

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, 5101 Mérida, Venezuela

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

Disponible en Internet el 25 de julio 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 determinó 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.U. Todos los derechos reservados.

* Autor para correspondencia.

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

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 nonrelated 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.U. 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

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*)^{1,15}. Sin embargo, las técnicas de tipificación basadas en la amplificación de ácidos nucleicos mediante PCR se utilizan mucho más, 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 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 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 (CVCM1931), 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 nalidixico (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 5 min a temperatura ambiente) y el ADN disuelto en

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.

el sobrenadante se recuperó en un tubo eppendorf estéril, el cual se almacenó a -20 °C hasta el momento de su uso¹⁷.

Determinación de los grupos filogenéticos de *Escherichia coli*

Las cepas fueron clasificadas dentro de los grupos filogenéticos (A, B1, B2 y D) de acuerdo con la presencia de los genes *chuA*, *yjaA* y el fragmento génico TspE4.C2, mediante una PCR múltiple utilizando los iniciadores y condiciones descritas previamente²⁵. 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 MgCl₂ (50 mM), 1,5 µl de dNTPs (10 mM; Bioneer, Daejeon, Corea), 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 et al.²⁵ 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+).

Tipificación de *Escherichia coli* por Rep-PCR

La relación clonal entre las cepas fue determinada 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 et al.²⁶. La mezcla de reacción para la Rep-PCR se realizó en un volumen final de 25 µl y estuvo constituida por 2,5 µl de buffer (10X), 2,5 µl de MgCl₂ (50 mM), 3 µl de dNTPs (10 mM), 3 µl de cada uno de los iniciadores (10 pmol/µl), 0,5 µl de *Taq* polimerasa (5 U/µl; Bioneer), 5,5 µl de 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 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 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 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 1](#). 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 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 clavulánico (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 intermedia 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 intermedia a ciprofloxacino y la resistencia a ampicilina fueron los marcadores más frecuentes. Todas las cepas de *E. coli* con fenotipo resistente fueron

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	1	AMP	Requesón
A25-4		CIP ^I	Crema de leche
A29-5		AMP	Requesón
A30-5		AMP	Requesón
A31-5		AMP	Requesón
A33-7	2	CIP ^I , AMP	Requesón
A36-7		CIP ^I , AMP	Requesón
A34-7		CIP ^I , AMP, AMC, NA	Requesón
A60-14	4	CIP ^I , AMP, CN, NN	Requesón
A61-14		CIP ^I , AMP, CN, NN	Requesón
A63-14		CIP ^I , AMP, CN, NN	Requesón
A62-14	5	CIP ^I , AMP, AMC, CN, NN	Requesón

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

aisladas de requesón, representando el 73,3% (11/15) del total de cepas recuperadas en ese producto. Solo una cepa (A25-4) proveniente de crema de leche presentó susceptibilidad intermedia a ciprofloxacino (tabla 2).

En la figura 1a se muestra un gel electroforético representativo de los productos amplificados por PCR correspondientes a los genes *chuA* (279 pb) y *yjaA* (211 pb) y al fragmento de ADN TspE4.C2 (152 pb), cuya presencia o ausencia en las cepas de *E. coli* determinó la clasificación de los grupos filogenéticos A, B1, B2 y D. La distribución porcentual de los filogrupos en las 45 cepas de *E. coli* se presenta en la figura 1b. El 82,2% (37/45) de las cepas fueron ubicadas en el grupo filogenético A, mientras que los grupos B1 y D se distribuyeron en igual proporción (8,9% [4/45]). Sin embargo, cuando se estudió la frecuencia de los filogrupos de acuerdo con el origen o procedencia de la cepa, se encontró que el grupo A predominó en los 3 tipos de producto lácteo (crema de leche: 93,3%; requesón: 86,6%; cuajada: 66,7%). El filogrupo B1 tuvo una frecuencia del 13,3% en cepas aisladas de cuajada y del 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 distribuyeron 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 antimicrobiana 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 antibióticos. Todas las cepas de *E. coli* que conformaron estos 3 subgrupos (IA-1, IA-2 y IB-1) fueron clasificadas dentro del filogrupo A.

Discusión

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

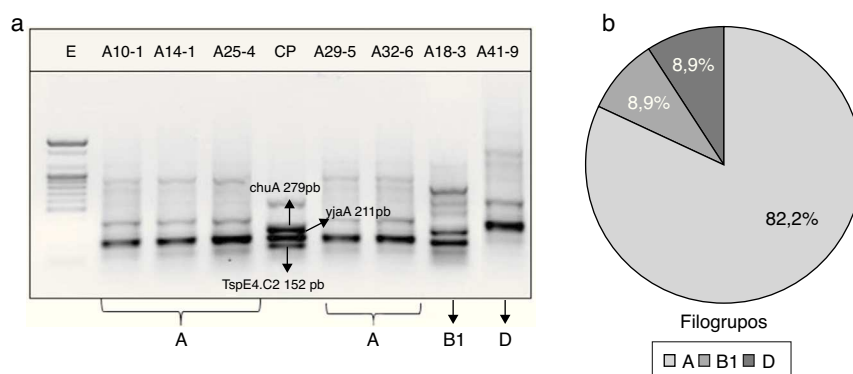


Figura 1 a) Gel electroforético representativo de la amplificación por PCR de los genes *chuA*, *yjaA* y del fragmento de ADN TspE4.C2 en cepas de *E. coli* aisladas de productos lácteos artesanales. CP: control positivo; E: marcador de peso molecular (100 pb). b) Distribución general de los grupos filogenéticos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

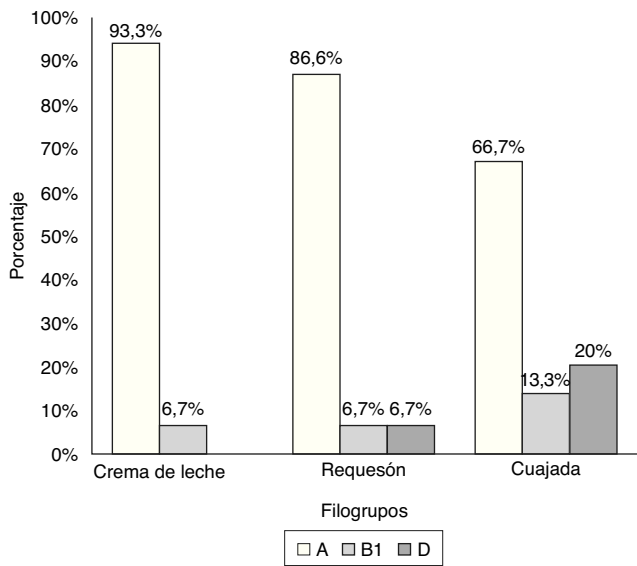


Figura 2 Distribución de los grupos filogenéticos de *E. coli* de acuerdo con el tipo producto lácteo de origen.

derivados no pasteurizados son potencialmente peligrosos por su alto riesgo de contaminación en todas las etapas de la producción²⁷. En este estudio se analizaron un conjunto de muestras provenientes de 3 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 productos 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 demostró 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 descritos por Tamang et al.¹³, quienes reportaron la presencia de *E. coli* resistente a β -lactámicos en un 16,7% en muestras de leche cruda provenientes de 5 provincias de Corea. Sin embargo, porcentajes superiores a los obtenidos en este estudio fueron registrados en la región de Jammu (India)²⁰, donde la prevalencia de cepas de *E. coli* multirresistentes en leche y derivados lácteos no pasteurizados fue del 48%, y en Irán se reportó una frecuencia de *E. coli* resistente a ampicilina, a cefalotina y a los aminoglucósidos mayor del 30% en productos lácteos fermentados con procesamiento artesanal⁸. Al respecto, se ha descrito que el uso de los antibióticos como terapéuticos, profilácticos y promotores del crecimiento en animales destinados al consumo

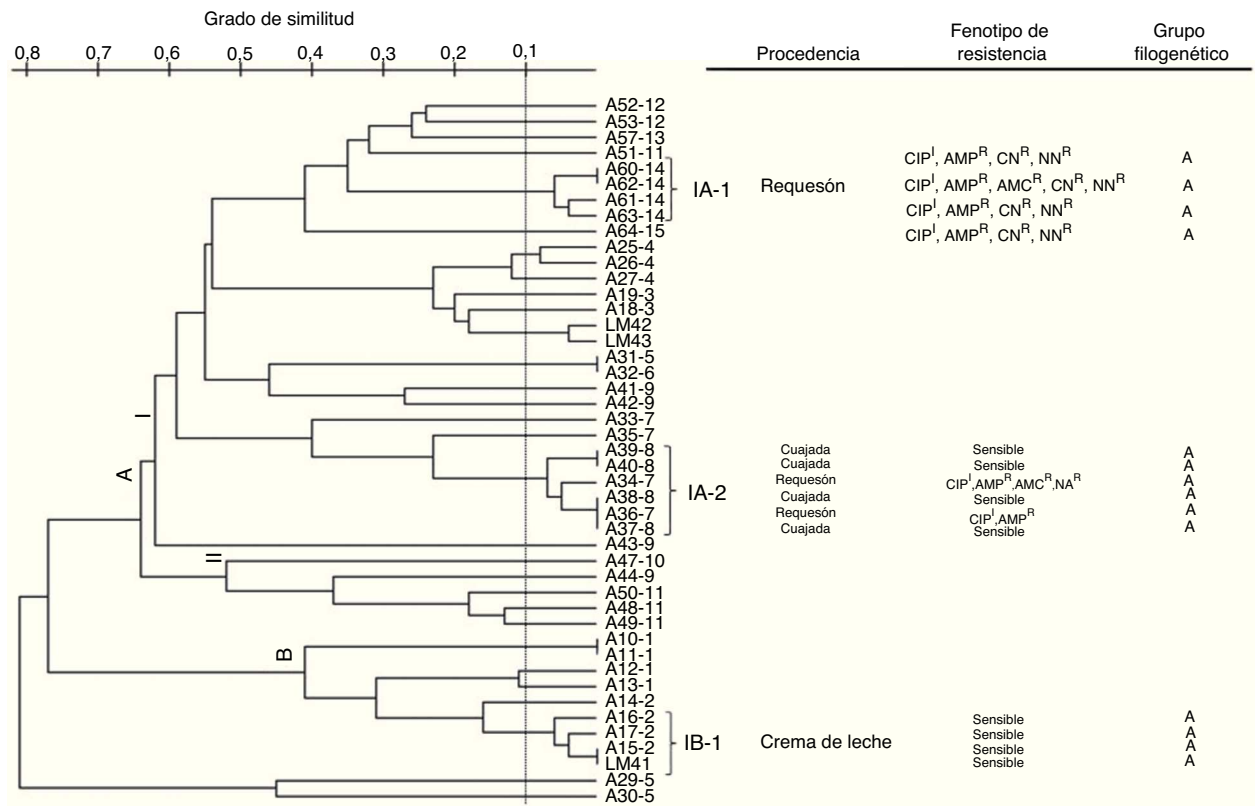


Figura 3 Diversidad clonal y características fenotípicas y genéticas de las cepas de *E. coli* aisladas de productos lácteos artesanales. ^I: intermedio; ^R: resistente. AMC: amoxicilina/ácido clavulánico; AMP: ampicilina; CIP: ciprofloxacino, CN: gentamicina; NA: ácido nalidíxico; NN: tobramicina.

humano ha contribuido con la aparición de cepas bacterianas resistentes^{9,12,28}.

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 et al.²¹ señalaron que las fuentes de contaminación con patotipos de *E. coli* multirresistentes de quesos artesanales provenientes del Valle de Beqaa (Líbano) 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 producción³.

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)^{6,7,27,28}. Los resultados obtenidos avalan esta afirmación, ya que la mayoría de las cepas de *E. coli* analizadas pertenecieron al filogrupo A, y las pocas cepas que presentaron algún marcador de resistencia se concentraron en este mismo filogrupo. Aunque Son et al.¹ no determinaron el perfil de resistencia de 570 cepas de *E. coli* aisladas en una finca productora de alimentos lácteos, el 86% de estas fueron consideradas como comensales, distribuyéndose entre los filogrupos A y B1; el 11% se agrupó en el filogrupo D y el 4% en el B2. No obstante, Asai et al.¹¹ 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* portador de diversos mecanismos de resistencia en la microbiota intestinal de humanos^{3,9,12,13,27,28}.

Por otra parte, los resultados obtenidos se ajustan a la hipótesis propuesta por Carlos et al.²⁹, 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. En este sentido, 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^{6,7}. 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.

La tipificación por Rep-PCR de las 45 cepas de *E. coli* aisladas de los 3 productos lácteos artesanales permitió evidenciar una estructura poblacional heterogénea, donde más del 95% de las cepas se distribuyeron en 2 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 el 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. Sin embargo, desde el punto de vista técnico es probable que utilizando otras herramientas moleculares con mayor poder discriminatorio, como la electroforesis de campo pulsante, y aumentado el número de cepas a estudiar, se pudiera dilucidar mejor la estructura y la distribución clonal de las cepas de *E. coli* presentes en alimentos lácteos artesanales que se expenden en Mérida, Venezuela. Estos aspectos serán considerados en estudios futuros.

Finalmente, los hallazgos obtenidos en este estudio permitieron concluir 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 heterogéneas. Las características fenotípicas y genéticas de estas cepas indican que aunque siendo en su mayoría distribuidas entre los grupos filogenéticos correspondientes a cepas comensales de baja patogenicidad, no se descarta la posibilidad de que estas puedan adquirir nueva información genética y convertirse en reservorios de genes que codifiquen para factores de virulencia y/o diversos mecanismos de resistencia antimicrobiana.

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 conlleva 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.

Si bien el estudio descrito se circunscribe a una localidad geográfica específica, los resultados obtenidos, muy probablemente, son representativos de una problemática nacional que incluso puede ser válida para otras regiones del continente que comparten características socioeconómicas y culturales similares.

Financiación

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

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Agradecimientos

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

Bibliografía

- Son I, van Kessel JAS, Karns JS. Genotypic diversity of *Escherichia coli* in a dairy farm. *Foodborne Pathog Dis.* 2009;6:837–47.
- Rodríguez C, Caldas L, Ogeerally P. Calidad sanitaria en queso artesanal tipo «telita». Upata, estado Bolívar, Venezuela. *Rev Soc Ven Microbiol.* 2009;29:98–102.
- 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>
- Ishii S, Sadowsky MJ. *Escherichia coli* in the environment: Implications for water quality and human health. *Microbes Environ.* 2008;23:101–8.
- 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.
- Leimbach A, Hacker J, Dobrindt U. *E. coli* as an all-rounder: The thin line between commensalism and pathogenicity. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2013;358:3–32.
- 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.
- 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.
- 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.
- Dehkordi FS, Yazdani F, Mozafari J, Valizadeh Y. Virulence factors, serogroups and antimicrobial resistance properties of *Escherichia coli* strains in fermented dairy products. *BMC Res Notes.* 2014;7:217. Doi:10.1186/1756-0500-7-217. [consultado 10/12/2013]. Disponible en: <http://www.biomedcentral.com/1756/0500/7/217>
- 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.
- 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.
- 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. *Appl Environ Microbiol.* 2013;79:3898–905.
- Organización Mundial de la Salud. Global Principles for the Containment of Antimicrobial Resistance in animals intended for Food. Ginebra, Suiza: WHO; 2000.
- Fernández CF. Aplicaciones de las técnicas de PCR a la epidemiología molecular de las enfermedades infecciosas. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2004;22:355–60.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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>
- 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>
- 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.
- Clermont O, Bonacorsi S, Bingen E. Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. *Appl Environ Microbiol.* 2000;66:4555–8.
- 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.

27. Leedom J. Milk of nonhuman origin and infectious diseases in humans. *Clin Infect Dis*. 2006;43:610–5.
28. Wang J, Stephan R, Karczmarczyk M, Yan Q, Hächler H. Molecular characterization of *bla*_{ESBL}-harboring conjugative plasmid identified in multi-drug resistant *Escherichia coli* isolated from food-producing animals and healthy humans. *Front Microbiol*. 2013;4: Article 188 Doi:10.3389/fmicb.2013.00188. [consultado 10 Dic 2013]. Disponible en: www.frontiersin.org
29. Carlos CM, Pires MM, Stoppe NC, Hachich EM, Sato MI, Gomes TAT, et al. *Escherichia coli* phylogenetic group determination and its application in the identification of the major animal source of fecal contamination. *BMC Microbiol*. 2010;10:161–71.