupados en fragmentos de ADN denominados "islas de patogenicidad" (PAI). Estos genes pueden ser transmitidos primariamente en forma vertical y en algunas situaciones en forma horizontal a través de plásmidos, transposones, bacteriófagos, además las PAI pueden albergar genes relacionados con resistencia a los antibióticos (Ananias y Yano, 2008; Ribeiro y cols., 2008; Zalewska y cols., 2009).

Los factores de virulencia determinados para cada patotipo de *E. coli* son distintos. En algunos casos pueden ser factores de colonización (o adhesinas) y en otros, son elementos capaces de unirse al mucus del intestino para resistir la movilidad del intestino. También estos factores pueden estar representados por diferentes toxinas, las cuales interfieren con la fisiología normal de las células del hospedero (Tabla 1) (Wilson y cols., 2002).

Las cepas ExPEC son caracterizadas por la diversidad de factores de virulencia que poseen (Tabla 2 y 3), de allí que puedan causar infecciones en una diversidad de sitios extraintestinales, tales como el tracto urinario, sangre, meninges, cavidad peritoneal y pulmones (Russo y Johnson, 2003).

Tabla 1. Principales factores de virulencia asociados con los distintos patotipos de *E. coli* patógena intestinal.

Patotipo	Factor de virulencia	Función	Genes
EHEC	Toxina Shiga	Dañan células intestinales, vasculares y renales.	<i>stx1, stx2</i>
	Plásmido pO157: serina proteasa extracelular, catalasa-peroxidasa, enterohemolisina, sistema de secreción tipo II, fimbrias.	Colonizan enterocitos y lisan los eritrocitos.	<i>espP, katP, hlyA, etp</i>
	Intimina	Lesión A/E "adherencia y esfacelación".	<i>eae</i>
EPEC	Adhesión: Fimbrias Bfp Plásmido EAF	Forman penachos sobre la superficie bacteriana	<i>bfpA</i>
	Intimina	Lesión A/E "adherencia y esfacelación".	<i>eae</i>
ETEC	Pilis o fimbrias CFA	Colonización de la mucosa del intestino delgado.	
	Enterotoxinas: termolábil (LT) y termoestable (ST)	Provocan la salida de agua y iones de las células intestinales.	<i>est, elt</i>
EIEC	Plásmido Pinv	Codifica proteínas involucradas en el proceso de patogénesis.	
	Antígeno de Invasión	Invasión del epitelio del colon.	<i>ipaH</i>
EAEC	Adhesión: Fimbrias de adherencia agregativa Tipo I y II	Unión a la mucosa intestinal.	<i>aafA, aggA, aggR</i>
	Dispersina	Mejora la colonización superficie intestinal.	<i>aap</i>
	Toxina: Enteroagregativa termoestable EAST-1	Produce secreción moco en las células intestinales.	<i>astA</i>
	Proteínas Pec y Pic	Actividad de proteasa	<i>pec, pic</i>
DAEC	Fimbria F1845	Fimbria de superficie involucrada en la adherencia difusa	<i>daaC</i>

Fuente: Paton y Paton, 1998; Schmidt y cols., 2000; Rodríguez, 2002; Zhang y cols., 2002; Hannaoui y cols., 2009.

Tabla 2. Principales factores de virulencia de *E. coli* causantes de infecciones extraintestinales.

Superficie		Función	
Adhesinas	Fimbriadas	Fimbrias P (alelos I, II y III) Fimbrias tipo 1 Fimbria F1C Fimbria S	Media la adherencia de la bacteria
	No fimbriadas (adhesinas X)	Adhesinas del antígeno Dr Adhesinas AFA y AFA III Adhesina M	
Flagelo			Movilidad y adaptación
Mecanismos evasores de las defensas del hospedero	Cápsula	K1, K2, K13, K5	Efecto antifagocitario, anticomplemento, resistencia al suero y evasión del sistema inmune.
	Lipopolisacáridos	O6, O4, O1, O2, O18, O83, O7	Efectos endotóxicos, antígeno O, inducción de citoquinas, resistencia al suero, inmunoadyuvante
	Proteínas de membrana externa		Receptor y transporte.
	Resistencia al suero	Proteína Trat *Plásmidos Col V	*Aumenta la virulencia de la bacteria.
Exportado		Función	
Toxinas	α -hemolisina		Citotoxicidad, hemólisis. Interferencia en la fagocitosis y apoptosis.
	Factor citotóxico necrosante		
	Toxina citoletal distensiva		Citotoxicidad
	Citolisina A Toxina secretada autotransportadora		
Sistema de captación de hierro (sideróforos)	Aerobactina Yersiniabactina Enterobactina		Captación de hierro
Invasinas	Invasinas del endotelio cerebral	Antígeno K1	Permite la invasión de cepas de <i>E. coli</i> al SNC de neonatos.

Fuente: Pacheco y Felipe, 1991; Emödy y cols., 2003; Andreu, 2005.

Tabla 3. Principales genes de virulencia de *E. coli* causantes de infecciones extraintestinales.

Factor de virulencia	Factor relacionado	Genes
Adhesinas	Fimbria tipo 1	<i>fimH</i>
	Fimbria S	<i>sfaD/E</i>
	Fimbria P	<i>papC</i>
	Adhesina no fimbriadas	<i>afaB/C</i>
	Adhesinas no fimbriadas -3	<i>afaB/C III</i>
	Adhesinas no fimbriadas -8	<i>afaE-8</i>
	Adhesina fimbriada P	<i>papG</i> (alelos I, II y III)
Cápsula	Grupo capsular 2 (K1/K5)	<i>kpsMTII</i>
	Grupo capsular 3	<i>kpsMTIII</i>
Sideróforos	Aerobactina	<i>lucD</i>
	Yersiniabactina	<i>fyuA</i>
	Salmochelina	<i>iroN</i>
Toxinas	Hemolisina	<i>hlyA</i>
	Factor citotóxico necrosante tipo 1	<i>cnf1</i>
	Toxina secretada autotransportadora	<i>stx</i>
	Toxina citoletal distensiva	<i>cdtB</i>
Varios	Invasinas del endotelio cerebral	<i>ibeA</i>
	Resistencia al suero aumento de resistencia al suero	<i>traT</i>
		<i>iss</i>
	Colicina V (bacteriocina)	<i>cvaC</i>
	Proteasa T (proteína de membrana externa)	<i>ompT</i>
	Proteínas uropatógenas específica	<i>usp</i>
	Adhesina homologa a <i>irga</i> de <i>Vibrio cholerae</i>	<i>lha</i>
Adhesina específica del grupo sanguíneo M	<i>bmaE</i>	

Fuente: Ananias y Yano, 2008; Karisik y cols., 2008; De Mello y cols., 2009.

2. *E. coli* como productor de Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETAs)

Las enfermedades transmitidas por alimentos (ETAs), son definidas como síndromes originados por la ingestión de alimentos y/o agua, que contienen agentes etiológicos en cantidades tales, que afectan la salud del consumidor

en forma individual o grupos de población. Identifica a este tipo de situaciones la contaminación del alimento, la cual puede ser endógena o bien ocurrir en algún punto de su transformación; por lo tanto el agente etiológico podría existir en los animales, vegetales o en el medio ambiente donde se almacena, se procesa o manipula el alimento (Delgado y cols., 2003).

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), las ETAs constituyen uno de los problemas de salud más relevantes, tanto en los países desarrollados, como en los países en vías de desarrollo. Cada año, la OMS recibe informes sobre la ocurrencia de cientos de casos de ETAs en todo el mundo, siendo los más frecuentes los ocasionados por alimentos que sufrieron contaminación biológica. La OMS estima que cada año se producen 1.500 millones de episodios de diarrea que ocasionan unos 3 millones de muertes en menores de 5 años. Se calcula que, dependiendo del país, un 15 al 70% de las ETAs son causadas por alimentos contaminados (World Health Organization, 1997).

Entre las bacterias asociadas a ETAs se incluyen *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* y *Clostridium perfringens*. Sin embargo, en los últimos años se presentaron brotes ocasionados por patógenos emergentes y reemergentes, aumentando los riesgos de contraer ETAs en la población. Entre los patógenos bacterianos emergentes se destacan: *Salmonella enteritidis* en huevos, *Salmonella* Typhimurium fagotipo 104 (DT 104), *Escherichia coli* O157:H7 en carnes y vegetales, *Listeria*

monocytogenes en carne y quesos, *Campylobacter jejuni* y *Yersinia enterocolitica* en carne de cerdo y aves, *Shigella dysenteriae* en agua y *Cronobacter sakasaki* en productos lácteos deshidratados. Entre los reemergentes se debe señalar *Vibrio cholerae* O1, cuya principal fuente de infección es el agua y los alimentos principalmente de origen marino (Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas INEI-ANLIS "Carlos G. Malbrán", 2011).

3. Importancia clínica y epidemiológica de *E. coli* O157

E. coli productor de toxina Shiga (STEC) es un patógeno emergente asociado a ETAs, con casos esporádicos de brotes de diarrea, colitis hemorrágica (CH) y complicaciones extraintestinales como el síndrome urémico hemolítico (SUH) y purpura trombocitopénica. Las cepas STEC asociadas a enfermedades severas en el hombre pertenecen a la categoría de *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), y es *E. coli* O157:H7 el prototipo de más de 150 serotipos que comparte este potencial patogénico (Levine, 1987; World Health Organization, 1997; Jure y cols., 2010).

La infección por *E. coli* STEC parece ser de distribución universal, pero su prevalencia solamente se conoce con cierto detalle en Argentina, Canadá, Estados Unidos y Europa Occidental (Tabla 4), aunque también se ha encontrado en países como Brasil, Chile, Colombia, México y Venezuela (Margall y cols., 1997; Hannaoui y cols., 2009).

Tabla 4. Brotes asociados a *E. coli* O157:H7.

Lugar	Fecha	Nº de Casos	Nº SUH (%)	Mortalidad (%)	Tipo de Brote	Fuente
Oregon/EE.UU.	1982	26	0	0	Comunidad	Hamburguesas
Michigan/EE.UU.	1982	21	0	0	Comunidad	Hamburguesas
Nebraska/EE.UU.	1984	34	1 (2,9)	4 (11,8)	Geriátrico	Hamburguesas
Ontario/Canadá	1985	73	12 (16,4)	19 (26)	Geriátrico	Sándwiches
Ontario/Canadá	1986	30	3 (10)	0	Escuela	Leche cruda
Utah/EE.UU.	1987	51			Cárcel	Carne molida
Missouri/EE.UU.	1989	243	2 (0,8)	4 (1,6)	Comunidad	Agua
Washington, Idaho, California, Nevada.	1992 a 1993	559	41 (7,3)	4 (0,7)	Comunidad Multiestado	Hamburguesas
Washington/EE.UU.	1994	20	1 (5,0)	0	Comunidad	Embutido Seco
Suecia	1995 1996	99	24 (24,2)	0	Comunidad	Carne
Washington, California, Colorado, Columbia Británica EE.UU., Canadá	1996	45	12(26,7)	0	Comunidad Multiestado	Jugo de manzana no pasteurizado
Escocia	1996	496	0	19 (3,8)	Comunidad	Carne
Japón	96	9451	101 (1,1)	12 (0,1)	Escolares	Vegetales, carne y pescado Salchichas
España	2000	158	6 (3,8)	0	Escolares	Salchichas
Argentina	2004	4	1	0	J. Infantes	Agua de Recreación

Fuente: Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas INEI-ANLIS "Carlos G. Malbrán", 2011.

En 1982, en Michigan y Oregon, EE.UU. se produjo un brote de colitis enterohemorrágica causado por el consumo de hamburguesas, identificándose por primera vez el serotipo de *E. coli* O157:H7 como patógeno humano (Riley y cols., 1983). También en 1993, tuvo lugar otro brote

originado por el consumo de hamburguesas poco cocidas que afectó a la región oeste de EE.UU y en donde se vieron afectadas 559 personas (Bell y cols., 1994; Barret y cols., 1994). En EE.UU, las infecciones por *E. coli* O157:H7 continúan siendo un problema importante de salud a pesar de la implementación de sistemas de vigilancia de los patógenos asociados a las ETAs y un estricto control de la producción de alimentos a partir del brote multiestado ocurrido en 1993. La incidencia de las infecciones por *E. coli* O157:H7 es de 2,1 casos/100.000 habitantes, y representa la segunda causa de las hospitalizaciones (29%) por ETAs después de *Listeria* (Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas INEI-ANLIS "Carlos G. Malbrán", 2011).

En Canadá, la incidencia de las infecciones por *E. coli* O157:H7 es de 5,3 casos/100.000 habitantes, siendo la exposición a carne molida mal cocida, contacto directo con el ganado, agua de consumo contaminada y un medio ambiente rural contaminado los factores de riesgo más importantes (Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas INEI-ANLIS "Carlos G. Malbrán", 2011).

En Europa continental, las infecciones por cepas STEC no-O157 son más frecuentes, mientras que en Gran Bretaña STEC O157 aparece asociada a casos esporádicos y brotes, fundamentalmente por productos cárnicos. En Alemania, cepas de *E. coli* O157:NM, sorbitol positivas, β -glucuronidasa positivas, son causa frecuente de casos esporádicos y brotes de diarrea y SUH (Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas INEI-ANLIS "Carlos G. Malbrán", 2011).

Diversos autores han estudiado en España la frecuencia de *E. coli* O157:H7 como causante de diarrea y se ha podido demostrar que ésta es muy baja, probablemente entre el 0,1 y 1% de las diarreas estudiadas y es detectada siempre en forma de casos esporádicos (Margall y cols., 1997).

En Asia, hay pocos reportes de infecciones por STEC O157, salvo en Japón a partir del brote masivo con más de 10.000 afectados en 1996, posiblemente por falta de sistemas de vigilancia (Watanabe y cols., 1996). En Australia las infecciones por STEC no-O157, fundamentalmente O111:NM, son más frecuentes que las de O157 (Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas INEI-ANLIS "Carlos G. Malbrán", 2011).

Respecto a Latinoamérica, en Colombia se comunicó en forma preliminar que *E. coli* O157:H7 fue el agente causal del 7,2% de los casos de diarrea y que el 6,5% del ganado era portador de este patógeno. En Chile y Argentina, STEC O157 y no-O157 están asociadas a casos de diarrea y SUH (Ríos y cols., 1999; Rivas y cols.; 2008). Durante el año 2002, se informó el primer caso que vincula a *E. coli* O157:H7 con episodios de diarrea sanguinolenta o SUH en Uruguay (Gadea y cols., 2004). En Paraguay a partir del año 2001 se comenzaron a notificar casos de diarrea asociados a *E. coli* O157:H7, después de la implementación de un programa regional de control de las enfermedades emergentes y reemergentes (Weiler y cols., 2005). Estos hallazgos demuestran la importancia de las enfermedades asociadas a STEC en Latinoamérica.

En Venezuela por las limitaciones en el diagnóstico de *E. coli* O157 no se cuenta con suficientes registros estadísticos y epidemiológicos. Sin embargo, se conoce de su existencia, por algunas investigaciones realizadas, como las de Bravo y Villalobos en el 2002, que determinaron la presencia de *E. coli* enterohemorrágica, en carne molida y chorizos procedentes de diversos expendios del mercado municipal de Cumaná, estado Sucre, y confirmaron la presencia del serotipo O157:H7 en un 3,15%, y las investigaciones de Narváez y colaboradores en el 2007, que reportaron este serotipo en muestras de heces de ganado bovino en el municipio Miranda, estado Zulia, donde aislaron 1,94% cepas de *E. coli* O157:H7.

Por otra parte, se ha determinado que *E. coli* O157 se transmite por vía fecal oral y el vehículo más frecuente de infección humana es la carne de bovino, fundamentalmente las hamburguesas poco cocidas. También se ha documentado la infección vehiculada por carne de pavo, salami, leche, yogurt, mayonesa, ensaladas, vegetales crudos y agua. La transmisión de persona a persona también ha sido demostrada y la dosis infectante mínima es baja; se estima entre 10^3 y 10^2 bacterias (Margall y cols., 1997; Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas INEI-ANLIS "Carlos G. Malbrán", 2011).

4. Mecanismos de resistencia antimicrobiana en *E. coli*

La resistencia bacteriana puede definirse como la capacidad de un microorganismo para crecer en presencia de un antimicrobiano a dosis

terapéuticas. El uso no siempre racional y muchas veces inadecuado de los antibióticos, ha favorecido la selección de cepas resistentes (García y cols., 2011).

E. coli, presenta altos porcentajes de resistencia contra ampicilina, trimetoprim-sulfametoxazol, tetraciclina, cloranfenicol y ácido nalidíxico (Tabla 5), lo que supone grandes complicaciones en el tratamiento cuando este es requerido (Mosquito y cols., 2011).

4.1 Antibióticos β -lactámicos

Uno de los grupos de antibióticos más importantes, tanto histórica como clínicamente, es el grupo de los β -lactámicos, el cual ha sido ampliamente utilizado para el tratamiento de las infecciones bacterianas debido a su baja toxicidad y a su amplio espectro de acción (Perozo y col., 2007).

Los β -lactámicos, son antibióticos de acción bactericida que actúan sobre la fase final de la síntesis del peptidoglicano. Actúan como sustratos competitivos de distintas enzimas participantes en la síntesis de membrana, esencialmente de las transpeptidasas denominadas proteínas fijadoras de penicilina (PBP), ya que presentan una similitud estructural con el extremo D-alanina-D-alanina del pentapéptido que enlaza las cadenas de *N*-acetilmurámico y *N*-acetilglucosamina del peptidoglicano (Perozo y cols., 2007; Mosquito y cols., 2011).

Tabla 5. Principales mecanismos de resistencia antibiótica estudiados en *E. coli*.

Familia de antibióticos	Mecanismo de acción	Mecanismos de resistencia	Genes implicados
β-lactámicos	Interfiere en las últimas fases de la síntesis del peptidoglicano, componente necesario en la formación de la pared bacteriana.	β-lactamasas: enzimas que se caracterizan por hidrolizar el enlace amida del núcleo betalactámico, inactivando de esta manera el antibiótico.	Genes que codifican β-lactamasas: <i>bla</i> TEM, <i>bla</i> SHV, <i>bla</i> CARB, <i>bla</i> OXA, <i>bla</i> CTX-M y <i>bla</i> GES.
Quinolonas	Inhibe la acción de las topoisomerasas y de la ADN girasa bacterianas	Mutaciones puntuales que generan el cambio de aminoácidos en la enzima blanco del antibiótico. Sistemas de expulsión. Presencia de genes plasmídicos de resistencia antibiótica.	Mutaciones a nivel de <i>gyrA</i> (gen que codifica una subunidad de la ADN girasa) y <i>parC</i> (gen que codifica una subunidad de la topoisomerasa IV). AcrAB-like (sistemas presente en diferentes enterobacterias). Familia de genes <i>qnr</i> (A, B, C, D S) que codifican proteínas Qnr que impiden estericamente la unión del antibiótico al blanco. Gen que codifica la variante cr de la acetiltransferasa β' (AAC (β')-Ib-cr), capaz de acetilar fluoroquinolonas.
Tetraciclinas	Se unen al ribosoma bacteriano, inhibiendo la síntesis de proteínas.	Presencia de bombas de eflujo específicas para tetraciclinas.	Genes <i>tetA</i> y <i>tetB</i> que codifican sistemas de eflujo.
Cloranfenicol	Inhibidor de la biosíntesis de las proteínas, previene la elongación de la cadena de péptidos al unirse al centro de la peptidiltransferasa del ribosoma 70S.	Inactivación enzimática por acetilación. Exportadores específicos de cloranfenicol.	Gen <i>cat</i> que codifica a la enzima cloranfenicol acetiltransferasa. Genes <i>floR</i> y <i>cmlA</i> .
Trimetoprim Sulfametoxazol	Inhibe la síntesis de la enzima dihidropteroato sintasa (sulfametoxazol) y de la enzima dihidrofolato reductasa (trimetoprim), las cuales son enzimas necesarias en la ruta del ácido fólico.	Presencia de genes que codifican formas mutantes de la enzima blanco.	Genes <i>sul1</i> y <i>sul2</i> (sulfametoxazol) y genes <i>dfr</i> (trimetoprim).

Fuente: Mosquito y cols., 2011.

En presencia de antibiótico, las transpeptidasas hidrolizan el enlace amida del anillo beta-lactámico y se forma un éster estable entre el compuesto hidrolizado y un grupo hidroxilo de la serina del sitio activo de la enzima. Con ello se inhibe la transpeptidación, se desestabiliza la pared celular y finalmente se produce la lisis bacteriana mediada por autolisinas. Este grupo incluyen las penicilinas, cefalosporinas, cefamicinas, carbapenemos y monobactámicos, entre otros antibióticos clínicamente útiles (Perozo y cols., 2007; Mosquito y cols., 2011).

4.2 Resistencia a los β -lactámicos

La resistencia a β -lactámicos está mediada por varios mecanismos (Figura 5):

1. Alteración de la diana (PBP).
2. Disminución de la permeabilidad.
3. Mecanismos de eflujo o expulsión del antibiótico.
4. Inactivación enzimática por β -lactamasas
 1. β -lactamasas cromosómicas.
 2. β -lactamasas plasmídicas: β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) (García y cols., 2011).

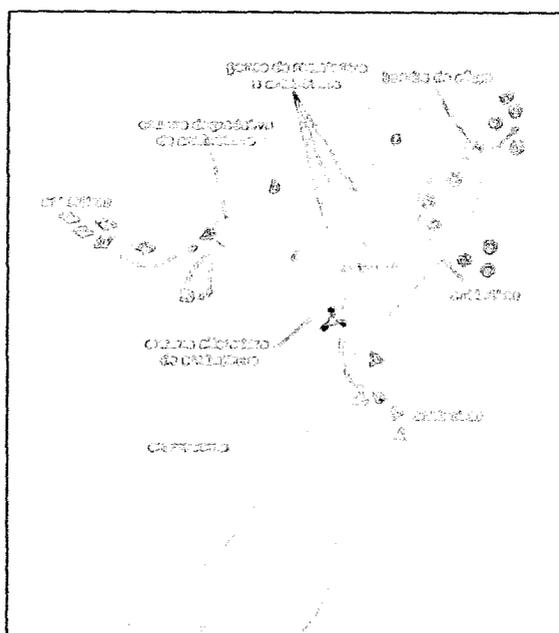


Figura 5. Mecanismos de resistencia a los antibióticos β -lactámicos. Fuente: Mandell y cols., 2006.

El mecanismo más utilizado por los bacilos gramnegativos para adquirir resistencia a los antibióticos β -lactámicos, ya sea que esto ocurra de manera natural o adquirida, es la inactivación de las drogas por las enzimas denominadas β -lactamasas, capaces de hidrolizar el enlace amida del anillo beta-lactámico (Perozo y cols., 2007; García y cols., 2011; Mosquito y cols., 2011).

4.3 β -lactamasas de espectro extendido (BLEE)

En *E. coli*, se ha estudiado ampliamente la producción de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE), las cuales son enzimas que se caracterizan por ser capaces de hidrolizar penicilinas, cefalosporinas de espectro extendido y monobactámicos, son sensibles a los carbapenemos pero, son inhibidas por

el ácido clavulánico. Las BLEE han evolucionado como resultado de mutaciones en el centro activo de las β -lactamasas plasmídicas clásicas TEM y SHV excepto la CTX-M. Estas mutaciones originan cambios en la secuencia de la cadena aminoacídica, como respuesta a la presión ejercida por el amplio uso de las cefalosporinas de tercera generación, permitiendo modificar su perfil de sustrato, mejorando su capacidad de hidrólisis frente a los β -lactámicos de amplio espectro. Estas enzimas generalmente están codificadas en genes que se encuentran frecuentemente en elementos extracromosómicos como los plásmidos (Cortés y cols., 2006; Blanc, 2007; Perozo y cols., 2007; García y cols., 2011).

Las BLEE se agrupan de acuerdo con dos sistemas generales, el de Ambler (1980) según la similitud en la secuencia de aminoácidos y el de Bush, Jacoby y Medeiros (1995), clasificadas según sus propiedades fenotípicas. De acuerdo con el esquema de Ambler, las β -lactamasas pueden dividirse en cuatro clases moleculares diferentes (A, B, C y D), cada una con una secuencia de aminoácidos distinta, donde las BLEE derivadas de SHV y TEM pertenecen a las enzimas de clase A, mientras que las BLEE derivadas de OXA pertenecen a la clase D (Tabla 6). En la clasificación de Bush y colaboradores, las BLEE se localizan en dos subgrupos del grupo 2, llamados 2be (principalmente BLEE derivadas de TEM y SHV) y 2d (BLEE derivadas de OXA) (Cortés y cols., 2006).

Tabla 6. Clasificación de las β -lactamasas bacterianas.

β -lactamasas	Bush, Jacoby y Medeiros	Molecular (Ambler)	Familias de β -lactamasas	Sustratos
Espectro ampliado	2b	A	TEM-1, TEM-2, SHV-1	Bencilpenicilinas, Aminopenicilinas, Carboxipenicilinas, Ureidopenicilinas, Cefalosporinas de espectro estrecho**.
	2d	D	OXA-1 a OXA-10, PSE-2 (OXA-10)	El mismo sustrato de TEM-1, TEM-2, SHV-1, más cloxacilina, meticilina y oxacilina.
Espectro extendido (BLEE)	2be	A	TEM-3 a TEM-26 SHV-2 A SHV-6, K1 de <i>K. oxytoca</i>	El mismo sustrato del grupo de espectro ampliado más cefalosporinas de tercera generación** y aztreonam.
	2br		TEM-30 a TEM-36, TRC-1	
	2d	D	OXA-1 a OXA-10	El mismo sustrato del grupo de espectro ampliado más cefepima para algunas enzimas
	ND*	A	Familia CTX-M	El mismo sustrato del grupo de espectro ampliado más cefepima para algunas enzimas
			Otras (BES-1, familia GES/IBC, PER-1, PER-2, SFO-1, TLA-1, VEB-1 y VEB-2).	El mismo sustrato de la familia TEM y SHV.
AmpC	ND*	C	ACC-1, ACT-1, CFE-1, familia CMY, DHA-1, DHA-2, familia FOX, familia LAT, MIR-1, MOX-1 y MOX-2.	El mismo sustrato del grupo de espectro ampliado más cefamicinas**
Carbapenemasas	ND*	B	Familia IMP, familia VIM, GIM-1 y SPM-1	El mismo sustrato del grupo de espectro extendido más cefamicinas** y carbapenémicos.
	ND*	A	KPC-1, KPC-2 y KPC-3	El mismo sustrato del grupo de la familia IMP, familia VIM, GIM-1 y SPM-1.
	ND*	D	OXA-23, OXA-24, OXA-25, OXA-26, OXA-27, OXA-40 y OXA-48	El mismo sustrato del grupo de la familia IMP, familia VIM, GIM-1 y SPM-1.

* No determinado. ** Benzilpenicilinas, penicilina G; aminopenicilinas, amoxicilina y ampicilina; carboxipenicilinas, carbenicilina y ticarcilina; ureidopenicilinas, piperacilina; cefalosporinas de espectro estrecho, cefazolina, cefalotina, cefamandol y cefuroxima, entre otras; cefalosporinas de tercera generación, cefotaxima, cefpodoxima, ceftazidima, y ceftriaxona; carbapenémicos, ertapenem, imipenem, y meropenem; cefamicinas, cefotetan, cefoxitin. Fuente: Cortés y cols., 2006.

4.4 Tipos de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE)

4.4.1 TEM

La β -lactamasa TEM-1 ha sido diseminada por todo el mundo, y es en la actualidad, el mecanismo de resistencia más común de las bacterias gramnegativas al grupo de los β -lactámicos. Es responsable de más del 90% de la resistencia de *E. coli* a la ampicilina. TEM-2 deriva de TEM-1 por una mutación puntual. La primera variante TEM con fenotipo de BLEE se aisló en 1987 y fue denominada TEM-3, fruto de una mutación puntual de la enzima TEM-1. A partir de entonces, se ha presentado un rápido incremento en el número y en la diversidad de las variantes de TEM con espectro extendido. Hoy en día, se conoce que las mutaciones puntuales en el gen parental *bla*_{TEM-1}, que han dado lugar a las enzimas caracterizadas como BLEE, tienen un número limitado de posiciones. Cada una de estas enzimas presenta una especificidad de sustrato y un punto isoeléctrico determinado (Cortés y cols., 2006; Blanc, 2007).

4.4.2 SHV

La mayoría de estas enzimas SHV se encuentran en cepas de *Klebsiella pneumoniae*; sin embargo, también se han identificado en *Citrobacter diversus*, *E. coli* y *Pseudomona aeruginosa*. La enzima progenitora, SHV-1, sólo tiene actividad contra penicilinas de amplio espectro como: ampicilina, ticarcilina y piperacilina. No obstante, como resultado de

mutaciones puntuales, su espectro ha sido ampliado a cefalosporinas de tercera generación, denominándose SHV-2. En la actualidad, existen alrededor de 150 tipos distintos de la β -lactamasa SHV; la mayoría de estas β -lactamasas tienen fenotipo BLEE, y algunas han sido reportadas como SHV-10, que tienen fenotipo de resistencia a inhibidores de β -lactamasas (Cortés y cols., 2006; Blanc, 2007).

4.4.3 CTX-M

Este grupo de enzimas es una nueva familia de β -lactamasas con un espectro ampliado de sustrato, que hidroliza de manera preferencial a cefotaxima y tiene actividad intrínseca contra cefalosporinas de tercera generación, sin requerir mutaciones adicionales, a diferencia de las antiguas BLEE. En la actualidad, son consideradas las más ampliamente diseminadas en el mundo. Estas se hallan codificadas en plásmidos transferibles y se encuentran principalmente, en cepas de *Salmonella enterica* serotipo Typhimurium y en *E. coli*, pero también ha sido descrita en otras especies de enterobacterias como *K. pneumoniae*, *Citrobacter freundii*, *Proteus mirabilis*, *Enterobacter cloacae* y *Enterobacter aerogenes* (Bonnet, 2004; Cortés y cols., 2006; Harada y cols., 2008; Mantilla y cols., 2009).

En este grupo se incluye a las enzimas denominadas CTX-M (activas frente a la cefotaxima) como la CTX-M-1 (también llamada MEN-1), desde la CTX-M-2 hasta CTX-M-58 y las enzimas Toho 1 y Toho 2. Se clasifican

filogenéticamente en 6 grupos (CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9, CTX-M-25 y CTX-M-45), distanciados evolutivamente unos de otros, ya que no comparten más de un 94% de identidad; el grupo CTX-M-1 incluye 6 enzimas mediadas por plásmidos (CTX-M-1, CTX-M-3, CTX-M-10, CTX-M-12, CTX-M-15 y FEC-1) y las enzimas no publicadas CTX-M-22, CTX-M-23, y CTX-M-28; el grupo CTX-M-2 está conformado por 8 enzimas (CTX-M-2, CTX-M-4, CTX-M-4L, CTXM-5, CTX-M-6, CTX-M-7, CTX-M-20 y Toho-1), mientras que el grupo CTX-M-8 está representado por una sola enzima. El grupo CTX-M-9 consta de 9 enzimas (CTX-M-9, CTX-M-13, CTX-M-14, CTX-M-16, CTX-M-17, CTX-M-19, CTX-M-21, CTX-M-27 y Toho-2) y otras 2 enzimas no publicadas, una de estas es la CTX-M-24 y el grupo CTX-M-25 que incluye solo CTX-M-25 y CTX-M-26 y por último el grupo CTX-M-45 conformada por una representante (Bonnet, 2004; Cortés y cols., 2006; Harada y cols., 2008; Mantilla y cols., 2009).

Estas enzimas muestran tan solo un 40% de similitud con las β -lactamasas tipo TEM y SHV, sin embargo los genes *bla*_{CTX-M} poseen un alto grado de similitud con los genes cromosómicos *bla*_{KLUA} que codifican las β -lactamasas del género *Kluyvera*. Por lo cual, se considera que los grupos CTX-M-1 y CTX-M-2 derivan de las β -lactamasas cromosómicas de *Kluyvera ascorbata*, mientras que los grupos CTX-M-8 y CTX-M-9 derivan de las β -lactamasas cromosómicas de *Kluyvera georgiana* (Harada y cols., 2008; Mantilla y cols., 2009).

4.5 β -lactamasa Amp-C

Las AmpC, son β -lactamasas pero no son consideradas estrictamente BLEE, pertenecen a la clase C según Ambler y al grupo 1 según Bush, Jacoby y Madeiros. Estas enzimas mediadas por plásmidos confieren resistencia a la ampicilina, amoxicilina, aztreonam y a la mayoría de las cefalosporinas. Se diferencian de las BLEE porque son resistentes a los inhibidores de β -lactamasas y susceptibles a las cefalosporinas de cuarta generación (Máttar y Martínez, 2007).

5. Impacto epidemiológico de *E. coli* productora de BLEE (TEM, SHV, CTX-M) transmitida por alimentos

La aparición de enterobacterias multirresistentes gracias a la producción de enzimas BLEE, se ha incrementado en los últimos años y se registra, además, una mayor morbilidad y mortalidad en los pacientes con infecciones por dichos microorganismos, registrándose frecuencias de cepas productoras de BLEE en diferentes países que varían desde un 20% a un 48% (Puig y cols., 2011).

En humanos, el principal reservorio de *E. coli* con BLEE es el tracto digestivo, y su transmisión se facilita por el contacto a través de las manos. También se ha considerado que ciertos alimentos de origen animal, principalmente en

relación con las aves de corral, podrían ser fuente de transmisión de enzimas BLEE al hombre (García y cols., 2011).

La primera bacteria de origen animal portadora de una enzima BLEE se aisló en 1998, y fue una *E. coli* portadora de SHV-12. Desde ese momento, se produce un incremento alarmante en la detección de estas enzimas, fundamentalmente, de los tipos CTX-M en animales sanos destinados al consumo humano. Por tanto, se plantea que el intestino de animales es un reservorio de bacterias portadoras de BLEE CTX-M, fundamentalmente en *E. coli* y no se descarta la posible transferencia al hombre por la cadena alimentaria (Puig y cols., 2011).

En Japón, un estudio nacional conducido entre 1999 y 2002 para la vigilancia de la susceptibilidad antimicrobiana en cepas de *E. coli* aisladas de alimentos, se encontraron 18 cepas resistentes a la cefazolina; seis portadoras de BLEE tipo CTX-M y ocho productoras de una β -lactamasa de espectro amplio *bla*_(CMY-2), a la vez que otras ocho, contenían una mutación en la región del promotor AmpC para la resistencia a la ampicilina (Kojima y cols., 2005).

En España, durante los años 2003 y 2004 se realizó un estudio donde se analizaron 866 muestras de diferentes alimentos y se encontró *E. coli* productora de BLEE tipo CTX-M-14, CTX-M-9, SHV-12, CTX-M-1, CTX-M-32 y SHV-2 (Lavilla y cols., 2008).

En Cuba, aunque se han identificado cepas de *Salmonella* y *E. coli* aisladas de alimentos con susceptibilidad reducida a cefalosporinas de tercera generación (cefotaxima y ceftriaxona), no se ha confirmado en dichos microorganismos la presencia de enzimas BLEE u otras de espectro amplio (Espino y cols., 2010).

Las BLEE en Latinoamérica alcanzan tasas preocupantes principalmente en Argentina, Brasil, Chile, Colombia, Ecuador, Guatemala, México, Panamá, Perú y Venezuela. La producción de BLEE en estos países mostraron variaciones marcadas de un país a otro, con rangos entre un 5% a 73%. Las enzimas más comúnmente encontradas en Latinoamérica son SHV-2, SHV-4, SHV-5, CTX-M-2, CTX-M-8 y PER-2 (Máttar y Martínez, 2007), esto en líneas generales, ya que son escasos los estudios reportados en este aspecto.

Un estudio realizado en Venezuela en el año 2010, reportó el aislamiento de varios serotipos de *Salmonella* productora de BLEE en muestras de pollo crudo (Molina y cols., 2010). En el 2012, González y colaboradores reportan el primer aislamiento de cepas de *Salmonella enterica* con resistencia a quinolonas asociadas a CTX-M y SHV mediada por plásmidos. En el caso de *E. coli* se desconoce la distribución de BLEE en cepas aisladas de alimentos.

6. Técnicas para la tipificación de cepas de *E. coli* e importancia en estudios epidemiológicos

El estudio epidemiológico molecular de las enfermedades infecciosas tiene por objeto determinar la relación clonal que existe entre varios aislados de una misma especie. Esta información es muy útil, sobre todo cuando se producen brotes epidémicos causados por cepas multirresistentes, porque permite determinar el número de clones circulantes, identificar la fuente de contaminación o reservorio y los vehículos de transmisión, evaluar la eficacia de las medidas de control dirigidas a evitar la diseminación de clones y diferenciar entre infección y recidiva (Fernández, 2004).

Los métodos de tipificación se clasifican en dos grandes grupos: fenotípicos (basados en características fisiológicas o bioquímicas) y genotípicos (basados en el estudio del ADN). En la investigación de brotes de ETAs, resulta difícil relacionar los aislados de origen humano, de alimentos y de ambiente por técnicas fenotípicas convencionales de tipificación, ya que estas son menos reproducibles y poseen menor poder de discriminación que los métodos genotípicos. Esto se debe a que la expresión de un carácter fenotípico es el resultado de la interacción del genotipo con el ambiente y, por tanto, es susceptible de modificarse cuando las condiciones ambientales varían (Fernández, 2004; Toro y cols., 2010).

El extraordinario avance de la biología molecular en los últimos años ha permitido desarrollar nuevos métodos genotípicos de tipificación. Estos métodos se sustentan en el estudio del ADN cromosómico o extracromosómico. Utilizando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y sus variantes, se han diseñado varias técnicas de tipificación bacteriana.

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR, *Polymerase Chain Reaction*), se fundamenta en la amplificación de genes o secuencias de ADN polimórficas, a través de ciclos repetidos y duplicados llevados a cabo por una enzima, llamada ADN polimerasa y la subsiguiente separación electroforética de los productos de la amplificación (Figura 6) (Fernández, 2004; Bedolla, 2007).

Existen diversas variantes de la PCR como método de tipificación bacteriana dependiendo de ciertas modificaciones en el protocolo de trabajo: las técnicas de amplificación al azar de ADN polimórfico (RAPD), la amplificación de elementos repetitivos (REP-PCR) y el análisis del polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción (PCR-RFLP), las cuales se han utilizado ampliamente en estudios epidemiológicos.

6.1 Amplificación al azar de ADN polimórfico (RAPD, *Random amplified polymorphic DNA*)

Esta técnica consiste en la amplificación de secuencias arbitrarias, en la que los iniciadores no están dirigidos a ninguna región específica. El uso de

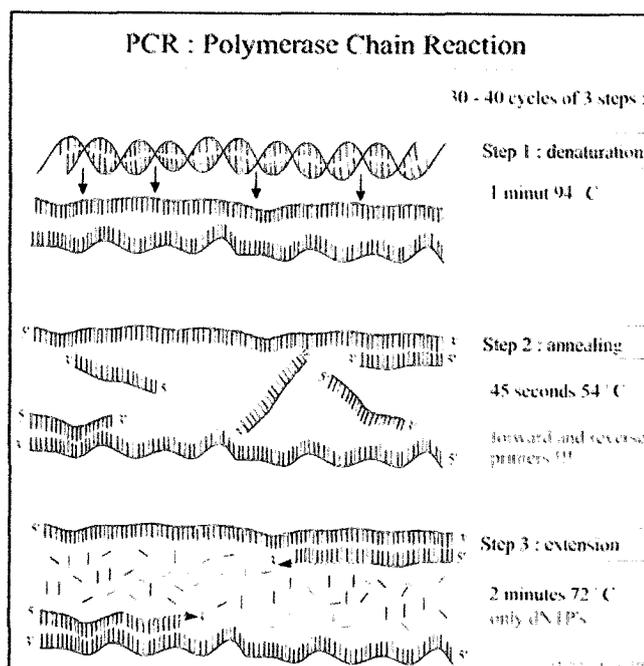


Figura 6. Etapas de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Fuente: Vierstraete, 1999.

www.bdigital.ula.ve

varios iniciadores con secuencias de nucleótidos aleatorias y de corta longitud (8-12 nucleótidos), hibridan a bajas temperaturas de alineamiento con suficiente afinidad a las secuencias del ADN cromosomal de la célula bacteriana (Struelens y cols., 1998; Fernández, 2004; Coll y cols., 2005), permitiendo amplificar las regiones que se encuentran localizadas entre dos iniciadores consecutivos. Los productos resultantes de la PCR pueden representar una variedad de fragmentos de ADN de diferentes tamaños, que son visualizados a través de electroforesis convencional en geles de agarosa (Bedolla, 2007), y que producen un patrón de bandas característico en cada cepa bacteriana

particular, con el potencial de detectar polimorfismo entre cepas ligeramente divergentes (Coll y cols., 2005).

El análisis de los perfiles producidos por el RAPD examina y compara el número y tamaño de bandas entre los aislamientos, permitiéndolos agrupar de acuerdo a la similitud de éstos. Actualmente, el RAPD es considerado el método más adecuado para una tipificación comparativa rápida, pero inadecuado para bibliotecas de tipificación en programas de vigilancia epidemiológica (Calderón y Yagui, 2002; Bedolla, 2007).

6.2 Amplificación de elementos repetitivos (REP-PCR, *repetitive element PCR fingerprinting*)

Esta es otra técnica de tipificación en la que se utilizan iniciadores que hibridan con secuencias de ADN repetidas (secuencias REP), que se encuentran distribuidas en diferentes localizaciones a lo largo del cromosoma bacteriano. Cuando dos secuencias están situadas lo suficientemente cerca, el fragmento de ADN que hay entre ambas es amplificado. Dado que el número y localización de estas secuencias repetidas entre cepas es variable, el número y tamaño de los fragmentos de ADN generados también variará, por lo que el polimorfismo resulta de la variabilidad en la repetición de dichas secuencias y de la distancia entre copias contiguas causadas por inserciones de ADN (Fernández, 2004; Coll y cols., 2005).

Las secuencias repetitivas palindrómicas extragénicas (secuencias REP) y las secuencias consenso repetitivas intragénicas de enterobacterias (secuencias ERIC), son las secuencias “rep” que se han utilizado con más frecuencia en estudios epidemiológicos (Calderón y Yagui, 2002; Fernández, 2004).

6.3 Análisis del polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción (PCR-RFLP, *restriction fragment length polymorphism*)

Esta técnica se fundamenta en la amplificación de una secuencia conocida de ADN, para someterla a un proceso de digestión, con enzimas de restricción y finalmente comparar los fragmentos resultantes en diferentes aislamientos bacterianos (De la Torre, 2006).

La PCR-RFLP permite diferenciar distintos microorganismos mediante el análisis de patrones de bandas, derivados de sus respectivos ADN. Primero se amplifican fragmentos de ADN específicos mediante PCR y posteriormente se tratan con enzimas de endonucleasas de restricción, que los cortan en trozos más pequeños, generando perfiles de restricción del ADN o fragmentos de restricción. Diferencias en la secuencia nucleotídica entre las especies estudiadas, darán lugar a fragmentos de diferentes tamaños, dichos fragmentos o el patrón de bandas es identificable por electroforesis en geles de agarosa, donde migran de acuerdo con su peso molecular (De la Torre, 2006).

6.4 Electroforesis en gel de campo pulsante (PFGE, *pulsed-field gel electrophoresis*)

Esta técnica utiliza un sistema de separación electroforética de pulsos alternos de corriente multidireccional, usando una cámara diseñada especialmente que dispone de 24 electrodos dispuestos periféricamente formando un hexágono alrededor del gel (Figura 7) (Calderón y Yagui, 2002; Coll y cols., 2005; Delgado y cols., 2006; Bedolla, 2007).

Se basa en que primero es aplicado un campo eléctrico (E1) al gel. Las hebras de ADN, cortadas previamente con enzimas de restricción (endonucleasa de restricción de ADN de clivaje o corte infrecuente), se elongan en la dirección del campo eléctrico y comienzan a migrar en el gel, por los cambios periódicos en el campo eléctrico. Este primer campo es entonces removido y un segundo campo (E2) en ángulo con el primer campo, es activado. El ADN debe cambiar la conformación y la reorientación antes de comenzar a migrar en la dirección del segundo campo eléctrico. El tiempo requerido para esta reorientación varía de acuerdo al peso molecular de la muestra (Máttar, 2000). En esta técnica, el genoma bacteriano, que típicamente es de 2.000 a 5.000 pares de kb en tamaño, al ser digerido con una enzima de restricción, genera aproximadamente desde 10 a 30 fragmentos de restricción que van de 10 a 800 kb (Delgado y cols., 2006; Bedolla, 2007). Es así como, los grandes fragmentos son separados permitiendo

obtener un patrón de ADN, que luego son comparados unos con otros para determinar sus relaciones (Calderón y Yagui, 2002).

La PFGE es la técnica estándar de referencia, para tipificar la mayoría de bacterias, hongos y parásitos con importancia clínica, debido a que posee un elevado poder de discriminación y una excelente reproducibilidad, aunque tiene el inconveniente de que es muy laboriosa y requiere de tiempo para la obtención de resultados, por lo que su uso diario en el laboratorio es poco práctico (Fernández, 2004).

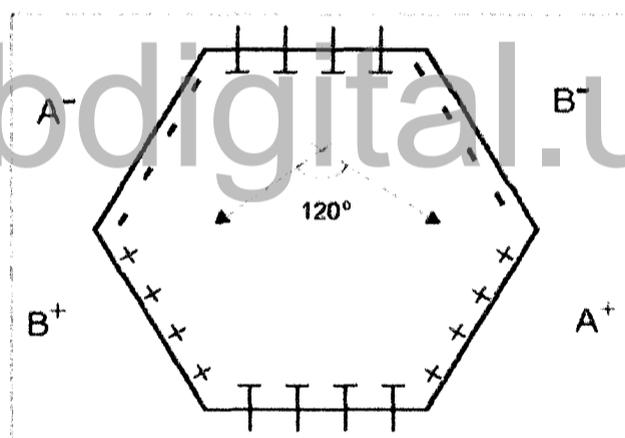


Figura 7. Esquema de la distribución de electrodos en el sistema de PFGE. El ángulo señalado (120°) es el ángulo de reorientación entre el campo eléctrico A y el B. Fuente: Coll y cols., 2005.

HIPÓTESIS

La presencia de *E. coli* en alimentos lácteos indica una contaminación de origen fecal, estas cepas presentan factores genéticos que condicionan su virulencia y resistencia antimicrobiana, las cuales favorecen su persistencia y diseminación a través de la cadena alimentaria.

www.bdigital.ula.ve

OBJETIVO GENERAL

Caracterizar fenotípica y genéticamente cepas de *Escherichia coli* aisladas de productos lácteos procesados artesanalmente y comercializados en el área urbana del estado Mérida, Venezuela.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar microbiológicamente las cepas de *E. coli* aisladas de los productos lácteos.
- Seleccionar inicialmente mediante pruebas bioquímicas las posibles cepas de *E. coli* O157.
- Establecer los perfiles de susceptibilidad de las cepas de *E. coli* a los agentes antimicrobianos.
- Clasificar las cepas de *E. coli* de acuerdo a sus grupos filogenéticos mediante la amplificación por PCR de los genes *chuA*, *yjaA* y el segmento génico TspE4.C2.
- Detectar la presencia de factores de virulencia, mediante la amplificación por PCR de los genes *fimH*, *kpsMTII*, *papAH*, PAI, *fyuA* y *usp*.

- Detectar la presencia de genes que codifican para la producción de β -lactamasas mediante la amplificación por PCR de acuerdo al perfil fenotípico de resistencia.
- Relacionar el grupo filogenético, el perfil de virulencia y la resistencia antimicrobiana.
- Establecer la relación o diversidad clonal de las cepas de estudio mediante la técnica de Rep-PCR.

www.bdigital.ula.ve

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Recolección de los productos lácteos

Se recolectaron 15 muestras de productos lácteos artesanales distribuidas de la siguiente manera: 5 crema de leche, 5 cuajada y 5 requesón. Estas muestras fueron adquiridas de manera aleatoria a partir de lotes no relacionados y en establecimientos comerciales diferentes ubicados en el área urbana del Municipio Libertador del estado Mérida, Venezuela, durante el período enero a julio 2013. Los productos lácteos seleccionados oscilaron entre 250 g y 500 g por presentación.

2. Aislamiento e identificación de las cepas de *E. coli*

Se tomaron porciones de diferentes sitios del producto lácteo para tener una muestra representativa. Se pesaron 10 g de cada muestra y se homogeneizaron en 90 mL de agua peptonada al 0,1% (dilución 10^{-1}), siguiendo las recomendaciones de la Comisión Venezolana de Normas Industriales (COVENIN norma N° 1126, 1989). Luego con la finalidad de mejorar la recuperación de las cepas de *E. coli* se realizó una incubación por 2 horas a 37 °C y a partir de esta solución, se realizaron 3 diluciones (10^{-2} – 10^{-4}) bajo las mismas condiciones (Figura 8). Posteriormente, de cada dilución se tomó 1 mL para inocular las placas rehidratables tipo Petrifilm *E. coli*/coliformes

(3M™, USA) (COVENIN norma N° 3276, 1997) y se incubaron a 35 °C por 18 a 24 horas, siguiendo las recomendaciones del proveedor.

Se escogieron todas las placas que mostraron un crecimiento entre 4 a 10 unidades formadoras de colonias (UFC) de *E. coli*, estas colonias fueron reconocidas por el color azul y su asociación a la producción de gas. A partir de estas placas, se seleccionaron al azar 4 colonias, las cuales fueron extraídas con el asa en punta, colocadas en caldo BHI (BBL, Cockeysville, Md, USA) e incubadas a 36 °C por 18 – 24 horas. Luego del crecimiento en dicho caldo y subcultivando en agar Levine o MacConkey (Himedia, Mumbai, India) a 36 °C por 18 - 24 horas, se seleccionaron las colonias fermentadoras de la lactosa que tuviesen morfología sugestiva de *E. coli* y a estas, se les confirmó su identificación mediante el sistema de galerías API 20E (BioMerièux, Marcy l’Etoile, France), de acuerdo a lo descrito por el proveedor.

Adicionalmente, a todas las cepas de *E. coli* seleccionadas se les determinó bioquímicamente la fermentación del sorbitol. Las variantes fenotípicas sorbitol negativa fueron sometidas a ensayos de aglutinación con antisueros específicos (AntiColi O157:K-, Sifin Berlin, Germany) con el objeto de descartar la presencia de una posible *E. coli* O157:H7. En estos ensayos se utilizaron como cepas control: *E. coli* ATCC 25922 y *E. coli* O157:H7 (CVCM1931), siguiendo el protocolo descrito por el proveedor.

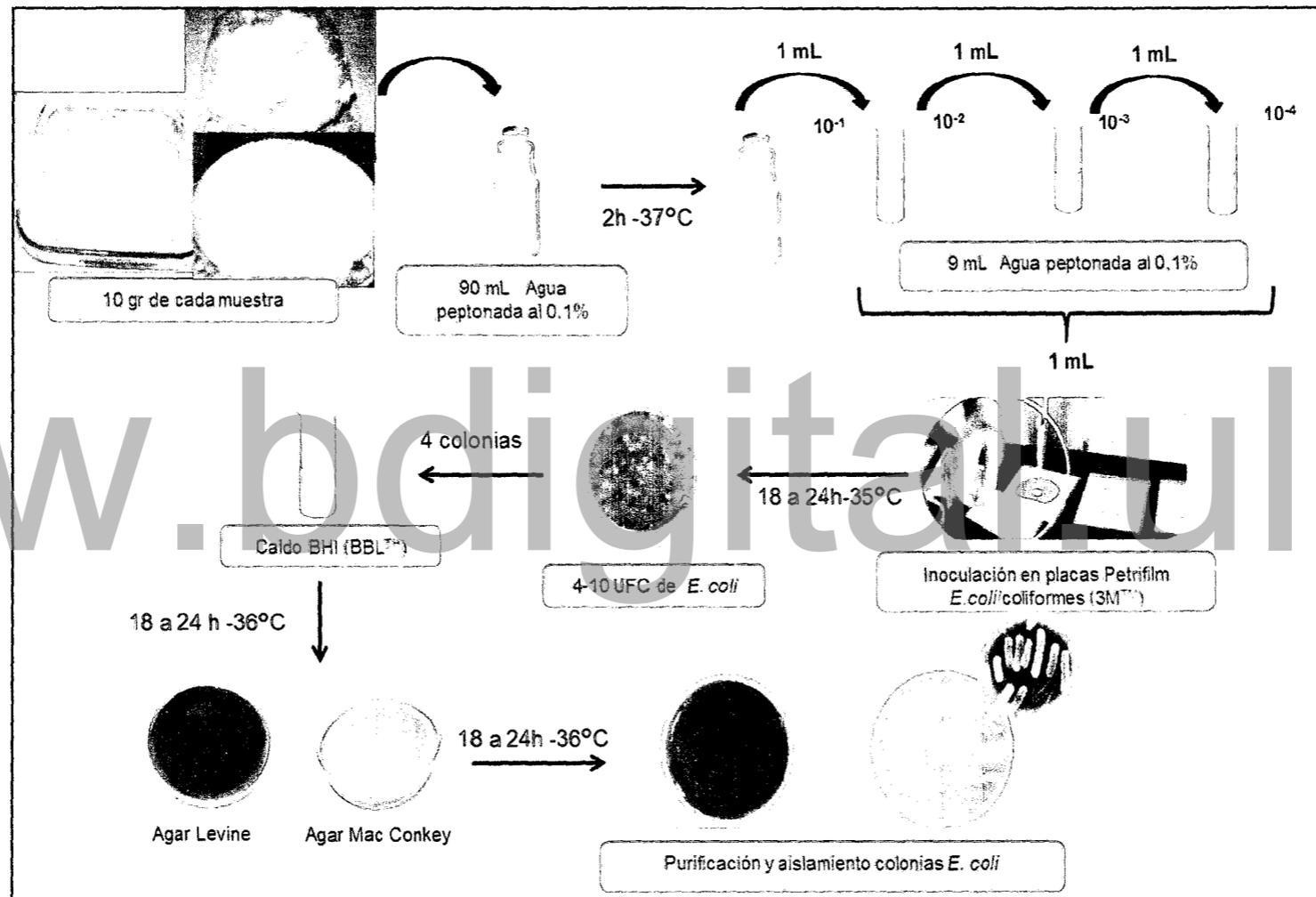


Figura 8. Representación esquemática de la recolección y aislamiento de las cepas de *E. coli*.

3. Pruebas de susceptibilidad antimicrobiana

La susceptibilidad antimicrobiana de las cepas de *E. coli* se realizó utilizando el método de difusión en agar con disco, de acuerdo a los criterios del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2013). Los discos de antibióticos utilizados fueron (BBL): ampicilina (10 µg), amoxicilina/ácido clavulánico (30/15 µg), ceftazidima (30 µg), cefotaxima (30 µg), gentamicina (10 µg), tobramicina (10 µg), amikacina (30 µg), ciprofloxacina (5 µg), ácido nalidíxico (30 µg), imipenem (10 µg), meropenem (10 µg) y ertapenem (10 µg). Las cepas de *E. coli* que resultaron con susceptibilidad intermedia y/o resistente a los antibióticos probados se les confirmó el fenotipo mediante la determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM) en agar, siguiendo las recomendaciones del CLSI. En estos ensayos se utilizó como cepa control *E. coli* ATCC 25922.

4. Extracción del ADN

La extracción y preparación del ADN genómico se realizó mezclando varias colonias provenientes de cultivos frescos en 200 µL de agua destilada estéril. Estas suspensiones se colocaron en congelación (-20 °C) durante 30 min y luego se sometieron a ebullición durante 15 min. Los residuos celulares se separaron por centrifugación (13.000 rpm durante 5 min a temperatura ambiente) y el ADN disuelto en el sobrenadante se recuperó en un tubo eppendorf estéril, el cual se almacenó a -20 °C hasta el momento de su uso.

5. Detección de genes que codifican β -lactamasas

Las cepas que resultaron resistentes a la ampicilina se les determinaron la presencia de genes codificantes para TEM utilizando los iniciadores señalados en la Tabla 7, utilizando las condiciones de amplificación previamente descritos por Ma y cols., (2005). Las amplificaciones se llevaron a cabo en un volumen final de 25 μ L y la mezcla estuvo compuesta por 2,5 μ L del buffer de reacción (10X), 1,25 μ L de MgCl₂ (50 Mm), 1,5 de dNTPs (10 mM; Fundaim, Venezuela), 2,5 μ L de cada iniciador (10 pmol/ μ L), 0,3 μ L de la *Taq* polimerasa (5 U/ μ L; Fundaim, Venezuela), 12,45 μ L de agua bidestilada ultrapura y 2 μ L del ADN extraído. Las PCRs se realizaron en un termociclador Perkin Elmer (GeneAmp PCR System 2400). Los amplicones obtenidos fueron purificados utilizando el sistema AccuPrep PCR Purification (Bioneer) y secuenciados por MacroGen Inc. (Seúl, Corea) mediante electroforesis capilar en un secuenciador modelo ABI 3730XL (Applied Biosystems, CA, USA), utilizando los mismos iniciadores usados en la PCR. Las secuencias nucleotídicas resultantes fueron analizadas mediante el uso del programa Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) del National Center for Biotechnology Information (NCBI) y comparadas con las secuencias genéticas incluidas en las base de datos <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>.

6. Determinación de los grupos filogenéticos de *E. coli*

Las cepas fueron clasificadas dentro de los grupos filogenéticos (A, B1, B2 y D) de acuerdo a la presencia de los genes *chuA*, *yjaA* y el fragmento génico TspE4.C2, mediante una PCR múltiple utilizando los iniciadores y condiciones descritas previamente (Clermont y cols., 2000). La mezcla de amplificación se realizó en un volumen final de 25 μL y estuvo compuesta por: 2,5 μL del buffer de reacción (10X), 1,5 μL de MgCl_2 (50 mM), 1,5 μL de dNTPs (10 mM; Bioneer, Daejeon, Korea), 2,5 μL de cada iniciador (10 pmol/ μL), 0,3 μL de la *Taq* polimerasa (5 U/ μL ; Bioneer), 2,2 μL de agua bidestilada ultrapura y 2 μL del ADN extraído. Los resultados fueron interpretados con base en el esquema de Clermont y cols., (2000) mediante la ausencia (-) o presencia (+) de los elementos antes descritos: grupo A: *chuA* - y TspE4.C2 -; B1: *chuA* - y TspE4.C2 +; B2: *chuA* + y *yjaA* + y el filogrupo D: *chuA* + y *yjaA* -. Para estos ensayos se utilizaron como cepas control *E. coli* LMM36-ULA (*chuA* + y *yjaA* +) y *E. coli* LMM32-ULA (TspE4.C2 +).

7. Detección de genes de virulencia

Se estudiaron 6 genes de virulencia, los cuales incluyeron: cápsula polisacárida específica del grupo II (*kpsMTII*), adhesina de la fimbria tipo 1 (*fimH*), fimbria P (*papAH*), marcador de isla de patogenicidad (PAI),

yersiniabactina (sideróforo *fyuA*) y proteína específica uropatógena (*usp*). Los genes *kpsMTII*, *fimH* y PAI fueron detectados mediante una PCR múltiple y el resto (*papAH*, *fyuA* y *usp*) por PCR simple, utilizando los iniciadores señalados en la Tabla 7 y las condiciones de amplificación previamente establecidas (Johnson y Stell, 2000 y Nakano y cols., 2001). La mezcla de reacción para las PCRs múltiple estuvo compuesta por 2,5 µL de agua bidestilada ultrapura, 2,0 µL de buffer (10X; Bioneer), 2,0 µL de dNTPs (10 mM; Bioneer), 1,5 µL de MgCl₂ (50 mM; Bioneer), 0,3 µL de *Taq* polimerasa (5 U/µL; Bioneer), 2,5 µL de cada iniciador (10 pmol/µL) excepto para el *fimH* que se utilizó 2 µL y de ADN 2 µL para un volumen final de 25 µL. Para las PCR simples se utilizaron 12,3 µL de agua bidestilada ultrapura, 2,5 µL de buffer (10X; Bioneer), 1,5 µL de dNTPs (10mM; Bioneer), 1,5 µL de MgCl₂ (50 mM; Bioneer), 0,2 µL de *Taq* polimerasa (5 U/µL; Bioneer), 2,5 µL de cada iniciador (10 pmol/µL) y 2 µL de ADN para un volumen final de 25 µL. Las cepas control utilizadas en estos ensayos fueron *E. coli* LMM/E02-ULA (*fimH* +, *fyuA* +, *kpsMTII* + y PAI +) y *E. coli* LMM/Sc03-ULA (*papAH* +) y *E. coli* LMM/E02-ULA (*usp* +).

En todos los ensayos, los productos amplificados se separaron en un gel de agarosa (Sigma-Aldrich Co. St. Louis, MO, USA) al 1%, teñido con bromuro de etidio (0,5 µg/mL; Sigma-Aldrich) y fotografiados con el UVP Biodoc-It System. Se utilizó el marcador de peso molecular de 100 pb (Bioneer) para identificar el tamaño de los productos amplificados.

8. Tipificación de *E. coli* por Rep-PCR

La relación clonal entre las cepas fue determinado por la amplificación de secuencias repetitivas por PCR (Rep-PCR) a partir del ADN total, utilizando los iniciadores: REP-1 F: 5'- IIIGCGCCGICATCAGGC - 3'; REP-2 R: 5'- ACGTCTTATCAGGCCTAC - 3' y las condiciones descritas por Lozano y cols., (2002). La mezcla de reacción para la Rep-PCR se realizó en un volumen final de 25 μ L y estuvo constituida por 2,5 μ L de buffer (10X), 2,5 μ L de MgCl₂ (50 Mm), 3 μ L de dNTPs (10 Mm), 3 μ L de cada uno de los iniciadores (10 pmol/ μ L), 0,5 μ L de *Taq* polimerasa (5 U/ μ L; Bioneer), 5,5 μ L de agua bidestilada estéril y 5 μ L de ADN. Los productos de amplificación se separaron en un gel de agarosa al 1,5%, teñido con bromuro de etidio y fotografiados con el UVP Biodoc-It System. Como marcador de peso molecular se utilizó una escalera de 50 pb (Bioneer). Los patrones obtenidos del Rep-PCR fueron analizados utilizando el Software Treecon 1.3b, el cual generó el dendograma o árbol de similitud para establecer las relaciones entre las cepas estudiadas. Los patrones con coeficientes de similitud superior al 90% fueron considerados relacionados clonalmente.

Tabla 7. Iniciadores empleados en las amplificaciones por PCRs.

Gen o fragmento de ADN	Nombre del iniciador	Secuencia del oligonucleótido 5→3'	Producto esperado	Referencia
<i>bla_{TEM}</i>	<i>bla_{TEM}</i> F	ATAAAATTCTTGAAGACGAAA	1105 pb	Ma y cols., 2005
	<i>bla_{TEM}</i> R	GACAGTTACCAATGCTTAATCA		
<i>chuA</i>	<i>chuA</i> F	GACGAACCAACGGTCAGGAT	279 pb	Clermont y cols., 2000
	<i>chuA</i> R	TGCCGCCAGTACCAAAGACA		
<i>yjaA</i>	<i>yjaA</i> F	TGAAGTGTGAGGAGACGCTG	211 pb	Clermont y cols., 2000
	<i>yjaA</i> R	ATGGAGAATGCGTTCCTCAAC		
TspE4.C2	TspE4C2 F	GAGTAATGTCGGGGCATTCA	152 pb	Clermont y cols., 2000
	TspE4C2R	CGCGCCAACAAAGTATTACG		
<i>kpsMTII</i>	<i>kpsMTII</i> F	GCGCATTTGCTGATACTGTTG	272 pb	Johnson y Stell, 2000
	<i>kpsMTII</i> R	CATCCAGACGATAAGCATGAGCA		
<i>fimH</i>	<i>fimH</i> F	TGCAGAACGGATAAGCCGTGG	508 pb	Johnson y Stell, 2000
	<i>fimH</i> R	GCAGTCACCTGCCCTCCGGTA		
PAI	PAI F	GGACATCCTGTTACAGCGCGCA	930 pb	Johnson y Stell, 2000
	PAI R	TCGCCACCAATCACAGCCGAAC		
<i>papAH</i>	<i>papAH</i> F	ATGGCAGTGGTCTTTTGGTG	720 pb	Johnson y Stell, 2000
	<i>papAH</i> R	CGTCCCACCATACGTGCTCTTC		
<i>fyuA</i>	<i>fyuA</i> F	TGATTAACCCCGCGACGGGAA	880 pb	Johnson y Stell, 2000
	<i>fyuA</i> R	CGCAGTAGGCACGATGTTGTA		
<i>usp</i>	<i>usp</i> F	ATGCTACTGTTTCCGGGTAGTGTGT	1000 pb	Nakano y cols., 2001
	<i>usp</i> R	CATCATGTAGTCGGGGCGTAACAT		

RESULTADOS

Un total de 90 cepas de *E. coli* fueron aisladas a partir de productos lácteos artesanales. De estas, se seleccionaron aleatoriamente 45 que correspondieron a 15 cepas por cada grupo de producto lácteo: crema de leche, cuajada y requesón. Ninguna de las cepas seleccionadas resultó positiva para la identificación del serotipo patógeno *E. coli* O157:H7 (datos no mostrados).

Los resultados de las pruebas de susceptibilidad realizadas en las 45 cepas de *E. coli* se muestran en la Tabla 8. El 73,3% (33/45) de las cepas fueron susceptibles a los 12 antibióticos probados. Las cefalosporinas de tercera generación (cefotaxima y ceftazidima), los carbapenemos y amikacina fueron los antibióticos con mayor actividad sobre las cepas estudiadas (100%), seguido en orden de frecuencia por ácido nalidíxico (97,8%; 44/45), amoxicilina/ácido clavulánico (95,6%; 43/45), gentamicina y tobramicina (ambos 91,1%; 41/45). La resistencia a la ampicilina se observó en el 24,4% de las cepas (11/45), mientras que el 8,9% (4/45) fue resistente a los aminoglucósidos. La resistencia a amoxicilina/ácido clavulánico y ácido nalidíxico estuvo representada por un bajo número de cepas (4,4%; 2/45 y 2,2%; 1/45, respectivamente). La susceptibilidad intermedia solo se evidenció con ciprofloxacina en 17,8% de las cepas (8/45).

Las cepas que presentaron resistencia a ampicilina fueron sometidas a la detección genética de β -lactamasas, resultando todas positivas para el gen

*bla*_{TEM-1} (datos no mostrados). El análisis bioinformático de este gen presentó un 100% de homología con la secuencia de referencia registrada en el Genbank N° HG941719.1.

Tabla 8. Susceptibilidad de 45 cepas de *E. coli* frente a doce agentes antimicrobianos.

Antibiótico	Susceptibilidad antimicrobiana		
	n (%)		
	Sensible	Intermedio*	Resistente*
Ampicilina	34 (75,5)	0	11 (24,4)
Amoxicilina/ácido clavulánico	43 (95,6)	0	2 (4,4)
Cefotaxima	45 (100)	0	0
Ceftazidima	45 (100)	0	0
Imipenem	45 (100)	0	0
Meropenem	45 (100)	0	0
Ertapenem	45 (100)	0	0
Amikacina	45 (100)	0	0
Gentamicina	41 (91,1)	0	4 (8,9)
Tobramicina	41 (91,1)	0	4 (8,9)
Ácido nalidíxico	44 (97,8)	0	1 (2,2)
Ciprofloxacina	37 (82,2)	8 (17,8)	0

* Los fenotipos fueron confirmados por concentración inhibitoria mínima: ampicilina >64µg/mL; amoxicilina/ácido clavulánico >64/32 µg/mL; gentamicina y tobramicina >32 µg/mL; ácido nalidíxico >32 µg/mL; ciprofloxacina 2 µg/mL.

La distribución porcentual de los filogrupos de las 45 cepas de *E. coli* estudiadas se muestran en las Figuras 9 y 10. Independientemente del origen del aislamiento de las cepas, el 82,2% (37/45) fueron ubicadas en el

grupo filogenético A. Los filogrupos B1 y D se observaron en igual proporción (8,9%; 4/45). El B1 fue el grupo con menor frecuencia de aislamiento en relación con la procedencia de las cepas (6,7% crema de leche y requesón y 13,3% cuajada). Por el contrario, el grupo D estuvo ausente en cepas aisladas de crema de leche, pero su distribución se evidenció con mayor frecuencia en *E. coli* proveniente de cuajada (20%; 3/15). Ninguna de las cepas clasificó para el grupo B2.

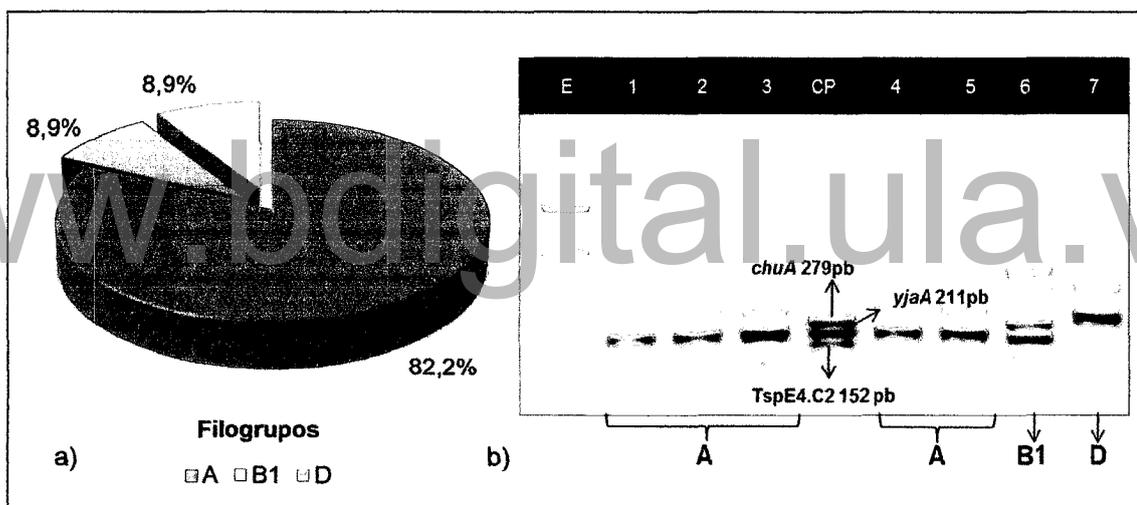


Figura 9. a) Distribución general de los grupos filogenéticos de *E. coli* aisladas de productos lácteos procesados artesanalmente. b) Gel electroforético representativo de la amplificación por PCR de los genes *chuA*, *yjaA* y el fragmento génico TspE4.C2 en las cepas de *E. coli* aisladas de productos lácteos artesanales. E: marcador de peso molecular (100 pb); CP: control positivo.

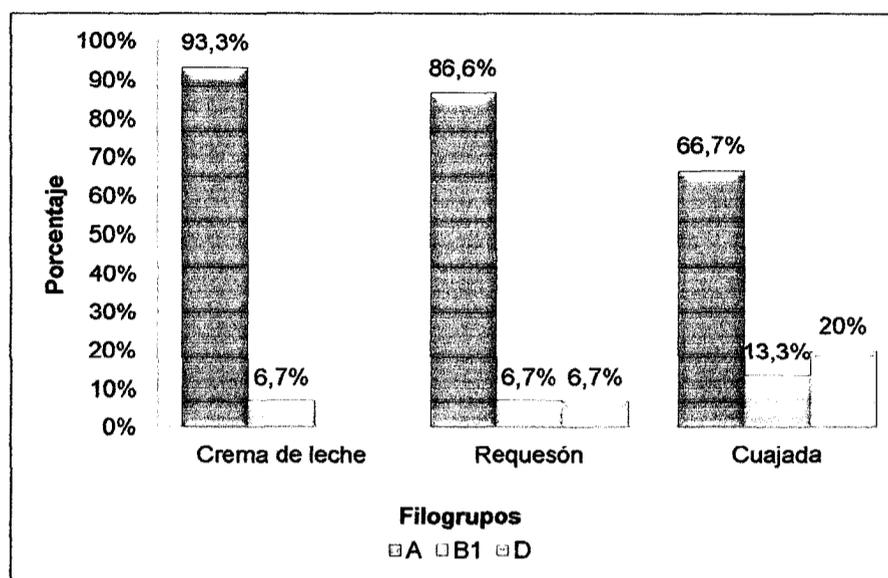


Figura 10. Distribución del perfil filogenético de *E. coli* de acuerdo al producto lácteo procesado.

La distribución de los factores de virulencia presentes en las cepas de *E. coli* se muestran en las Figuras 11 y 12. Todas las cepas analizadas presentaron al menos un factor de virulencia, siendo el gen *fimH* el más frecuente (97,8%; 44/45), seguido por los genes *fyuA* (68,9%; 31/45), *kpsMTII* (57,8%; 26/45), *papAH* (44,4%; 20/45) y *usp* (22,2%; 10/45). No obstante, estos genes se distribuyeron en tres particulares frecuencias de acuerdo a la procedencia de las cepas: los aislados provenientes de crema de leche mostraron el siguiente orden de frecuencia *fimH-fyuA-kpsMTII-papAH-usp*, en el caso de las cepas aisladas en requesón, la distribución de los genes difirió del anterior en que el gen *kpsMTII*, ocupó el segundo lugar y *fyuA* el tercer lugar de frecuencia, mientras que la distribución *fimH-fyuA-usp-kpsMTII-papAH* se

observó en los aislados recuperados de cuajada. Por otra parte, destaca el hecho que en ninguna de las cepas estudiadas se encontró el marcador de la isla de patogenicidad (PAI).

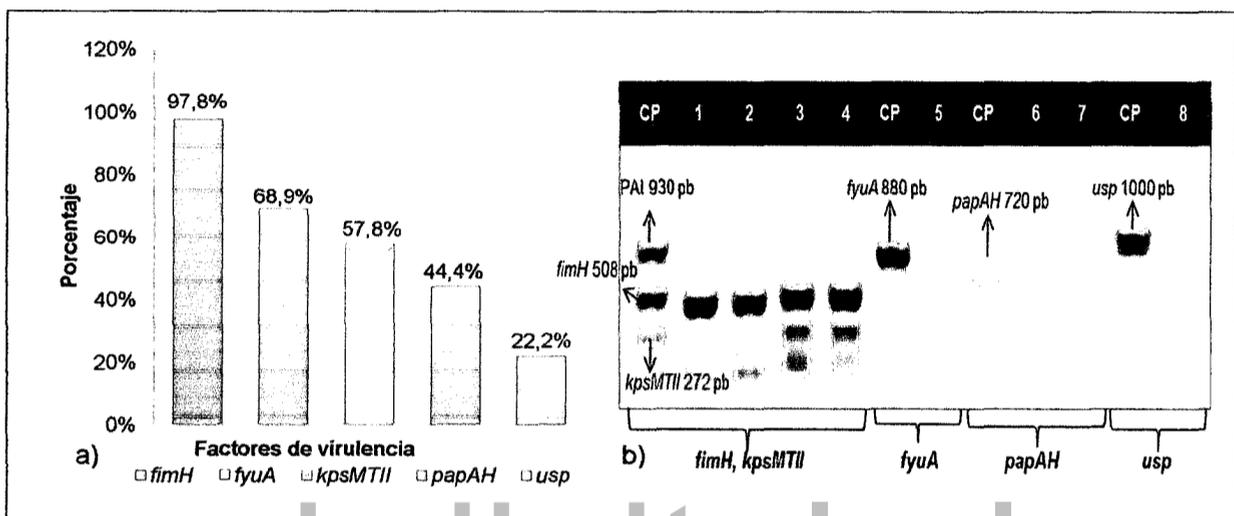


Figura 11. a) Distribución general de los factores de virulencia en los productos lácteos estudiados. b) Gel electroforético representativo de la amplificación por PCR de los genes *fimH*, *kpsMTII*, *fyuA*, *papAH* y *usp* en las cepas de *E. coli* aisladas de productos lácteos artesanales. CP: control positivo.

Al relacionar la distribución de los grupos filogenéticos de las cepas de *E. coli* y su procedencia con los factores de virulencia (Tabla 9), se evidenció que los aislados pertenecientes al filogrupo A provenientes de cualquiera de los productos lácteos analizados, presentaron invariablemente cinco genes de virulencia. El *fimH* se mantuvo como el de mayor frecuencia (66,7% - 86,7%) y el *usp* en el último lugar de este grupo (6,7% - 20%). En cuanto a las cepas

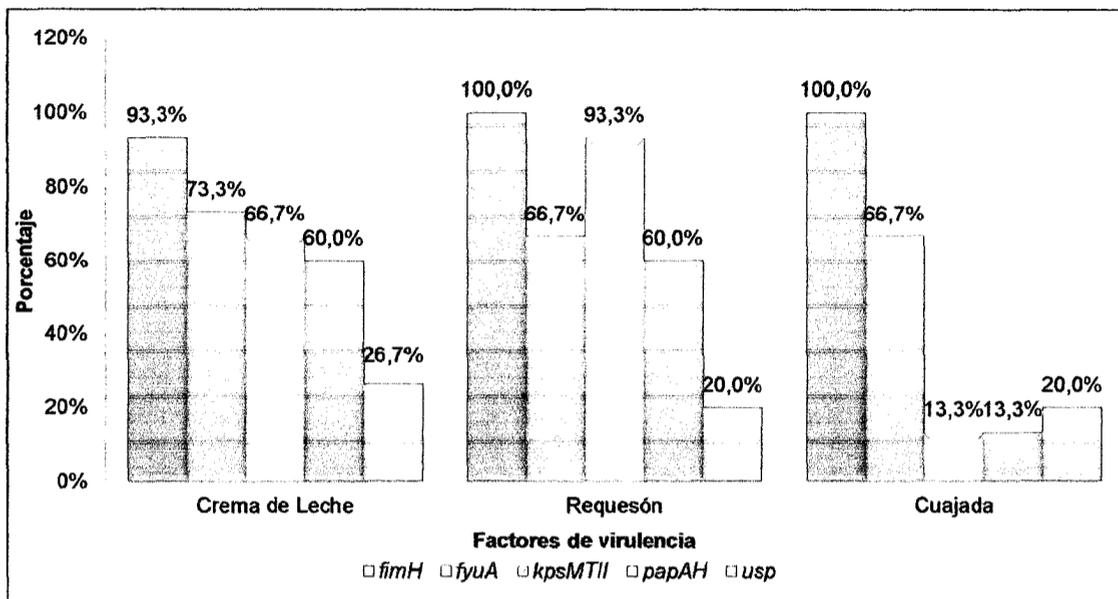


Figura 12. Distribución y frecuencia de los factores de virulencia de acuerdo al tipo de producto lácteo.

del grupo B1, el número de genes de virulencia detectados fue en el orden siguiente: 6 en cuajada, 3 en requesón y 2 en crema de leche. Las cepas del filogrupo D aisladas en requesón y las recuperadas de cuajada en ningún caso presentaron el gen *papAH*.

La distribución de los fenotipos de susceptibilidad en función de los grupos filogenéticos y los factores de virulencia se muestran en la Tabla 10. Las cepas sensibles a los agentes antimicrobianos probados se distribuyeron en orden de frecuencia en los siguientes filogrupos: A (75,8%; 25/33), B1 y D (12,1%; 4/33, respectivamente). En todas las cepas sensibles se detectaron 5 genes de virulencia, excepto en el caso de los aislados del grupo filogenético D, donde se observó la ausencia del gen *papAH*. Por otra parte,

Tabla 9. Distribución de los grupos filogenéticos y presencia de factores de virulencia de *E. coli* de acuerdo al tipo de producto lácteo analizado.

<i>E. coli</i> Grupo Filogenético <i>n</i> (%)	Factores de virulencia <i>n</i> (%)				
	<i>fimH</i>	<i>fyuA</i>	<i>kpsMTII</i>	<i>papAH</i>	<i>usp</i>
Crema de leche <i>n</i> = 15 (100)					
A 14 (93,3)	13 (86,7)	11 (73,3)	10 (66,7)	9 (60)	3 (20)
B1 1 (6,7)	1 (6,7)	0	0	0	1 (6,7)
Requesón <i>n</i> = 15 (100)					
A 13 (86,6)	13 (86,6)	9 (60)	13 (86,6)	9 (60)	3 (20)
B1 1 (6,7)	1 (6,7)	1 (6,7)	1 (6,7)	0	0
D 1 (6,7)	1 (6,7)	0	0	0	0
Cuajada <i>n</i> = 15 (100)					
A 10 (66,7)	10 (66,7)	7 (46,7)	1 (6,7)	1 (6,7)	1 (6,7)
B1 2 (13,3)	2 (13,3)	2 (13,3)	0	1 (6,7)	1 (6,7)
D 3 (20)	3 (20)	1 (6,7)	1 (6,7)	0	1 (6,7)

las 12 cepas con fenotipo intermedio/resistente fueron clasificadas en un único grupo filogenético, el A. Del mismo modo que en los aislados sensibles de los filogrupos A y B1, estas cepas demostraron la presencia de 5 genes de virulencia cuya frecuencia fue la siguiente: *fimH* y *kpsMTII* 100%, *fyuA* y *papAH* 66,7% (8/12) y *usp* 16,7% (2/12). Al establecer la relación entre los diferentes marcadores de resistencia y la asociación con los distintos genes de virulencia estudiados (Tabla 11), se pudo observar que todas las cepas con resistencia a ampicilina, gentamicina, tobramicina y ciprofloxacina se asociaron con 5 genes de virulencia. Las cepas resistentes a amoxicilina/ácido clavulánico no se les detectó el gen *usp*, mientras que el

único aislado resistente al ácido nalidíxico solo presentó la combinación de los genes *fimH* y *kpsMTII*.

Tabla 10. Distribución de los fenotipos de susceptibilidad de acuerdo con los grupos filogenéticos y factores de virulencia presentes en las cepas de *E. coli*.

Susceptibilidad <i>E. coli</i>		Factores de virulencia				
Grupo filogenético		<i>n</i> (%)				
<i>n</i> (%)		<i>fimH</i>	<i>fyuA</i>	<i>kpsMTII</i>	<i>papAH</i>	<i>usp</i>
Cepas sensibles <i>n</i> = 33 (100)						
A	25 (75,8)	24 (72,7)	19 (57,6)	12 (36,4)	11 (33,3)	5 (15,1)
B1	4 (12,1)	4 (12,1)	3 (9,1)	1 (3,0)	1 (3,0)	2 (6,1)
D	4 (12,1)	4 (12,1)	1 (3,0)	1 (3,0)	0	1 (3,0)
Cepas intermedia/resistentes						
A	12 (100)	12 (100)	8 (66,7)	12 (100)	8 (66,7)	2 (16,7)

El número de factores de virulencia y las combinaciones de estos genes fueron estudiados en los distintos filogrupos de las 33 cepas sensibles, aisladas de los tres productos lácteos (Tabla 12). Catorce patrones de virulencia distintos se establecieron de acuerdo al número y combinación de los genes detectados. En el filogrupo A se encontró el mayor número de cepas con patrones diversos, que abarcaron desde la presencia de un solo gen hasta la asociación de 5 determinantes de virulencia. La mayoría de estas cepas fueron aisladas de crema de leche. Nueve de las 15 cepas

Tabla 11. Distribución de los marcadores de resistencia de acuerdo a los factores de virulencia presentes en las 12 cepas de *E. coli* con fenotipo intermedio/resistente.

Marcador de resistencia	Factores de virulencia <i>n</i> (%)				
	<i>fimH</i>	<i>fyuA</i>	<i>kpsMTII</i>	<i>papAH</i>	<i>usp</i>
Ampicilina	11 (100)	8 (72,7)	11 (100)	8 (72,7)	2 (18,2)
Amoxicilina/Ac. clavulánico	2 (100)	1 (50)	2 (100)	1 (50)	0
Gentamicina	4 (100)	3 (75)	4 (100)	4 (100)	1 (25)
Tobramicina	4 (100)	3 (75)	4 (100)	4 (100)	1 (25)
Ácido Nalidíxico	1 (100)	0	1 (100)	0	0
Ciprofloxacina	8 (100)	5 (62,5)	8 (100)	5 (62,5)	1 (12,5)

provenientes de cuajada fueron las que portaron el menor número de genes de virulencia. En una sola cepa sensible del grupo A y aislada en crema de leche no se detectó el *fimH*, pero se demostró la presencia de dos genes de virulencia (*kpsMTII* y *fyuA*).

En relación a las 12 cepas con fenotipo intermedio/resistente se pudo observar que casi todas fueron recuperadas a partir de muestras de requesón y fueron clasificadas exclusivamente en el filogrupo A. Solo una cepa fue aislada de crema de leche y esta a su vez fue la única con un fenotipo de susceptibilidad intermedia a la ciprofloxacina sin asociación a otros antibióticos. El marcador de resistencia más frecuente estuvo representado por la ampicilina y, en por lo menos 5 cepas, este se asoció

Tabla 12. Relación de los perfiles de virulencia con los filogrupos y origen de las 33 cepas de *E. coli* con fenotipo sensible.

N° Factores de virulencia	Perfil de genes de virulencia	Grupo Filogenético (n)			Origen de la cepa (n)			n (%)
		A	B1	D	CL	RQ	CJ	
1	<i>fimH</i>	3	-	2	-	1	4	5 (15,1)
2	<i>fimH, fyuA</i>	4	1	-	-	-	5	5 (15,1)
	<i>fimH, usp</i>	-	1	-	1	-	-	1 (3,0)
	<i>kpsMTII, fyuA</i>	1	-	-	1	-	-	1 (3,0)
	<i>fimH, kpsMTII</i>	-	-	1	-	-	1	1 (3,0)
	<i>fimH, kpsMTII, fyuA</i>	4	1	-	3	1	1	5 (15,1)
3	<i>fimH, usp, papAH</i>	2	-	-	2	-	-	2 (6,1)
	<i>fimH, usp, fyuA</i>	1	-	1	-	-	2	2 (6,1)
	<i>fimH, papAH, fyuA</i>	3	-	-	2	-	1	3 (9,1)
	<i>fimH, kpsMTII, papAH</i>	1	-	-	1	-	-	1 (3,0)
4	<i>fimH, kpsMTII, papAH, fyuA</i>	4	-	-	3	1	-	4 (12,1)
	<i>fimH, usp, papAH, fyuA</i>	-	1	-	-	-	1	1 (3,0)
	<i>fimH, kpsMTII, usp, fyuA</i>	1	-	-	-	1	-	1 (3,0)
5	<i>fimH, kpsMTII, usp, papAH, fyuA</i>	1	-	-	1	-	-	1 (3,0)
Total							33 (100)	

CL: crema de leche; RQ: requesón; CJ: cuajada

con la resistencia a más de tres antibióticos no β -lactámicos. La mayoría de las cepas resistentes presentaron al menos la combinación de 3 genes de virulencia (10/12). En todos los perfiles de virulencia prevaleció la presencia de los genes *fimH* y *kpsMTII* (Tabla 13).

Las relaciones genéticas de las cepas de *E. coli* y sus respectivas características se muestran en la Figura 13. El 95,6% de las cepas estudiadas (43/45) se distribuyeron en dos principales grupos A y B, los cuales mostraron niveles de similitud entre un 35% y 58%, respectivamente. El grupo A, se subdividió en dos subgrupos el I y II. En el primero destacaron dos subclusters con aproximadamente un 95% de similitud caracterizados por: el IA-1 conformado por 4 cepas aisladas de requesón con al menos 3 marcadores de resistencia asociados con 3, 4 o 5 genes de virulencia y el IA-2, integrado por 6 cepas (4 provenientes de cuajada y 2 de requesón), de las cuales 2 mostraron entre 2 y 4 marcadores de resistencia y 4 fueron susceptibles. Estas cepas presentaron patrones de virulencia conformados por la asociación de un máximo de 3 genes de virulencia. En el grupo B, se observó un subcluster (IB-1) con relaciones de similitud cercana al 95%, estructurado por 4 cepas aisladas de crema de leche, sensibles a los antibióticos y con patrones de virulencia diferentes compuestos por 2 hasta 4 genes de virulencia. Todas las cepas que conformaron estos tres subclusters fueron clasificadas dentro del grupo filogenético A.

Tabla 13. Características fenotípicas y genéticas de las 12 cepas de *E. coli* con fenotipo intermedio/resistentes aisladas de los productos lácteos analizados.

Cepa N°	Procedencia	Patrón de Resistencia	Grupo Filogenético	Perfil de genes de virulencia
A25-4	Crema de leche	CIP ^I	A	<i>fimH, kpsMTII, fyuA</i>
A19-3	Requesón	AMP	A	<i>fimH, kpsMTII, papAH, usp</i>
A29-5	Requesón	AMP	A	<i>fimH, kpsMTII, papAH, fyuA</i>
A30-5	Requesón	AMP	A	<i>fimH, kpsMTII, fyuA, papAH</i>
A31-5	Requesón	AMP	A	<i>fimH, kpsMTII, fyuA</i>
A33-7	Requesón	CIP ^I , AMP	A	<i>fimH, kpsMTII, papAH, fyuA</i>
A36-7	Requesón	CIP ^I , AMP	A	<i>fimH, kpsMTII</i>
A34-7	Requesón	CIP ^I , AMP, AMC, NA	A	<i>fimH, kpsMTII</i>
A60-14	Requesón	CIP ^I , AMP, CN, NN	A	<i>fimH, kpsMTII, papAH, fyuA</i>
A61-14	Requesón	CIP ^I , AMP, CN, NN	A	<i>fimH, kpsMTII, papAH</i>
A63-14	Requesón	CIP ^I , AMP, CN, NN	A	<i>fimH, kpsMTII, papAH, fyuA, usp</i>
A62-14	Requesón	CIP ^I , AMP, AMC, CN, NN	A	<i>fimH, kpsMTII, papAH, fyuA</i>

CIP^I: ciprofloxacina susceptibilidad intermedia; AMP: ampicilina; AMC: amoxicilina/ácido clavulánico; CN: gentamicina; NN: tobramicina; NA: ácido nalidíxico.

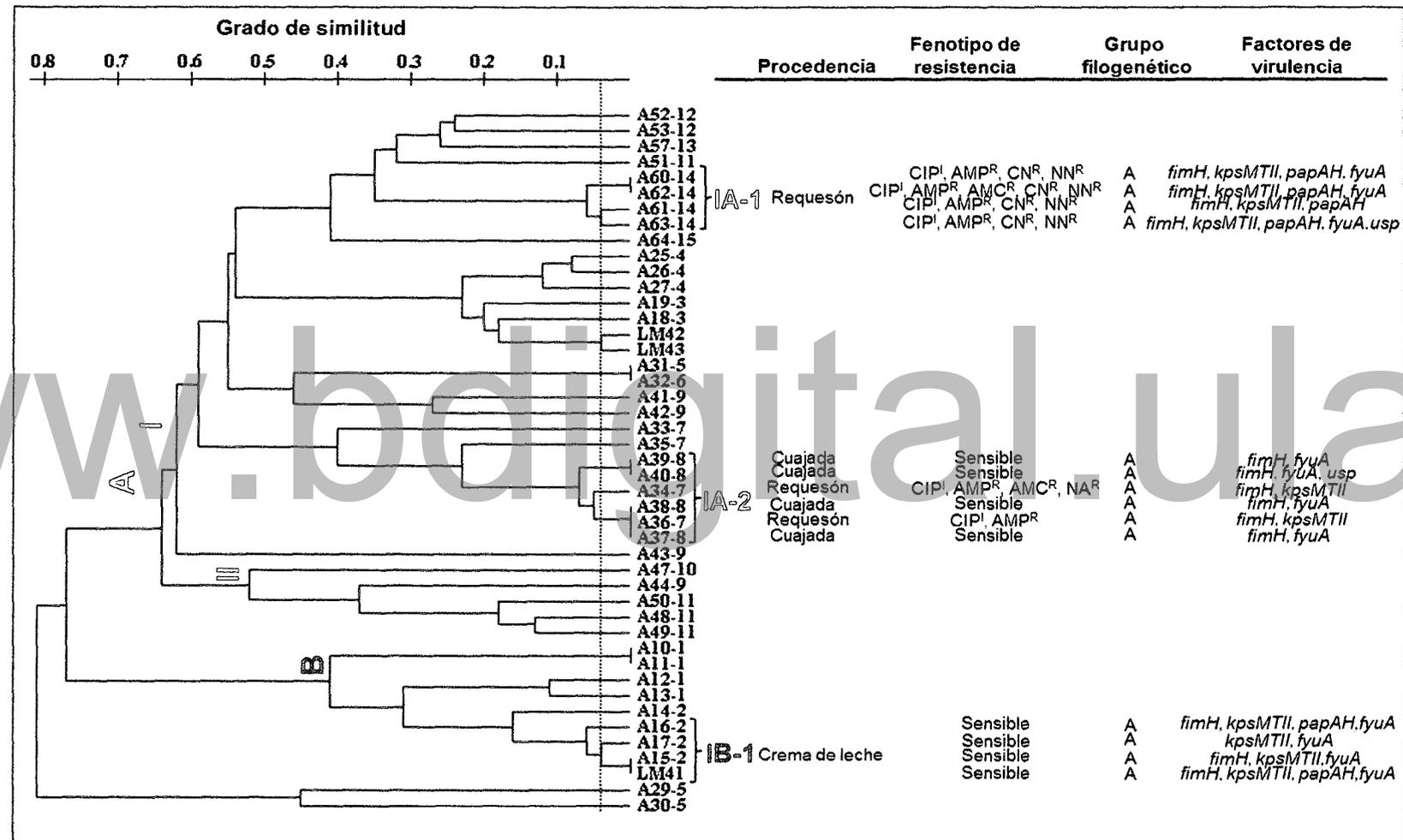


Figura 13. Diversidad clonal y características fenotípicas y genéticas de las 45 cepas de *E. coli* aisladas de productos lácteos.

DISCUSIÓN

En este estudio se analizaron un conjunto de muestras provenientes de tres grupos de productos lácteos artesanales: crema de leche, cuajada y requesón, los cuales fueron adquiridos en diferentes establecimientos comerciales de la ciudad de Mérida. En ningún caso estos alimentos fueron reportados como vehículos en la transmisión o brote de alguna enfermedad de origen alimentario durante el lapso de estudio.

De un total de 90 cepas de *E. coli* aisladas de los derivados lácteos analizados, 45 fueron seleccionadas para su caracterización posterior. El análisis fenotípico de estas cepas mostró que más del 70% fueron susceptibles a los antibióticos ensayados, destacando la excelente actividad exhibida por las cefalosporinas de amplio espectro, carbapenemos y amikacina. No obstante, un porcentaje menor al 25% de las cepas fueron resistentes a ampicilina y menos del 10% mostraron baja susceptibilidad a gentamicina, tobramicina, amoxicilina/ácido clavulánico y ácido nalidíxico. Estos resultados son similares a los descrito por Tamang y cols., (2013) quienes reportaron la presencia de *E. coli* resistente a β -lactámicos en un 16,7% en muestras de leche cruda provenientes de cinco provincias de Corea. Sin embargo, porcentajes superiores a los obtenidos en este estudio fueron registrados en la región de Jammu (India), donde la prevalencia de cepas de *E. coli* multirresistentes en leche y derivados lácteos no

pasteurizados fue del 48% y en Iran, se reportó una frecuencia de *E. coli* resistente a ampicilina, cefalotina y a los aminoglucósidos mayor del 30% en productos lácteos fermentados con procesamiento artesanal (Rashid y cols., 2013; Darehabi y cols., 2013). Al respecto, se ha descrito que el uso de los antibióticos como terapéuticos, profilácticos y promotores del crecimiento en animales destinados al consumo humano, han contribuido con la aparición de cepas bacterianas resistentes (Tham y cols., 2012; Da Costa y cols., 2013; Wang y cols., 2013).

En este trabajo las cepas de *E. coli* con fenotipos resistentes fueron aisladas casi exclusivamente de muestras de requesón y es posible que este producto haya sido elaborado con lácteos contaminados desde su origen en el animal.

Sin embargo, no se descarta que este hallazgo también se encuentre asociado a la naturaleza misma de su elaboración, ya que en las etapas de escurrido y amasado existe una mayor exposición de la materia prima a fuentes de contaminación provenientes del ambiente y/o del manipulador. En este sentido, Saleh y cols., (2009) señalaron que las fuentes de contaminación con patotipos de *E. coli* multirresistentes de quesos artesanales provenientes del Valle de Beqaa (Libano), fueron la manipulación y el secado al aire libre de la materia prima. Por el contrario, la evaluación de la calidad microbiológica de 126 quesos naturales de elaboración doméstica en Hokkaido (Japón), reportó un 19,8% de muestras positivas para coliformes con valores menores a 25 ufc/g y solo una muestra (0,8%) fue

positiva para *E. coli* enteroinvasiva. Estos resultados, según los estándares internacionales, fueron considerados satisfactorios, debido al uso de leches pasteurizadas y a la implementación de buenas prácticas higiénicas en todas las etapas de la producción (Esho y cols., 2013).

Varios reportes señalan que dentro de la diversidad genética de *E. coli*, los grupos A y B1 reúnen las cepas comensales con pocos o ningún factor de virulencia, pero que son reservorios de genes de resistencia con una frecuencia mayor que en el resto de los filogrupos (B2 y D) (Leedom, 2006; Le Gall y cols., 2007; Leimbach y cols., 2013; Wang y cols., 2013). Los resultados obtenidos avalan esta afirmación, ya que el 82,2% de las cepas analizadas pertenecieron al grupo A, incluyendo aquellas que se les detectó el gen *bla*_{TEM-1} asociado a otros marcadores de resistencia. Asai y cols., (2011) señalaron que las cepas de *E. coli* productoras de β -lactamasas aisladas de alimentos provenientes de animales con colibacilosis se clasificaron indistintamente en los grupos filogenéticos A, B1 y D. Al respecto, varios autores coinciden en señalar que la cadena alimentaria es el vehículo de transferencia de genes de resistencia, y se ha sugerido un origen alimentario a la presencia de *E. coli* portadora de diversos mecanismos de resistencia en la microbiota intestinal de humanos (Leedom, 2006; Tham y cols., 2012; Da Costa y cols., 2013; Esho y cols., 2013; Tamang y cols., 2013; Wang y cols., 2013). En este sentido, la OMS recomienda monitorear la resistencia antimicrobiana en una "bacteria indicadora" como *E. coli* para analizar los fenotipos y mecanismos

de resistencia que pudieran diseminarse a través de alimentos de origen animal y sus derivados, en diferentes áreas geográficas (Organización Mundial de la Salud, 2000).

Por otra parte, los resultados obtenidos se ajustan a la hipótesis propuesta por Carlos y cols., (2010) quienes señalaron que la distribución de los grupos filogenéticos de *E. coli* puede ayudar a la identificación de las principales fuentes de contaminación fecal en productos de origen animal. De esta manera, cepas de *E. coli* de los grupos A y B1 se encuentran en un amplio espectro de mamíferos herbívoros y carnívoros, respectivamente, mientras que el B2 y D tienen un estrecho y especializado rango de hospederos, particularmente el filogrupo B2 es un buen indicador de contaminación fecal humana (Le Gall y cols., 2007; Leimbach y cols., 2013). En este estudio, el filogrupo dominante fue el A, correspondiéndose con cepas comensales de *E. coli* probablemente presentes en un hospedero bovino, mientras que la ausencia de cepas del grupo B2 podría indicar que la fuente de contaminación fecal de los productos lácteos no era de origen humano.

E. coli es un reservorio importante de genes que codifican para diversos factores de virulencia, los cuales le permiten a este microorganismo sobrevivir a los mecanismos de defensa del hospedero y ocasionar infecciones en áreas anatómicas distantes a la intestinal (Vincent y cols., 2010; Bergeron y cols., 2012). Al respecto, independientemente del grupo filogenético, y de la presencia o no de marcadores de resistencia todas las cepas de

E. coli aisladas de los tres tipos de productos lácteos, por lo menos albergaban un gen de virulencia. Por lo tanto, la mayoría de las cepas estuvieron dotadas genéticamente de tres principales factores de virulencia: adhesión (*fimH*), sistemas para la captación de hierro (*fyuA*) y formación de cápsula (*kpsMTII*) y con menor frecuencia la expresión de fimbrias P (*papAH*) y la producción de una bacteriocina (*usp*). Este perfil de virulencia es similar al reportado por nuestro equipo Millán y cols., (2014) en cepas de *E. coli* uropatógenas aisladas de pacientes procedentes de la misma localidad en donde se realizó el presente trabajo. En este sentido, Vincent y cols., (2010) y Johnson y cols., (2012), afirman que las cepas de *E. coli* extraintestinales aisladas de alimentos son indistinguibles o genéticamente relacionadas a aquellas causantes de infecciones del tracto urinario (ITU) en el hombre. De hecho, Cortés y cols., (2010) describieron el mismo perfil de virulencia en cepas de *E. coli* aisladas de granjas avícolas y porcinas y las provenientes de pacientes con ITU, sepsis y meningitis en el noroeste de España. Por consiguiente, se ha establecido que los alimentos son una de las principales fuentes de cepas de *E. coli* que albergan una gran carga de información genética, que puede ser transmitida de una cepa a otra a través de plásmidos o islas de patogenicidad. Estas cepas que incluyen no solamente genes de resistencia a los antibióticos, sino también determinantes que incrementan su potencial de virulencia y favorecen el establecimiento de infecciones extraintestinales (Johnson y cols., 2005; Vincent y cols., 2010; Obeng y cols., 2012; Kmet y cols., 2013; Virpari y cols., 2013).

La tipificación por Rep-PCR de las 45 cepas de *E. coli* aisladas de los tres productos lácteos artesanales, permitió evidenciar una estructura poblacional heterogénea, donde más del 95% de las cepas se distribuyó en dos grandes grupos, cuyos índices de similitud no superaron el 60%. Sin embargo, 3 subgrupos (IA-1, IA-2 y IB-1) con una relación genéticamente distante, destacaron por rangos internos de similitud de aproximadamente 95%, sin asociación alguna con las características fenotípicas. Es probable que la distribución policlonal observada en este estudio haya estado influenciada por la participación de diferentes factores intervinientes no controlados, tales como origen de la materia prima para la elaboración del producto, área geográfica donde se realizó el estudio, manufactura, condiciones de preservación del producto y aleatoriedad en la selección de las cepas, entre otros.

En este contexto, los hallazgos obtenidos en este estudio determinaron que los productos lácteos como crema de leche, cuajada y requesón de procesamiento artesanal disponibles comercialmente para el consumo humano, están contaminados con cepas de *E. coli* clonalmente diversas. Estas cepas suponen un potencial patogénico importante, no solo por la cantidad de genes de virulencia presentes, sino también por la asociación de estos con determinantes de resistencia. Por lo tanto, ambas características proporcionan a las cepas estudiadas ventajas para mejorar los mecanismos

adaptativos en diferentes nichos ecológicos y facilitar de este modo, su diseminación a través de la cadena alimentaria.

Desde el punto de vista epidemiológico, la detección de cepas de *E. coli* en alimentos lácteos indica una contaminación de origen fecal, que eventualmente podría estar asociada con la presencia de otros enteropatógenos. Por ende, la información presentada en este estudio revela la necesidad de intensificar los controles higiénico-sanitarios en todas las etapas que conllevan a la manufactura artesanal del producto, así como la implementación de medidas que permitan la vigilancia epidemiológica de cepas bacterianas potencialmente patógenas presentes en los productos y derivados lácteos no pasteurizados de fabricación artesanal que se expenden en la ciudad de Mérida, Venezuela.

Este estudio representa un aporte importante al conocimiento, ya que, por primera vez en Venezuela se describen las características fenotípicas y genéticas que determinan el potencial patogénico de cepas de *E. coli* obtenidas de productos lácteos destinados a la comercialización y consumo humano.

CONCLUSIONES

1. La mayoría de las cepas de *E. coli* fueron susceptibles a los antibióticos probados.
2. Un porcentaje menor al 25% de las cepas estudiadas con fenotipo resistente a la ampicilina eran portadoras del gen *bla*_{TEM-1}.
3. La mayoría de las cepas fueron clasificadas dentro del grupo filogenético A. Esta característica fue independiente del origen de donde se aisló la cepa (crema de leche, requesón o cuajada).
4. Tres principales factores de virulencia fueron detectados en las cepas estudiadas: adhesión (*fimH*), sistemas para la captación de hierro (*fyuA*) y formación de cápsula (*kpsMTII*).
5. Estas cepas constituyeron genéticamente un grupo poblacional heterogéneo, por lo que no se evidenció una diseminación clonal.
6. Las cepas de *E. coli* presentaron una carga genética que determinó su potencial patogénico, así como los mecanismos adaptativos que facilitaron su permanencia en diferentes nichos ecológicos en la cadena alimentaria.
7. Este es el primer estudio de caracterización fenotípica y genética de cepas de *E. coli* provenientes de productos lácteos procesados artesanalmente y comercializados en la ciudad de Mérida.

RECOMENDACIONES

1. La detección de cepas resistentes, sugiere el establecimiento de estrategias epidemiológicas que contribuyan con el uso racional de los antibióticos en animales destinados al consumo humano, así como la implementación de medidas higiénicas en todas las etapas que conllevan a la manufactura artesanal de los productos lácteos.
2. Ampliar el estudio de caracterización genética de las cepas con la búsqueda de otros factores de virulencia y aplicar técnicas con alto poder discriminatorio, como la electroforesis de campo pulsado, a fin de detectar clonas altamente patógenas que pudieran estar diseminándose a través de la cadena alimentaria.
3. La detección de cepas de *E. coli* en alimentos lácteos indica una contaminación de origen fecal, esto obliga a realizar la búsqueda de otros enteropatógenos que pudieran estar presentes en este tipo de alimentos.
4. Implementar medidas que permitan la vigilancia epidemiológica de cepas bacterianas potencialmente patógenas presentes en los productos y derivados lácteos no pasteurizados de fabricación artesanal que se expenden en la ciudad de Mérida, Venezuela.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ambler, R.P. (1980). The structure of β -lactamases. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 289: 321-331.
- Ananias, M. y Yano, T. (2008). Serogroups and virulence genotypes of *Escherichia coli* isolated from patients with sepsis. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 41 (10): 877-883.
- Andreu, A. (2005). Patogenia de las infecciones del tracto urinario. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 23 (Supl 4): 15-21.
- Asai, T.; Masani, K.; Sato, C.; Hiki, M.; Usui, M.; Baba, K.; *et al.* (2011). Phylogenetic groups and cephalosporin resistance genes of *Escherichia coli* from diseased food-producing animals in Japan. *Acta Veterinaria Escandinavica*, 53: 52-57.
- Barret, T.J., Lior, H.; Green, J.H.; Khakhria, R.; Wells, J.G.; Bell, B.P.; *et al.* (1994). Laboratory investigation of a multistate food-borne outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 by using pulsed-field gel electrophoresis and phage typing. *Journal of Clinical Microbiology*, 32: 3013-3017.
- Bedolla, C. (2007). *Uso actual de las técnicas moleculares en el análisis y tipificación de microorganismos patógenos*. Recuperado el 16 de Febrero del 2013, de <http://www.engormix.com/MA-ganaderia-carne/sanidad/articulos/uso-actual-tecnicas-moleculares-t1814/p0.htm>
- Bell, B.P.; Goldfolt, M.; Griffin, P.M.; Davis, M.A.; Gordon, D.C.; Tarr, P.I.; *et al.* (1994). A multistate outbreak of *Escherichia coli* O157:H7-

associated bloody diarrhea and hemolytic uremic syndrome from hamburgers: the Washington experience. *JAMA*, 272 (17): 1349-1353.

Bentley, R. y Meganathan, R. (1982). Biosynthesis of Vitamin K (menaquinone) in Bacteria. *Microbiological Reviews*, 46 (3): 241-280.

Bergeron, C.; Prussing, C.; Boerlin, P.; Daignault, D.; Dutil, L.; Reid-Smith, R.; **et al.** (2012). Chicken as Reservoir for Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli* in Humans, Canada. *Emerging Infectious Diseases*, 18 (3): 415-421.

Blanc, V. (2007). *Caracterización de cepas y de plásmidos de Enterobacteriaceae portadores de β -lactamasas de espectro extendido*. Universidad Autónoma de Barcelona, España.

Blanco, M.; Blanco, J.; Blanco, J.; Alonso, M.; Abalia, I.; Rodríguez, E., **et al.** (1995). Factores de virulencia y serogrupos O de *Escherichia coli* causantes de infecciones urinarias comunitarias. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 13(4): 236-241.

Blanco, J.; Blanco, M.; Blanco, J.E.; Mora, A.; Alonso, M.P; González, E.A, **et al.** (2002). *Enterobacterias: características generales. Género Escherichia*. En S. Vadillo; S. Piriz y E. Mateos., *Manual de Microbiología Veterinaria* (pp. 301- 325). España: McGraw-Hill Interamericana.

Bonnet, R. (2004). Growing Group of Extended-Spectrum β -Lactamases: the CTX-M Enzymes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48 (1): 1-14.

Bravo, V. y Villalobos, L. (2002). *Escherichia coli* enterohemorrágica en productos cárnicos comercializados en el mercado municipal de Cumaná, Venezuela. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 22: 119-121.

Bush, K.; Jacoby, G.A. y Medeiros, A.A. (1995). A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 39 (6):1211-1233.

Calderón, R. y Yagui, M. (2002). *Manual de procedimientos para la investigación de brotes de infecciones intrahospitalarias producidas por bacterias mediante métodos de biología molecular*. Recuperado el 17 de Febrero del 2013 de http://www.ins.gob.pe/repositorioaps/0/4/jer/1-1/MANUAL_%20BROTOS.pdf

Carlos, C.; Pires, M.; Stoppe, N.; Hachich, E.; Sato, M.; Gomes, T.; *et al.* (2010). *Escherichia coli* phylogenetic group determination and its application in the identification of the major animal source of fecal contamination. *BMC Microbiology*, 10: 161-171.

Clermont, O.; Bonacorsi, S. y Bingen, E. (2000). Rapid and Simple Determination of the *Escherichia coli* Phylogenetic Group. *Applied and Environmental Microbiology*, 66 (10): 4555–4558.

CLSI. (2013). Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, twenty-third informational supplement. Document M100-S23. Wayne, PA.

Coll, P.; Coque, M.; Domínguez, M.; Vásquez, J. y Vila, J. (2005). *Procedimientos en Microbiología Clínica. Métodos moleculares de tipificación epidemiológica en bacteriología*. Recuperado el 17 de Febrero del 2013 de <http://www.seimc.org/documentos/protocolos/microbiologia/cap18.htm>.

Comisión Venezolana de Normas Industriales. COVENIN norma N° 1126 (1989). Alimentos. Identificación y preparación de muestras para el análisis microbiológico. Recuperado el 5 de Noviembre del 2013 de <http://www.sencamer.gob.ve/sencamer/normas/1126-89.pdf>.

Comisión Venezolana de Normas Industriales. COVENIN norma N° 3276 (1997). Alimentos. Recuento de coliformes y *Escherichia coli*. Método en placa con películas secas rehidratables (Petrifilm). Recuperado el 06 de Octubre del 2013 de <http://www.sencamer.gob.ve/sencamer/normas/3276-97.pdf>.

Cortés, J.A.; Urdaneta, A.M.; Potdevin, G.; Cuervo, S.I.; Bermúdez, D. y Molina, C.A. (2006) Impacto de las β -lactamasas de espectro extendido en pacientes con cáncer. *Revista Colombiana de Cancerología*, 10(3): 183- 196.

Cortés, P.; Blanc, V.; Mora, A.; Dahbi, G.; Blanco, J.; Blanco, M.; *et al.* (2010). Isolation and Characterization of Potentially Pathogenic Antimicrobial-Resistant *Escherichia coli* Strains from Chicken and Pig Farms in Spain. *Applied and Environmental Microbiology*, 76 (9): 2799-2805.

Da Costa, P.M.; Loureiro, L. y Matos, A. (2013). Transfer of multidrug-resistant bacteria between intermingled ecological niches: the interface between humans, animals and the environment. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 10: 278-294.

Darehabi, H.; Naseri, M.; Menbari, S.; Mobaleghi, J. y Kalantar, E. (2013). Antibiotic resistance pattern of *Escherichia coli* Groups A, B1, B2 and D isolated from frozen foods and children with diarrheae in sanandaj, Iran. *International Journal of Enteric Pathogens*, 01 (01): 1-4.

De la Torre, M. (2006). *Caracterización molecular y fenotípica como herramienta de marcaje epidemiológico para cepas de Salmonella de origen porcino*. Universidad Autónoma de Barcelona, España.

Delgado, R.; Gutiérrez, C.J. y Hurtado, A. (2003). Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETA) de origen marino en Nueva

Esparta: II. Características Clínicas y Etiológicas. *Revista del Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel*, 34 (2): 11-16.

Delgado, N.; Muñoz, J.; García, M.; Ibañez, R.; Muñoz, S.; Serrano, R.; *et al.* (2006). Molecular epidemiology of drug-resistant *Salmonella* Typhimurium in Spain. *Revista Española de Quimioterapia*, 19 (2): 152-160.

De Mello, A.; Campos, A., Silva, R.; Matos, A y Gales, A. (2009). A virulência de *Escherichia coli* patogênica extra-intestinal (ExPEC) em relação à idade e ao sexo do hospedeiro. *O Mundo Da Saúde*, 33 (4): 392-400.

Edwards, P.R. y Ewing, W.H. (1972). *Identification of Enterobacteriaceae*. Minneapolis: Burgess Publishing Co.

Emödy, L.; Kerenyi, M. y Nagy, G. (2003). Virulence factors of uropathogenic *Escherichia coli*. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 22: 29-33.

Esho, FK.; Enkhtuya, B.; Kusumoto, A. y Kawamoto, K. (2013). Microbial assessment and prevalence of foodborne pathogens in natural cheeses in Japan. *BioMed Research International*. Recuperado el 10 de Diciembre del 2013, de <http://www.hindawi.com/journals/ibmri/2013/205801/>

Espino, M.; Puig, Y.; Leyva, V.; Martino, T.; Méndez, D.; Soto, P.; *et al.* (2010). Resistencia a los antimicrobianos en cepas de *Salmonella* y *E. coli* aisladas de alimentos, Cuba 2004-2007. *Revista Panamericana de Infectología*, 12 (2): 37-43.

Fairbrother, J.M. y Nadeau, É. (2006). *Escherichia coli*: on-farm contamination of animals. *Revue Scientifique at Technique Office International des Epizooties*, 25 (2): 555-569.

Fernández, C.F. (2004). Aplicaciones de las técnicas de PCR a la epidemiología molecular de las enfermedades infecciosas. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 22 (6): 355-360.

Fotadar, U.; Zaveloff, P. y Terracio L. (2005). Growth of *Escherichia coli* at elevated temperatures. *Journal of Basic Microbiology*, 45 (5): 403-404.

Gadea, M.P.; Varela, G.; Bernardá, M.; Sirok, A.; Mota, M.I., Sabelli, R.; *et al.* (2004). Primer aislamiento en Uruguay de *Escherichia coli* productora de toxina Shiga del serotipo O157:H7 en una niña con síndrome urémico hemolítico. *Revista Médica del Uruguay*, 20: 79-81.

García, A.M.; García, E.; Hernández, A.; Ruiz, J.; Yagüe, G.; Herrero, J.A.; *et al.* (2011). Bacteriemias por *Escherichia coli* productor de betalactamasas de espectro extendido (BLEE): significación clínica y perspectivas actuales. *Revista Española de Quimioterapia*, 24 (2): 57-66.

Gonzalez, F.; Pallecchi, L.; Rossolini, G.; y Araque, M. (2012). Plasmid-mediated quinolone resistance determinant *qnrB19* in non-typhoidal *Salmonella enterica* strains isolated in Venezuela. *Journal of Infection in Developing Countries*, 6 (5): 462-464.

Hannaoui, E.J.; Villalobos, L.B. y Martínez, R.E. (2009). *Escherichia coli* shigatoxigénica: Patogénesis, diagnóstico y tratamiento. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 29: 13-20.

Harada, S.; Ishii, Y. y Yamaguchi, K. (2008). Extended-spectrum β -lactamases: Implications for the Clinical Laboratory and Therapy. *Korean Journal of Laboratory Medicine*, 28: 401-412.

Herzer, P.J.; Inouye, S.; Inouye, M. y Whittam, T. (1990). Phylogenetic Distribution of Branched RNA-Linked Multicopy Single-Stranded DNA among Natural Isolates of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 172 (11): 6175-6181.

Heymann, D.L. (2011). *El control de las enfermedades transmisibles*. Washington, D.C.: OPS.

Hudault, S.; Guignot, J. y Servin, A. (2001). *Escherichia coli* strains colonizing the gastrointestinal tract protect germfree mice against *Salmonella typhimurium* infection. *Gut*, 49: 47-55.

Ingledeu, J.; Poole, R. (1984). The Respiratory Chains of *Escherichia coli*. *Microbiological Reviews*, 48 (3): 222-271.

Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas INEI-ANLIS "Carlos G. Malbrán". (2011). Manual de procedimientos: Detección de *Escherichia coli* productor de toxina Shiga O157 y no-O157 en alimentos por separación inmunomagnética y PCR. Buenos Aires: Argentina.

Johnson, J.R. (1991). Virulence Factors in *Escherichia coli* Urinary Tract Infection. *Clinical Microbiology Reviews*, 4: 80-128.

Johnson, J.R. y Stell, A. (2000). Extended Virulence Genotypes of *Escherichia coli* Strains from Patients with Urosepsis in Relation to Phylogeny and Host Compromise. *The Journal of Infectious Diseases*, 181: 261- 272.

Johnson, J.R. (2002). *Evolution of pathogenic Escherichia coli*. En M.S. Donnenberg, *Escherichia coli: Virulence mechanisms of a versatile pathogen* (pp. 55-77). USA: Elsevier Science Inc.

- Johnson, J.; Kuskowski, M.; Smith, K.; O'Bryan, T. y Tatini S. (2005). Antimicrobial-Resistant and Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli* in Retail Foods. *The Journal of Infectious Diseases*, 191: 1040–1049.
- Johnson, T.; Logue, C.; Johnson, J.; Kuskowski, M.; Sherwood, J.; Barnes, J.; *et al.* (2012). Associations Between Multidrug Resistance, Plasmid Content, and Virulence Potential Among Extraintestinal Pathogenic and Commensal *Escherichia coli* from Humans and Poultry. *Foodborne Pathogens and Disease*, 9 (1): 37-46.
- Jure, M.A.; Condorí, S.; Leotta, G.A.; Chinen, I.; Miliwebsky, E.; Allori, E.; *et al.* (2010). Detección, aislamiento y caracterización de *Escherichia coli* productor de toxina Shiga a partir de carne molida fresca proveniente de carnicerías de Concepción, provincia de Tucumán. *Revista Argentina de Microbiología*, 42: 284-287.
- Kaper, J.B.; Nataro, J.P.; Mobley, H.L.T. (2004). Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature*, 2: 123-140.
- Karisik, E.; Ellington, M.; Livermore, D. y Woodford, N. (2008). Virulence factors in *Escherichia coli* with CTX-M-15 and other extended-spectrum β -lactamases in the UK. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 61: 54-58.
- Kmet, V.; Drugdova, Z.; Kmetova, M. y Stanko, M. (2013). Virulence and antibiotic resistance of *Escherichia coli* isolated from rooks. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 20 (2): 273–275.
- Kojima, A.; Ishii, Y.; Ishihara, K.; Esaki, H.; Asai, T.; Oda, Ch.; *et al.* (2005). Extended-spectrum-lactamase-producing *Escherichia coli* strains isolated from farm animals from 1999 to 2002: Report from the Japanese Veterinary Antimicrobial Resistance Monitoring Program. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49 (8): 3533–3537.

- Koneman, E.L.; Procop, G.W.; Schreckenberger, P.C.; Woods, G.L.; Janda, W.M.; Allen, S.D., *et al.* (2008). *Diagnóstico Microbiológico: texto y atlas en color*. Buenos Aires: Médica Panamericana.
- Lavilla, S.; González, J.J.; Miró, E.; Domínguez, A.; Llagostera, M.; Bartolomé, R.M.; *et al.* (2008). Dissemination of extended-spectrum betalactamase-producing bacteria: the food-borne outbreak lesson. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 61: 1244- 1251.
- Leedom, J. (2006). Milk of nonhuman origin and infectious diseases in humans. *Clinical Infectious Diseases*, 43: 610–615.
- Le Gall, T.; Clermont, O.; Gouriou, S.; Picard, B.; Nassif, X.; Denamur, E.; *et al.* (2007). Extraintestinal virulence is a coincidental by-product of commensalism in B2 phylogenetic group *Escherichia coli* strains. *Molecular Biology and Evolution*, 24: 2373-2384.
- Leimbach, A.; Hacker, J. y Dobrindt, U. (2013). *E. coli* as an all-rounder: the thin line between commensalism and pathogenicity. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 358: 3-32.
- Levine, M.M. (1987). *Escherichia coli* that cause diarrhea: enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic, and enteroadherent. *Journal of Infectious Diseases*, 155: 377-89.
- Lozano, D.; Cisneros, J.; Becerril, B.; Cuberos, L.; Prados, T.; Ortíz, C.; *et al.* (2002). Comparison of a Repetitive extragenic palindromic sequence-based PCR method and clinical and microbiological methods for determining strain sources in cases of nosocomial *Acinetobacter baumannii* bacteremia. *Journal of Clinical Microbiology*, 40 (12): 4571–4575
- Ma, L.; Chang, F.Y.; Fung, C.P.; Chen, T.L.; Lin, J.C.; Lu, P.L.; *et al.* (2005). Variety of TEM, SHV, and CTX-M type beta-lactamases presente in

recent clinical isolates of *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* and *Enterobacter cloacae* from Taiwan. *Microbial Drug Resistance*, 11: 31-39.

Mandell, G.; Bennet, J. y Dollin, R. (2006). *Enfermedades infecciosas: Principios y Prácticas*. España: Elsevier.

Mantilla, J.; Barreto, E.; Reguero, M. y Velandia, D. (2009) Identificación por PCR- SSCP de genes de cefotaximasas en aislamientos hospitalarios de *Enterobacteriaceae*. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 11 (2): 57-65.

Margall, N.; Domínguez, A.; Prats, G. y Salleras, L. (1997). *Escherichia coli* Enterohemorrágica. *Revista Española de Salud Pública*, 71 (5): 437-443.

Máttar, S. (2000). Utilidad de la biología molecular en el estudio de las zoonosis. *Revista MVZ-CORDOBA*, 5 (1): 46-50.

Máttar, S. y Martínez, P. (2007). Emergencia de la resistencia antibiótica debida a las β -lactamasas de espectro extendido (BLEE): detección, impacto clínico y epidemiología. *Revista de la Asociación Colombiana de Infectología*, 11(1): 23-35.

Maynard, C.; Bekal, S.; Sanschagrín, F.; Levesque, R.; Brousseau, R.; Masson, L., *et al.* (2004). Heterogeneity among Virulence and Antimicrobial Resistance Gene Profiles of Extraintestinal *Escherichia coli* Isolates of Animal and Human Origin. *Journal of Clinical Microbiology*, 42 (12): 5444–5452.

Millán, Y.; Hernández, E.; Millán, B.; y Araque, M. (2014). Distribución de grupos filogenéticos y factores de virulencia en cepas de *Escherichia coli* uropatógena productora de beta-lactamasa CTX-M-15 aisladas de

pacientes de la comunidad en Mérida, Venezuela. *Revista Argentina de Microbiología*, 46 (3):1-7

Molina, N.; Millán, B. y Araque, M. (2010). Indicadores de calidad sanitaria y fenotipificación de *Salmonella entérica* aislada de pollo crudo comercializado en el área urbana de Mérida, Venezuela. *Revista de la Asociación Colombiana de Infectología*, 14 (3): 174-185.

Mosquito, S.; Ruiz, J.; Bauer, J.L. y Ochoa, T.J. (2011). Mecanismos Moleculares de Resistencia Antibiótica en *Escherichia coli* asociadas a diarrea. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 28(4): 648-656.

Nakano, M.; Yamamoto, S.; Terai, A.; Ogawa, O.; Makino, S.; Hayashi, H.; *et al.* (2001). Structural and sequence diversity of the pathogenicity island of uropathogenic *Escherichia coli* which encodes the USP protein. *Fems Microbiology Letter*, 205: 71-76.

Narváez, C.; Carruyo, G.; Moreno, M.; Rodas, A.; Hoet, A. y Wittum, T. (2007). Aislamiento de *Escherichia coli* O157:H7 en muestras de heces de ganado bovino doble propósito del municipio Miranda, estado Zulia, Venezuela. *Revista Científica*, 17: 239-245.

Nataro, J.P. y Kaper, J.B. (1998). Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews*, 11(1): 142-201.

Obeng, A.; Rickard, H.; Ndi, O.; Sexton, M. y Barton, M. (2012). Antibiotic resistance, phylogenetic grouping and virulence potential of *Escherichia coli* isolated from the faeces of intensively farmed and free range poultry. *Veterinary Microbiology*, 154: 305–315.

Organización Mundial de la Salud. (2000). "Global principles for the containment of antimicrobial resistance in animals intended for food". WHO, Geneva, Switzerland.

- Orskov, F. (1973). International *Escherichia* Centre (WHO). Comunicación personal. Dinamarca: Copenhagen.
- Pacheco, C. y Felipe, I. (1991). Características patogénicas de *Escherichia coli*. *Semina*, 12 (2): 83-90.
- Paton, A.W. y Paton, J.C. (1998). Detection and Characterization of Shiga Toxigenic *Escherichia coli* by Using Multiplex PCR Assays for *stx1*, *stx2*, *eaeA*, Enterohemorrhagic *E. coli hlyA*, *rfbO111*, and *rfbO157*. *Journal of Clinical Microbiology*, 36 (2): 598-602.
- Perozo, M.A.; Castellano, G.M.; Ginestre, P.M. y Harris, B. (2007). Caracterización Molecular y Detección de Betalactamasas de Espectro Extendido en Cepas de *E. coli* y *K. pneumoniae* aisladas en las Unidades de Cuidados Intensivos de un Hospital Universitario. *Kasmera*, 35 (2): 91 - 106.
- Puig, Y.P.; Espino, H.M. y Leyva, C.L. (2011). Resistencia antimicrobiana en *Salmonella* y *E. coli* aisladas de alimentos: revisión de la literatura. *Panorama Cuba y Salud*, 6 (1): 30-38.
- Rashid, M.; Kotwal, S.; Malik, M. y Singh, M. (2013). Prevalence, genetic profile of virulence determinants and multidrug resistance of *Escherichia coli* isolates from foods of animal origin. *Veterinary World*, 6 (3): 139-142.
- Ribeiro, M.; Yano, T. y Da Silva, D. (2008). Genotypic characterization of virulence factors in *Escherichia coli* strains from patients with cystitis. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 50 (5): 255-260.
- Riley, L.W.; Remis, R.S.; Helgeson, McGee, H.B.; Wells, J.G.; Davis, B.R., *et al.* (1983). Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia*

coli O157:H7 serotype. *New England Journal of Medicine*, 308, 681-685.

Ríos, M.; Prado, V.; Trucksis, M.; Arellano, C.; Borie, C.; Alexandre, M., *et al.* (1999). Clonal diversity of Chilean isolates of enterohemorrhagic *Escherichia coli* from patients with hemolytic-uremic syndrome, asymptomatic subjects, animal reservoirs, and food products. *Journal of Clinical Microbiology*, 37 (3): 778-781.

Rivas, M.; Sosa, E.S.; Rangel, J.; Caletti, M.G.; Vallés, P.; Mead, P.; *et al.* (2008). Risk factors associated with Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections, Argentina. *Emerging Infectious Diseases*, 14 (5): 763-771.

Rodríguez, G. (2002). Principales características y diagnósticos de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. *Salud Pública México*, 44 (5): 464-475.

Rogers, K. (2011). *Evil E. coli*. Recuperado el 12 de Enero de 2013, de <http://www.britannica.com/blogs/2011/06/evil-coli/>.

Russo, T.A. y Johnson, J.R. (2000). Proposal for a New Inclusive Designation for Extraintestinal Pathogenic Isolates of *Escherichia coli*: ExPEC. *The Journal of Infectious Diseases*, 181: 1753-1754.

Russo, T.A. y Johnson, J.R. (2003). Medical and economic impact of extraintestinal infections due to *Escherichia coli*: focus on an increasingly important endemic problem. *Microbes and Infection*, 5: 449-456.

Saleh, I.; Zouhairi, O.; Alwan, N.; Hawi, A.; Barbour, E. y Harakeh, S. (2009). Antimicrobial resistance and pathogenicity of *Escherichia coli* isolated from common dairy products in the Lebanon. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 103: 39-52.

- Schmidt, H.; Scheef, J.; Morabito, S.; Caprioli, A.; Wieler, L.H. y Karch, H. (2000). A New Shiga Toxin 2 Variant (Stx2f) from *Escherichia coli* Isolated from Pigeons. *Applied and Environmental Microbiology*, 66: 1205-1208.
- Smith, J.; Fratamico, P. y Gunthe, N. (2007). Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli*. *Foodborne Pathogens Disease*, 4 (2): 134-163.
- Sneath, P.; Mair, N.; Sharpe, M. y Holt, J. (1984). *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Baltimore: Williams and Wilkins.
- Soto, C. (2006). Expresión de factores de virulencia en cepas extraintestinales de *Escherichia coli*. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 24 (8): 479- 480.
- Soto, S.M.; Jiménez de Anta, M.T. y Vila, J. (2006). Quinolones Induce Partial or Total Loss of Pathogenicity Islands in Uropathogenic *Escherichia coli* by SOS-Dependent or -Independent Pathways, Respectively. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50 (2): 649-653.
- Sousa, C.P. (2006). The versatile strategies of *Escherichia coli* pathotypes: a mini review. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*, 12: 363-373.
- Struelens, M. (1998). Molecular epidemiologic typing systems of bacterial pathogens: current issues and perspectives. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 93(5): 581-585.
- Tamang, M.; Nam, H.; Gurung, M.; Jang, G.; Kim, S.; Jung, S.; *et al.* (2013). Molecular characterization of CTX-M β -lactamase and associated addiction systems in *Escherichia coli* circulating among cattle, farm workers, and the farm environment. *Applied and Environmental Microbiology*, 79 (13): 3898 –3905.

- Tham, J.; Walder, M.; Melander, E. y Odenhoit, I. (2012). Prevalence of extended-spectrum beta-lactamase-producing bacteria in food. *Infection and Drug Resistance*, 25: 143-147.
- Todar, K. (2008). Pathogenic *E. coli*. USA: Online textbook of bacteriology. Recuperado el 11 de Diciembre del 2012, de <http://textbookofbacteriology.net/e.coli.html>.
- Toro, E.S.; Miró, A.O.; Ugarte, C.I. y Larrea, F.J. (2010). Electroforesis de campo eléctrico pulsado en la tipificación molecular de cepas aisladas de un brote de Salmonelosis ocasionado por consumo de queso contaminado con *Salmonella Javiana*. *Revista del Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel"*, 41 (2): 22-26.
- Vierstraete, A. (1999). *Principle of the PCR*. Recuperado el 17 de Febrero del 2013, de <http://users.ugent.be/~avierstr/principles/pcr.html>.
- Vincent, C.; Boerlin, P.; Daignault, D.; Dozois, C.; Dutil, L.; Galanakis, C.; et al. (2010). Food Reservoir for *Escherichia coli* Causing Urinary Tract Infections. *Emerging Infectious Diseases*, 16 (1): 88-95.
- Virpari, P.; Nayak, J.; Brahmabhatt, M. y Thaker, H. (2013). Study on isolation, molecular detection of virulence gene and antibiotic sensitivity pattern of *Escherichia coli* isolated from milk and milk products. *Veterinary World*, 6 (8): 541-545.
- Von Baum, H. y Marre, R. (2005). Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* and therapeutic implications. *International Journal of Medical Microbiology*, 295: 503-511.
- Wang, J.; Stephan, R.; Karczmarczyk, M.; Yan, Q.; Hächler, H. y Fanning, S. (2013). Molecular characterization of *bla*_{ESBL}-harboring conjugative plasmid identified in multi-drug resistant *Escherichia coli* isolated from food-producing animals and healthy humans. *Frontier in Microbiology*, 4: 1-9.

Watanabe, H.; Wada, A.; Inagaki, Y.; Itoh, K. y Tamura K. (1996). Outbreaks of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 infection by two different genotype strains in Japan. *Lancet*, 348: 381-382.

Weiler, N.; Rivas, M.; Zárate, N.; Miliwebsky, E.; Álvarez, M.; Chinen, I.; *et al.* (2005). *Escherichia coli* O157:H7 associated with diarrhea cases in Asunción, Paraguay. *Emerging Infectious Diseases*. Enviado.

Wilson, J.W.; Schurr, M.J.; LeBlanc, C.L.; Ramamurthy, R.; Buchanan, K.L. y Nickerson, C.A. (2002). Mechanisms of bacterial pathogenicity. *Postgraduate Medical Journal*, 78: 216–224.

World Health Organization. (1997). Prevention and control of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) infections. *Report of a WHO Consultation*. Geneva: World Health Organization.

Yang, H.; Vinopal, R.; Grasso, D. y Smets, B. (2004). High Diversity among environmental *Escherichia coli* isolates from a bovine feedlot. *Applied and Environmental Microbiology*, 70 (3): 1528–1536.

Zalewska, B.; Wilkanowiczs, S.; Piatek, R. y Kur, J. (2009). Biofilm formation as a virulence determinant of uropathogenic *Escherichia coli* Dr Strains. *Polish Journal of Microbiology*, 58 (3): 223-229.

Zhang, W.; Bielaszewska, M.; Thorsten, K. y Karch, H. (2002). Identification, characterization, and distribution of a Shiga toxin 1 gene variant (stx1c) in *Escherichia coli* strains isolated from humans. *Journal of Clinical Microbiology*, 40: 1441-1446.



Infectio

Asociación Colombiana de Infectología

www.elsevier.es/infectio



ORIGINAL

Caracterización molecular de cepas de *Escherichia coli* aisladas de productos lácteos artesanales elaborados en Mérida, Venezuela

Leidys Guillén, Beatriz Millán, y María Araque*

Laboratorio de Microbiología Molecular, Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela

Recibido el 5 de febrero de 2014; aceptado el 30 de abril de 2014

PALABRAS CLAVE

Escherichia coli;
Grupos filogenéticos;
Caracterización molecular;
Productos lácteos

Resumen

Objetivo: Determinar los grupos filogenéticos y la diversidad clonal de cepas de *Escherichia coli* aisladas de productos lácteos artesanales elaborados y comercializados en Mérida, Venezuela.

Materiales y métodos: Se analizaron 45 cepas de *E. coli* provenientes de productos lácteos artesanales (crema de leche, cuajada y requesón). Estas cepas se aislaron según la norma de la Comisión Venezolana de Normas Industriales (COVENIN) y la identificación se llevó a cabo por metodologías convencionales. La susceptibilidad antimicrobiana se determinó mediante la técnica de difusión del disco, y los fenotipos con susceptibilidad intermedia o resistente fueron confirmados por concentración inhibitoria mínima (CIM). El grupo filogenético se realizó mediante amplificación por PCR de los genes *chuA*, *yjaA* y del fragmento TspE4.C2 y la tipificación de las cepas por Rep-PCR.

Resultados: El 73,3% (33/45) de las cepas fueron susceptibles a todos los antibióticos probados y el 24,4% (11/45) presentaron resistencia a la ampicilina. La mayoría de las cepas resistentes fueron aisladas de requesón. El 82,2% de las cepas fueron ubicadas en el filogrupo A y el 8,9% en los grupos B1 y D, respectivamente. El filogrupo B2 no fue detectado. La tipificación por Rep-PCR de las cepas demostró una estructura poblacional heterogénea.

Conclusión: La caracterización molecular de estas cepas demostró que no están relacionadas clonalmente y en su mayoría se distribuyeron entre los filogrupos correspondientes a cepas comensales de baja patogenicidad. La detección de *E. coli* en alimentos lácteos indica una contaminación de origen fecal, que eventualmente podría estar asociada con la presencia de otros enteropatógenos.

© 2014 ACIN. Publicado por Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: araquemc@ula.ve (M. Araque).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.infect.2014.04.004>

0123-9392/© 2014 ACIN. Publicado por Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

Cómo citar este artículo: Guillén L, et al. Caracterización molecular de cepas de *Escherichia coli* aisladas de productos lácteos artesanales elaborados en Mérida, Venezuela. *Infectio*. 2014. <http://dx.doi.org/10.1016/j.infect.2014.04.004>

KEYWORDS

Escherichia coli;
Phylogenetic groups;
Molecular
characterization;
Dairy products

Molecular characterization of *Escherichia coli* strains isolated from homemade dairy foods produced in Mérida, Venezuela

Abstract

Objective: To determine phylogenetic groups and clonal diversity of *Escherichia coli* strains isolated from several homemade dairy foods produced and marketed in Mérida, Venezuela.

Materials and methods: Forty-five *E. coli* strains isolated from homemade dairy products (cream cheese, curd and cottage cheese) were analyzed. These strains were isolated according to procedures established by the Venezuelan Commission of Industrial Norms (COVENIN) and identification was carried out using conventional methods. Antimicrobial susceptibility was determined by the disk diffusion method and phenotypes with intermediate or resistant susceptibility were confirmed by minimum inhibitory concentration (MIC). Phylogenetic groups were identified by PCR amplification of *chuA*, *yjaA* genes and the TspE4.c2 DNA fragment, while molecular typing was carried out by Rep-PCR.

Results: Of the 45 isolates, 33 (73.3%) were susceptible to all antibiotics tested while 11 (24.4%) were ampicillin-resistant. The phylogenetic group A was the most common (82.2%), followed by B1 and D (8.9%, respectively). The phylogroup B2 was not detected and Rep-PCR typing of *E. coli* strains showed a heterogeneous population structure.

Conclusion: The molecular characterization of *E. coli* strains showed that they were clonally unrelated and mostly distributed among phylogenetic groups that belong to low pathogenicity commensal strains. Detection of *E. coli* strains in dairy foods indicates a contamination of fecal origin, which could be associated with the presence of other enteric pathogens.

© 2014 ACIN. Published by Elsevier España, S.L. All rights reserved.

Introducción

Escherichia coli es un microorganismo que se encuentra en el intestino de humanos y animales formando parte de la microbiota normal¹. La presencia de esta bacteria en alimentos indica generalmente una contaminación directa o indirecta de origen fecal, que en algunas ocasiones pudiera estar acompañada de otros patógenos intestinales. La detección y cuantificación de *E. coli* constituye uno de los parámetros importantes para evaluar la calidad sanitaria de un alimento^{1,2}. Algunos derivados lácteos que no son sometidos a procesos de higienización pueden tener una cantidad permisible de *E. coli*, sin que ello signifique necesariamente un peligro para el consumidor o una disminución en la calidad de estos productos³. Sin embargo, valores por encima de los límites recomendados para *E. coli* como indicador pueden advertir sobre una inadecuada manipulación y condiciones sanitarias deficientes durante la producción, almacenamiento, transporte y comercialización de estos alimentos^{2,3}.

E. coli tiene la habilidad de sobrevivir y desarrollarse en el medio ambiente gracias a su versatilidad para aprovechar distintas fuentes de energía, además de ser un microorganismo poco exigente en sus requerimientos nutricionales. Esta capacidad de adaptación a diversas condiciones favorece su integración a comunidades microbianas en una variedad de ambientes⁴. Esta propiedad de *E. coli* constituye uno de los factores que facilita la contaminación de alimentos de origen animal y vegetal, frutas y sus derivados, fuentes de agua potable, así como su intervención y/o persistencia en cualquiera de las etapas de la cadena alimentaria^{4,5}.

Aunque *E. coli* es el principal componente aerobio de la flora intestinal del hospedero humano, sus

interrelaciones con este permiten separarla en 3 grandes grupos: cepas comensales, patotipos intestinales y patógenos extraintestinales⁶. A su vez, con base en el análisis de isoenzimas (MLEE, del inglés *Multilocus Enzyme Electrophoresis*) las cepas de *E. coli* son designadas en 4 grupos filogenéticos principales: A, B1, B2 y D^{6,7}. Las cepas comensales se ubican principalmente en los filogrupos A y B1, mientras que las patógenas extraintestinales se agrupan en el B2 y el D, y los patotipos intestinales, en cualquiera de los filogrupos⁶⁻⁸. Algunos estudios señalan que las cepas de *E. coli* aisladas del ambiente pertenecen al grupo filogenético B1^{4,6}, mientras que cepas contaminantes de alimentos pueden encontrarse en cualquiera de los 4 filogrupos⁸.

Por otra parte, *E. coli* es considerado como un reservorio y transmisor de genes a otros miembros de la microbiota humana o animal. Por consiguiente, el tracto gastrointestinal se convierte en el nicho ideal para la transferencia a gran escala de genes de resistencia antimicrobiana y de factores de patogenicidad^{8,9}. De hecho, en los últimos años, se ha registrado un aumento importante de cepas de *E. coli* resistentes a los antibióticos provenientes de animales sanos y sus productos destinados al consumo humano¹⁰⁻¹³. Esta resistencia, al estar codificada principalmente en elementos genéticos móviles, facilita su diseminación en diferentes ecosistemas, incluyendo el humano^{9,13}. En este sentido, la Organización Mundial de la Salud recomienda monitorizar la resistencia antimicrobiana en una «bacteria indicadora» como *E. coli* para analizar los fenotipos y mecanismos de resistencia que pudieran diseminarse a través de alimentos de origen animal y sus derivados, en diferentes áreas geográficas¹⁴.

Actualmente, las técnicas moleculares que analizan las características o polimorfismos genéticos de microorganismos han ampliado notablemente el campo de la tipificación

Cómo citar este artículo: Guillén L, et al. Caracterización molecular de cepas de *Escherichia coli* aisladas de productos lácteos artesanales elaborados en Mérida, Venezuela. *Infectio*. 2014. <http://dx.doi.org/10.1016/j.infect.2014.04.004>

de bacterias de interés epidemiológico; dentro de estas técnicas destacan por su alto poder de discriminación el análisis del polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP, del inglés *Restriction Fragment Length Polymorphism*) y la electroforesis en gel de campos pulsantes (PFGE, del inglés *Pulsed-Field Gel Electrophoresis*)^{1,13}. Sin embargo, las técnicas de tipificación basadas en la amplificación de ácidos nucleicos mediante PCR son extensamente utilizadas, por ser menos laboriosas, ya que no dependen de enzimas ni de equipos de electroforesis especiales y tienen un aceptable nivel discriminatorio y buena reproducibilidad, y además son de relativo bajo costo. Entre las técnicas alternativas se encuentra la amplificación de elementos repetitivos (Rep-PCR, del inglés *repetitive element PCR fingerprinting*), para la rápida obtención de huellas genómicas¹⁵. En el caso de *E. coli*, esta técnica tiene la finalidad de determinar la relación y origen clonal de cepas de la misma especie, determinar el número de clones circulantes, reconocer brotes infecciosos de casos no relacionados, así como evaluar la eficacia de las medidas de control dirigidas a evitar la diseminación de clonas con características particulares de patogenicidad o resistencia¹⁵⁻¹⁷.

Existen numerosas investigaciones que reportan las características moleculares de cepas de *E. coli* aisladas de muestras clínicas de humanos y de animales enfermos, y una gran variedad de trabajos analizan el grado de relaciones genéticas entre cepas patógenas en animales con las de origen humano^{13,18,19}. Por el contrario, los estudios que describen las propiedades genéticas de *E. coli* aisladas de alimentos de origen animal destinados al consumo humano, especialmente de los que no tienen un procesamiento industrial, son escasos^{11,20,21}. Particularmente, en Venezuela existen pocos reportes que involucren técnicas moleculares para estudiar la diversidad genética y la importancia epidemiológica de bacterias presentes en alimentos procesados artesanalmente¹⁶. Por tal motivo, el objetivo de este estudio fue determinar los grupos filogenéticos y la diversidad clonal de cepas de *E. coli* aisladas de productos lácteos procesados artesanalmente y comercializados en Mérida, Venezuela.

Materiales y métodos

Productos lácteos

Se recolectaron 15 muestras de productos lácteos artesanales distribuidas de la siguiente manera: 5 de crema de leche, 5 de cuajada y 5 de quesón. Estas muestras fueron adquiridas de manera aleatoria a partir de lotes no relacionados y en establecimientos comerciales diferentes ubicados en el área urbana del Municipio Libertador del estado Mérida, Venezuela, durante el período enero a julio 2013. Los productos lácteos seleccionados oscilaron entre 250 y 500 g por presentación.

Aislamiento e identificación de las cepas de *Escherichia coli*

Se tomaron porciones de diferentes sitios del producto lácteo para tener una muestra representativa. Se pesaron 10 g de cada muestra y se homogeneizaron en 90 ml de agua

peptonada al 0,1% (dilución 10^{-1}), siguiendo las recomendaciones de la Comisión Venezolana de Normas Industriales (COVENIN)²². Luego, con la finalidad de mejorar la recuperación de las cepas de *E. coli* se realizó una incubación por 2 h a 37 °C, y a partir de esta solución se realizaron 3 diluciones (10^{-2} a 10^{-4}) bajo las mismas condiciones. Posteriormente, de cada dilución se tomó 1 ml para inocular las placas rehidratables tipo Petrifilm *E. coli*/coliformes (3M™, EE. UU.)²³ y se incubaron a 35 °C por 18 a 24 h, siguiendo las recomendaciones del proveedor.

Se escogieron todas las placas que mostraron un crecimiento entre 4 a 10 unidades formadoras de colonias (UFC) de *E. coli*; estas colonias fueron reconocidas por el color azul y su asociación a la producción de gas. A partir de estas placas, se seleccionaron al azar 4 colonias, las cuales fueron extraídas con el asa en punta, colocadas en caldo BHI (BBL, Cockeysville, Md, EE. UU.) e incubadas a 36 °C por 18-24 h. Luego del crecimiento en dicho caldo y subcultivando en agar Levine o MacConkey (Himedia, Mumbai, India) a 36 °C por 18-24 h, se seleccionaron las colonias fermentadoras de la lactosa que tuviesen morfología sugestiva de *E. coli*, y a estas se les confirmó su identificación mediante el sistema de galerías API 20E (BioMérieux, Marcy l'Etoile, Francia), de acuerdo a lo descrito por el proveedor.

Adicionalmente, a todas las cepas de *E. coli* seleccionadas se les determinó bioquímicamente la fermentación del sorbitol. Las variantes fenotípicas sorbitol negativas fueron sometidas a ensayos de aglutinación con antiseros específicos (AntiColi O157:K-, Sifin Berlin, Alemania) con el objeto de descartar la presencia de una posible *E. coli* O157:H7. En estos ensayos se utilizaron como cepas control: *E. coli* ATCC 25922 y *E. coli* O157:H7 (CVC1931), siguiendo el protocolo descrito por el proveedor.

Pruebas de susceptibilidad antimicrobiana

La susceptibilidad antimicrobiana de las cepas de *E. coli* se realizó utilizando el método de difusión por disco, de acuerdo con los criterios del *Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)*²⁴. Los discos de antibióticos utilizados fueron (BBL): ampicilina (10 µg), amoxicilina/ácido clavulánico (30/15 µg), ceftazidima (30 µg), cefotaxima (30 µg), gentamicina (10 µg), tobramicina (10 µg), amikacina (30 µg), ciprofloxacino (5 µg), ácido nalidíxico (30 µg), imipenem (10 µg), meropenem (10 µg) y ertapenem (10 µg). Las cepas de *E. coli* que resultaron con susceptibilidad intermedia y/o resistente a los antibióticos probados se les confirmó el fenotipo mediante la determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM) en agar, siguiendo las recomendaciones del CLSI²⁰. En estos ensayos se utilizó como cepa control *E. coli* ATCC 25922.

Extracción del ADN

La extracción y preparación del ADN genómico se realizó mezclando varias colonias provenientes de cultivos frescos en 200 µl de agua destilada estéril. Estas suspensiones se colocaron en congelación (-20 °C) durante 30 min y luego se sometieron a ebullición durante 15 min. Los residuos celulares se separaron por centrifugación (13.000 rpm durante

Cómo citar este artículo: Guillén L, et al. Caracterización molecular de cepas de *Escherichia coli* aisladas de productos lácteos artesanales elaborados en Mérida, Venezuela. *Infectio*. 2014. <http://dx.doi.org/10.1016/j.infect.2014.04.004>

Tabla 1 Susceptibilidad de 45 cepas de *Escherichia coli* aisladas de productos lácteos artesanales frente a 12 agentes antimicrobianos

Antibiótico	Susceptibilidad antimicrobiana, n (%)		
	Sensible	Intermedio ^a	Resistente ^a
Ampicilina	34 (75,5)	0	11 (24,4)
Amoxicilina/ácido clavulánico	43 (95,6)	0	2 (4,4)
Cefotaxima	45 (100)	0	0
Ceftazidima	45 (100)	0	0
Imipenem	45 (100)	0	0
Meropenem	45 (100)	0	0
Ertapenem	45 (100)	0	0
Amikacina	45 (100)	0	0
Gentamicina	41 (91,1)	0	4 (8,9)
Tobramicina	41 (91,1)	0	4 (8,9)
Ácido nalidíxico	44 (97,8)	0	1 (2,2)
Ciprofloxacino	37 (82,2)	8 (17,8)	0

^a Los fenotipos fueron confirmados por concentración inhibitoria mínima: ampicilina > 64 µg/ml; amoxicilina/ácido clavulánico > 64/32 µg/ml; gentamicina y tobramicina > 32 µg/ml; ácido nalidíxico > 32 µg/ml; ciprofloxacino 2 µg/ml.

235 5 min a temperatura ambiente) y el ADN disuelto en el sobre-
236 nadante se recuperó en un tubo eppendorf estéril, el cual
237 se almacenó a -20 °C hasta el momento de su uso¹⁷.

238 Determinación de los grupos filogenéticos de 239 *Escherichia coli*

240 Las cepas fueron clasificadas dentro de los grupos filogenéti-
241 cos (A, B1, B2 y D) de acuerdo con la presencia de los genes
242 *chuA*, *yjaA* y el fragmento génico TspE4.C2, mediante una
243 PCR múltiple utilizando los iniciadores y condiciones des-
244 critas previamente²⁵. La mezcla de amplificación se realizó
245 en un volumen final de 25 µl y estuvo compuesta por: 2,5 µl
246 del buffer de reacción (10X), 1,5 µl de MgCl₂ (50 mM), 1,5 µl
247 de dNTPs (10 mM; Bioneer, Daejeon, Corea), 2,5 µl de cada
248 iniciador (10 pmol/µl), 0,3 µl de la *Taq* polimerasa (5 U/µl;
249 Bioneer), 2,2 µl de agua bidestilada ultrapura y 2 µl del ADN
250 extraído. Los resultados fueron interpretados con base en el
251 esquema de Clermont et al.²⁵ mediante la ausencia (-) o pre-
252 sencia (+) de los elementos antes descritos: grupo A: *chuA*-
253 y TspE4.C2-; B1: *chuA*- y TspE4.C2+; B2: *chuA*+ y *yjaA*+ y
254 el filogrupo D: *chuA*+ y *yjaA*-. Para estos ensayos se utiliza-
255 ron como cepas control *E. coli* LMM36-ULA (*chuA*+ y *yjaA*+)
256 y *E. coli* LMM32-ULA (TspE4.C2+).

257 Tipificación de *Escherichia coli* por Rep-PCR

258 La relación clonal entre las cepas fue determinado por
259 la amplificación de secuencias repetitivas por PCR (Rep-
260 PCR) a partir del ADN total, utilizando los iniciadores:
261 REP-1 F: 5'- IIIIGCGCCGICATCAGGC-3'; REP-2 R: 5'-
262 ACGTCTTATCAGGCCTAC-3' y las condiciones descritas por
263 Lozano et al.²⁶. La mezcla de reacción para la Rep-PCR se
264 realizó en un volumen final de 25 µl y estuvo constituida por
265 2,5 µl de buffer (10X), 2,5 µl de MgCl₂ (50 mM), 3 µl de dNTPs
266 (10 mM), 3 µl de cada uno de los iniciadores (10 pmol/µl),
267 0,5 µl de *Taq* polimerasa (5U/µl; Bioneer), 5,5 µl de
268 agua bidestilada estéril y 5 µl de ADN. Los productos de

amplificación se separaron en un gel de agarosa al 1,5%,
teñido con bromuro de etidio y fotografiados con el UVP
Biodoc-It System. Como marcador de peso molecular se uti-
lizó una escalera de 50 pb (Bioneer). Los patrones obtenidos
del Rep-PCR fueron analizados utilizando el Software Tree-
con 1.3b, el cual generó el dendrograma o árbol de similitud
para establecer las relaciones entre las cepas estudiadas.
Los patrones con coeficientes de similitud superior al 90%
fueron considerados relacionados clonalmente.

Resultados

Un total de 90 cepas de *E. coli* fueron aisladas a partir de
derivados lácteos artesanales. De estas, se seleccionaron
aleatoriamente 45 que correspondieron a 15 cepas por cada
grupo de producto lácteo: crema de leche, cuajada y reque-
són. Ninguna de las cepas seleccionadas resultó positiva
para la identificación del serotipo patógeno *E. coli* O157:H7
(datos no mostrados).

Los resultados de las pruebas de susceptibilidad realiza-
das en las 45 cepas de *E. coli* se muestran en la tabla 1.
El 73,3% (33/45) de las cepas fueron susceptibles a los 12
antibióticos probados. Las cefalosporinas de tercera gene-
ración (cefotaxima y ceftazidima), los carbapenemos y la
amikacina fueron los antibióticos con mayor actividad sobre
las cepas estudiadas (100%), seguido en orden de frecuencia
por ácido nalidíxico (97,8%; 44/45), amoxicilina/ácido cla-
vulánico (95,6%; 43/45), gentamicina y tobramicina (ambos
91,1%; 41/45). La resistencia a ampicilina se observó en el
24,4% de las cepas (11/45), mientras que el 8,9% (4/45)
fue resistente a gentamicina y tobramicina. La resistencia
a amoxicilina/ácido clavulánico y al ácido nalidíxico estuvo
representada por un bajo número de cepas (4,4% [2/45] y
2,2% [1/45], respectivamente). La susceptibilidad interme-
dia solo se evidenció con ciprofloxacino en 17,8% de las cepas
(8/45). Los fenotipos de multiresistencia se observaron en 5
cepas (11,1%) y estuvieron conformados por la asociación de
4 o 5 antibióticos, de los cuales la susceptibilidad interme-
dia a ciprofloxacino y la resistencia a ampicilina fueron los

Cómo citar este artículo: Guillén L, et al. Caracterización molecular de cepas de *Escherichia coli* aisladas de productos lácteos artesanales elaborados en Mérida, Venezuela. Infectio. 2014. <http://dx.doi.org/10.1016/j.infect.2014.04.004>

Tabla 2 Distribución de los patrones de resistencia y procedencia de las cepas de *Escherichia coli*

Cepa número	Marcadores de resistencia (n)	Patrón de resistencia	Procedencia
A19-3		AMP	Requesón
A25-4		CIP ⁱ	Crema de leche
A29-5	1	AMP	Requesón
A30-5		AMP	Requesón
A31-5		AMP	Requesón
A33-7		CIP ⁱ , AMP	Requesón
A36-7	2	CIP ⁱ , AMP	Requesón
A34-7		CIP ⁱ , AMP, AMC, NA	Requesón
A60-14		CIP ⁱ , AMP, CN, NN	Requesón
A61-14	4	CIP ⁱ , AMP, CN, NN	Requesón
A63-14		CIP ⁱ , AMP, CN, NN	Requesón
A62-14	55	CIP ⁱ , AMP, AMC, CN, NN	Requesón

AMC: amoxicilina/ácido clavulánico; AMP: ampicilina; CIPⁱ: ciprofloxacino susceptibilidad intermedia; CN: gentamicina; NA: ácido nalidixico; NN: tobramicina.

306 marcadores más frecuentes. Todas las cepas de *E. coli* con
 307 fenotipo resistente fueron aisladas de requesón, represen-
 308 tando el 73,3% (11/15) del total de cepas recuperadas en ese
 309 producto. Solo una cepa (A25-4) proveniente de crema de
 310 leche presentó susceptibilidad intermedia a ciprofloxacino
 311 (tabla 2).

312 En la figura 1a se muestra un gel electroforético
 313 representativo de los productos amplificados por PCR corres-
 314 pondientes a los genes *chuA* (279 pb) y *yjaA* (211 pb) y
 315 al fragmento de ADN TspE4.C2 (152 pb), cuya presencia o
 316 ausencia en las cepas de *E. coli* determinó la clasificación
 317 de los grupos filogenéticos A, B1, B2 y D. La distribución
 318 porcentual de los filogrupos en las 45 cepas de *E. coli* se
 319 presenta en la figura 1b. El 82,2% (37/45) de las cepas
 320 fueron ubicadas en el grupo filogenético A, mientras que
 321 los grupos B1 y D se distribuyeron en igual proporción
 322 (8,9% [4/45]). Sin embargo, cuando se estudió la frecuencia
 323 de los filogrupos de acuerdo con el origen o procedencia
 324 de la cepa, se encontró que el grupo A predominó en
 325 los 3 tipos de producto lácteo (crema de leche: 93,3%;
 326 requesón: 86,6%; cuajada: 66,7%). El filogrupo B1 tuvo una
 327 frecuencia del 13,3% en cepas aisladas de cuajada y del
 328 6,7% en crema de leche y requesón. Por el contrario,

el grupo D estuvo ausente en las cepas obtenidas a partir
 de crema de leche, pero su distribución se evidenció
 con mayor frecuencia en *E. coli* aisladas de cuajada (20%
 [3/15]). Ninguna de las cepas clasificó para el grupo B2
 (fig. 2).

Las relaciones genéticas de las cepas de *E. coli* y sus
 respectivas características fenotípicas se muestran en la
 figura 3. El 95,6% de las cepas estudiadas (43/45) se distri-
 buyeron en 2 grupos principales, A y B, los cuales mostraron
 niveles de similitud entre un 35 y un 58%, respectivamente.
 En el grupo A, específicamente en la rama i, se observaron
 2 subgrupos (IA-1 y IA-2) con aproximadamente un 95% de
 similitud. El IA-1 estaba conformado por 4 cepas aisladas de
 requesón y con al menos 4 marcadores de resistencia anti-
 microbiana comunes, y el IA-2 estaba integrado por 6 cepas
 (4 provenientes de cuajada y 2 de requesón), de las cuales 2
 mostraron entre 2 y 4 marcadores de resistencia y 4 fueron
 susceptibles. En el grupo B se observó un subgrupo (IB-1) con
 relaciones de similitud cercana al 95%, estructurado por 4
 cepas provenientes de crema de leche y sensibles a los anti-
 bióticos. Todas las cepas de *E. coli* que conformaron estos 3
 subgrupos (IA-1, IA-2 y IB-1) fueron clasificadas dentro del
 filogrupo A.

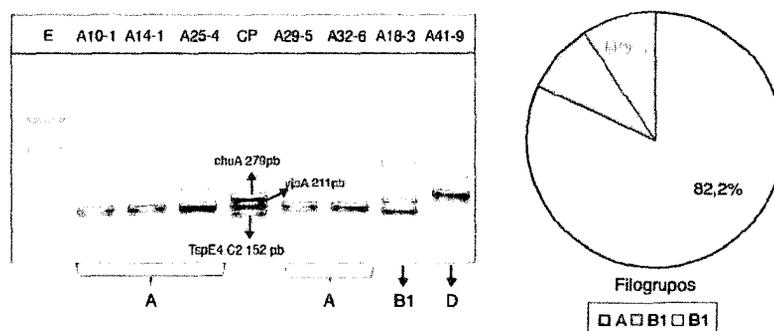


Figura 1 a) Gel electroforético representativo de la amplificación por PCR de los genes *chuA*, *yjaA* y del fragmento de ADN TspE4.C2 en cepas de *E. coli* aisladas de productos lácteos artesanales. CP: control positivo; E: marcador de peso molecular (100 pb). b) Distribución general de los grupos filogenéticos de *E. coli* aisladas de productos lácteos artesanales.

Cómo citar este artículo: Guillén L, et al. Caracterización molecular de cepas de *Escherichia coli* aisladas de productos lácteos artesanales elaborados en Mérida, Venezuela. *Infectio*. 2014. <http://dx.doi.org/10.1016/j.infect.2014.04.004>

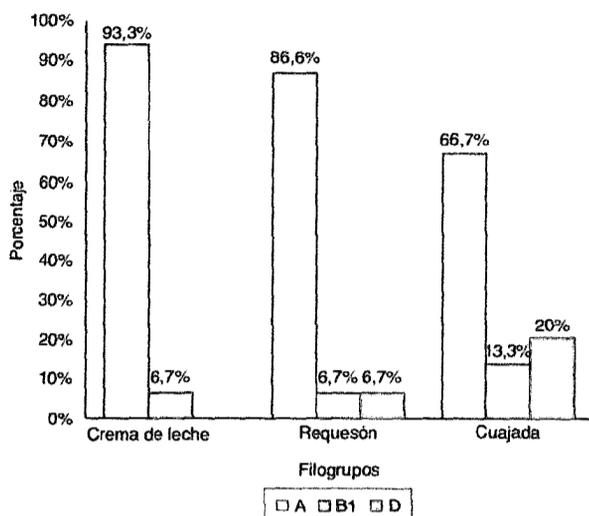


Figura 2 Distribución de los grupos filogenéticos de *E. coli* de acuerdo con el tipo producto lácteo de origen.

352 **Discusión**

353 *E. coli* es uno de los agentes biológicos que con mayor
 354 frecuencia se encuentra involucrado en la contaminación
 355 de alimentos. Particularmente la leche y sus productos

356 derivados no pasteurizados son potencialmente peligrosos
 357 por su alto riesgo de contaminación en todas las etapas de
 358 la producción²⁷. En este estudio se analizaron un conjunto
 359 provenientes de 3 grupos de productos lácteos
 360 artesanales —crema de leche, cuajada y requesón—, los
 361 cuales fueron adquiridos en diferentes establecimientos
 362 comerciales de la ciudad de Mérida. En ningún caso estos
 363 productos fueron reportados como vehículos en la transmi-
 364 sión o brote de alguna enfermedad de origen alimentario
 365 durante el lapso de estudio.

366 De un total de 90 cepas de *E. coli* aisladas de los derivados
 367 lácteos analizados, 45 fueron seleccionadas para su caracte-
 368 rización posterior. El análisis fenotípico de estas cepas
 369 demostró que más del 70% fueron susceptibles a los antibió-
 370 ticos ensayados, destacando la excelente actividad exhibida
 371 por las cefalosporinas de amplio espectro, carbapenemos
 372 y amikacina. No obstante, un porcentaje menor al 25%
 373 de las cepas fueron resistentes a ampicilina, y menos del
 374 10% mostraron baja susceptibilidad a gentamicina, tobra-
 375 micina, amoxicilina/ácido clavulánico y ácido nalidíxico.
 376 Estos resultados son similares a los descrito por Tamang
 377 et al.¹³, quienes reportaron la presencia de *E. coli* resis-
 378 tente a β-lactámicos en un 16,7% en muestras de leche
 379 cruda provenientes de 5 provincias de Corea. Sin embargo,
 380 porcentajes superiores a los obtenidos en este estudio fue-
 381 ron registrados en la región de Jammu (India)²⁰, donde la
 382 prevalencia de cepas de *E. coli* multiresistentes en leche y
 383 derivados lácteos no pasteurizados fue del 48%, y en Irán se
 384 reportó una frecuencia de *E. coli* resistente a ampicilina, a

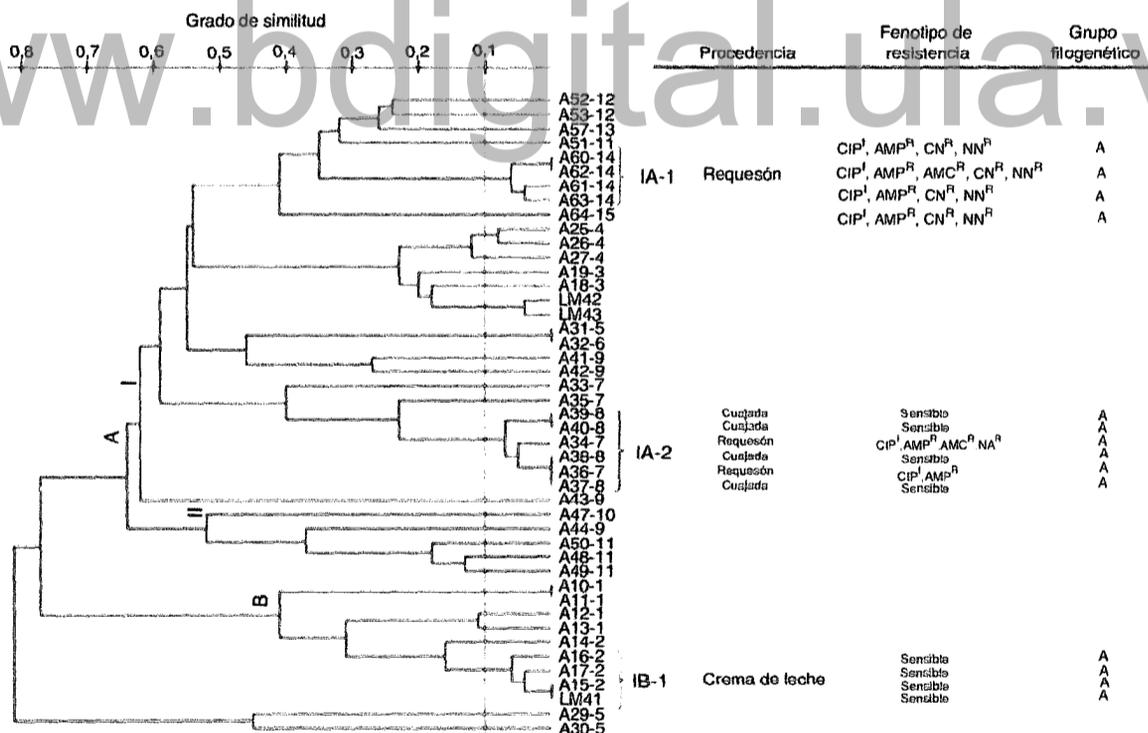


Figura 3 Diversidad clonal y características fenotípicas y genéticas de las cepas de *E. coli* aisladas de productos lácteos artesanales. I: intermedio; R: resistente. AMC: amoxicilina/ácido clavulánico; AMP: ampicilina; CIP: ciprofloxacino, CN: gentamicina; NA: ácido nalidíxico; NN: tobramicina.

Cómo citar este artículo: Guillén L, et al. Caracterización molecular de cepas de *Escherichia coli* aisladas de productos lácteos artesanales elaborados en Mérida, Venezuela. Infectio. 2014. <http://dx.doi.org/10.1016/j.infect.2014.04.004>

385 cefalotina y a los aminoglucósidos mayor del 30% en produc- 446
 386 tos lácteos fermentados con procesamiento artesanal⁶. Al 447
 387 respecto, se ha descrito que el uso de los antibióticos como 448
 388 terapéuticos, profilácticos y promotores del crecimiento en 449
 389 animales destinados al consumo humano ha contribuido con 450
 390 la aparición de cepas bacterianas resistentes^{9,12,28}.

391 En este trabajo, las cepas de *E. coli* con fenotipos resis- 451
 392 tentes fueron aisladas casi exclusivamente de muestras de 452
 393 requesón, y es posible que este producto haya sido elabo- 453
 394 rado con lácteos contaminados desde su origen en el animal. 454
 395 Sin embargo, no se descarta que este hallazgo también se 455
 396 encuentre asociado a la naturaleza misma de su elabora- 456
 397 ción, ya que en las etapas de escurrido y amasado existe 457
 398 una mayor exposición de la materia prima a fuentes de con- 458
 399 taminación provenientes del ambiente y/o del manipulador. 459
 400 En este sentido, Saleh et al.²¹ señalaron que las fuentes de 460
 401 contaminación con patotipos de *E. coli* multirresistentes de 461
 402 quesos artesanales provenientes del Valle de Beqaa (Líbano) 462
 403 fueron la manipulación y el secado al aire libre de la materia 463
 404 prima. Por el contrario, la evaluación de la calidad micro- 464
 405 biológica de 126 quesos naturales de elaboración doméstica 465
 406 en Hokkaido (Japón) reportó un 19,8% de muestras posi- 466
 407 tivas para coliformes con valores menores a 25 UFC/g, y 467
 408 solo una muestra (0,8%) fue positiva para *E. coli* enteroinva- 468
 409 siva. Estos resultados, según los estándares internacionales, 469
 410 fueron considerados satisfactorios, debido al uso de leches 470
 411 pasteurizadas y a la implementación de buenas prácticas 471
 412 higiénicas en todas las etapas de la producción³.

413 Varios reportes señalan que dentro de la diversidad gené- 472
 414 tica de *E. coli*, los grupos A y B1 reúnen las cepas comensales 473
 415 con pocos o ningún factor de virulencia, pero que son reser- 474
 416 vorios de genes de resistencia con una frecuencia mayor que 475
 417 en el resto de los filogrupos (B2 y D)^{6,7,27,28}. Los resultados 476
 418 obtenidos avalan esta afirmación, ya que la mayoría de las 477
 419 cepas de *E. coli* analizadas pertenecieron al filogrupo A, y 478
 420 las pocas cepas que presentaron algún marcador de resis- 479
 421 tencia se concentraron en este mismo filogrupo. Aunque 480
 422 Son et al.¹ no determinaron el perfil de resistencia de 570 481
 423 cepas de *E. coli* aisladas en una finca productora de ali- 482
 424 mentos lácteos, el 86% de estas fueron consideradas como 483
 425 comensales, distribuyéndose entre los filogrupos A y B1; el 484
 426 11% se agrupó en el filogrupo D y el 4% en el B2. No obstante, 485
 427 Asai et al.¹¹ señalaron que las cepas de *E. coli* productoras 486
 428 de β -lactamasas aisladas de alimentos provenientes de 487
 429 animales con colibacilosis se clasificaron indistintamente 488
 430 en los grupos filogenéticos A, B1 y D. Al respecto, varios 489
 431 autores coinciden en señalar que la cadena alimentaria es 490
 432 el vehículo de transferencia de genes de resistencia, y se 491
 433 ha sugerido un origen alimentario a la presencia de *E. coli* 492
 434 portador de diversos mecanismos de resistencia en la micro- 493
 435 biota intestinal de humanos^{3,9,12,13,27,28}.

436 Por otra parte, los resultados obtenidos se ajustan a la 494
 437 hipótesis propuesta por Carlos et al.²⁹, quienes señalaron 495
 438 que la distribución de los grupos filogenéticos de *E. coli* 496
 439 puede ayudar a la identificación de las principales fuentes de 497
 440 contaminación fecal en productos de origen animal. En este 498
 441 sentido, cepas de *E. coli* de los grupos A y B1 se encuentran 499
 442 en un amplio espectro de mamíferos herbívoros y carnívoros, 500
 443 respectivamente, mientras que el B2 y D tienen un estre- 501
 444 cho y especializado rango de hospederos; particularmente 502
 445 el filogrupo B2 es un buen indicador de contaminación fecal 503

humana^{6,7}. En este estudio, el filogrupo dominante fue el A, 504
 correspondiéndose con cepas comensales de *E. coli* proba- 505
 blemente presentes en un hospedero bovino, mientras que la 506

ausencia de cepas del grupo B2 podría indicar que la fuente 507
 de contaminación fecal de los productos lácteos no era de 508
 origen humano. 509
 La tipificación por Rep-PCR de las 45 cepas de *E. coli* 510
 aisladas de los 3 productos lácteos artesanales permitió 511
 evidenciar una estructura poblacional heterogénea, donde 512
 más del 95% de las cepas se distribuyeron en 2 grandes 513
 grupos, cuyos índices de similitud no superaron el 60%. 514
 Sin embargo, 3 subgrupos (IA-1, IA-2 y IB-1) con una rela- 515
 ción genéticamente distante destacaron por rangos internos 516
 de similitud de aproximadamente el 95%, sin asociación 517
 alguna con las características fenotípicas. Es probable que 518
 la distribución policlonal observada en este estudio haya 519
 estado influenciada por la participación de diferentes fac- 520
 tores intervinientes no controlados, tales como origen de 521
 la materia prima para la elaboración del producto, área 522
 geográfica donde se realizó el estudio, manufactura, con- 523
 diciones de preservación del producto y aleatoriedad en 524
 la selección de las cepas, entre otros. Sin embargo, desde 525
 el punto de vista técnico es probable que utilizando otras 526
 herramientas moleculares con mayor poder discriminatorio, 527
 como la electroforesis de campo pulsante, y aumentado el 528
 número de cepas a estudiar, se pudiera dilucidar mejor la 529
 estructura y la distribución clonal de las cepas de *E. coli* 530
 presentes en alimentos lácteos artesanales que se expenden 531
 en Mérida, Venezuela. Estos aspectos serán considerados en 532
 estudios futuros.

533 Finalmente, los hallazgos obtenidos en este estudio per- 534
 mitieron concluir que los productos lácteos como crema 535
 de leche, cuajada y requesón de procesamiento artesanal 536
 disponibles comercialmente para el consumo humano 537
 están contaminados con cepas de *E. coli* clonalmente hete- 538
 rogéneas. Las características fenotípicas y genéticas de 539
 estas cepas indican que aunque siendo en su mayoría dis- 540
 tribuidas entre los grupos filogenéticos correspondientes a 541
 cepas comensales de baja patogenicidad, no se descarta la 542
 posibilidad de que estas puedan adquirir nueva información 543
 genética y convertirse en reservorios de genes que codifi- 544
 quen para factores de virulencia y/o diversos mecanismos 545
 de resistencia antimicrobiana.

546 Desde el punto de vista epidemiológico, la detección 547
 de cepas de *E. coli* en alimentos lácteos indica una conta- 548
 minación de origen fecal, que eventualmente podría estar 549
 asociada con la presencia de otros enteropatógenos. Por 550
 ende, la información presentada en este estudio revela la 551
 necesidad de intensificar los controles higiénico-sanitarios 552
 en todas las etapas que conlleva la manufactura artesanal 553
 del producto, así como la implementación de medidas que 554
 permitan la vigilancia epidemiológica de cepas bacterianas 555
 potencialmente patógenas presentes en los productos y deri- 556
 vados lácteos no pasteurizados de fabricación artesanal que 557
 se expenden en la ciudad de Mérida, Venezuela.

558 Si bien el estudio descrito se circunscribe a una loca- 559
 lidad geográfica específica, los resultados obtenidos, muy 560
 probablemente, son representativos de una problemática 561
 nacional que incluso puede ser válida para otras regiones del 562
 continente que comparten características socioeconómicas 563
 y culturales similares. 564

Cómo citar este artículo: Guillén L, et al. Caracterización molecular de cepas de *Escherichia coli* aisladas de productos lácteos artesanales elaborados en Mérida, Venezuela. Infectio. 2014. <http://dx.doi.org/10.1016/j.infect.2014.04.004>

507 **Financiación**

508 Este trabajo fue parcialmente financiado por el Consejo
509 de Desarrollo Científico Humanístico, Tecnológico y de las
510 Artes, Universidad de Los Andes (CDCHTA-ULA) Proyecto
511 N.º FA-541-13-03-EM y por el Fondo Nacional de Ciencia y
512 Tecnología (FONACIT). Fortalecimiento del Laboratorio de
513 Microbiología Molecular de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis,
514 Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela (Proyecto
515 No. 2012002321).

516 **Conflicto de intereses**

517 Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

518 **Agradecimientos**

519 Los autores agradecemos a las profesoras Yolima Rosales
520 y Cándida Díaz, del Laboratorio de Microbiología de Alimentos,
521 y Judith Velasco, del Laboratorio de Síndromes Gastrointestinales
522 de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Universidad de Los Andes,
523 Mérida, por sus valiosas recomendaciones en la realización de este estudio.
524

525 **Bibliografía**

- 526 1. Son I, van Kessel JAS, Karns JS. Genotypic diversity of *Escherichia coli* in a dairy farm. *Foodborne Pathog Dis.* 2009;6:837–47.
527
528 2. Rodríguez C, Caldas L, Ogeerally P. Calidad sanitaria en queso artesanal tipo «telita». Upara, estado Bolívar, Venezuela. *Rev Soc Ven Microbiol.* 2009;29:98–102.
529
530 3. Esho FK, Enkhtuya B, Kusumoto A, Kawamoto K. Microbial assessment and prevalence of foodborne pathogens in natural cheeses in Japan. *BioMed Res Int.* 2013, Article ID 205801. Doi.org/10.1155/2013/205801. [consultado 10/12/2013]. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1155/2013/205801>
531
532 4. Ishii S, Sadowsky MJ. *Escherichia coli* in the environment: Implications for water quality and human health. *Microbes Environ.* 2008;23:101–8.
533
534 5. Walk ST, Mladonicky JM, Middleton JA, Heidt AJ, Cunningham JR, Bartlett P, et al. Influence of antibiotic selection on genetic composition of *Escherichia coli* populations from conventional and organic dairy farms. *Appl Environ Microbiol.* 2007;73:5982–9.
535
536 6. Leimbach A, Hacker J, Dobrindt U. *E coli* as an all-rounder: The thin line between commensalism and pathogenicity. 2013;358:3–32.
537
538 7. Le Gall T, Clermont O, Gouriou S, Picard B, Nassif X, Denamur E, et al. Extraintestinal virulence is a coincidental by-product of commensalism in B2 phylogenetic group *Escherichia coli* strains. *Mol Biol Evol.* 2007;24:2373–84.
539
540 8. Darehabi HK, Naseri MH, Menbari S, Mobaleghi J, Kalantar E. Antibiotic resistance pattern of *Escherichia coli* groups A, B1, B2 and D isolated from frozen foods and children with diarrhea in Sanandaj, Iran. *Int J Enteropathog.* 2013;1:1–4.
541
542 9. Da Costa PM, Loureiro L, Matos AJF. Transfer of multidrug-resistant bacteria between intermingled ecological niches: The interface between humans, animals and the environment. *Int J Environ Res Public Health.* 2013;10:278–94.
543
544 10. Dehkordi FS, Yazdani F, Mozafari J, Valtzadeh Y. Virulence factors, serogroups and antimicrobial resistance properties of *Escherichia coli* strains in fermented dairy products. 2014;7:217. Doi:10.1186/1756-0500-7-217. [consultado

- 10/12/2013]. Disponible en: <http://www.biomedcentral.com/1756/0500/7/217>
545
546 11. Asai T, Masani K, Sato C, Hiki M, Usui M, Baba K, et al. Phylogenetic groups and cephalosporin resistance genes of *Escherichia coli* from diseased food-producing animals in Japan. *Acta Vet Scand.* 2011;53:52–7.
547
548 12. Tham J, Walder M, Melander E, Odenholt I. Prevalence of extended-spectrum beta-lactamase-producing bacteria in food. *Infect Drug Resist.* 2012;5:143–7.
549
550 13. Tamang MD, Nam HM, Gurung M, Jang GC, Kim SR, Jung SC, et al. Molecular characterization of CTX-M β -lactamase and associated addiction systems in *Escherichia coli* circulating among cattle, farm workers, and the farm environment. 2013;79:3898–905.
551
552 14. Organización Mundial de la Salud. Global Principles for the Containment of Antimicrobial Resistance in animals intended for Food. Ginebra, Suiza: WHO; 2000.
553
554 15. Fernández CF. Aplicaciones de las técnicas de PCR a la epidemiología molecular de las enfermedades infecciosas. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2004;22:355–60.
555
556 16. Pérez I, Falco A, Tapia MS, Alonso G. Aislamiento e identificación de cepas del género *Bifidobacterium* presentes en productos lácteos fermentados tipo yogur. *Rev Soc Ven Microbiol.* 2012;32:29–36.
557
558 17. Hernández E, Araque M, Millán Y, Millán B, Vielma S. Prevalencia de β -lactamasa CTX-M-15 en grupos filogenéticos de *Escherichia coli* uropatógena aisladas en pacientes de la comunidad de Mérida, Venezuela. *Invest Clin.* 2014;55:32–43.
559
560 18. Johnson TJ, Logue CM, Johnson JR, Kuskowski MA, Sherwood JS, Barnes HJ, et al. Associations between multidrug resistance, plasmid content and virulence potential among extraintestinal pathogenic and commensal *Escherichia coli* from humans and poultry. *Foodborne Pathog Dis.* 2012;9:37–46.
561
562 19. White AP, Sibley KA, Sibley CD, Wasmuth JD, Schaefer R, Surette MG, et al. Intergenic sequence comparison of *Escherichia coli* isolates reveals lifestyle adaptations but not host specificity. *Appl Environ Microbiol.* 2011;77:7620–32.
563
564 20. Rashid M, Kotwal SK, Malik MA, Singh M. Prevalence, genetic profile of virulence determinants and multidrug resistance of *Escherichia coli* isolates from foods of animal origin. *Vet World.* 2013;6:139–42.
565
566 21. Saleh I, Zouhairi O, Alwan N, Hawi A, Barbour E, Harakeh S. Antimicrobial resistance and pathogenicity of *Escherichia coli* isolated from common dairy products in the Lebanon. *An Trop Med Parasitol.* 2009;103:39–52.
567
568 22. Comisión Venezolana de Normas Industriales (COVENIN), norma N.º 1126-89. Alimentos. Identificación y preparación de muestras para el análisis microbiológico [consultado 5 Nov 2013]. Disponible en: <http://www.sencamer.gob.ve/sencamer/normas/1126-89.pdf>
569
570 23. Comisión Venezolana de Normas Industriales (COVENIN), norma N.º 3276-97. Alimentos. Recuento de coliformes y *Escherichia coli*. Método en placa con películas secas rehidratables (Petrifilm) [consultado 6 Oct 2013]. Disponible en: <http://www.sencamer.gob.ve/sencamer/normas/3276-97.pdf>
571
572 24. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, Twenty-Third Informational Supplement. Document M100-S23. Wayne (PA), EE. UU.: CLSI; 2013.
573
574 25. Clermont O, Bonacorsi S, Bingen E. Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. *Appl Environ Microbiol.* 2000;66:4555–8.
575
576 26. Lozano D, Cisneros J, Becerril B, Cuberos L, Prados T, Ortiz C, et al. Comparison of a repetitive extragenic palindromic sequence-based PCR method and clinical and microbiological methods for determining strain sources in cases of nosocomial *Acinetobacter baumannii* bacteremia. *J Clin Microbiol.* 2002;40:4571–5.
577
578
579
580
581
582
583
584
585
586
587
588
589
590
591
592
593
594
595
596
597
598
599
600
601
602
603
604
605
606
607
608
609
610
611
612
613
614
615
616
617
618
619
620
621
622
623
624
625
626
627
628
629
630

Cómo citar este artículo: Guillén L, et al. Caracterización molecular de cepas de *Escherichia coli* aisladas de productos lácteos artesanales elaborados en Mérida, Venezuela. *Infectio.* 2014. <http://dx.doi.org/10.1016/j.infect.2014.04.004>

- 631 27. Leedom J. Milk of nonhuman origin and infectious diseases in
632 humans. *Clin Infect Dis*. 2006;43:610-5. 636
- 633 28. Wang J, Stephan R, Karczmarczyk M, Yan Q, Hächler H. Mole- 637
634 cular characterization of *bla*_{ESBL}-harboring conjugative plasmid 638
635 identified in multi-drug resistant *Escherichia coli* isolated from 639
2013.4. Article 188 Doi:10.3389/fmicb.2013.00188. [consultado 640
10 Dic 2013]. Disponible en: www.frontiersin.org 641
29. Carlos CM, Pires MM, Stoppe NC, Hachich EM, Sato MI, Gomes 636
TAT, et al. *Escherichia coli* phylogenetic group determination 637
and its application in the identification of the major animal 638
source of fecal contamination. *BMC Microbiol*. 2010;10:161-71. 639
640
641

www.bdigital.ula.ve

Cómo citar este artículo: Guillén L, et al. Caracterización molecular de cepas de *Escherichia coli* aisladas de productos lácteos artesanales elaborados en Mérida, Venezuela. *Infectio*. 2014. <http://dx.doi.org/10.1016/j.infect.2014.04.004>