UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE HONDURAS

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE MICROBIOLOGÍA

MAESTRÍA EN ENFERMEDADES INFECCIOSAS Y ZOONÓTICAS

"Caracterización molecular de patotipos y grupos filogenéticos de cepas de *Escherichia coli* diarreogénicas circulantes en Honduras en el período 2012-2015"

TESIS SUSTENTADA POR:

JENIFFER DENISSE FIALLOS LÓPEZ

PARA OPTAR AL GRADO DE MÁSTER EN ENFERMEDADES INFECCIOSAS Y ZOONÓTICAS

TEGUCIGALPA, M.D.C. SEPTIEMBRE 2017 HONDURAS, C.A.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE HONDURAS

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE MICROBIOLOGÍA

MAESTRÍA EN ENFERMEDADES INFECCIOSAS Y ZOONÓTICAS

RECTORA

JULIETA CASTELLANOS M.Sc.

VICERRECTORA ACADÉMICA

BELINDA FLORES, M.Sc.

DIRECTORA DEL SISTEMA DE ESTUDIOS DE POSTGRADO

LETICIA SALOMÓN, M.Sc.

DECANO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS

NABIL KAWAS, M.Sc.

COORDINADORA DEL POSTGRADO EN ENFERMEDADES INFECCIOSAS Y ZOONÓTICAS

MARITZA CANALES GIRÓN, M.SP.

TEGUCIGALPA, M.D.C. SEPTIEMBRE 2017 HONDURAS; C.A.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE HONDURAS

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE MICROBIOLOGÍA

MAESTRÍA EN ENFERMEDADES INFECCIOSAS Y ZOONÓTICAS

ASESORA DE TESIS

LOURDES ENRÍQUEZ M.Sc.

REVISOR EXTERNO

ARMANDO NAVARRO OCAÑA, Ph.D.

TERNA EXAMINADORA:

ANNABELLE FERRERA, Ph.D.

LOURDES ENRÍQUEZ, M.Sc.

ARMANDO NAVARRO OCAÑA, Ph.D.

TEGUCIGALPA, M.D.C. SEPTIEMBRE 2017 HONDURAS, C.A.

ÍNDICE

ÍNDICE ..... **I**

AGRADECIMIENTOS ..... **I**

DEDICATORIA ..... **II**

LISTA DE FIGURAS ..... **III**

LISTA DE TABLAS ..... **III**

LISTA DE ANEXOS ..... **IV**

LISTA DE GRÁFICAS ..... **IV**

LISTA DE ABREVIATURAS ..... **V**

RESUMEN **0**

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN **1**

CAPÍTULO 2: MARCO TEÓRICO **5**

1. Descripción de *Escherichia coli* 5
2. Criterios de clasificación de *E. coli* 8
3. Descripción general de patotipos de *E. coli* 9
4. Epidemiologia general de *E. coli* 12

4.2 Epidemiologia de E. coli en América Latina *13*

4.3 Antecedentes de E. coli en Honduras *14*

5. Descripción específica sobre cinco patotipos de *Escherichia coli* 15

5.a. E. coli enteropatógena (EPEC) *16*

5.2 5.b. E. coli enterohemorrágica (EHEC) y productora de toxina Shiga (STEC) *18*

5.3 5.c. E. coli enterotoxigénica (ETEC) *20*

5.c.1 Factores de colonización 23

5.4 5.d. E. coli enteroinvasiva (EIEC) *23*

5.5 5.e. E. coli enteroagregativa (EAEC) *26*

6. Descripción de la filogenia de *E. coli* 27

CAPÍTULO 3: METODOLOGÍA **31**

1. Objetivo General 31
2. Objetivos específicos 31
3. Diseño de investigación 32
4. Unidad de análisis 32

4.1 Cepas de origen humano *32*

4.2 Cepas de quesos artesanales *33*

4.3 Cepas de origen hídrico *35*

4.4 Cepas de alimentos (lechugas y carne molida) *36*

5. Muestra 36
6. Periodo de estudio 37
7. Recolección de datos 37
8. Análisis de laboratorio 37

8.1 Confirmación de identificación bioquímica *38*

8.2 Determinación antigénica de cepas de E. coli *38*

8.3 Caracterización molecular de patotipos de E. coli *39*

8.4 Extracción de ácidos nucleicos ... *39*
8.5 Amplificación de genes mediante Reacción en cadena de la polimerasa PCR ... *40*
8.5.a. PCR Factores de virulencia y colonización de patotipos ... 40
8.5.b. PCR Grupos filogenéticos ... 41
9. ANÁLISIS BIOESTADÍSTICO ... 43
10. CONSIDERACIONES ÉTICAS ... 43
11. CONSIDERACIONES DE BIOSEGURIDAD ... 43
12. LIMITACIONES ... 44

CAPÍTULO 4: RESULTADOS ... 45

1. IDENTIFICACIÓN BIOQUÍMICA ... 46
2. SEROLOGÍA ... 46
3. CEPAS DE ORIGEN HUMANO ... 47
4. CEPAS DE QUESOS ARTESANALES ... 52
5. CEPAS DE ORIGEN HÍDRICO ... 58
6. CEPAS DE ALIMENTOS (CARNE MOLIDA Y LECHUGAS) ... 65
7. RESULTADOS GENERALES ... 67

CAPÍTULO 5: DISCUSIÓN ... 71

CAPÍTULO 6: CONCLUSIONES ... 81

CAPÍTULO 7: RECOMENDACIONES ... 83

CAPÍTULO 8: REFERENCIAS ... 86

ANEXOS ... 92

AGRADECIMIENTOS

A mis padres y hermano por apoyarme.

A los microbiólogos industriales involucrados en verificación y organización del cepario de enterobacterias del laboratorio de Investigación Teasdale-Corti, Alejandra Morales Molina, Fernando Montoya Mondragón, Gerardo Daniel de Jesús Alvarado García, Isaac Sabillón Zelaya. Gracias por las largas jornadas de trabajo en laboratorio.

A la Red de Macro-universidades de América Latina y el Caribe por el financiamiento de la estancia y la oportunidad de poder desarrollar la serología y gran parte del proyecto.

Al Instituto de Investigaciones en Microbiología (IIM), por el financiamiento en las técnicas moleculares realizadas en Honduras. A M. Sc. Yessy Cabrera por el apoyo en los procedimientos en el Laboratorio de Biología Molecular en UNAH.

A los señores Tec. Gabriel Pérez Soto y Tec. Luis Antonio León Alamilla por su gigantesca labor en realizar serología en el laboratorio de Patógenos Entéricos de la Universidad Autónoma de México. Sus análisis fueron pilar fundamental para este primer trabajo de serotipos en Honduras.

A Biol. Delia Licona Moreno, por su paciencia en enseñanza de todos los protocolos utilizados en este proyecto. Su valiosa ayuda y apoyo en las largas jornadas de laboratorio y explicación en estandarización de estas técnicas fue enorme.

Se agradece a la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA), Programa de Innovación Tecnológica (PAPIIT) por el apoyo al Proyecto “Búsqueda de inmunógenos protectores contra *Salmonella* y *Escherichia coli* bacterias involucradas en la patogénesis de infecciones intestinales IN216417.

A LACER (Latinoamerican Coallition for *Escherichia coli* Research) por brindar los contactos que apoyan en gran medida este tipo de investigaciones y por brindar el conocimiento epidemiológico en la región sobre este versátil patógeno.

A mis asesores Dr. Armando Navarro Ocaña por su gran conocimiento y disponibilidad y recursos de laboratorio para generar este proyecto; Dra. Lourdes Enríquez de Madrid y Dra. Annabelle Ferrera por su tiempo.

DEDICATORIA

A el conocimiento científico de mi país.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Relación entre los distintos patotipos de *Escherichia coli* 12
Figura 2. Mapa de América Latina con patotipos prevalentes en cada país. 14
Figura 3. Patogénesis EPEC. 18
Figura 4. Patogénesis STEC. 20
Figura 5. Patogénesis ETEC. 23
Figura 6. Patogénesis EIEC. 25
Figura 7. Patogénesis EAEC. 27
Figura 8. Localidades de Centros de atención a la salud donde se tomaron las muestras diarreicas. 33
Figura 9. Número de cepas de *E. coli* aisladas de quesos artesanales por departamento. Un total de 48 cepas fueron analizadas. 34
Figura 10. Mapa del lago de Yojoa con las estaciones de monitoreo, mayo de 2014 a marzo de 2015. Tomado de:[Hernándes Oviedo, 2016] 36
Figura 11. Mapa de distribución espacial de patotipos de *E. coli* en quesos artesanales por departamento. 57
Figura 12. Distribución espacial de patotipos de *E. coli* por estación en el Lago de Yojoa. 64

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Iniciadores a utilizar en PCR para identificación de patotipos y factores de colonización de *Escherichia coli.* 41
Tabla 2. Iniciadores utilizados en PCR cuádruplex para identificación de grupos filogenéticos. [Olivier Clermont, 2013] 42
Tabla 3. Serotipos de *E. coli* aislada de heces diarreicas en niños menores de tres años. 47
Tabla 4. Resultados de factores de virulencia en cepas de origen humano. 49
Tabla 5. Serotipos de *E. coli* aislada de quesos artesanales. 52
Tabla 6. Resultados de factores de virulencia en cepas de quesos artesanales. 54
Tabla 7. Serotipos de *E. coli* aislada de fuentes de agua. 59
Tabla 8. Resultados de factores de virulencia en cepas de origen hídrico. 60
Tabla 9. Serotipos de *E. coli* aislada a partir de alimentos. 66
Tabla 10. Resultados de factores de virulencia en cepas de alimentos. 67
Tabla 11. Resultados completos de quesos artesanales. 148
Tabla 12. Resultados de patotipos de quesos artesanales y su origen. 149
Tabla 13. Resultados cepas de agua y su localidad y temperatura 150
Tabla 14. Cepas de Lago de Yojoa y distribución por época. 150
Tabla 15. Resultados de alimentos por fuente. 151
Tabla 16. Resultados de patotipos en alimentos por fuente. 151
Tabla 17. Frecuencias y porcentajes de patotipos de acuerdo a grupos filogenéticos. 152

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Registro y Hoja de resultado 92
Anexo 2. Formulario de registro de caja 93
Anexo 3. Registro de cepario de Enterobacterias Laboratorio Teasdale-Corti 94
Anexo 4. Flujograma de trabajo 115
Anexo 5. Códigos de cepas enviadas a UNAM 116
Anexo 6. Procedimiento Serología 117
Anexo 7. Protocolo de extracción de ADN/Método de ebullición 119
Anexo 8. Flujograma de decisión dicotómica Olivier Clermont 119
Anexo 9. Protocolos PCR UNAM 120
Anexo 10. Protocolos PCR UNAH- Laboratorio de Biología Molecular 135
Anexo 11. Constancia de Resolución. Aprobación CEI-MEIZ 137
Anexo 12. Resultados completos serología y PCR 138
Anexo 13. Fotografías geles de agarosa (distintos PCR) 143
Anexo 14. Resultados de quesos artesanales por departamento y tipo de queso 148
Anexo 15. Resultados de origen hídrico por localidad. 149
Anexo 16. Resultados de origen alimenticio 150
Anexo 17. Serotipos de *E. coli* causantes de diarrea. 153
Anexo 18. Hoja de bioseguridad *Escherichia coli* enterohemorrágica 154
Anexo 19. Hoja de bioseguridad *Escherichia coli* enteroinvasiva 156
Anexo 20. Hoja de bioseguridad *Escherichia coli* enteropatogénica 159
Anexo 21. Hoja de bioseguridad *Escherichia coli* enterotoxigénica 162
Anexo 22. Formulario de Bioseguridad 165

LISTA DE GRÁFICAS

Gráfica 1. Frecuencia de grupos filogenéticos de acuerdo a frecuencia de los distintos patotipos en cepas de origen humano. 50
Gráfica 2. Frecuencia de grupos filogenéticos de acuerdo a frecuencia de los distintos patotipos en cepas de quesos artesanales. 55
Gráfica 3. Frecuencia de grupos filogenéticos de acuerdo a frecuencia de los distintos patotipos en cepas de origen hídrico. 61
Gráfica 4. Frecuencia de grupos filogenéticos de acuerdo a frecuencia de los distintos patotipos en cepas de diferentes fuentes. 68

LISTA DE ABREVIATURAS

AA	Adherencia agregada
AAF	Fimbria de adherencia agregada
ADN	Acido desoxirribonucleico
A/E	Lesión de adhesión y esfacelamiento
AMPc	Adenosin monofosfato cíclico
aEPEC	*Escherichia coli* entero patógena atípicas
BFP	Pili formador de penacho
Células HEp-2	Cepa 2 de carcinoma epidermoide humano (**H**uman **Ep**idermoid carcinoma strain #2)
CFTR	Regulador de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística
DAEC	*Escherichia coli* difusa adherente
EAEC	*Escherichia coli* enteroagregativa
EAF	Factor de adherencia de EPEC
ECOR	Colección de referencia de *Escherichia coli*
EIEC	*Escherichia coli* enteroinvasiva
ELISA	Enzyme linked Immuno Sorbent Assay-Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas
EPEC	*Escherichia coli* entero patogénica
ETEC	*Escherichia coli* enterotoxigénica
ExPec	*Escherichia coli* patógena extra intestinal
IpaH	Gen de invasión plasmídico de antígeno H
LEE	Locus de eliminación del enterocito
LT	Enterotoxina termolábil
MAEC	*Escherichia coli* asociada a meningitis
MLST	Tipificación Multilocus de secuencias
NMEC	*Escherichia coli* de meningitis neonatal
STEC	*Escherichia coli* productora de toxina-Shiga
ST	Enterotoxina termo estable
SST3	Sistema de secreción tipo 3
SUH	Síndrome urémico hemolítico
tEPEC	*Escherichia coli* entero patogénica típicas
Tir	Receptor de intimina traslocado
UPEC	*Escherichia coli* uropatógena

RESUMEN

Introducción: *Escherichia coli* es un patógeno versátil capaz de sobrevivir en diversos ambientes, además de ser habitante normal de a microbiota intestinal de humanos y animales, debido a esta característica ha sido denominado indicador de contaminación fecal en aguas y alimentos. *E. coli* tiene la capacidad de albergar varios factores de virulencia codificados por distintos genes que pueden producir patologías sean estas intestinales y extraintestinales. Las características que brindan los factores de virulencia brindan la clasificación en distintos patotipos en los cuales se definen como intestinales principales: EPEC, ETEC, EAEC, EIEC y STEC. Existe una estructura de organización de grupos filogenéticos de *E. coli* donde se clasifican las cepas en 8 grupos filogenéticos mayores (A, B1, B2, C, D, E, F) y cinco clados crípticos (CI-CV) en las cuales se pueden ver cada uno de los patotipos en distintos grupos filogenéticos. Reportes de presencia de estos factores de virulencia circulantes en distintos ambientes se han reportado en Honduras desde el 2014 donde se ha observado que ETEC y EPEC son los patotipos prevalentes, aunque también se han encontrado cepas que producen toxinas del patotipo STEC. La investigación de *E. coli* patógena se debe incrementar con el objetivo de vigilar los patotipos causantes de diarrea en el ambiente. **Objetivos:** El objetivo general del estudio fue clasificar cepas de *E. coli* de fuentes humanas, y de ambiente (aguas y alimentos de diferentes zonas geográficas del país) en los distintos patotipos y grupos filogenéticos. El primer objetivo específico fue clasificar las cepas de acuerdo a la presencia o ausencia de factores de virulencia de los cinco patotipos diarreogénicos de *E. coli.* El segundo objetivo fue clasificar aquellas cepas que presentaron factores de virulencia en 7 grupos filogenéticos y un clado críptico. **Material y Métodos:** Se analizaron 188 cepas provenientes de humanos (86 cepas), quesos artesanales (48 cepas), fuentes de agua (32 cepas), y alimentos (16 cepas de lechugas y 6 cepas de carne molida). Se logró clasificar en serotipos todas las cepas para facilitar su clasificación de patotipos y ayudar a orientar la búsqueda de factores de virulencia de los cinco patotipos intestinales causantes de diarrea. Se utilizaron PCR convencionales para cada uno de los factores de patogenicidad que describen un patotipo particular. La clasificación de las cepas en grupos filogenéticos se realizó por PCR multiplex descrita por Clermont (Clermont, 2013). Se realizó un análisis de frecuencias que respondían a ambos objetivos planteados. **Resultados:** Un total de 106 cepas presentaron factores de virulencia de los distintos patotipos siendo EPEC el más frecuente con un 33% (n=62) pertenecientes del cual un 19 % (n=36) se diferenciaron como aEPEC y un 14 % (n=26) se diferenciaron como tEPEC. El siguiente patotipo en frecuencia fue ETEC, con un 16 % (n=30) del total de las cepas analizadas. El patotipo por primera vez analizado en Honduras es EAEC, con frecuencia de 6 % (n=12) del total de cepas. Los patotipos STEC y EIEC obtuvieron ambos un 1 % de positividad (n=1 cada uno). En cuanto a los grupos filogenéticos de aquellas cepas que presentaron factores de virulencia de los patotipos se describen en la gráfica 4. El grupo filogenético más frecuente es el B1 con un 36% (n=38), el siguiente grupo más frecuente es el A con 27% (n=29), el grupo D con 10% (n=11), B2 con un 8% (n=9), U con 7% (n=7), C 6% (n=6), E 3% (n=3), Clado 1 o 2 con un 2% (n=2) y finalmente F con 1% (n=1). **Discusión:** Existe un incremento en los últimos años del patotipo de EPEC en países en desarrollo y desarrollados. El presente estudio concuerda con ello y también con el hecho de que las EPEC atípicas han incrementado con respecto a las típicas. ETEC sigue siendo un patotipo que también predomina y existen cepas que albergan ambas toxinas (*lt+, sth+*). EAEC es un patotipo que debe ser más estudiado ya que es la primera vez que se reporta al igual que EIEC. **Conclusión**: Existe la presencia de E. coli patógena en ambientes que pueden estar causando enfermedad y están presentes en alimentos y aguas. La vigilancia de EPEC y ETEC en el país debe ser tomada en cuenta. Este es el primer estudio que presenta los serotipos más variados en el país. La búsqueda de los demás patotipos en otras fuentes se debe realizar.

Capítulo 1: INTRODUCCIÓN

Un patógeno bacteriano es un microorganismo altamente adaptado, el cual tiene la capacidad de causar enfermedad. Las estrategias utilizadas por éste para causar infección y enfermedad generalmente incluyen un grupo dinámico de determinantes o factores de virulencia, los cuales son expresados por la interacción de una bacteria en particular con su hospedero en específico.

La variación en esta adaptación puede ser un resultado de cambios ambientales, la invasión a nuevos hábitats y otras circunstancias que ayuden a promover o inhibir la expresión de genes. Los cambios en la población microbiana o nichos ecológicos pueden ocasionar la generación de nuevos patógenos, el desarrollo de cepas virulentas y por ende la adaptación e incluso el desarrollo de resistencia a antibióticos; en fin, el desarrollo de mecanismos para lograr sobrevivir a diversas condiciones ambientales.

Los mecanismos que permiten el ajuste a condiciones ambientales incluyen la selección de la mejor variante adaptada y variaciones a partir de un ancestro común, las cuales pueden coexistir simultáneamente. La evolución a nivel molecular puede ocurrir por re-arreglo de genes (pérdida o ganancia) y transporte horizontal de genes, entre otros. Siendo este último señalado como responsable de la diversidad en la patogenicidad por la adquisición de genes que codifican por los factores de virulencia [Herve´ Philippe, 2003].

Escherichia coli es una especie bacteriana e incluye una amplia variedad de cepas que van desde patógenos altamente especializados que producen brotes de enfermedades severas, patógenos oportunistas que producen enfermedad si las defensas del hospedero están comprometidas, y cepas avirulentas que se han considerado comensales, parte de la microbiota intestinal, incluyendo aquellas cepas bien caracterizadas que son para uso de laboratorio [Sousa, 2006].

Las diferencias en la habilidad de cepas de *E. coli* para causar enfermedad y los diversos síndromes producidos por varios patotipos pueden ser atribuidas a genes específicos que codifican para los factores de virulencia y la capacidad que tiene *E. coli* para el intercambio génico [D.A. Rasko, 2008].

E. coli es una bacteria muy versátil, ya que es un patógeno causante de diarreas, y una característica básica de este tipo de patógenos, es la presencia de los factores que le permiten su persistencia en el ambiente externo. Al ser *E. coli* un habitante del intestino de mamíferos, esta bacteria ha adquirido mecanismos para vivir en ambos ambientes: en el exterior y en el interior de un hospedero [Savageau, 1983]. Es por esta razón que se ha considerado como indicador de contaminación fecal en fuentes de agua y alimentos ya que su presencia puede ser un buen pronosticador de enfermedades gastrointestinales [WHO, 2008].

Este hecho ha dado lugar a investigaciones referentes al genoma de *E. coli* y la relación con el ambiente externo. Los estudios han revelado que genotipos idénticos o similares de *E. coli* pueden ser recuperados de múltiples localizaciones en diferentes temporadas y de distintos ambientes [M. Ratajczak, 2010]. Lo antes mencionado ha abierto una brecha en investigación, todavía no concluida, sobre el entendimiento de la ecología y epidemiología de esta bacteria.

En los comienzos de la investigación de este patógeno, se caracterizaba y diferenciaba de otras, fenotípicamente. Posteriormente los estudios de serotipos permitieron de alguna manera distinguir entre cepas de *E. coli.* Finalmente, los estudios de ADN permitieron iniciar con el análisis de su diversidad genómica y el mejor entendimiento de sus variantes patógenas o patotipos y su relación entre cepas, es decir, su filogenia [Roy R. Chaudhuri, 2012].

En la actualidad se utilizan técnicas moleculares para analizar y caracterizar los polimorfismos genéticos que han ampliado el campo de tipificación de bacterias de interés epidemiológico. Dentro de estas técnicas destacan, por su poder de discriminación, las siguientes: análisis de polimorfismos de la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP- *Restriction fragment length polymorfism*) y la electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE- *Pulsed field gel electroforesis*). Sin embargo, las técnicas basadas en amplificación de ácidos nucleicos tienen muchas ventajas y son más utilizadas ya que no dependen de enzimas ni equipos especiales, tienen buena reproducibilidad, y son de relativo bajo costo.

La tendencia en numerosas investigaciones ha sido reportar las características moleculares de cepas de *E. coli* aisladas de muestras clínicas de humanos,

animales, alimentos y muestras ambientales en general. El estudio realizado en el país han tendido a estudiar dos patotipos diarreogénicos (ETEC, EPEC), lo cual ha evidenciado la importancia de conocer con más profundidad las características de las cepas circulantes en cuanto a sus patotipos [Espinoza, 2013].

Otros reportes en el país advierten la presencia de otros patotipos en otras fuentes como alimentos donde STEC se ha visto predominante en alimentos de origen cárnico [Ferrera, 2014].

Los estudios que describen las propiedades genéticas de *E. coli* aisladas de alimentos y agua destinados al consumo humano, cuyo proceso no ha sido industrial, son escasos. Es necesario estudiar la diversidad genética y la importancia epidemiológica de bacterias presentes en alimentos procesados artesanalmente y fuentes de agua. Por tal motivo el objetivo general de este estudio será determinar los grupos filogenéticos y la diversidad de cepas en cuanto a los patotipos de *E. coli* provenientes de diferentes fuentes circulando durante el periodo de 2012-2015, lo que permitirá una mejor comprensión de las consecuencias para la salud pública de la ocurrencia de *E. coli* portadoras de genes de virulencia. Los hallazgos de *E. coli* diarreogénica deben ser reportados para entender el comportamiento del microorganismo en el ambiente y buscar maneras de intervención y reducir así la exposición a *E. coli* patógenas.

Capítulo 2: MARCO TEÓRICO

1. Descripción de *Escherichia coli*

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

E. coli es una bacteria Gram negativa perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae,* anaeróbica facultativa con un tipo de metabolismo respiratorio fermentativo, puede ser no móvil o móvil por flagelos perítricos, lactosa positiva, lisina descarboxilasa negativo e indol positivo. *E. coli* puede crecer en presencia y ausencia de oxígeno; bajo condiciones anaerobias crecerá por la vía de la fermentación, produciendo

ácidos mixtos y gas como producto final. También es capaz de crecer mediante respiración anaeróbica, ya que es capaz de utilizar nitrato (NO_3), dióxido de nitrógeno (NO_2) o fumarato como aceptores finales de electrones en el proceso de transporte. Es por este hecho en parte, que *E. coli* tiene la capacidad de adaptarse a su hábitat del intestino (anaeróbico) y fuera del intestino (aeróbico) [Savageau, 1983].

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

La población de cepas comensales constituyen un reservorio importante de donde las cepas patógenas emergen continuamente. La habilidad de *E. coli* de existir como un comensal adaptado al humano, combinado con su tendencia natural de intercambio genético, su presencia ubicua, y la variación genética en reservorios aun no caracterizados, contribuyen a la aparición de cepas patógenas nuevas y con potencial de resistencia a drogas antimicrobianas. Muchos estudios demuestran que cepas patógenas de *E. coli* han derivado de cepas comensales por la adquisición de *loci* extra e intracromosomales, mutaciones pato-adaptativas y deleciones genómicas que integran la expresión de las características de patogenicidad [Gordon, 2013b].

Uno de los hábitats más colonizado es el intestino humano y de animales de sangre caliente, en el cual se reporta una densidad de 10^{12} organismos por gramo de heces, característica por la cual *E. coli* es empleada como indicador de contaminación

fecal. La detección y enumeración de coliformes es indicador de calidad sanitaria del agua, alimentos y en general como indicador de la condición sanitaria en el ambiente de proceso de alimentos [Kelly, 2009]. Monitorear los niveles de contaminación de *E. coli* es importante, ya que su presencia indica la posibilidad de existencia de bacterias patógenas, incluyendo aquellos grupos de *E. coli* que han adquirido mecanismos de patogenicidad [Michael P. Doyle, 2006].

La adquisición de los mecanismos de patogenicidad en algunos casos es expresada fenotípicamente, ya que las diferencias entre *E. coli* patógenas y no patógenas son frecuentemente detectadas a nivel molecular. Muchas de estas diferencias causan cambios en la fisiología del ciclo de vida de la bacteria. Nuevas cepas de *E. coli* emergen todo el tiempo por el proceso natural de variabilidad genética y otras cepas desarrollan características que pueden ser peligrosas en el hospedero [Sujay Chattopadhyay, 2013]. Los síntomas en un hospedero adulto pueden no pasar de un episodio de diarrea, pero puede suceder una sintomatología más severa en niños y pacientes inmunocomprometidos.

Las especies patógenas son capaces de causar una gran variedad de enfermedades. El tracto gastrointestinal, las meninges, y los riñones son los órganos diana de *E. coli* patógenas. Las enfermedades resultantes de infecciones por *E. coli* incluyen diarrea, disentería, falla renal y muerte [James R. Johnson, 2001]. El potencial de patogenicidad de una cepa particular de *E. coli* dependerá de los genes de virulencia específicos que posee. Genes de virulencia específicos definen un patotipo puntual de *E. coli*, y cada patotipo tendrá inclinación a causar una determinada sintomatología en el hospedero.

2. Criterios de clasificación de *E. coli*

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

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

Otros hallazgos condujeron a la caracterización del tipo de adherencia a las superficies o efecto en cultivos celulares, y fueron clasificadas según su patrón de adherencia a células HEp-2 como: adherencia localizada (LA), adherencia agregativa (AA) y adherencia difusa (DA). La adhesión es el primer paso para mantener a los miembros de la microbiota normal en el intestino y etapa crítica en todas las infecciones diarreicas causadas por las cepas de *E. coli* patógenas. Es importante por lo tanto comprender las características que subyacen a la adhesión de *E. coli* [Isabel C.A. Scaletsky, 1984].

Posteriormente se describió la clasificación en ocho categorías de patotipos también conocidos como patovares en función de la ubicación de la patología que producen en el organismo como *E. coli* diarreogénica (DEC) o *E. coli* extra intestinal; dos de ellos son patotipos extra intestinales: *E. coli* uropatógena (UPEC) y *E. coli* asociada a meningitis neonatal (NMEC o MAEC), y seis son diarreogénicos que se describirán posteriormente [Christian-Daniel Kohler, 2011].

3. Descripción general de patotipos de *E. coli*

Inicialmente las cepas de *E. coli* se consideraron no patógenas hasta 1940 donde éstas se vieron asociadas a diferentes brotes de diarrea infantil en países

occidentales y se asociaron a un serotipo definido como *E. coli* enteropatógena (EPEC) [Roy R. Chaudhuri, 2012]. Recientemente, para referirse a cepas de *E. coli* que causan una enfermedad y que se caracterizan por compartir determinados factores de virulencia, se han descrito 8 distintas categorías de patotipos. Los patotipos de *E. coli* diarreogénica, pueden colonizar el tracto digestivo de los humanos, pueden ser transmitidos directamente de persona a persona, de animal a persona o indirectamente a través de agua y alimentos contaminados. De acuerdo a la patogénesis y características epidemiológicas, este grupo de cepas es dividido en seis patotipos: *E. coli* enteropatógena (EPEC), *E. coli* productora de toxina Shiga (STEC), *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* entero invasiva (EIEC), *E. coli* entero agregativa (EAEC), *E. coli* difusamente adherente (DAEC). Estos patotipos son causantes de enfermedades gastrointestinales, por lo que saber la información sobre la distribución local y regional de estos patógenos es relevante para tomar medidas de prevención y control [Gustavo Varela, 2010].

Las cepas de *E. coli* extra intestinal (ExPec) incluyen *E. coli* asociada a meningitis (MAEC) y *E. coli* uropatógena (UPEC). Estas cepas comparten muchos factores de virulencia, y está claro que los clones únicos pueden causar ambos meningitis e infecciones del tracto urinario (ITU). Sobre UPEC, algunas cepas exhiben adherencia difusa en cultivos celulares y comparten las mismas adhesinas con *E. coli* difusa adherente (DAEC) [James R. Johnson, 2001].

En la figura 1 se muestra la relación entre los distintos patotipos de *E. coli* que a continuación se describen. DAEC (anaranjado en figura 1) es un patotipo heterogéneo, que ha sido ligado epidemiológicamente a diarrea e ITU. Existen

también reportes de cepas de STEC (verde), definidas así por la producción de toxina Shiga usualmente codificadas por bacteriófagos, causando ITU y otras infecciones extra intestinales. Algunas cepas de STEC son capaces de adherirse íntimamente a células epiteliales, borrar o eliminar las micro vellosidades, y provocar la formación de un pedestal de adhesión, compuesto de proteínas del citoesqueleto, una propiedad que define a *E. coli* de adhesión y esfacelamiento (AEEC). Las cepas que son ambas, STEC y AEEC (color rosa), son conocidas como *E. coli* entero hemorrágica (EHEC). El serotipo más importante encontrado dentro del patotipo EHEC es O157:H7. Las cepas de AEEC que no producen toxina Shiga son referidas como *E. coli* entero patógenas (EPEC).

Entre las EPEC, muchas cepas producen un pelo formador de penacho (BFP) y se unen a células cultivadas en un patrón de adherencia localizado. Son nombrados como EPEC típicas mientras aquellas que no producen toxina Shiga ni el pelo formador de penacho (BFP) son conocidas como EPEC atípicas. Algunas cepas de EPEC atípicas exhiben adherencia difusa [Isabel C.A. Scaletsky, 1999].

E. coli enteroinvasiva (EIEC - color gris) invade cultivos de células con alta eficiencia, se multiplica en el citoplasma, y se propaga de célula a célula. Estas cepas incluyen los organismos comúnmente clasificados en el género *Shigella,* el cual se encuentra filogenéticamente dentro de la especie *E. coli*. Las cepas clasificadas como *Shigella dysenteriae* serogrupo 1 producen toxinas Shiga y por lo tanto pueden ser descritos como miembros de ambos patotipos EIEC y STEC. *E. coli* enteroagregativa (EAEC - color azul) causa diarrea aguda y persistente y son definidas por su patrón de adherencia. Cepas de *E. coli* enterotoxigénica (ETEC)

causan diarrea aguda y son definidas por la producción de enterotoxinas termo-lábiles y termo-estables [D.A. Rasko, 2008].

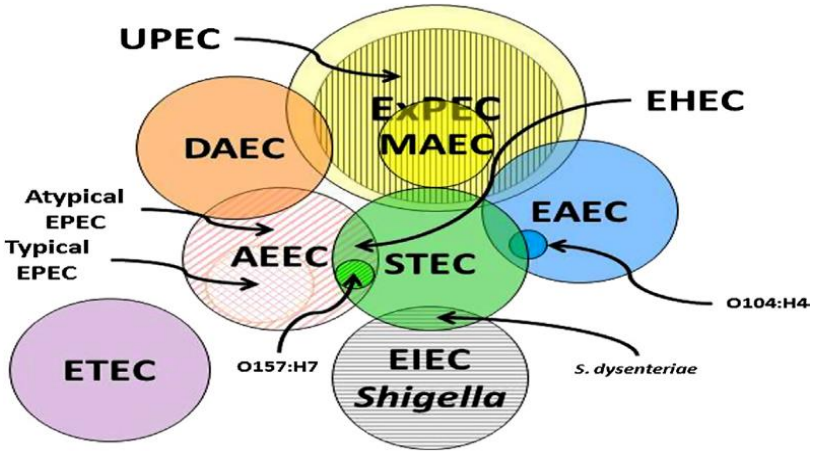


Figura 1. Relación entre los distintos patotipos de *Escherichia coli*

Tomado de: [Gordon, 2013a]

4. Epidemiologia general de *E. coli*

La diarrea es la segunda causa de muerte en niños menores de 5 años en países en desarrollo. Las cepas diarreogénicas de *E. coli* son responsables de millones de episodios de diarrea cada año en todo el mundo. ETEC es endémica en países en desarrollo y el patógeno más frecuentemente aislado en niños con diarrea, así como de adultos viajeros a zonas endémicas [Nina Williams, 2010]. Las cepas de EPEC están distribuidas ampliamente, particularmente en regiones desarrolladas. Cepas atípicas de EPEC, que carecen de pili formadores de penacho están emergiendo en países desarrollados e industrializados y están asociados con diarrea persistente. A diferencia de EPEC típica, las cepas de EPEC atípica han sido aisladas de una variedad de especie de animales.

Las cepas de EAEC han emergido como la segunda causa de la diarrea del viajero después de ETEC, y como uno de los patotipos de *E. coli* diarreogénica más aislados en diarrea infantil. La diarrea persistente en niños ha sido asociada con EAEC, tanto en países desarrollados y en desarrollo, y se han reportado brotes afectando adultos y niños por igual. Las cepas de EAEC son muy diversas, y un factor limitante para estudios epidemiológicos es el hecho que no se han detectado marcadores genéticos que identifiquen todas las EAEC [Nadia Boisen, 2013].

STEC continúa siendo una importante causa de diarrea esporádica y epidémica. STEC está presente en varias especies de animales, y es detectada en niveles bajos en evacuaciones de niños con diarrea en países en desarrollo [Islam, 2006]. La historia natural de *E. coli* diarreogénica es compleja, subrayando los factores responsables de cambios en cepas y patotipos de las mismas, incluyendo la pérdida y adquisición de elementos móviles [Nina Williams, 2010].

4.2 Epidemiologia de *E. coli* en América Latina

En América Latina, la distribución de los distintos patotipos está altamente regionalizada y el impacto de las enfermedades diarreicas son distintas en los países. Estudios epidemiológicos en México, Brasil, Argentina, Chile, Venezuela, Nicaragua, Paraguay, Uruguay, Colombia y Perú han dado a conocer un mapa único de esta distribución de patotipos, confirmando la prevalencia regional de diferentes aislamientos de *E. coli* patógena. Los casos de diarreas en México, Colombia y Nicaragua están asociados a ETEC. En contraste, el patotipo diarreogénico prevalente en Brasil, y Perú corresponden a EAEC. En Venezuela, Chile, Argentina y Uruguay, EPEC (a-EPEC y t-EPEC) es el patotipo prevalente [Torres, 2017].

Existen patotipos que requieren atención como ser el serotipo O157:H7, el cual tiene mayor impacto en el sur del continente a pesar del predominio de linajes del serotipo argentino O157 asociado con SUH en este país. En la figura 2 se muestra un mapa ilustrando la prevalencia de patotipos en América Latina.

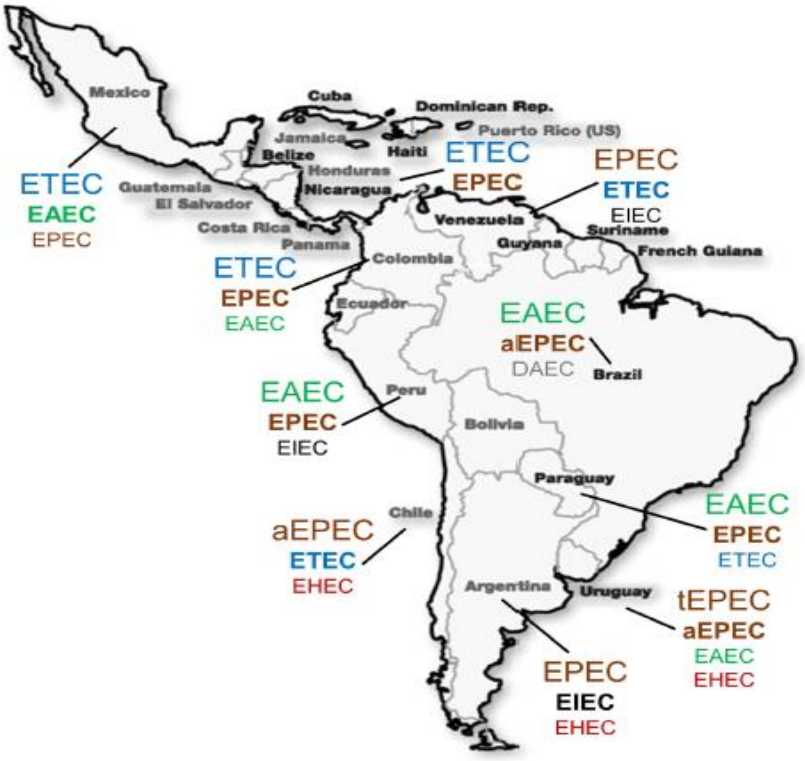


Figura 2. Mapa de América Latina con patotipos prevalentes en cada país.

(El tamaño de fuente representa el patotipo más prevalente causando enfermedades diarreicas). Tomado de [Torres, 2017]

4.3 Antecedentes de *E. coli* en Honduras

Existen reportes en Honduras que demuestran la presencia de factores de virulencia que definen un patotipo [Ferrera, 2014]. Las investigaciones de *E. coli* se

comenzaron en el 2007 donde se recolectaron cepas de origen humano (n=117), carne molida (n=52), al igual cepas de origen hídrico (n=97). Las cepas de origen hídrico tuvieron distintos orígenes ya que fueron de rio, agua residual y agua de contenedores en domicilio. Los patotipos que se buscaron en estas fuentes fueron ETEC, STEC y EPEC. Se encontraron los tres patotipos en el ambiente distribuidos de la siguiente manera. En muestras humanas ETEC fue el patotipo más frecuente (14 cepas de 117) donde las cepas que amplificaron para la toxina termolábil fueron las más frecuentes con un 64%, seguida de toxina termoestable con un 29%; existen cepas que presentaron ambas toxinas (7%). EPEC en muestras humanas fue descrito en menor frecuencia con un 4% del total analizadas. El mismo escenario se observó en aquellas cepas de origen hídrico donde un 29% presento la toxina termolábil de ETEC y 18% la toxina termoestable porcina y 35% toxina termoestable humana. Las fuentes de agua también presentaron cepas que albergan ambas toxinas en un 18%; al igual que las cepas humanas, EPEC está presente en un 4%. STEC (indistinto de stx1 o stx2) se encontró en cepas de origen cárnico (3 cepas) y origen hídrico (1 cepa) [Ferrera, 2014].

5. Descripción específica sobre cinco patotipos de *Escherichia coli*

Para un mejor entendimiento de cada uno de los distintos patotipos de *E. coli* se describirán a continuación individualmente y para efectos específicos de esta investigación cinco de ellos: *E. coli* enteropatógena (EPEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), y finalmente *E. coli* productora de toxina Shiga o (STEC).

5.a. *E. coli* enteropatógena (EPEC)

Las cepas de EPEC son causantes de diarrea y su transmisión es vía fecal-oral a causa de alimentos, agua o fómites actuando como vehículo. En adultos sanos, la diarrea inducida por EPEC puede ser iniciada con una dosis de 10^8 a 10^{10} microorganismos, siendo esta dosis infecciosa menor en niños [Matthew A. Croxen, 2013]. Los serotipos de EPEC fueron los primeros en describirse y en 1987 la Organización Mundial de la Salud acordó que los serogrupos O26, O55, O86, O111, O114, O119; O125, O126, O127, O128, O142 y O158 serían los de búsqueda prioritaria al ser los causantes de enfermedad. [WHO, 1987]. En cuanto a la patogénesis de este patotipo; luego de un acoplamiento íntimo, las cepas borran las microvellosidades del hospedero, generando así características histopatológicas conocidas como efecto de adhesión y esfacelamiento (*attaching and effacing*-A/E). EPEC se distingue de otros patotipos como EAEC, EIEC y ETEC que no provocan este efecto de A/E [Gaytan, 2016]. Los elementos genéticos responsables de la producción de este efecto citopatológico están dentro de una gran isla de patogenicidad conocida como LEE (*locus of enterocyte effacement*). Además, las cepas EPEC son clasificadas como típicas o atípicas por la presencia o ausencia del factor de adherencia de EPEC (*EPEC adherence factor*, EAF), plásmido que codifica BFP (*bundle forming pili*) [Isabel C.A. Scaletsky, 1999].

El plásmido EAF que alberga las cepas típicas de EPEC es requerido para la adherencia localizada; algunos de éstos pueden ser movilizados por conjugación hacia otras cepas de *E. coli* si contienen los genes de transferencia.

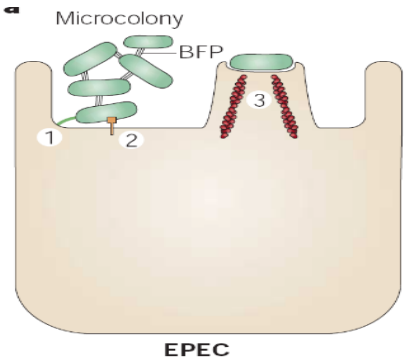
El BFP es miembro del tipo IV-B de fimbria, que son producidas por un gran número de bacterias Gram negativas patógenas; esta forma un ramillete que asemeja a sogas en la superficie celular de las cepas típicas de EPEC. Estos pili son importantes factores de virulencia y son requeridos para la adherencia localizada en células epiteliales [Isabel C.A. Scaletsky, 1984].

BFP está compuesto por subunidades repetidas de monómeros de pili, que codifican *bfpA,* el primer gen en el operón *bfp.* Una mutación en este gen conduce a la pérdida de la adherencia localizada [R.P. Anantha, 2000].

Otros factores relacionados con LEE son los genes *eae* y *tir* que codifican para la intimina y el receptor de intimina traslocado (*translocated intimin receptor*, por sus siglas en inglés). La intimina es una adhesina de la membrana externa requerida para el acoplamiento de EPEC a las células epiteliales mientras que Tir une la intimina a la superficie de la célula hospedera. La intimina ß es el subtipo más prevalente en las cepas de EPEC de humanos y animales. Mutaciones en el gen *eae* conducen a pérdida de la adhesión y esfacelamiento y la invasión de las células huésped [Shahista Nisa, 2013]. En la figura 3 se muestra el efecto en las células por parte de este patotipo.

Se han desarrollado técnicas de PCR multiplex que se enfocan en la identificación de genes de virulencia asociados a la clasificación de EPEC, y aquellos capaces de distinguir entre patotipos relacionados [Katia R.S. Aranda, 2007]. El gen *eae* es típicamente utilizado para identificar EHEC, EPEC típicas (tEPEC), y EPEC atípicas (aEPEC). Las cepas productoras de toxina Shiga son entonces excluidas basadas

en la presencia de los genes *stx*. Con el objetivo de discriminar EPEC típicas de atípicas se detectan los genes *bfp* [Shahista Nisa, 2013].



1. Adhesión inicial
2. Translocación de proteína
3. Formación de pedestal

[James B. Kaper,

Figura 3. Patogénesis EPEC.

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

5.25.b. *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) y productora de toxina Shiga (STEC)

EHEC es un subtipo de STEC que alberga factores de virulencia adicionales, como ser los sistemas de secreción tipo III (SST3), que se trasloca con efectores bacterianos en células de mamífero; también está definida por la habilidad de inducir lesiones características de adhesión y esfacelamiento en células hospederas y causar manifestaciones como colitis hemorrágica y síndrome urémico hemolítico (SUH). *E. coli* O157:H7 es el serotipo predominante de EHEC que causa infecciones humanas en el mundo [Pennington, 2010].

En 1977, después de que STX fue originalmente identificado en extractos de cultivo de *Shigella dysenteriae*, se demostró que algunas cepas de *E. coli* producían citotoxinas que mataban las células Vero y neutralizaban el suero anti-Stx. Estas citotoxinas fueron nombradas toxinas parecidas a toxina Shiga, debido a su similitud a Stx de *Shigella*, y de allí el nombre de STEC [A.D. O`Brien, 1983].

La transmisión de STEC de animales a humanos ocurre predominantemente por una variedad de vehículos alimenticios como ser lechuga, queso y carne. Un factor importante que distingue STEC, particularmente *E. coli* O157:H7, de otros patógenos de alimentos es su baja dosis infectiva, que es de 10 a 100 microorganismos [Islam, 2006].

Las infecciones por STEC pueden resultar en SUH, que es la causa más frecuente de falla renal en infantes; este síndrome se define por la triada de anemia hemolítica, trombocitopenia, y falla renal [Patricia G. Valle, 2005]. La toxina Shiga es clasificada en dos grupos Stx 1 y Stx 2 basados en su perfil serológico. Estas toxinas generalmente tienen perfiles epidemiológicos distintos; por ejemplo, los datos existentes sugieren que cepas de *E. coli* O157:H7 que producen Stx 2 y no Stx 1 se encuentran más asociadas con SUH y enfermedades severas en humanos, pero no todos los subtipos de Stx 2 están asociados con SUH en humanos [L. Beutin, 2008]. En la figura 4 se muestra la patogénesis celular de este patotipo.

En cuanto a las técnicas que se han utilizado para el diagnóstico de STEC, en primer lugar, se reportan ELISAs con anticuerpos monoclonales y policlonales, que son fáciles y menos costosas que los métodos de cultivo celular. Estas técnicas son un

poco menos sensibles, lo cual es una limitante importante para el diagnóstico ya que en los estados tardíos de la enfermedad el número de STEC en heces puede ser extremadamente bajo, pero no indetectable. Recientemente las técnicas moleculares para la detección de STEC han adquirido popularidad debido a que estas técnicas primariamente dependen en la detección de los genes de Stx usando PCR o RT-PCR, que son altamente sensibles y específicos [L.T. Nguyen, 2004].

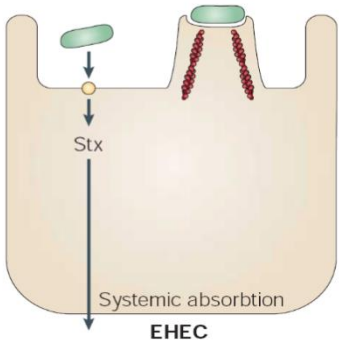


Figura 4. Patogénesis STEC.

Tomado de: [James B. Kaper, 2004]. EHEC induce también las lesiones de adhesión y esfacelamiento en el colon. La característica distintiva de EHEC es la elaboración de la toxina Shiga, que se absorbe sistemáticamente causando graves enfermedades.

5.35.c. *E. coli* enterotoxigénica (ETEC)

Este patotipo fue descubierto en el curso de una investigación clínica en Calcuta, India, durante 1950, con *Vibrio cholerae,* en la que los cultivos por esta bacteria resultaron negativos pero la sintomatología clínica era presuntiva de cólera por presentar una diarrea acuosa y deshidratación [Fleckenstein, 2013]. En ambos tipos

de países, tanto industrializados como en desarrollo, ETEC es transmitida por alimentos y agua. Los estudios epidemiológicos en los que se utilizaron voluntarios, han sugerido que el inóculo de ETEC requerido para establecer enfermedad en sujetos sanos es relativamente alto y que la transmisión de persona a persona no es común. La dosis requerida para establecer enfermedad puede ser pocos microorganismos en comparación con la dosis infectiva en países en desarrollo, es decir estas dosis pueden variar de acuerdo a geografía [C. Wenneras, 2004].

ETEC es un patotipo diverso de organismos diarreogénicos que comparten la habilidad de producir y eficientemente secretar enterotoxinas termo-lábiles (LT, *heat-labile toxin*); la cual presenta un mecanismo similar a la enterotoxina de *Vibrio cholerae*, y termo-estables (ST, *heat-stable toxin*) que contiene múltiples residuos de cisteína que le brinda estabilidad al ser expuestas al calor y ser poco inmunogénica [Dorsey; FC, 2006]. Ambas toxinas pueden expresarse juntas o solo una de estas y así ocasionar daño a células epiteliales y se ha considerado como el principal agente etiológico de la diarrea del viajero [C. Wenneras, 2004]. El periodo de incubación puede ser tan corto como 5 horas, pero generalmente el promedio es entre 1 a 2 días después de ingerir alimentos contaminados y la duración de la diarrea de 3 a 5 días [Sacks, 2011]. En la figura 5 se ilustra la patogénesis celular de este patotipo.

La toxina termo-lábil es una molécula compuesta de una subunidad B pentámera y una sola subunidad A, compuesta de dos principales dominios: A1 (responsables de toxicidad) y A2 (ancla covalentemente la subunidad A al centro del pentámero B). La actividad de la toxina reside en la subunidad A, mientras que la subunidad B

es responsable de la unión a la célula hospedera. Ambas permiten la entrada a las células epiteliales. Siguiendo con el secuestro de la subunidad A1 al citoplasma de la célula hospedera, esta actúa con los factores ribosilantes de ADP (ARFs- ADP *ribosylating factors*) para transferir ADP-ribosa desde NAD a la subunidad alfa de la GTPasa (Gsα). La formación de un complejo ternario de ADP-ribosilado Gsα GTP y adenilato ciclasa cataliza cAMP. El incremento resultante de cAMP activa la proteína quinasa A que subsecuentemente fosforila CFTR (*Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator,* por sus siglas en inglés), activando canales de cloro. Este evento hace que el cloro salga al lumen intestinal y decrece el sodio y la absorción del agua resultando así en una diarrea característica de ETEC [Fleckenstein, 2013]. ETEC puede secretar toxinas termo estables que se enganchan al dominio extracelular de guanililciclasa C (GC-C) de la superficie apical de las células epiteliales intestinales. Esta unión activa la porción intracelular de GC-C que convierte de GTP en mensajero intracelular de cGMP; las elevaciones de cGMP conducen a activación de la unión con la membrana a proteínas dependientes de cGMP que fosforilan CFTR [Jafari A, 2012]. St se divide en dos subtipos STp y Sth. Sth es de origen humano mientras que STp se identificó de una cepa que infecta cerdos, aunque también se han aislado cepas de origen bovino y humano [Nagy, 1999].

En cuanto a las técnicas para diagnóstico existen ELISAs y las técnicas moleculares para diagnóstico de ETEC que consisten en la identificación de genes que codifican para toxina termolábil y termoestable.

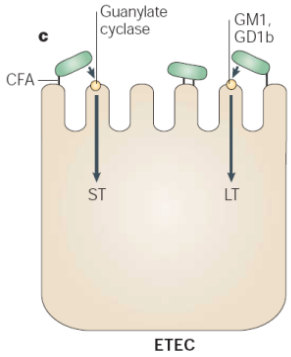


Figura 5. Patogénesis ETEC.

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

5.c.1 Factores de colonización

Los factores de colonización (CFs) son adhesinas que se fijan a las células epiteliales del intestino. Los CFs se clasifican en antígenos de superficie (CS) y factores de colonización putativos (PCF). Son proteínas expuestas sobre la superficie bacteriana. Los CS están constituidos por fimbrias o pili que facilitan la adhesión de ETEC a las células epiteliales del intestino y los PCF son adhesinas que permiten una unión más estrecha entre la bacteria y la célula hospedera, los cuales no pueden ser identificados empleando el microscopio electrónico, estos CFs son también llamados no fimbriales [Vipin Madhavan, 2015]. Los factores de colonización fimbriales comunes son cfa/I, CS1-CS18, CS21 [Anantha, 2004].

5.45.d. *E. coli* enteroinvasiva (EIEC)

EIEC se ha estudiado en conjunto con *Shigella* ya que ambas comparten un antepasado en común, pero su caracterización fenotípica es distinta. Los aislados de EIEC que causan enfermedad idéntica a la disentería causada por *Shigella* fueron identificados en 1970 [R. Lan, 2004]. Las propiedades bioquímicas y

patogénicas que EIEC comparte con *Shigella* crean un problema en distinguir estos patógenos. Por ejemplo, a diferencia de *E. coli* proveniente de microbiota normal, las cepas EIEC son no-móviles y un 70% de los aislamientos son incapaces de fermentar lactosa; éstas también son características de *Shigella sp*. Algunos serotipos de EIEC incluso comparten antígenos O idénticos o cruzados con *Shigella sp*. Adicionalmente, las cepas de EIEC son casi universalmente negativas a la actividad de lisina descarboxilasa donde casi el 90% de *E. coli* es positiva. La identificación bioquímica puede ser iniciada con cultivos en medios diferenciales/selectivos pero debido a la similitud fenotípica, bioquímica y genética se hacen difíciles de distinguir. Continuando con las características bioquímicas, por lo general el género *Shigella* es negativo en movilidad, no fermenta lactosa, fermentación de mucato y utilización de acetato de sodio. EIEC es positivo en una o más de estas pruebas, pero estos métodos no son confiables ya que muchas de las cepas de EIEC pueden mostrar un fenotipo parecido a *Shigella sp.* [R. Lan, 2004].

La técnica de PCR para detectar marcadores genéticos específicos de cada patotipo es una herramienta común de diagnóstico para diferenciar EIEC de *Shigella sp*., principalmente utilizando el gen de invasión plasmídico de antígeno H (*IpaH-invasión plasmid antigen* H). Los miembros de la familia IpaH están asociados a virulencia y sus mutantes están emparentados con el escape del fagosoma [CM Fernandez-Prada, 2000].

La patogénesis de EIEC y *Shigella* es similar después de ser fagocitada por los macrófagos; la bacteria escapa del fagosoma e induce muerte de la célula

hospedera y gana acceso al costado lateral. Dentro de la célula epitelial la bacteria lisa solo una membrana del fagosoma para evitar la muerte y replicarse dentro del citosol. Luego la bacteria polimeriza la actina de la célula hospedera creando una "cola" de actina que promueve la propagación a otras células. En la siguiente célula invadida la bacteria escapa de la doble membrana del fagosoma y la replicación y propagación continúa a través de la mucosa colónica. Finalmente, las células epiteliales se necrosan y estas células mueren liberando la bacteria en el lumen intestinal donde luego se diseminan a un nuevo hospedero por la ruta fecal-oral; sea este por agua o alimentos contaminados [Matthew A. Croxen, 2013]. En la figura 6 se ilustra la patogénesis celular de EIEC. La dosis infectiva para que EIEC produzca enfermedad es 10^8 UFC, a diferencia de *Shigella sp* donde se ha demostrado que de 200 a 5,000 organismos han producido patología.

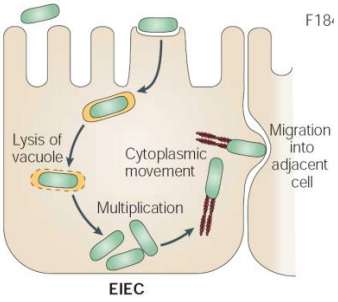


Figura 6. Patogénesis EIEC.

Tomado de: [James B. Kaper, 2004] EIEC invade las células epiteliales colónicas, lisa el fagosoma y se mueve a través de la célula nucleando microfilamentos de actina. La bacteria puede moverse lateralmente a través del epitelio en una propagación de célula a célula o puede salir y entrar de nuevo en la membrana plasmática baso-lateral.

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

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

Las diferencias entre cepas patógenas de EAEC de las que no lo son, se desconocen en su totalidad, pero estudios recientes de patogénesis han sugerido tres estados generales de infección: 1) adherencia a la mucosa intestinal por virtud de una fimbria de adherencia agregativa (AAF-*aggregative adherence fimbriae,* en inglés) y otros factores de virulencia; 2) estimulación de la producción de moco, formando un *biofilm* o biopelícula en la superficie de la mucosa intestinal; y 3) toxicidad a la mucosa, manifestada por la liberación de citoquinas, exfoliación celular, secreción intestinal e inducción de inflamación en la mucosa [N. Boisen, 2012]. En la figura 7 se ilustra el efecto citopatológico de EAEC.

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

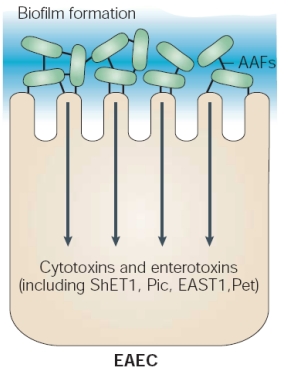


Figura 7. Patogénesis EAEC.

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

6. Descripción de la filogenia de *E. coli*

Existe una extensa subestructura genética dentro de las especies de *E. coli* y, debido a la variabilidad génica de los distintos patotipos, recientemente se ha investigado sobre la relación entre cepas de acuerdo a grupos filogenéticos. Se han separado en los siguientes grupos en términos de su acción en el hospedero: a) comensales, b) patotipos intestinales y c) patógenos extraintestinales. Con base en estudios de análisis de isoenzimas (MLEE- *Multilocus Enzyme Electrophoresis*) en la colección de referencia de *E. coli* (ECOR- *E. coli reference collection*) se han separado las cepas de *E. coli* en 4 grupos filogenéticos principales: A, B1, B2, y D. Las cepas comensales están ubicadas en lo grupos filogenéticos A y B1, las cepas

patógenas extra intestinales se encuentran en el grupo B2 y D, los patotipos intestinales en cualquiera de los filo-grupos [Roy R. Chaudhuri, 2012].

En adición a esos grupos filogenéticos existe un grupo E en el cual O157:H7 es el miembro más conocido. Otros científicos reconocen la existencia de filo grupos conocidos como C y F. Las cepas del filogrupo C están estrechamente relacionadas con el filogrupo B1 y cepas del filogrupo F están relacionadas con las cepas de los filogrupos D y B2 [Gordon, 2013a]. Existe un incremento en la evidencia de que los distintos grupos filogenéticos juegan distintos roles ecológicos; por ejemplo, en humanos, el grupo A y B2 son más comunes, siendo los grupos B1 y D menos prevalentes, mientras que en animales las cepas B1 son predominantes seguidos de A, B2 y D [Olivier Tenaillon, 2010].

Como ya se comentó anteriormente, las técnicas de tipificación molecular son muy útiles para realizar estudios ecológicos y epidemiológicos. A pesar de que en la actualidad ya existe una gran variedad, continúan surgiendo nuevas técnicas que mejoran o complementan los resultados obtenidos con las anteriores. MLEE ha permitido grandes avances en la investigación de las relaciones génicas entre las distintas cepas, pero existen unas de éstas que no son tipificables con esta metodología debido a la degradación de las proteínas durante el proceso de preparación de las muestras. Por ello, una nueva técnica basada en la secuenciación de genes (MLST- *Multilocus sequence typing*, en inglés) se presenta como una alternativa para mejorar la capacidad de identificación de estos agentes [Roy R. Chaudhuri, 2012].

La tipificación multilocus de secuencias (MLST), a pesar de ser una técnica relativamente novedosa en el campo de la biología molecular, es una técnica genética empleada para realizar clasificaciones taxonómicas de bacterias, hongos y parásitos. Se basa en el análisis de los pequeños cambios producidos en las secuencias de una serie de genes denominados “housekeeping” (que generalmente codifican funciones metabólicas esenciales) de tamaños entre 450-500 pb para caracterizar las distintas cepas mediante perfiles alélicos únicos (denominados en inglés *sequence type-ST*). Este sistema de tipificación es altamente discriminatorio y basta el análisis de pocos genes (6-8) para obtener buenos resultados. Esta técnica, al igual que la MLEE, presenta la limitación relacionada con el costo que supone [Roy R. Chaudhuri, 2012].

No obstante, se han desarrollado otras técnicas para establecer las relaciones filogenéticas de esta bacteria. Existe un protocolo de PCR triple para permitir la clasificación de las cepas de *E. coli* en los cuatro grupos filogenéticos mayores A, B1, B2 o D. Se basa en la presencia o ausencia de los genes *chuA* (presente en las cepas de los grupos B2 y D, ausente en B1 y A) junto con *yjaA* (presente en el grupo B2, ausente en grupo D) y el fragmento de ADN TSPE4.C2 (presente en grupo B1, y ausente en grupo A) [Olivier Clermont, 2000].

Las comparaciones con secuencias basadas en análisis filogenéticos demuestran que la triple PCR de Clermont permite la tipificación de alrededor del 85-90% de las cepas de *E. coli,* con el correcto grupo filogenético [David M. Gordon, 2008]. Este método es simple y presenta la ventaja de un bajo costo en comparación con MLST y ha proporcionado evidencia que las cepas de varios grupos filogenéticos difieren

en sus características fenotípicas y genotípicas, su nicho ecológico y su habilidad para causar enfermedad [Ingmar Zudea, 2013].

Estudios realizados mediante MLST, han generado la caracterización de cepas de *E. coli* de fuentes no clínicas. Esto ha permitido un mejor entendimiento sobre la creciente diversidad y variación genética del género *Escherichia* y además describir cinco clados de *Escherichia*. Este término fue usado fundamentado en los métodos fenotípicos estándares, y las cepas pertenecientes a estas nuevas especies de *Escherichia* son fenotípicamente indistinguibles de *E. coli.* Por esta razón su importancia para la microbiología aplicada y clínica no ha sido determinada. Estos clados son cinco (CI-CV) y fueron aislados de fuentes humanas, animales y ambientales [Seth T.Walk, 2009].

Recientemente (2013) la misma técnica de Clermont para ubicar cepas de *E. coli* en los cuatro grupos filogenéticos mayores sufrió una modificación y ahora permite ubicarlos en siete grupos (A, B1, B2, C, D, E, F) pertenecientes a *E. coli sensu stricto* y a un octavo clado críptico llamado I. Este método adiciona un gen aparte de los genes : *chuA (*gen requerido para transporte de hemo en EHEC O157:H7 [Alfredo G. Torres, 1997])*, yjaA* (gen inicialmente identificado en la secuencia completa del genoma de *E. coli* K-12 cuya función es desconocida [Olivier Clermont, 2000]), TspE4.C2 (un fragmento de ADN que posteriormente se caracterizó como un gen esterasa lipasa [Olivier Clermont, 2013]), que es el gen *arpA,* que permite que las cepas pertenecientes al filogrupo F se diferencien de las pertenecientes al grupo D. El gen *arpA* está presente en todas las cepas de *E. coli* con excepción de las pertenecientes al filo grupos B2 y F, y también ausente en los clados crípticos II, III,

IV, V, así como en *Escherichia albertii* y *Escherichia fergusonii.* Este método está validado y permite asignar aproximadamente 95% de las cepas de *E. coli* en el correcto grupo filogenético [Olivier Clermont, 2013]. Una limitación de este método es que algunas cepas no se podrán definir en un grupo filogenético especifico ya que se necesitaría análisis MLST para saberlo, pero es ventajoso obtener la identificación de 4 grupos filogenéticos adicionales en comparación con su técnica predecesora para un mejor entendimiento de la eco epidemiología de este género.

Capítulo 3: METODOLOGÍA

1. Objetivo General

- Caracterizar los patotipos y grupos filogenéticos de *Escherichia coli* circulantes en Honduras, aislados de diferentes fuentes durante el periodo de 2012-2015.

2. Objetivos específicos

- Determinar molecularmente la frecuencia de cinco patotipos diarreogénicos de *E. coli* procedentes de diferentes fuentes durante el periodo 2012-2015.
- Clasificar molecularmente los patotipos diarreogénicos de *E. coli* de acuerdo a la presencia de los genes *chuA, yjaA, TSPe4.C2, arpA* en los 8 grupos filogenéticos (A, B1, B2, C, D, E, F, y clado 1).

3. Diseño de investigación

Se propuso un diseño descriptivo observacional con un alcance exploratorio y enfoque cuantitativo.

4. Unidad de análisis

Producto de 4 estudios anteriores se han recolectado desde el año 2012 diferentes cepas de *E. coli* las cuales pertenecen a la colección del cepario del Laboratorio Teasdale-Corti. Estos estudios incluyen: un estudio llevado a cabo en pacientes pediátricos en diferentes centros asistenciales de salud en Tegucigalpa y Comayagüela, un estudio para evaluar la calidad microbiológica de fuentes de agua para consumo humano y recreacional en la misma zona geográfica y además un estudio en el Lago de Yojoa, un estudio de calidad microbiológica en productos lácteos artesanales y finalmente un estudio de calidad microbiológica en alimentos como lechugas y carne molida.

4.1 Cepas de origen humano

La investigación se llevó a cabo en el Hospital de Especialidades del Instituto Hondureño de Seguridad Social, en el Hospital Escuela Universitario y en el Centro de Salud Alonso Suazo. La población estudiada fueron niños menores de tres años de edad, que acudieron con cuadro de diarrea aguda a los centros mencionados. En la figura 8 se muestran los establecimientos de salud donde se recolectaron las muestras.

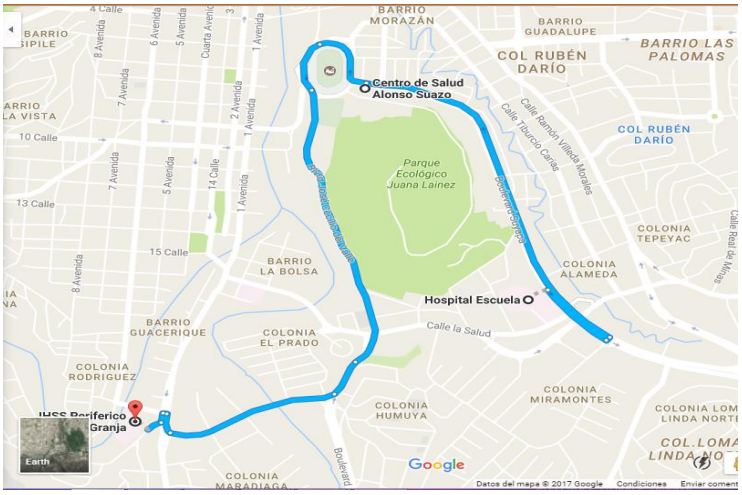


Figura 8. Localidades de Centros de atención a la salud donde se tomaron las muestras diarreicas.

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

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

4.2 Cepas de quesos artesanales

Se analizaron un total de 72 cepas provenientes de dos estudios de evaluación microbiológica de quesos artesanales. Del primer estudio se obtuvieron 24 cepas, esta investigación fue realizada a partir de muestras de queso artesanal adquiridas en diferentes establecimientos de Tegucigalpa y Comayagüela [Coello, 2015]. El segundo estudio aportó 48 cepas de *E. coli* de quesos artesanales variados. Estos quesos fueron obtenidos de distintos departamentos de Honduras que pertenecen a las zonas productoras de lácteos artesanales, los cuales están organizados en regiones productoras. Los departamentos de la región centro oriental incluyen: Olancho, El Paraíso, Yoro y Atlántida. En la región occidental el departamento de Ocotepeque, y de la región sur o del Pacifico se obtuvieron del departamento de Valle [Montoya, 2015]. En el siguiente mapa se muestra el número de cepas aisladas por localidad (Fig. 9).

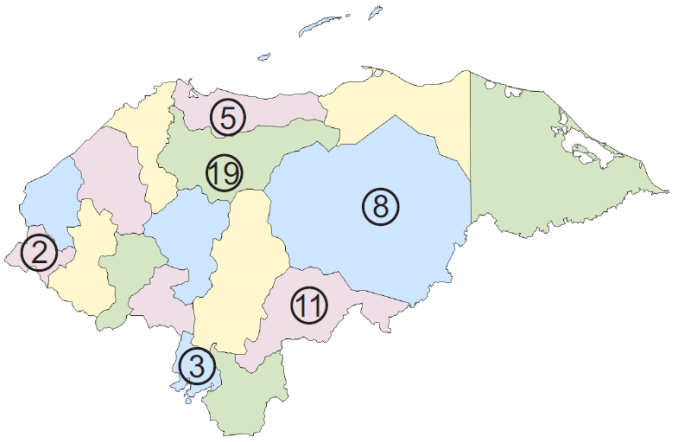


Figura 9. Número de cepas de *E. coli* aisladas de quesos artesanales por departamento. Un total de 48 cepas fueron analizadas.

En la región centro oriental se obtuvieron 24 cepas; distribuidas de la siguiente manera: Olancho (n=8), El Paraíso (n=11) y Atlántida (n=5). En la región Occidental se obtuvieron 21 cepas; Yoro (n=19) y Ocotepeque (n=2) y de la región sur del departamento de Valle (n=3). La mayoría de cepas se obtuvieron de queso semiseco (n=41), queso seco (n=4) y queso fresco (n=3).

4.3 Cepas de origen hídrico

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

En el segundo estudio correspondiente al Lago de Yojoa se realizaron 6 jornadas bimensuales durante un año entre 2014 y 2015, que resultaron en tres muestreos en época seca y tres en época lluviosa. Se ubicaron seis estaciones de muestreo las cuales se identifican en el siguiente mapa (Figura 10).

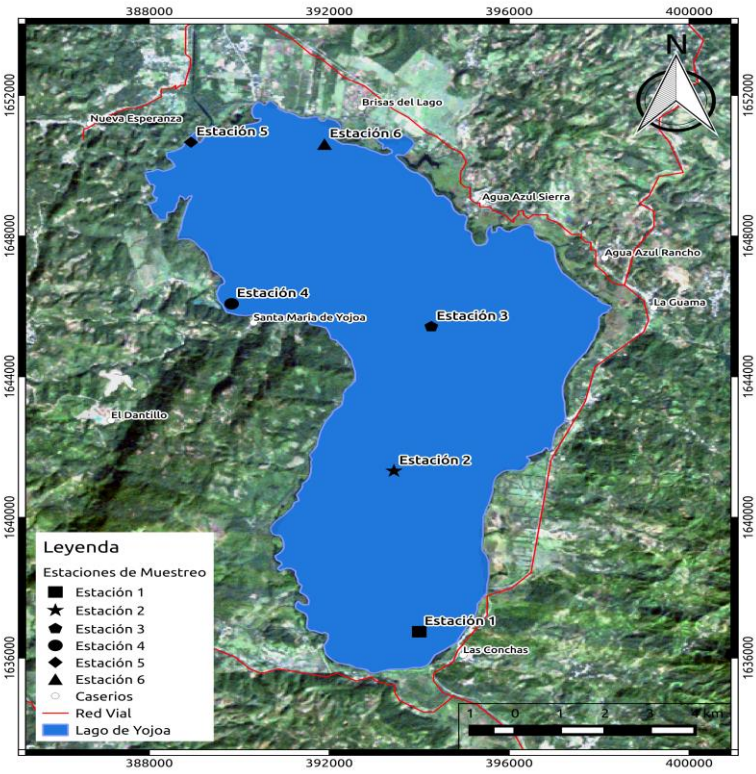


Figura 10. Mapa del lago de Yojoa con las estaciones de monitoreo, mayo de 2014 a marzo de 2015. Tomado de:[Hernándes Oviedo, 2016]

4.4 Cepas de alimentos (lechugas y carne molida)

Se obtuvieron un total de 22 cepas aisladas de alimentos**;** 16 cepas de lechugas y 6 cepas de carne molida de mercados y supermercados de Tegucigalpa y Comayagüela.

5. Muestra

Se aplicó un muestreo por conveniencia, el cual se propuso analizar inicialmente 200 cepas conservadas en el cepario del laboratorio Teasdale-Corti.

6. Periodo de estudio

Se planeó que el estudio tuviera una duración de 10 meses, comprendidas entre los meses de febrero a octubre de 2016. El periodo de este estudio se prolongó, dividiéndose de la siguiente manera: 4 meses en organización de cepario de enterobacterias UNAH, 4 meses análisis serológico y análisis molecular en UNAM, finalmente se emplearon 2 meses para el análisis molecular en los laboratorios Teasdale-Corti y de Biología Molecular en la UNAH. Un total de 15 meses fueron invertidos para el análisis de laboratorio.

7. Recolección de datos

Las fuentes primarias para la recolección de datos fueron las cepas del Laboratorio Teasdale-Corti. Se utilizó una hoja de registro de cepario y una hoja de resultados (Ver Anexo 1 y 2) para la debida recolección de información de las cepas de *E. coli* a evaluar y el registro de los resultados obtenidos en los análisis moleculares. El sistema de registro constó de un respaldo en forma física utilizando el Anexo 1 y de forma digital utilizando para esto el programa Excel y facilitar el análisis de resultados de frecuencia. Las fuentes secundarias de recolección de información fueron los informes técnicos de los estudios que permitieron coleccionar las cepas los cuales permitieron identificar el origen y códigos de estas cepas. Las cepas codificadas se ordenaron por caja; estos registros se muestran en el Anexo 3.

8. Análisis de laboratorio

Se realizó el procesamiento bacteriológico de reactivación y verificación de viabilidad y pureza de las cepas en el Laboratorio Teasdale-Corti y los análisis moleculares en el Laboratorio de Biología Molecular de la Escuela de Microbiología;

ambos laboratorios cuentan con la infraestructura necesaria para ejecutar la investigación propuesta. Adicionalmente se realizó un análisis de clasificación de serotipos de las cepas al igual que su filogenia y factores de virulencia y algunos factores de colonización (principalmente de las cepas con serotipos de ETEC) en el Laboratorio de Patógenos Entéricos en el Departamento de Salud Pública de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México. El flujograma de trabajo que se empleó para cada una de las cepas se describe en el anexo 4. Los códigos de cepas trabajados se describen en el anexo 5.

8.1 Confirmación de identificación bioquímica

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

8.2 Determinación antigénica de cepas de *E. coli*

La tipificación serológica se realizó utilizando 187 sueros (SERUNAM) contra los 187 antígenos somáticos (O) y 53 sueros contra los antígenos flagelares (H) del esquema antigénico de *E. coli.* Estos sueros se obtuvieron de conejos inmunizados con cepas de referencia de *E. coli* (NCTC- *National Collection of Type Culture*). El

procedimiento para cada antígeno se describe en el Anexo 6. Terminada la identificación bioquímica y serológica de las cepas, se clasificaron en serogrupos (los serotipos correspondientes a cada patotipo). En algunos casos un serotipo se encontró reportado por más de un patotipo, lo que se tomó en cuenta para aumentar las posibilidades de encontrar factores de virulencia correspondientes para cada uno. La serología sirve como un orientador del patotipo correspondiente ya que en la naturaleza pueden existir cepas híbridas que contienen uno o más factores de virulencia.

8.3 Caracterización molecular de patotipos de *E. coli*

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

8.4 Extracción de ácidos nucleicos

La caracterización de cepas se llevó a cabo en el Laboratorio de Patógenos Entéricos de la UNAM, y siguiendo sus procedimientos se utilizó el método de extracción descrito por Islam (Ver Anexo 7) [Islam, 2006]. En el laboratorio de Biología Molecular en UNAH se utilizó el método descrito por Boom solamente para aquellas cepas control [R. Boom, 1990].

8.5 Amplificación de genes mediante Reacción en cadena de la polimerasa PCR

8.5.a. PCR Factores de virulencia y colonización de patotipos

Se efectuaron varios protocolos de PCR para determinar la presencia de secuencias específicas en genes que codifican para factores de virulencia de cinco patotipos diarreogénicos de *E. coli* (EPEC, EAEC, ETEC, EIEC y STEC). Los marcadores de virulencia a utilizar incluyeron, *eae* (gen estructural para la intimina en EPEC y EHEC), *bfpA* (gen estructural para BFP de las EPEC típicas) y *eaf*, *AggR* (activador transcripcional de AAFs de EAEC), *lt*, *sth* y *stp* (enterotoxinas de ETEC), *IpaH* (plásmido de invasión de antígeno H encontrado en EIEC y *Shigella*) en este se incluyó el gen *lacY* del operón lactosa para confirmar la presencia de *E. coli*, y *stx* (Toxina Shiga 1 y 2). Los iniciadores, secuencias y cepas de referencia empleados se describen en la Tabla 1.

Genes	Código	Secuencia de primers 5´a 3´	Peso de amplicón (pb)	Referencia	Cepa de referencia
stx1	Vtx-det-F1	GTACGGGGATGCAGATAAATCGC	209	[Scheutz, 2012]	87657 108287
	Vtx1-det-R1	AGCAGTCATTACATAAGAACGYCCACT			
stx2	F4	GGCACTGTCTGAAACTGCTCCTGT	627		E32511
	R1	ATTAAACTGCCACTTCAGCAAATCC			
	F4.f	CGCTGTCTGAGGCATCTCCGCT	625		
	R1-e/f	TAAACTTCACCTGGGAAAGCC			
Eae	SK1	CCCGAATTCGGCACSAGCATAAGC	864	[Schmidt, 1994]	87237 108287
	SK2	CCCGGATCCGTCTGCCCAGTATTC			
Bfp	bfp-F	AATGGTGCTTGCGCTTGCTGC	326	[Gunzburg, 1995]	87237 E2348
	bfp-R	GCCGCTTTATCCAACCTGGTA			
Eaf	EAF-F	CAGGGTAAAAGAAAGATGATAA	397	[Franke, 1994]	87237 E2348
	EAF-R	TATGGGGACCATGTATTATCA			
Lt	LtA-F	ACGGCGTTACTATCCTCTC	273	[Rodas, 2009]	H-10407
	LtA-R	TGGTCTCGGTCAGATATGTG			
Stp	Stp-F	TCTTTCCCCTCTTTTAGTCAG	166	[Rodas, 2009]	
	Stp-R	ACAGGCAGGATTACAACAAAG			
Sth	Sth-F	CTTTCTGTATTATCTTTTTCACCTTT	181	[Chattopadhyay, 2012]	H-10407
	Sth-R	CACCCGGTACAAGCAGGATTAC			
Cfa	CFAI-F	GGTGCAATGGCTCTGACCACA	479	[Bekal, 2003]	H-10407 115365
	CFAI-R	GTCATTACAAGAGATACTACT			
cs1	Cs1-F	GCTCACACCATCAACACCGTT	321		112114
	Cs1-R	CGTTGACTTAGTCAGGATAAT			
cs3	CS3-F	GGGCCCACTCTAACCAAAGAA	401		112114
	CS3-R	CGGTAATTACCTGAAACTAAA			
cs21	CS21-F	ATGAGCCTGCTGGAAGTTATCATTG	608	[Mazariego-Espinosa, 2010]	9034ª 115362
	CS21-R	TTAACGGCTACCTAAAGTAATTGAGTT			
IpaH	EM_Sh ipaH_F	ATCTAATAACTTTGGATGTGTCCGA	187	[Navarro, 2016]	DYS6 287780 (O42)
	EM_Sh_ipaH_R	TTAAGATTAGAAGGCAGAGATGGAA			
LacY	EM LacY_F	CAATAATCAGTTCGTTTTCTGGC	241		
	EM LacY_R	AGCAAACTGTTGGTCAAAAACAT			
AggR	aggR-F	CTAATTGTACAATCGATGTA	308	[Czeczulin, 1999]	49766
	AggR-R	ATGAAGTAATTCTTGAAT			

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

8.5.b. PCR Grupos filogenéticos

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

Genes	Código	Secuencia de primers 5´a 3´	Peso de amplicón (pb)	Referencia	Cepa de referencia
chuA	chuA-F	ATGGTACCGGACGAACCAAC	288	[Olivier Clermont, 2013]	K-12 116979 108287 ECOR 70
	chuA-R	TGCCGCCCAGTACCAAAGACA			
yjaA	yjaA-F	CAAACGTGAAGTGTCAGGAG	211		
	yjaA-R	ATTGCGTTCCTCAACCTGTG			
TspE4.C2	TspE4-F	CACTATTCGTAAGGTCATCC	152		
	TspE4-R	AGTTTATCGCTGCGGGTCGC			
arpA	arpA-F	AACGCTATTCGCCAGCTTGC	400		
	arpA-R	TCTCCCCATACCGTACGCTA			
*arpA**	ArpAgpC-F	AGTTTTATGCCCAGTGCGAG	219		
	ArpAgpC-R	TCTGCGCCGGTCACGCCC			
*trpA***	TrpBA-F	CGGCGATAAAGACATCTTCAC	489		
	TrpBA-R	GCAACGCGGCCTGGCGGAAG			

*Corresponde al primer ArpAgpC (Filo grupos A o C)
** Corresponde al primer trpBA usado como control interno.

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

Al igual que en los métodos de extracción de ADN, en ambos laboratorios se emplearon diferentes equipos: un termociclador Multigene Optimax en el laboratorio de patógenos entéricos de la UNAM y un termociclador Gene Amp PCR System 9700 (Applied Biosystems ®) en el laboratorio de Biología Molecular UNAH. La distribución de los productos de PCR se realizó en geles de agarosa a distintas concentraciones según los protocolos estandarizados (ver anexo 9 y 10). La coloración de los geles se realizó en UNAM con Red gel (Biotium, Biolabs) y en UNAH se utilizó bromuro de etidio. La visualización de los amplicones en gel se realizó en transiluminador (Biosens SC805-Gel Image Systems). Los protocolos de PCR detallados con programa de termociclaje, controles, reactivos se encuentran en los anexos 9 y 10. Las fotografías detalladas de los distintos PCR se ubican en el anexo 13.

9. Análisis bioestadístico

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

10. Consideraciones éticas

Las consideraciones éticas en las cepas de origen hídrico y de los diferentes alimentos no existen; ya que las muestras de donde se aislaron fueron obtenidas de manera aleatoria mediante los distintos proyectos realizados. Las muestras diarreicas de origen humano a utilizar, desde el proyecto inicial de su aislamiento fueron anonimizadas, es decir que no tienen un registro que se pueda rastrear, lo cual conlleva a que no habrá conflictos éticos y de interés por el uso de las cepas recolectadas en el laboratorio Teasdale-Corti. No obstante, se sometió el protocolo a revisión y aprobación por el CEI-MEIZ (Ver Anexo 11).

11. Consideraciones de Bioseguridad

E. coli es un microorganismo infeccioso clasificado en el grupo de riesgo 2 para los niveles de bioseguridad en los laboratorios. El grupo de riesgo 2 representa un riesgo individual moderado y un riesgo poblacional bajo, por lo que se utilizaron técnicas microbiológicas apropiadas. Se validaron los procedimientos operativos estándares para el manejo de cepas en la implementación de las técnicas para su caracterización. Las cepas viables se trabajaron en la cabina de bioseguridad clase II tipo A2. Utilizando además el equipo de protección personal indispensable para este nivel (gabacha y guantes) [Zelaya, 2009]. Se adjunta en los anexos 18 al 21

las hojas de seguridad de los distintos patotipos de *E. coli* y en el anexo 22 el formulario de bioseguridad de la MEIZ respectivamente.

Los procedimientos moleculares fueron ejecutados siguiendo las directrices de bioseguridad y las buenas prácticas de laboratorio establecidas en cada laboratorio, para garantizar al máximo la no contaminación de la muestra a evaluar, asegurando de esta manera la fiabilidad de los datos.

12. Limitaciones

Este estudio tiene una limitación en cuanto a una de las técnicas a utilizar ya que no fue posible determinar algunos grupos filogenéticos al momento de la amplificación en vista de que no todas las cepas respondieron al perfil investigado. En la literatura se refiere hacer MLST a aquellas cepas que no se puedan categorizar con la técnica de PCR al igual que la construcción de un árbol filogenético.

Capítulo 4: RESULTADOS

El objetivo de nuestro estudio fue caracterizar molecularmente las cepas de diversos orígenes que se habían conservado en el laboratorio de Teasdale-Cortí, producto de estudios anteriores, a fin de conocer los patotipos circulantes y los grupos filogenéticos a los que se encontraban asociadas estas cepas; por lo que fue necesario entonces desarrollar un protocolo de trabajo que permitiera asegurar la viabilidad y pureza de las cepas en estudio, la caracterización fenotípica, una serotipificación mediante la cual se establecieron los lineamientos a seguir en la caracterización molecular.

Se llegaron a analizar 212 cepas, pero después de su análisis se eliminaron 24 cepas de origen de quesos artesanales (primer estudio), ya que sus resultados de serología, filogenia y resultados moleculares presentaron el mismo serotipo, grupo filogenético, y su perfil molecular fue negativo. Por lo tanto, los resultados que se presentan a continuación son los relativos a 188 cepas.

Las 188 cepas pudieron caracterizarse mediante las técnicas propuestas y buscando obtener la mayor cantidad de resultados positivos de factores de virulencia guiados por el serotipo de cada cepa. Los resultados, al igual que la presentación de unidad de análisis se realizó diferenciando cada una de las fuentes: humanas, hídricas y alimentos. Se diseñaron dos tablas para una mejor organización de los resultados, en cada grupo de cepas según su procedencia; una en la que se presentan los resultados de acuerdo al grupo filogenético al cual pertenecen los distintos serotipos y su respectiva frecuencia; y en la segunda tabla de cada procedencia se presentan los resultados de acuerdo a los patotipos en la

que se describe el serotipo, grupo filogenético y genes para los cuales amplificaron los distintos serotipos. Los resultados completos y sin categorizar se ubican en el anexo 12. Los resultados, de una manera general e indistintamente de la fuente se discuten al final de la presentación de resultados por fuente.

1. Identificación bioquímica

La determinación del perfil bioquímico consistió en la utilización de glucosa y lactosa con producción de gas, la producción de indol y ácido de la fermentación de la glucosa (rojo de metilo), la producción de ureasas, la deaminación de la fenilalanina, la reacción de Voges-Proskauer, y la utilización de gluconato y malonato. De las 188 cepas analizadas, 7 no concordaron con el perfil bioquímico de *E. coli* y se sustituyeron con nuevas cepas. Las 7 cepas correspondían a los proyectos de aguas (4 cepas) y carne molida (3 cepas) en el departamento de Francisco Morazán. Para todas las otras cepas el perfil bioquímico fue coincidente con el perfil clásico de *E. coli*. A su vez durante el proceso de identificación bioquímica se obtuvieron 11 cepas sorbitol positivo (en búsqueda de cepas presuntivas de STEC).

2. Serología

En el capítulo 2 se mencionaron las similitudes que existían entre los géneros *Escherichia* y *Shigella* ya que filogenéticamente tienen ancestros comunes. En cuanto a serología tres cepas de origen humano presentaron antígenos de *Shigella dysenteriae* (dys6 y dys15). Los serotipos comunes por fuente y los más frecuentes por cada una se describen en el análisis realizado por origen.

3. Cepas de origen humano

Los resultados de las 86 cepas de origen humano se muestran en la tabla 3. Estos se han dividido en serotipos, de acuerdo a los grupos filogenéticos en que se encuentran y la frecuencia de cada uno.

Serotipo	N	Grupo	Serotipo	N	Grupo	Serotipo	N	Grupo
dys6:H26	1	A	dys15:H10	2	B1	O8:H9	1	C
O?:H-	5		O109:H21	1		O20:H1	1	
O?:H10	2		O113:H10	1		O?:H-	1	D
O?:H4	2		O150:H8	2		O1:H?	1	
O?:H9	1		O159:H21	1		O15:H18	1	
O101:H9	2		O173:H51	5		O166:H15	1	
O128ab:H-	1		O23:H25	1		O23:H25	1	
O16:H48	1		O8:H16	1		O44:H18	1	
O171:H10	1		08:H19	3		O73:H18	2	
O176:H10	1		O8:H31	1		O86:H2	2	
O20:H?/H-	1		O88:H8	2		O86:H18	1	
O20:H30	3		OR:H27	1		O86:H34	1	
O20:H41	1		O100:H31	1	B2	O44:H-	1	E
O27:H6	2		O2:H6	2		O154:H45	1	
O6:H10	1		O25:H4	3		O169:H41	1	
O60:H-	2		O6:H1	3		O20:H18	1	F
O65:H32	3		O91:H21	1		O166:H15	1	U
O76:H45	1							
O92:H10	2							
O92:H33	2							
OR:H33	1							
Total:	**36**			**31**			**19**	**86**

Tabla 3. Serotipos de *E. coli* aislada de heces diarreicas en niños menores de tres años.

El serotipo más frecuente en las cepas de origen humano es O?:H- (n=6) y este se encuentra en dos grupos filogenéticos (A, D). El serotipo O113:H10 (n=5) según literatura [Rodriguez-Angeles, 2002] pertenece a el patotipo STEC (ver anexo 17),

pero como se discutió previamente existen cepas híbridas que pueden transportar uno o más factores de virulencia. En el caso de que los serotipos estén dentro de este patotipo se realiza una distinción entre EPEC y STEC.

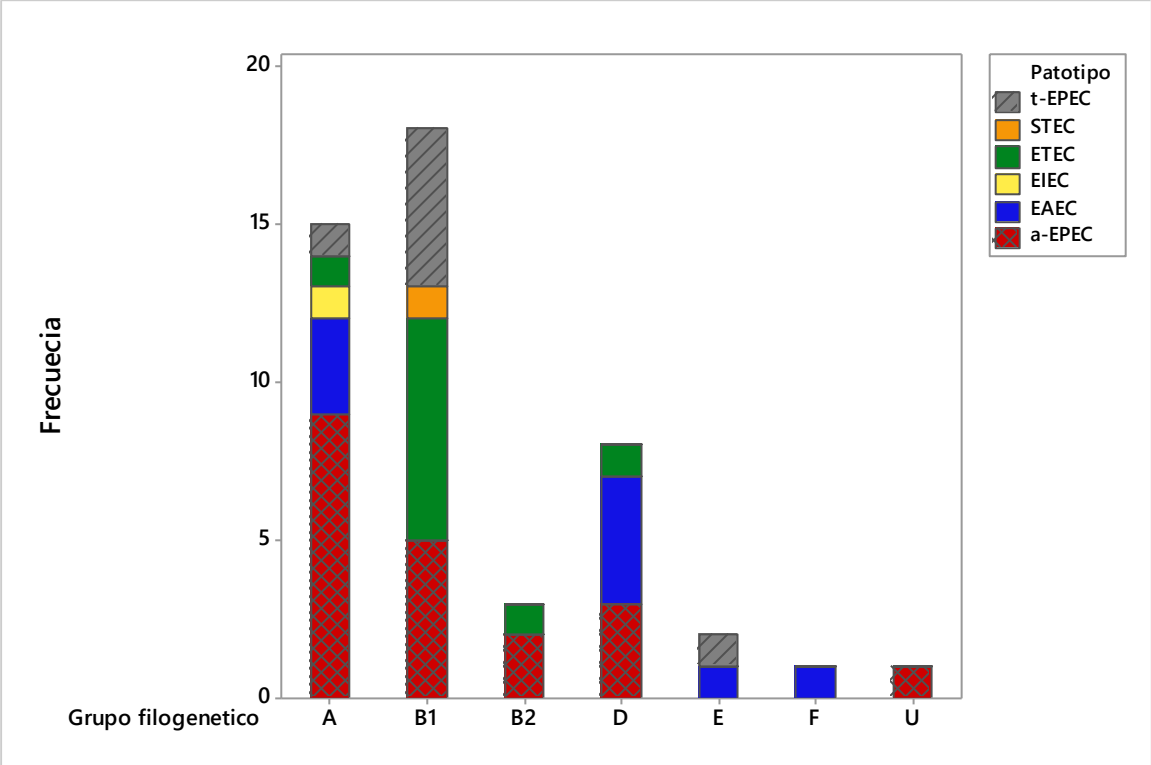
El grupo filogenético más frecuente es el A con 42 % (n=36), le sigue el grupo B1 con 24 % (n=21), D con 14 % (n=12), B2 con 12 % (n=10). Los grupos filogenéticos con menor frecuencia son E 3 % (n=3), C 2 % (n=2), F 1 % (n=1) y U 1% (n=1) de una cepa que no se pudo determinar su grupo filogenético. El factor de virulencia positivo por cada serotipo se presenta a continuación (Tabla 4).

Serotipo	N	Grupo	Patotipo	Gen
O?:H9	1	A	a-EPEC	*eae*+
O101:H9	1			
O128ab:H-	1			
O171:H10	1			
O176:H10	1			
O20:H41	1			
O60:H-	2			
O76:H45	1			
O88:H8	1	B1		
O173:H51	4			
O100:H31	1	B2		
O2:H6	1			
O44:H18	1	D		
O73:H18	1			
O86:H2	1			
O166:H15	1	U		
O65:H32	1	A	t-EPEC	*eae*+,*bfp*+
O88:H8	1	B1		
O109:H21	1			
O23:H25	1			
O150:H8	1			
O173:H51	1			
O169:H41	1	E		
O?:H10	2	A	EAEC	*aggR*+
O92:H10	1			

O86:H2	1	D		
O15:H18	1			
O86:H18	1			
O86:H34	1			
O44:H-	1	E		
O20:H18	1	F		
O16:H48	1	A	EIEC	*Ipa*H+
O113:H10	1	B1	STEC	*stx1*+
O20:H30	1	A	ETEC	*lt*+,*sth*+
dys15:H10	2	B1		
O159:H21	1			
O81:H31	1			
O8:H19	3			*stp*+
O25:H4	1	B2		
O73:H18	1	D		*sth*+
TOTAL	48			

Tabla 4. Resultados de factores de virulencia en cepas de origen humano.

En la tabla 4 se observa que en las cepas de origen humano se identificó la presencia de los 5 patotipos diarreogénicos. Se dividieron por serotipo, grupo filogenético y la frecuencia de acuerdo a los factores de virulencia que presentó cada cepa. En la gráfica 1 se muestran las cepas que amplificaron para factores de los distintos patotipos agrupados según su grupo filogenético.



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

Se describe un 56 % de cepas positivas (n=48) del total de cepas humanas (n=86). El patotipo con mayor frecuencia fue EPEC con un 56 % (n=27) siendo estas divididas en EPEC atípicas 41 % (n=20) y EPEC típicas 15% (n=7). En cuanto a los grupos filogenéticos a-EPEC presentó mayor representación el grupo A (n=9), y D (n=3). El serotipo O173:H51 (n=5) y el O88:H8 (n=2) se encuentró en ambos grupos y en el mismo grupo filogenético.

El patotipo EAEC (donde el factor a identificar fue el regulador maestro de genes de virulencia único para este patotipo *AggR)* tuvo una frecuencia del 19 % (n=9) y donde el serogrupo O86 fue el más frecuente (n=3); pertenecientes todos al grupo

filogenético D. Además, se encuentró este serotipo como una EPEC atípica en el mismo grupo filogenético.

Los patotipos EIEC y STEC tuvieron igual representación del 1 % cada uno; EIEC con el serotipo O16:H40 del grupo A y STEC la cual presentó solamente *stx1* con el serotipo O113:H10 del grupo B1.

ETEC presentó una variedad de resultados ya que en los serotipos se observó la presencia una o más toxinas. ETEC se identificó en el 12 % (n=10), 5 cepas presentaron ambas toxinas *lt+/sth+* con el serotipo más frecuente *S*. *dysenteriae* 15:H10 (n=2) del grupo B1, los menos frecuentes del mismo grupo filogenético fueron O159:H21 y O81:H31. En el caso de la toxina termoestable (ST) porcina *stp+* el serotipo O8:H19 (n=3) fue el más frecuente y perteneciente al grupo B1 a diferencia el serotipo O25:H4 (n=1) representante del grupo B2 que también amplificó para esta toxina. El tipo de la toxina termo estable humana de ETEC solamente se identificó en el serotipo O73:H18 del grupo D; serotipo que también se encontró en a-EPEC en el mismo grupo filogenético. Cabe agregar que ninguna cepa de origen humano clasificada como ETEC amplificó para los factores de colonización o antígenos de superficie buscados (*cfa, CS1, CS3, CS21*). La única cepa (del total de cepas analizadas en el proyecto) dentro del grupo filogenético F, se encontró en esta fuente de origen humano, y cabe destacar que fue del patotipo EAEC.

4. Cepas de quesos artesanales

Los resultados de las 48 cepas de quesos artesanales se muestran en la tabla 5. Estos se han organizado en serotipos, de acuerdo a los grupos filogenéticos en que se encuentran y la frecuencia de cada uno.

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

Tabla 5. Serotipos de *E. coli* aislada de quesos artesanales.

En cuanto los grupos filogenéticos el de mayor frecuencia fue el grupo B1 con 50 % (n=24), seguido del grupo A con el 21 % (n=10). A continuación, el grupo C tuvo una frecuencia de 8 % (n=4) y el grupo B2 con un 4 % (n=2). Los grupos D, E y Clado 1 tuvieron una frecuencia de 2 % (n=1) cada uno. Un 11 % (n=5) de las cepas

de origen de quesos artesanales no se pudieron agrupar en los demás grupos filogenéticos es decir se nombran U.

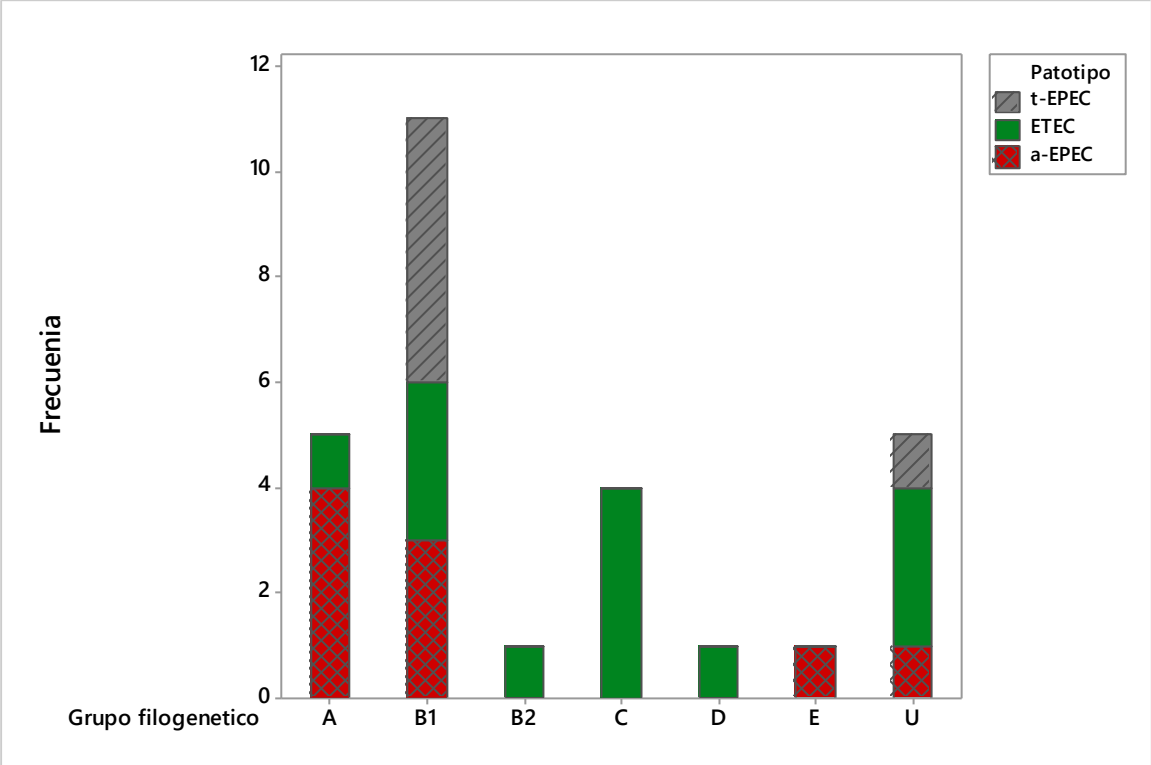
Es de hacer notar que, entre las cepas provenientes de quesos artesanales, el serogrupo O6 representó el 23 % (n=11). En este serogrupo se clasificaron seis diferentes serotipos, de la siguiente manera: el de mayor frecuencia es el O6: H? con un 8 % (n=4) correspondientes al grupo B1. El serotipo O6:H2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

El serogrupo O6 al igual que el O8 generalmente se encuentran en la literatura identificados con el patotipo ETEC. El serogrupo O8 en estas cepas es el segundo más frecuente con 19 % (n=9); los serotipos son O8:H12 de las cuales tres cepas pertenecen al grupo B1 y una con grupo desconocido (U). El segundo serotipo es O8:H9 con tres cepas en el grupo C, finalmente O8:H21 con dos cepas en el grupo B1. El 15 % (n=7) de las cepas pertenece al serogrupo O159 en el cual el serotipo O159:H21 es el frecuente con tres cepas en el grupo B1 junto con su variante no móvil haciendo un total de 4 cepas en este grupo. Las demás variantes de O159:H21 (n=2) no tienen un grupo definido (U) y O159:H11 (n=1) se encuentró en el grupo D. Los resultados de sus factores de virulencia se encuentran en la tabla 6. En la gráfica 2 se muestran los grupos filogenéticos de acuerdo a las cepas que contenían factores de los distintos patotipos.

Serotipo	N	Grupo	Patotipo	Gen
O40:H4	1	A	a-EPEC	*eae+*

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

Tabla 6. Resultados de factores de virulencia en cepas de quesos artesanales.



Gráfica 2. Frecuencia de grupos filogenéticos de acuerdo a frecuencia de los distintos patotipos en cepas de quesos artesanales.

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

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

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

En cuanto a los serogrupos mencionados en el análisis de la tabla 6. El serogrupo O8 con sus serotipos O8:H21(n=1) y O8:H12 (n=2), se encontraron en el mismo patotipo EPEC, siendo ambos EPEC típicas y del grupo B1 y una cepa de grupo U (desconocido). El serogrupo O6 presenta mayor diversidad ya que los serotipos O6:H9, O6:H1, O6:H16, O6:H2, pertenecientes a los grupos B1, B2, C, y U respectivamente, pertenecen al patotipo ETEC. El serotipo O6: H? se encuentró en el grupo B1 y pertenece a las EPEC típicas.

Los hechos a resaltar de esta fuente son, que ninguna cepa amplificó el gen *eaf* de EPEC típicas, que solamente dos cepas de ETEC presentaron los factores de colonización o antígenos de superficie CS1, CS21 y CS3, las cuales son de los serotipos O6:H16 (este amplificó para *cfa*) y O159:H12. Que ninguna cepa amplificó para la porción porcina de la toxina termoestable de ETEC. Que ambas cepas mencionadas anteriormente provienen del departamento de Atlántida (ver anexo 14). Y que estas cepas no amplificaron para alguna de las toxinas de STEC u otro factor de virulencia de los demás patotipos.

Anteriormente, en la descripción de la muestra se mencionó la distribución del tipo de estos quesos, siendo el tipo semiseco el que representó el 86 % (n=41) de las muestras, seguido de queso seco con 8 % (n=4) y queso fresco con 6 % (n=3). En cuanto a la proveniencia de las muestras, corresponden a las zonas productoras de acuerdo a la distribución de la Secretaria de Agricultura y Ganadería (SAG). La zona centro oriental representó el 90 % (n=43) de los quesos analizados; los aislamientos

fueron divididos de la siguiente manera: El Paraíso representó el 23 % (n=11), Olancho 17 % (n=8), Atlántida el 10 % (n=5) y Yoro un 40 % (n=19). La región Occidental representada por el departamento de Ocotepeque con un 4 % (n=2). La región sur del país solamente esta representa por un 6 % existiendo tres aislamientos del departamento de Valle.

Para crear un análisis completo y recuperar la mayor información posible de estas cepas se analizó la distribución de patotipos en el país de acuerdo al origen departamental de cada una de ellas, y el tipo de queso del cual fueron obtenidas. El siguiente mapa (Figura 11) muestra la distribución de patotipos de quesos artesanales con sus serotipos. La tabla 13 adjunta en el anexo 14 muestra el análisis de datos para obtener esta distribución.

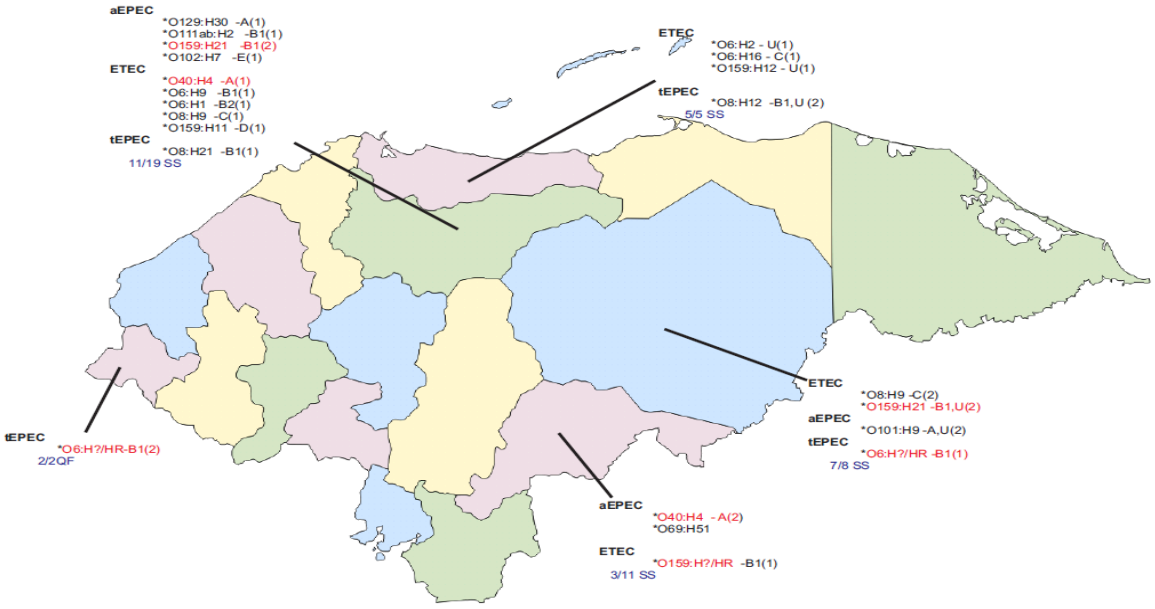


Figura 11. Mapa de distribución espacial de patotipos de *E. coli* en quesos artesanales por departamento.

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

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

5. Cepas de origen hídrico

Los resultados de las 32 cepas de origen hídrico se muestran en la tabla 7. Estos se han dividido en serotipos, de acuerdo a los grupos filogenéticos en que se encuentran y la frecuencia de cada uno.

Serotipo	N	Grupo
O111ab:H-	1	A
O184:H11	1	
O3:H2	1	
O40:H-	1	
O40:H10	1	

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

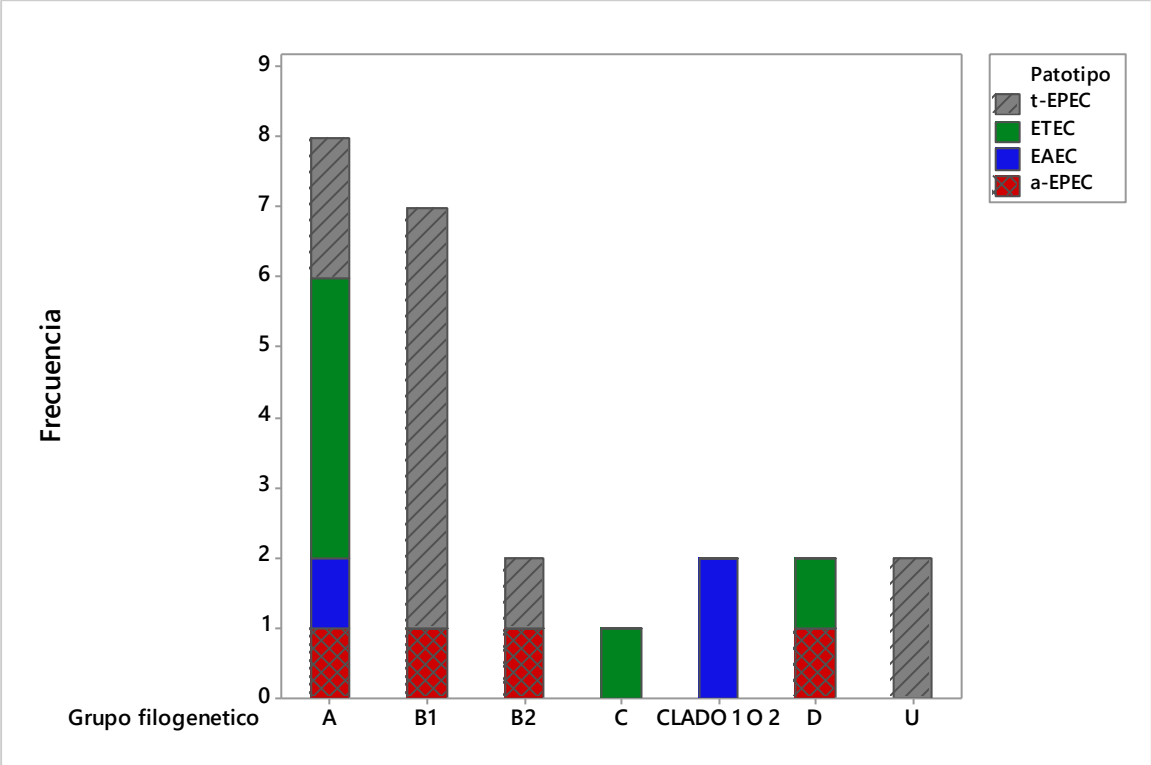
Tabla 7. Serotipos de *E. coli* aislada de fuentes de agua.

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

Los serotipos frecuentes son O111ab con un 22 % (n=7), con sus variantes no móviles y una cepa con antígeno flagelar H2; estos se ubican en los grupos A y B1 pertenecientes al patotipo EPEC en la literatura. El segundo serotipo más frecuente es el O6:H16 con un 13 % (n=4) perteneciente al grupo A y representante del patotipo ETEC. En tercer lugar, el serotipo O3 y su variante no móvil representó el 9 % (n=3), estos se encuentran en grupo A y Clado 1 o 2, este serotipo se ha reportado como miembro del patotipo EAEC. Los resultados de patogenicidad de estas cepas de fuentes de agua se describen a continuación en la tabla 8. En la gráfica 3 se muestran los grupos filogenéticos de acuerdo a las cepas que contenían factores de los distintos patotipos.

Serotipo	**N**	**Grupo**	**Patotipo**	**Gen**
O111ab:H-	1	A	a-EPEC	*eae+*
O159:H21	1	B1		
O127:H6	1	B2		
O129:H15	1	D		
O9:H10	1	A	t-EPEC	*eae+,bfp+*
O40:H10	1			
O127:H6	1	B2		
O111ab:H-	5	B1		*eae+,bfp+,eaf+*
O111ab:H2	1			
O128ab:H2	2	U		
O6:H16	4	A	ETEC	*lt+,sth+,cs1+,cs3+,cfa*
O8:H9	1	C		*lt+,sth+,cs21+*
O159:H21	1	D		*lt+,sth+*
O3:H2	1	A	EAEC	*aggR+*
O3:H2	1	CLADO 1 O 2		
O3:H?	1	CLADO 1 O 2		
Total	24			

Tabla 8. Resultados de factores de virulencia en cepas de origen hídrico.



Gráfica 3. Frecuencia de grupos filogenéticos de acuerdo a frecuencia de los distintos patotipos en cepas de origen hídrico.

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

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

puntos geográficos. En ETEC se destaca que en esta fuente todas presentaron ambas toxinas, y la mayoría de las cepas presentaron los factores de colonización principales como *cfa* (4 cepas) y los antígenos de superficie CS1, CS21 y CS3. En última instancia se encuentra EAEC con un 13 % (n=3), el cual se encuentra en ambas localidades. La distribución por localidad se describe en la tabla 14 en el anexo 15.

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

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

El serotipo O40:H10, fue identificado en dos cepas una de ellas presentó factores de virulencia coincidentes con el patotipo EPEC típico del grupo filogenético A y la otra que no presentó factores de virulencia se ubicó en el grupo filogenético B1.

Las dos cepas del serotipo O128ab:H2 originarias del Lago de Yojoa, las cuales no se diferenciaron en un grupo filogenético (U), se destacaron como miembros de EPEC típicas. El serotipo O3:H2 y sus variantes no móviles mencionadas anteriormente concuerda con el patotipo EAEC, pero aquí se diferencian en grupo

filogenético ya que están en grupo A y clado 1 o 2. La localidad de EAEC es Francisco Morazán.

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

Lamentablemente se desconocen algunos datos de origen (localidad y si las aguas eran subterráneas o superficiales) de las cepas provenientes de Francisco Morazán y no se puede crear una distribución ilustrativa de aquellas cepas positivas y sus patotipos, al contrario que las cepas del Lago de Yojoa, de las cuales se puede crear una distribución de acuerdo a muestreo, estación y época del año. La información de las cepas del Lago de Yojoa se encuentra en la tabla 15 del anexo 15. A continuación, se muestra la distribución de patotipos por estación y época del año (Figura 12). Se toman en cuenta solamente 5 muestreos ya que del sexto muestreo no se obtuvieron cepas.

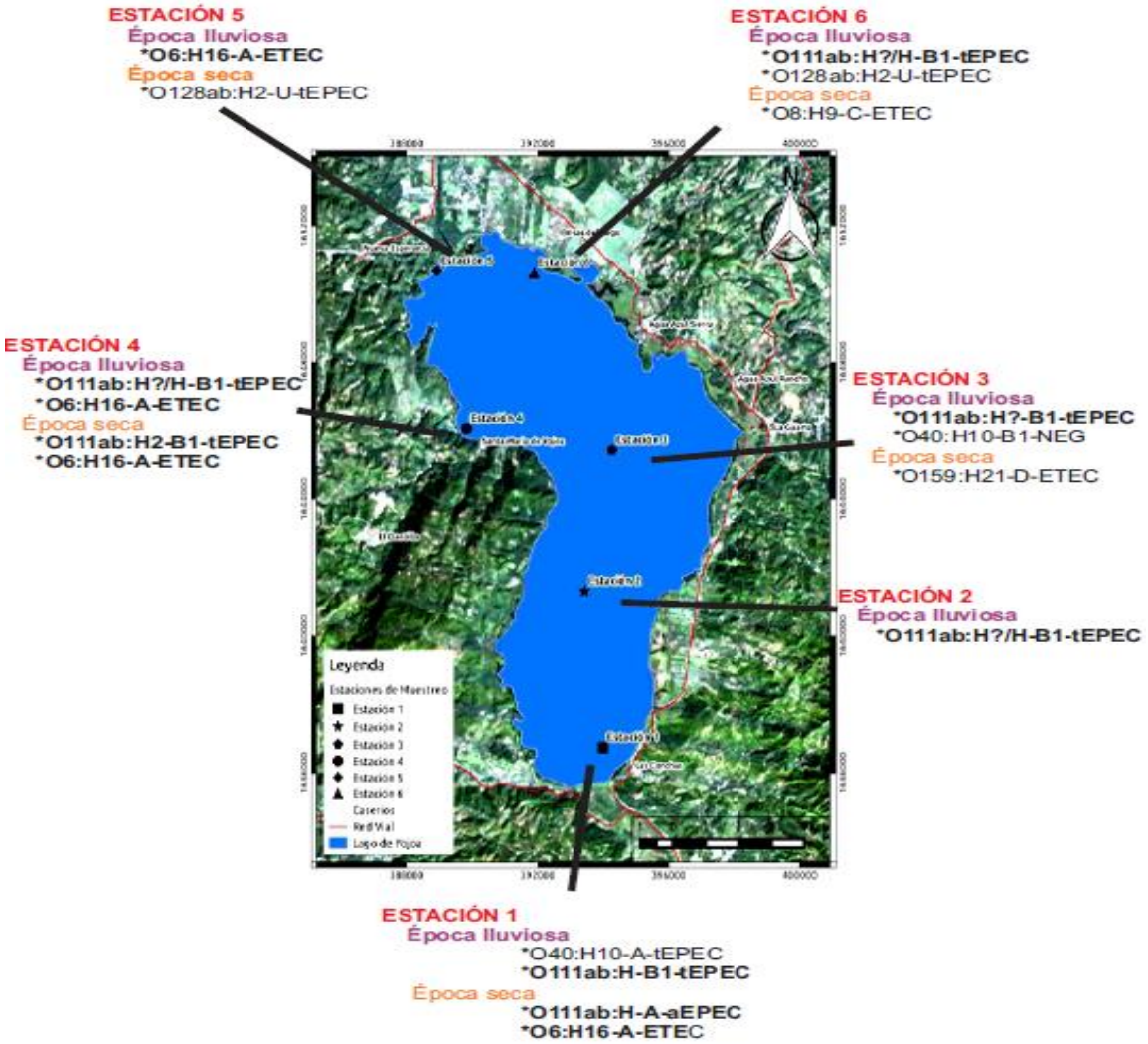


Figura 12. Distribución espacial de patotipos de *E. coli* por estación en el Lago de Yojoa.

Durante la época lluviosa se obtuvieron 10 cepas de las cuales 7 corresponden a EPEC típicas, 2 cepas a ETEC y 1 fue negativa. En época seca se obtuvieron 7 cepas de las cuales 3 se distinguieron como EPEC (1 a-EPEC y 2 t-EPEC) y 4 como ETEC. Se observó que ambos patotipos están en ambas estaciones en distintas proporciones. En época lluviosa EPEC es más frecuente y ETEC lo es en época

seca. Se puede observar que el serogrupo O111ab se encuentra en 5 de 6 estaciones y en las dos épocas del año como EPEC típicas y atípicas. El serotipo O6:H16 representante del patotipo ETEC se encuentra en las estaciones 1, 4 y 5. El comportamiento de O6:H16 es notable ya que en época lluviosa se observa en estación 5; ambas épocas del año en la estación 4, y época seca en la estación 1. El serotipo O40:H10 se observó en época lluviosa en las estaciones 1 y 3 pero como ya se había mencionado anteriormente tiene diferente filogenia y uno de ellos se encuentra negativo para EPEC. En resumen, se observó con frecuencia el grupo filogenético B1 en la época lluviosa, a excepción de las estaciones 4 que está en ambas estaciones. Se observó que en época seca los grupos filogenéticos fluctúan entre los grupos C, D y cepas U, a excepción de la estación 4, y uno donde prevalece el grupo A y B1.

6. Cepas de alimentos (carne molida y lechugas)

Los resultados de 22 cepas de alimentos se muestran en la tabla 9. Estos se han dividido en serotipos, de acuerdo a los grupos filogenéticos en que se encuentran y la frecuencia de cada uno.

Serotipo	N	Grupo
O?:H-	1	A
O120:H?	1	
O147:H32	1	
O182:H?	3	
O20:H?	2	
O70:H11	1	
O?:H10	1	B1
O103:H16	1	
O140:H21	1	
O15:H8	2	
O150:H8	2	

O88:H8	1	
O25:H8	1	B2
O125ab:H5	1	
O125ab:H?	1	
O174:H3	1	C
O102:H7	1	E
TOTAL	22	

Tabla 9. Serotipos de *E. coli* aislada a partir de alimentos.

Se analizaron un total de 22 cepas de alimentos que comprenden solamente lechugas de mercados y supermercados de la capital al igual que carne molida. El 73 % (n=16) corresponde a las cepas aisladas de lechugas y el 27 % (n=6) a las cepas aisladas de carne molida. En cuanto a las cepas de lechugas el 56 % (n=9) pertenece a lechugas compradas en mercados y el 44 % (n=7) fueron lechugas compradas en supermercados. En cuanto a las cepas aisladas de carne molida no se tiene la información del origen de cada una de ellas. La distribución de estas cepas de acuerdo al origen y su respectivo serotipo se detallan en las tablas 16 y 17 del anexo 16.

En la filogenia de estas cepas el grupo A representa el 41 % (n=9), B1 el 36 % (n=8), B2 el 14 % (n=3) y finalmente grupo C y E comprenden el 10 % cada uno (n=1). Los serotipos más frecuentes en esta fuente fueron O182:H?, O20:H?, O15:H8, O150:H8 y finalmente O125ab:H5 y su variante no móvil. Los serotipos frecuentes antes mencionados están dentro de las cepas de lechugas. A continuación, en la tabla 10 se describen aquellas cepas que amplificaron para factores de virulencia.

Serotipo	N	Grupo	Patotipo	Gen
O140:H21	1	B1	a-EPEC	*eae+*
O125ab:H5	2	B2		
O15:H8	1	B1	t-EPEC	*eae+,bfp+*
O25:H8	1	B2		
TOTAL	5			

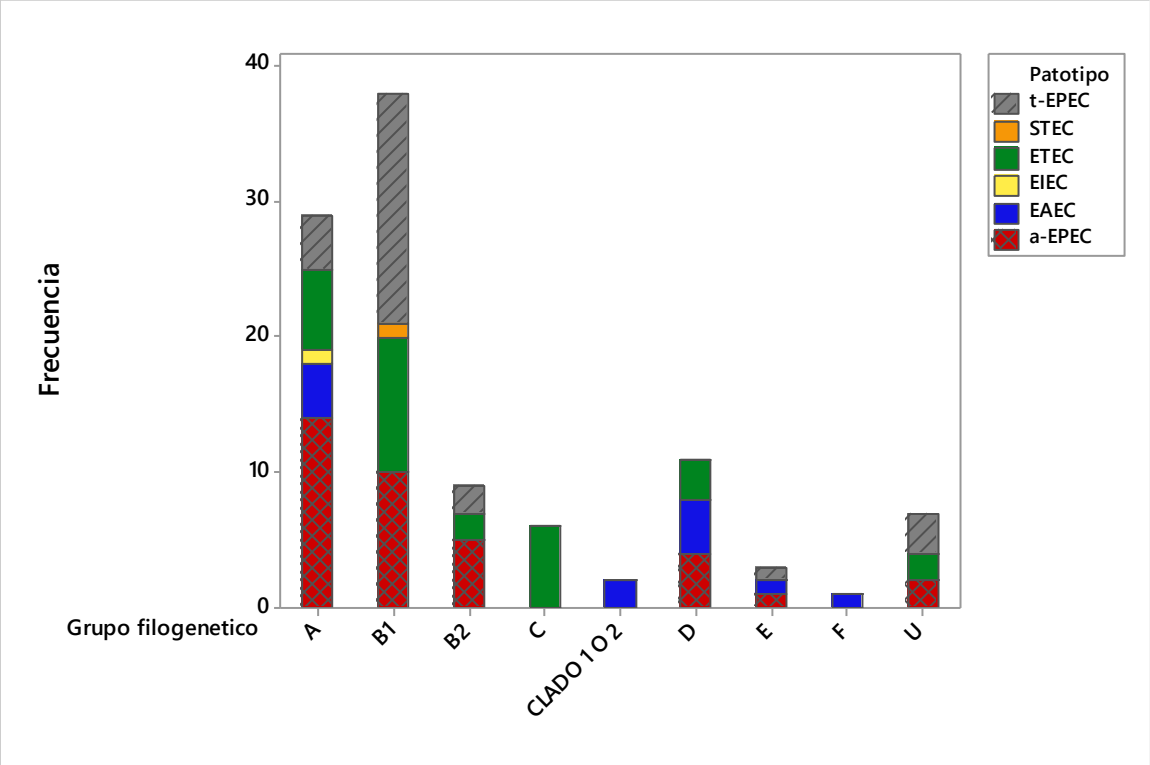
Tabla 10. Resultados de factores de virulencia en cepas de alimentos.

Un 23 % (n=5) de las cepas amplificaron genes de virulencia de EPEC solamente. El patotipo EPEC representa el 100 % (n=5) en estas cepas, dividido en 60 %(n=3) de EPEC atípicas y 40 %(n=2) de EPEC típicas. En el patotipo EPEC solamente el serotipo O140: H21 del grupo B1 es de origen de carne molida siendo esta una cepa EPEC atípica. El siguiente serotipo, el cual representa dos cepas O125ab:H5 del grupo B2, son dos cepas EPEC atípicas de lechugas compradas en mercados. Los serotipos O15:H8 y O25:H8 de los grupos B1 y B2 respectivamente, son de origen de lechugas compradas en supermercado siendo estas cepas típicas de EPEC.

7. Resultados generales

Luego del análisis de fuentes se pudo concluir que 106 cepas amplificaron para los distintos factores de virulencia de los distintos patotipos; es decir un 56 % de las cepas son portadoras de al menos un factor de virulencia. La gráfica 4 (se creó con ayuda del anexo 16 tabla 8) expresa la frecuencia total de aquellas cepas que presentaron factores de los distintos patotipos distribuidos en los grupos

filogenéticos (independientemente de el origen de cepa y numero de factores).



Gráfica 4. Frecuencia de grupos filogenéticos de acuerdo a frecuencia de los distintos patotipos en cepas de diferentes fuentes.

Estos patotipos se clasificaron de la siguiente manera: un 33% (n=62) pertenecientes al patotipo EPEC; del cual un 19 % (n=36) se diferenciaron como aEPEC y un 14 % (n=26) se diferenciaron como tEPEC. El siguiente patotipo en frecuencia fue ETEC, con un 16 % (n=30) del total de las cepas analizadas. El patotipo por primera vez analizado en Honduras es EAEC, con frecuencia de 6 % (n=12) del total de cepas. Los patotipos STEC y EIEC obtuvieron ambos un 1 % de positividad (n=1 cada uno).

En el Lago de Yojoa se encotraron cepas variadas que albergan tanto factores de colonización como de virulencia. Anteriormente se observó la distribución de estas

cepas presentes tanto a orillas de lago, cerca de vertientes de ríos, lugares de pesca y restaurantes.

En cuanto a la filogenia, un 96 % (n=180) del total de cepas analizadas se lograron clasificar en los distintos grupos filogenéticos. Se observó una mayor frecuencia del grupo filogenético A con un 35 % (n=65) del total de las cepas aisladas, seguido del grupo B1 con 34 % (n=63). El grupo B2 con un 9 % (n=17), y el grupo D con 8 % (n=15) del total de las cepas. Los Grupos C, E, y aquellas cepas que no se pudieron ubicar en algún grupo filogenético (U) representaron el 12 % del total, es decir que cada grupo representó un 4 % (n=8) del total de cepas. Los aislamientos pertenecientes a los Clados 1 y 2 representan el 2 % (n=3); y como se había mencionado anteriormente una cepa se diferenció en el grupo F (0.5 %), siendo esta una cepa EAEC.

En cuanto a los grupos filogenéticos de aquellas cepas que presentaron factores de virulencia de los patotipos se describen en la gráfica 4. El grupo filogenético más frecuente es el B1 con un 36% (n=38), el siguiente grupo más frecuente es el A con 27% (n=29), el grupo D con 10% (n=11), B2 con un 8% (n=9), U con 7% (n=7), C 6% (n=6), E 3% (n=3), Clado 1 o 2 con un 2% (n=2) y finalmente F con 1% (n=1).

La distribución de grupos filogenéticos varió por fuente: generalmente el grupo A es más frecuente en fuentes humanas y alimentos, mientras que en quesos el grupo B1 se observó en mayor proporción. Las fuentes hídricas presentan igual frecuencia en ambos grupos. El grupo D es más frecuente en cepas humanas que en las otras fuentes, donde se encuentró de 0 a 2 cepas pertenecientes a este grupo, pero mayor a diez en las cepas humanas.

Se observa que existen diferencias entre patotipos y grupos filogenéticos; por ejemplo t-EPEC es más frecuente en el grupo B1 que en el A, donde a-EPEC es el de mayor frecuencia. EPEC típicas se encuentran en todos los grupos, a excepción de C, D y clado 1 o 2; EPEC atípicas no se encuentran en los grupos C, y clado 1 o 2. El grupo C representa solamente al patotipo ETEC y en el grupo E este patotipo no está representado. El único miembro del grupo filogenético F es EAEC y la única cepa STEC se encuentra en el grupo B1. El grupo filogenético A representó 4 patotipos, B1 representó 3 patotipos, grupos B2, D, E, U representaon cada uno 2 patotipos y solamente el grupo C, F, y clado 1 o 2 un patotipo.

Los resultados revelaron al menos 100 serotipos de los cuales se destacan: O128ab:H-, que está presente en la fuente humana y la hídrica, incluyendo a EPEC típica y atípica de los grupos A y U. El serogrupo O20, con sus serotipos O20:H18, como EAEC del grupo F; O20:H30 como ETEC del grupo A y O20:H41 como EPEC atípica del grupo A. Todos los anteriores serotipos pertenecen a la fuente humana. Los demás serotipos O20:H1, O20: H?, O20:H11, y O20:H21 de las fuentes humanas, alimentos y quesos, son comensales ya que no presentan factores de patogenicidad.

El serotipo O111ab:H2 y su variante no móvil se encuentró en fuentes de quesos y aguas como patotipo EPEC ambos. Previamente se había mencionado el serotipo O159:H21 y sus variantes no móviles y H2 los cuales se encuentran en fuentes humanas, quesos y aguas. Este serotipo a excepción de su variante H2 está presente en el grupo filogenético B1. En cuanto al patotipo de este serotipo se encuentra como ETEC en la mayoría de cepas y también como EPEC atípica. El

serotipo O86:H2 presentó dos cepas en el grupo D en las fuentes humanas, diferenciado en dos patotipos EPEC atípica y EAEC.

Capítulo 5: DISCUSIÓN

El manejo y prevención de enfermedades diarreicas no es un tema que tenga aristas desconocidas. La prevención o cuidados que se deben tener para evitar enfermedades diarreicas son básicos y conocidos por la población. El saneamiento básico en un país es importante para la prevención de enfermedades; sin este, el correcto lavado de manos, alimentos y consumo de agua es difícil. La población puede estar educada en hábitos de higiene y consumo seguro de alimentos, pero lo importante es el correcto saneamiento para que las fuentes de agua no sean contaminadas con patógenos entéricos que alberguen factores de patogenicidad y el ciclo se detenga o se controle.

Escherichia coli, por ser un habitante normal del intestino de humanos y animales de sangre caliente, es reconocido indicador de calidad e higiene de agua y alimentos; por lo tanto, en nuestro estudio además de considerar aislamientos de heces humanas, se incluyeron cepas que se recolectaron en diversos estudios de calidad microbiológica de alimentos y agua, considerados como vehículos de transmisión de las cepas patógenas.

De las 200 cepas seleccionadas para el presente estudio, una vez realizadas las pruebas de pureza, viabilidad y caracterización fenotípica, se encontró que en realidad se trataba de 188 cepas las que cumplían las condiciones para ser incluidas en el proyecto.

Este estudio es el primero en reunir una cantidad significativa de cepas en Honduras, aunque no es comparable con otros realizados en Centroamérica; ni metodológicamente ni en número de cepas, ya que, en la mayoría de los casos, las muestras se circunscriben a muestras humanas y el diseño metodológico más empleado es el caso-control. En nuestro caso se optó por analizar una colección de cepas con diferentes procedencias a fin de realizar una descripción de los patotipos circulantes y los grupos filogenéticos a que pertenecen estos patotipos.

Como se ha presentado en el capítulo anterior, de las 188 cepas analizadas, el 100 % fueron bioquímicamente identificadas como *E. coli.* La serología es una herramienta empleada particularmente en laboratorios de referencia, ya que las posibilidades de someter cada cepa a 187 antisueros somáticos y a 56 flagelares, son muy pocas, por lo cual en la mayoría de los casos se recurre localmente a antisueros específicos para casos particulares tales como O157:H7, que es un patógeno reconocido en los últimos años por su impacto en salud pública por causar el Síndrome Urémico Hemolítico.En nuestro caso, la serología sirvió como una prueba orientadora para agrupar las cepas en patotipos según el resultado de la serología y, de esta manera someterlas a las pruebas moleculares correspondientes. La oportunidad de poder realizar la serología nos permitió conocer los serotipos circulantes en Honduras. No se encontró un estudio referente en el país donde la serología de *E. coli* se haya realizado con tanto detalle. Los resultados de serología además de brindar orientación para la realización de las pruebas moleculares, sirvió para informarnos acerca de los serotipos comunes en los distintos ambientes. Al combinar toda la información de factores de

patogenicidad y filogenia de las cepas con su serotipo vemos si estos se presentan en los distintos ambientes como cepas patógenas o como cepas que aún no adquieren estos factores y su relación filogenética.

Previamente se mencionaron aquellos serotipos comunes en cada fuente y se resaltaron los comunes en todas las fuentes. El serotipo O159:H21 fue descrito por primera vez por Blanco en 1992[Blanco, 1992], aislado durante 1983 en un pequeño brote de diarrea en infantes de distintos hospitales de España, albergando solamente la toxina termolábil. Este serotipo y sus variantes (O159:H4, O159:H-) se ha considerado típico de ETEC, se ha reportado en Egipto como un serotipo que codifica una de dos toxinas, Lt+ o ST+ así como sucede en las cepas descritas en este estudio [Peruski, 1999]. En este mismo estudio se describe el serotipo O111ab como ETEC, de acuerdo a nuestros resultados este serotipo (O111ab) de clasificó como EPEC. Según el estudio de Timm, en 2006 [Timm, 2006] existen otras variantes de este serogrupo (O159:H42) albergando factores de STEC (*stx2*) en heces de ganado vacuno en Brasil. Recientemente, en el 2016 Baranzoni [Baranzoni, 2016], describió el serotipo O159:H- como otro serotipo de STEC, en este estudio el serotipo O159:H21 es negativo para ambas toxinas Shiga en cepas provenientes de ganado porcino donde este patotipo es de importancia epidemiológica. Podemos considerar que clasificar en serotipos las cepas de *E. coli,* orienta la búsqueda de factores de virulencia pero que el diagnóstico molecular es indispensable para clasificar las cepas en los distintos grupos patógenos y que aún hay mucho por estudiar para comprender un patógeno tan ubicuo.

Al comparar los porcentajes obtenidos en nuestro estudio, con reportes publicados en 2017 por Torres, en general en América Latina los aislamientos más frecuentes en muestras humanas corresponden al patotipo ETEC [Torres, 2017]. En Nicaragua, el estudio de Vilchez y colaboradores [Vilchez, 2009] , se destaca que el patotipo prevalente en cepas humanas es ETEC, en segundo lugar fue EPEC atípica, EIEC y EAEC en niños con diarrea. Otro estudio realizado por Reyes y colaboradores [Reyes, 2010] en el mismo país en el año 2010, que incluyó 2,164 aislamientos de *E. coli* de 282 muestras positivas, concluyó que EPEC y EAEC no estuvieron asociadas a diarrea (aunque si presentes) pero que ETEC estuvo asociado a diarrea en los infantes y principalmente aquellas cepas *lt+/sth+.*

En Guatemala, Torres y colaboradores[Torres, 2015] realizaron un estudio caso-control, en viajeros a zonas rurales, encontrando que el patotipo causante del mayor número de casos de diarrea fue ETEC. Los casos severos de diarrea se presentaron en las estaciones de verano-lluviosas de mayo a septiembre. Según Torres, se observó que en los controles también se amplificaron toxinas de ETEC en un 10 %. Las cepas con la toxina termolábil *lt+* fueron más comunes en casos de diarrea persistente seguida de cepas que albergan la toxina termoestable *st+* [Torres, 2015]. En un estudio realizado por Ouyang-Latimer en México durante los meses de verano donde se analizaron un total de 166 cepas, la mayoría de cepas presentaron ST+ seguidas de LT+/ST+ y por ultimo Lt [Ouyang-Latimer, 2010; Torres, 2015].

Reportes previos en Honduras ha mostrado que ETEC está en mayor frecuencia que EPEC [Ferrera, 2014], [Espinoza, 2013]. Ochoa y colaboradores [Ochoa, 2008]

han encontrado que esto ha cambiado en países tanto desarrollados como en desarrollo, esto debido a la población en estudio o también deberse a la susceptibilidad de infección relacionado con la edad de la población en estudio. EPEC y principalmente aquellas atípicas se han visto en mayor proporción que las típicas, lo cual concuerda con lo encontrado en las fuentes humanas y de alimentos de origen lácteo de este estudio.

Existen diferencias en los resultados de este estudio con los demás en la región; ya que EPEC sobrepasa a ETEC y esta tendencia se presenta en las distintas fuentes de origen. Esta diferencia de patotipos entre nuestros resultados y los antes mencionados llevados a cabo en Guatemala y Nicaragua puede tener muchas causas. En primer lugar, los estudios en ambos países se llevaron a cabo solamente en muestras de humanos con muestra fue mayor a la analizada en el presente estudio. En segundo lugar, la diferencia en metodología podría ser una razón para las diferencias entre los estudios, ya que aquellos fueron estudios caso control (donde los aislamientos procedentes de los controles también presentaron factores). No hay suficientes estudios que avalen una relación entre presencia de patotipos con relación a estacionalidad. La bibliografía consultada se refiere a muestras puntuales de un solo origen. La estacionalidad de EPEC y ETEC puede fluctuar de época lluviosa a seca ya que existen reportes de cambios en la presencia de patotipos en pacientes con diarrea según estación sea esta lluviosa o seca, según Paredes-Paredes en su estudio en visitantes a México que presentaron diarrea del viajero; aquellos infectados con EPEC fueron identificados en igual proporción en ambas épocas. ETEC en cambio, está en distintas proporciones

siendo esta mayor cuando la temperatura incrementa (época seca) [Paredes-Paredes, 2011]. Al no tener información de la época en la cual se tomaron cada una de las cepas de origen humano no se logró concluir en este estudio algo acerca de la estacionalidad. Se podría inferir algo en relación a las cepas caracterizadas en las muestras de agua específicamente aquellas extraídas del Lago de Yojoa. En el artículo de Hernándes Oviedo se describe las temperaturas y estaciones en las cuales se tomaron las muestras de agua en el Lago de Yojoa [Hernándes Oviedo, 2016].

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

es indicativo de la influencia antropogénica en estos ambientes [Martinez-Nazaret, 2015].

Entre las cepas EPEC se observa que a-EPEC es más frecuente que t-EPEC, a excepción de las fuentes hídricas donde se ve mayor frecuencia de las cepas EPEC típicas que albergan el factor de adherencia de EPEC (*eaf*+). En algunos casos, los aislados de EPEC han perdido probablemente su plásmido EAF ancestral y han adquirido otro plásmido EAF procedentes de un linaje diferente de *E. coli*. Además, los plásmidos EAF se han sometido modificaciones genéticas, incluida la recombinación de los genes bfp y otros genes en el plásmido [Hazen, 2015]. Muchos estudios llevados a cabo los últimos 20 años revelan que ha decrecido la frecuencia de t-EPEC mientras que han aumentado la frecuencia de a-EPEC en países en desarrollo [Hernandes, 2009] [Ochoa, 2008].

No obstante, es de hacer notar que EPEC se puede estudiar a profundidad ya que en este estudio el gen de intimina no diferencia entre los subtipos (al menos 35 distintos) y se ha reportado en distintos estudios que aquellas cepas EPEC atípicas los subtipos beta 1, épsilon 1 y theta son los más frecuentes [Contreras, 2010]. En el presente estudio no se diferenció entre cada subtipo, sino que se amplificó el gen “universal” de la intimina.

En cuanto a grupo filogenéticos se encuentra el estudio de Ratajczak del 2010, [Ratajczak, 2010] , el cual habla acerca de filogenia y su influencia de las condiciones hidrológicas en las poblaciones de *E. coli* en cuencas de agua. Sin embargo, no realizan una comparación con patotipos. La filogenia de estas cepas

también difieren en estacionalidad ya que según Ratajczak los grupos B1 y A están sobre representados en las muestras de agua fresca en periodos de lluvia, y los grupos B2 y D son raros en este tipo de muestras [Ratajczak, 2010].

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

Hernández Oviedo y colaboradores [Hernándes Oviedo, 2016] describen las temperaturas ambientales y de superficie de agua en el lago de Yojoa, en cada muestreo realizando un promedio de las temperaturas máximas y mínimas. Así como se describe en la tabla 14 del anexo 15, existen diferencias en temperaturas; ejemplo de ello es el predominio de EPEC en ambas estaciones. No obstante, ETEC apareció cuando inicia la época lluviosa y existe un aumento de temperatura ambiental aproximado de cuatro grados Celsius entre el muestreo 2 y 3. Así como antes se ha resaltado ETEC es predominante en las cepas encontradas en épocas secas. Aunque sean pocas las cepas recolectadas se logra distinguir una tendencia en las distintas cepas del lago de Yojoa.

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

Cabe resaltar que según los hallazgos de Escobar-Paramo, [Escobar-Paramo, 2004] las cepas que causan infección extra intestinal pueden originarse de cualquier grupo filogenético de *E. coli* y toda la evidencia disponible indica que los principales patotipos responsables por enfermedades intestinales han surgido de cada uno de los grupos filogenéticos en múltiples ocasiones. Otra conclusión de estos autores es que los patógenos responsables de diarrea severa aguda como los son las causadas por toxinas o invasión a células eucariotas como los patotipos EHEC, ETEC, y EIEC/*Shigella* no se encuentran en los grupos D y B2. Los patotipos anteriores, así como sus factores de virulencia específicos pueden ser encontrados solamente en los grupos A, B1, C, y E. Los patotipos ligados a diarrea crónica o leves o como los son EPEC, EAEC y DAEC están distribuidos en toda la filogenia. La descripción anterior indica que el intercambio genético puede ocurrir entre cepas de diferentes grupos filogenéticos, cepas comensales y patógenas y cepas con distintos patotipos. La existencia de cepas de ETEC en todas las fuentes también hace resaltar otra de las observaciones de Escobar-Paramo y colaboradores, y es que no hay un agrupamiento particular en el árbol filogenético por las cepas de

ETEC [Escobar-Paramo, 2004]. La distribución de los genes *lt* y *st* asociados a este patotipo se limita a los grupos A, B1 y C. Esto puede indicar un modo predominantemente horizontal de transmisión de factores de virulencia por múltiple e independiente inclusión de plásmidos conteniendo estos genes o puede indicar una diseminación entre especies. Las cepas ETEC de este estudio concuerdan, pero también se encuentran en los grupos B2 y D en humanos, quesos y aguas.

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

Capítulo 6: CONCLUSIONES

Por primera vez en Honduras se describen los serotipos de *E. coli* en distintos ambientes, se analiza su distribución y se describe cuáles albergan los factores que definen los patotipos. Igualmente se compara aquellos serotipos que todavía no los han obtenido, indicando así cuales cepas siguen siendo comensales y cuáles son potenciales patógenos. Se analiza a su vez su clasificación filogenética.

El objetivo de este estudio fue describir y observar la presencia de los distintos patotipos de *E. coli* en el ambiente junto con su filogenia y serotipos. Las cepas que albergan los distintos factores de virulencia son potenciales patógenos causantes de enfermedades diarreicas.

Se detectaron 5 patotipos diarreogénicos de *E. coli* principalmente entre las cepas de origen humano.

Las cepas EPEC, típicas y atípicas, tuvieron distinta frecuencia en los distintos ambientes, siendo t-EPEC más frecuente en ambiente acuático y a-EPEC entre las cepas de origen humano, quesos artesanales y alimentos.

Las cepas de origen hídrico presentaron el factor de adherencia de EPEC y fueron las únicas del total analizadas que lo amplificaron. ETEC se encuentra en todas las fuentes analizadas y algunas cepas presentan ambas toxinas lt+ y sth+ stp+, y factores de colonización.

Se observan ambos patotipos (EPEC y ETEC) y EAEC en todas las fuentes, así que estos patotipos podrían ser aquellos causantes de patologías intestinales en el país y ser candidatos de vigilancia epidemiológica de patógenos entéricos.

EAEC es un patotipo que debe ser vigilado ya que se encuentra en tercer lugar en frecuencia en los ambientes humano y acuático. Este puede ser un patógeno de importancia en los casos de diarreas en el país causadas por consumo de agua contaminada.

Aunque EIEC y STEC sean los patotipos con menor frecuencia, esto no quiere decir que no puedan ser causantes de enfermedad o que no se encuentren en otros ambientes y puedan ser causa de infecciones.

La distribución de serotipos que albergan factores de patogenicidad se encuentra en distintos grupos filogenéticos. Ciertos serotipos se encuentran en las distintas fuentes albergando distintos factores y en distintos grupos filogenéticos dando prueba de la plasticidad génica de las cepas de *E. coli* en distintos ambientes.

Capítulo 7: RECOMENDACIONES

La comparación entre los casos diarreicos y portadores sanos debe ser el próximo paso a seguir en la investigación de distribución de *E. coli* diarreogénica en Honduras ya que conociendo los patotipos de *E. coli* y sus serotipos se tiene una base para la búsqueda de *E. coli* y su potencial como patógeno. El análisis de los casos de diarrea y su diagnóstico molecular en aquellas áreas donde se aislaron patotipos de alimentos y aguas es pertinente. La acción anterior se realizaría con el objetivo de verificar la patogenicidad de estas cepas y observar aquellos serotipos que son causa de diarreas en estas áreas.

El estudio de cepas de origen humano y su correlación con enfermedad, factores sociales, acceso a correcto saneamiento, uso de agua potable debe ser analizado. El hecho de comparar los aspectos anteriores dará una visión global de las enfermedades causadas por patógenos entéricos, no solamente *E. coli*. La difusión de estos estudios ambientales debe ser para la población interesada así se podrían generar soluciones y evitar así muertes en infantes y adultos mayores los cuales son los más susceptibles. La educación junto con la difusión de resultados es vital para la prevención y solución de las enfermedades infecciosas en la comunidad.

Tomando en cuenta la recomendación anterior, y el hecho de que EPEC es el patotipo más frecuente, se debe analizar la posibilidad de aumentar los genes de subtipos de intimina e igualmente correlacionarlos con la enfermedad.

En cuanto a filogenia y serotipos no se tiene información concreta en toda la región así que sería una colaboración interesante observar si las cepas encontradas son

clonas compartidas con similar origen filogenético o son distintas. La construcción de un árbol filogenético sería muy buen aporte para continuar la comprensión de cepas ambientales y su origen.

En microbiología industrial interesa mucho aquellos patógenos causantes de enfermedades de origen alimentario, así como *E. coli*. El aumento de muestra de estas fuentes, como el aumento de variedad de alimentos a analizar sería recomendable, ya que complementaría la información obtenida en este estudio. La búsqueda del patotipo STEC en alimentos de origen animal es importante. Aunque en quesos artesanales de este estudio no se haya encontrado, no quiere decir que no pueda existir. Las cepas de origen animal no se deben limitar a ganado vacuno ya que hay evidencia reciente en países como Brasil donde cepas de *E. coli* de origen aviar están emergiendo como patógenos.

Otro tópico a considerar en cuanto a cepas de origen humano, ambiental y de origen alimenticio es la búsqueda de genes causantes de resistencia a antibióticos. El hecho de que una cepa ambiental exprese genes de resistencia es un tópico importante ya que la vigilancia debe ser con mayor énfasis; en vista de que estas cepas pueden poseer o adquirir factores de patogenicidad, y pueden llevar a enfermedad en un hospedero susceptible.

El orden y la correcta identificación fenotípica tanto el correcto registro de trabajos pequeños de recolección de cepas es imperativo. La supervisión de estos es punto clave para generar estudios grandes; de esta manera no se perderían cepas en análisis, en el caso que se desee en un futuro realizar una distribución espacial de

cepas portadoras de factores de patogenicidad. Se recomienda el seguimiento de almacenaje de cepas de acuerdo a reglas y formularios establecidos. La implementación de nuevas formas de almacenaje de cepas para mantener los factores y características de las mismas se debe iniciar.

Capítulo 8: REFERENCIAS

A.D. O`Brien, GDL. 1983. Purification and Characterization of a *Shigella dysenteriae* 1-like ttoxin produced by *Escherichia coli*. Infection and Immunity 40(2):675-683.

Alfredo G. Torres, SMP. 1997. Haem iron-transport system in enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 Molecular Microbiology 23(4):825-833.

Anantha, RP, McVeigh, A. L., Lee, L. H., Agnew, M. K., Cassels, F. J., Scott, D. A. 2004. Evolutionary and functional relationships of colonization factor antigen I and other class 5 adhesive fimbriae of enterotoxigenic *Escherichia coli.* Infection and Immunity(72):7190-7201.

Baranzoni, GMF, Pina M.; Gangiredla, Jayanthi; Patel, Isha. 2016. Characterization of Shiga Toxin Subtypes and Virulence Genes in Porcine Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli*. Frontiers in Microbiology 7(547).

Bekal, SB, Roland; Masson Luke; Prefontaine, Gabrielle; Fairbrother John; Harel, Josee. 2003. Rapid Identification of *Escherichia coli* pathotypes by virulence gene detectioon with DNA microarrays. Journal of Clinical Microbiology 41(5):21113-22125.

Blanco, JG, E.A.; Espinosa, P.; Blanco, M.; Garabal, J.I.; Alonso, M.P. 1992. ENTEROTOXIGENIC AND NECROTIZING *ESCHERICHIA COLI* IN HUMAN DIARRHOEA IN SPAIN European Journal of Epidemiology 8(4):548-552.

C. Wenneras, VE. 2004. Prevalence of enterotoxigenic *Escherichia coli*-associated diarrhoea and carrier state in the developing world. Journal Health of Population Nutrition 22:370-382.

Carlos, CP, Mathias M; Stoppe, Nancy C; Hachich, Elayse M. . 2010. *Escherichia coli* phylogenetic group determination and its application in tthe identification of major animal source of fecal contamination. BMC Microbiology 10(161).

CM Fernandez-Prada, DH, AB Hatman, J Kopelowitz 2000. *Shigella flexneri* IpaH 7.8 facilitates escape of virulent bacteria from the endocytic vacuoles of mouse and human macrophages. Infection and Immunity 68:3608-3619.

Coello, A. 2015. Investigacion aislamiento e identificacion de *Salmonella sp., Shigella sp*. y *Listeria monocytogenes* en quesos artesanales distribuidos en el Municipio Distrito Central, Honduras. Centro de Estudios y Control de Contaminantes CESCCO.

Contreras, CAO, T. J.; Lacher, D.W.; Navarro, A.; Talledo M.; Donnenberg, M.S. 2010. Allelic variability of critical virulence genes (*eae, bfpA and per*A) in typical and atypical enteropathogenic *Escherichia coli* in Peruvian children. Journal Of Medical Microbiology 59:25-31.

Czeczulin, JRW, Thomas S.; Henderson, Ian R.; Navarro-Garcia, Fernando; Nataro, James P. 1999. Phylogenetic Analysis of Enteroaggregative and Diffusely Adherent *Escherichia coli*. Infection and Immunity 67(6):2692-2699.

Chattopadhyay, ST, Veronika; McVeigh, Annette; Kislela, Dagmara I, Dorl, Kathleen; Navarro, Armando; Sokurenko, Evgenl V.; Savarlno, tephen J. 2012. Adaptive Evolution of Class 5 Fimbrial Genes in Enterotoxigenic *Escherichia coli* and Its Functional Consequences. The Journal of Biologcal Chemistry 287(9):6150-6158.

Christian-Daniel Kohler, UD. 2011. What defines extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*? International Journal of Medical Microbiology 301:642-647.

D.A. Rasko, MJR, G.S Myers. 2008. The pangenome structure of *Escherichia col*i: comparative genomis analysis of *E. coli* commensal and pathogenic isolates. Journal of Bacteriology 190:6881-6893.

Daniel, WW. 2002. Bioestadistica. Base para el analisis de las ciencias de la salud. editores L, editor. Mexico.

David M. Gordon, OC. 2008. Assigning *Escherichia coli* strains to phylogenetic groups: multi-locus sequence typing versus the PCR triplex method. Environmental Microbiology(10):2484-2496.

Dorsey; FC, F, J.F.; Flekenstein JM. 2006. Directed delivery of heat-labile enterotoxin by enterotoxigenic *Escherchia coli*. Cell Microbiology 8(9):1516-1527.

Escobar-Paramo, PO, Clermont; Blanc-Potard, Anne-Beatrice; Bui, Hung; . 2004. A Specific Genetic Background Is Required for Acquisition and Expression of Virulence Factors in *Escherichia coli*. Molecular Biology and Evolution 21(6):1085.1094.

Escherich, T. 1989. The intestinal bacteria of the neonate and breast-fed infant. Reviews on Clinical Infectious diseases(11):352-356.

Espinoza, JdC. 2013. Caracterizacion fenotipica y molecular de aislamientos clinicos de *Escherichia coli* enterotoxigenica (ETEC) y enteropatogena (EPEC) en muestras fecales de niños menores de tres años en centros de salud de Tegucigalpa y Comayaguela; Honduras C.A. [Academic]. Honduras; C.A.: Universidad Nacional Autonoma de Honduras.

Ferrera, AE, Lourdes. 2014. Characterization of *E. coli* isolated from samples of different biological and environmental sources. POSTER ed. Montreal, Canada: POSTER. p 1.

Fleckenstein, JM. 2013. Enterotoxigenic *Escherichia coli*. In: Donnenberg MS, editor. *Escherichia coli* Pathotypes and Principles of pathogenesis. University of Mryland School of Medicine: Elsevier. p 183-201.

Franke, JF, Sylvia; Schmidt, Herbert; Schwarzkopf, Andreas; Wiele, Lothar H.; Baijer, Georg; Beutin, Lothar; Karch, Helge. 1994. Nucleotide Sequence Analysis of Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) Adherence Factor Probe and Development of PCR for Rapid Detection of EPEC Harboring Virulence Plasmids. Journal of Clinical Microbiology 32(10):2460-2463.

Gaytan, MM-S, Veronica; Soto, Eduardo; . 2016. Type Three Secretion System in Attaching and Effacing Pathogens. Frontiers in cellular and infection Microbiology 6(129).

Gomes, TATE, W.P.; Scaletsky, I.C.A.; Guth, B.E.C.; Piazza; R.M.F; Ferreira, L.C.; Martinez, M.B. 2016. Diarrheagenic *Escherichia coli*. Barazilian Journal of MIcrobiology 47:3-30.

Gordon, DM. 2013a. The ecology of *Escherichia coli*.

Gordon, DM. 2013b. *Escherichia coli* Pathotypes and Principles of pathogenesis

In: Donnenberg MS, editor. The ecology of *Escherichia coli*. University of Mryland School of Medicine: Elsevier.

Gunzburg, tTT, Nadia G.;Riley, Lee W. 1995. Identification of Enteropathogenic *Escherichia coli* by PCR-based detection of the Bundle-Formig Pilus Gene. Journal of Clinical Microbiology 33(5):1375-1377.

Gustavo Varela, OGG-D, Theresa Ochoa. 2010. Diarrheagenic *Escherichia coli* in Children from Uruguay. In: Torres AG, editor. Diarrheagenic *Escherichia coli* in Children from Uruguay

1ed. University of Texas. p 2019-2222.

Hazen, THK, JAmes B.; Nataro, James P.; Rasko, David A. . 2015. Comparative Genomics Provides Insight into the Diversity of the Attaching and Effacing *Escherichia coli* Virulence Plasmids. Infection and Immunity 83(10):4103-4117.

Hernándes Oviedo, AIM, Mirna; Henriquez, Lourdes; Garay, Marcela 2016. Variación espacial y temporal de la diversidad y abundancia del fitoplancton del lago de Yojoa en un año hidrológico 2014-2015. Revista Ciencia y Tecnologia 19:40-77.

Hernandes, RE, WP; Vieira MAM; Gomes TAT. 2009. An Overview of atypical enterophatogenic *Escherichia coli*. federation of European Microbiological Societies Letters 297:137-149.

Herve´ Philippe, CJD. 2003. Horizontal gene transfer and phylogenetics. Current Opinion in Microbiology(6):498-505.

I. Orskov, FO. 1984. Serotyyping of *Escherichia coli*. Methods in Microbiology 14.

I. Orskov, FO, K. Jann 1977. Serology, chemistry, and genetics of O and K antigens of *Escherichia coli*. Bacteriology Reviews 41:667-710.

Ingle J., DO, Clermont; Skurnik, David; Denamur, Erick; Walk, Seth T.; Gordon, David M. 2011. Biofilm Formation by and Thermal Niche and Virulence Characteristics of *Escherichia spp*. Environmental Microbiology 77(8):2695-2700.

Ingmar Zudea, b, 1, Andreas Leimbacha,b,1, Ulrich Dobrindta,b. 2013. Prevalence of autotransporters in *Escherichia coli:* what is the impact of phylogeny and pathotype? International Journal of Medical Microbiology:243–256.

Isabel C.A. Scaletsky, JSP, M.Z. Pedroso. 1999. Virulence properties of atypical EPEC strains. Journal Of Medical Microbiology 48:41-49.

Isabel C.A. Scaletsky, MLMS, Luiz Trabulsi. 1984. Distinctive patterns of adherence of enteropathogenic *Escerichia coli* to HeLa cells. Infection and Immunity 45(2):534-536.

Islam, MAH, A.E.; Talukder, K.A.; Zwietering, M.A.; . 2006. Evaluation of Immunomagnetic separation and PCR for the detection of *Escherichia coli* O157 in animal feces and meats. Journal of Food Protection 69(12):2865-2869.

Jafari A, AM, Bouzari S. 2012. *Escerichia coli*: a brief review of diarrheagenic pathotypes and their role in diarrheal diseases in Iran. Iranian Journal of Microbiology 4(3):102-117.

James B. Kaper, JPN, Harry L.T. Mobley. 2004. Pathogenic *Escherichia coli*. Nature Microbiology Reviews 2.

James R. Johnson, TAR. 2001. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli:*"The other bad *E. coli*". Office of Research and Development, Medical Research Service, and Department of Veterans Affairs merit review.

Katia R.S. Aranda, SHF, Isabel C. A. Scaletsky. 2007. Single multiplex assay to identify simultaneously enteropathogenic, enteroaggregative, enterotoxigenic, enteroinvasive and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains in Brazilian children. Federation of European Microbiological Societies 267:145-150.

Kelly, BGVABDJ. 2009. Horizontal gene transfer of virulence determinants in selected bacterial foodborne pathogens Food and Chemical Toxicology 47:969-977.

L. Beutin, UK, G. Krausse. 2008. Evaluation of major types of Shiga toxin 2E-producing *Escherichia coli* bacteria present in food, pigs, and the environment as potential pathogens for humans. Applied Environmental Microbiology 74(15):4806-4816.

L.T. Nguyen, BEG. 2004. Detection of *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes* in beef products by real-time polymerase chain reaction Foodborne Pathogenic Disease 1(4):231-240.

M. Ratajczak, EL, T. Berthe. 2010. Influence of hydrological conditions on the *Escherichia coli* popultion structure in the water of a creek on the rural watershed. BMC Microbiology(10):222.

Martinez-Nazaret, REVdB, Luz B; Castillo, Lena K. 2015. *Escherichia coli* DIARREOGÉNICAS PROCEDENTES DE AGUAS MARINAS RECREACIONALES CARACTERIZADAS POR REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA. FCV-LUZ XXV(4):248-254.

Matthew A. Croxen, RJL, Roland Scholz. 2013. Recent Advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli*. Clinical Microbiology Reviews 26(4):822-880.

Mazariego-Espinosa, KC, Ariadnna; Ledesma, Maria A.; Ochoa, Sara A.; Xicohtenccatl-Cortes, Juan. 2010. Longus, a Type IV pilus of Enterotoxigenic *Escherichia coli*, Is involved in adherence to intestinal epithelial cells Journal of Bacteriology 192(11):2791-2800.

Michael P. Doyle, BRC. 2006. Antimicrobial resistance: Implications for the Food System: Mechanisms for emergence and dissemination of antimicrobial resitance. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety 5.

Montoya, TBD. 2015. Evaluacion de la calidad microbiologica de productos lacteos de seis departamentos de Honduras durante el periodo de enero a septiembre del 2015 [Academic]: Universidad Nacional Autonoma de Honduras. 86 p.

N. Boisen, FS, D.A. Rasko. 2012. Genomic characterization of enteroaggregative *Escherichia coli* from children in Mali. Journal of Infectious Diseases 205(3):431-444.

Nadia Boisen, KAK, James P. Nataro 2013. *Escherichia coli*: Pathotypes and principles of pathogenesis. In: Donnenberg MS, editor. Enteroagregative *Escherichia coli*. University of Maryland School of Medicine: Elsevier. p 247-264.

Nagy, BF, Peter. 1999. Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) in farm animals. Veterinary Medical Research Institute of the Hungarian Academy of Science BioMed Central 30(2-3):259-284.

Navarro, AEC, Carlos A.; Melendez-Herrada, Enrique; Cravioto, Alejandro. 2016. *Escherichia coli* DERIVED FROM DIFFERENT SOURCES SHARE ANTIGENIC CHARACTERISTICS WITH Shigellaboydii 18 AND VIRULENCE FACTORS WITH ENTEROTOXIGENIC *E. coli*. International Journal of Advanced Research (IJAR) 4(10):629-638.

Nina Williams, AGT, Sonja Lloyd. 2010. Pathogenic *Escherichia coli* in Latin America. In: Torres AG, editor. Evolution and Epidemiology of Diarrheagenic *Escherichia coli*

University of Texas: Bentham eBooks. p 8-25.

Ochoa, TB, F. ; Contreras, C. Mercado, E. 2008. New insights into the epidemiology of enteropathogenic *Escherichia coli* infection. Tropical Medical Hygiene 102:852-856.

Olivier Clermont, JC, Erick Denamur, David M. Gordon. 2013. The Clermont *Escherichia coli* Phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylo-groups. Environmental Microbiology reports 5(1):58-65.

Olivier Clermont, SB, Edouard Bingen. 2000. Rapid and Simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. Applied and Environmental Microbiology 66(10):4555-4558.

Olivier Tenaillon, DS, Bertrand Picard, Erick Denamur. 2010. The population Genetics of commensal *Escherichia coli*. Nature Microbiology Reviews 8:2017-2217.

Ouyang-Latimer, JA, NJ.; Jiang, ZD.; Okhuysen, PC.; Paredes, M. . 2010. Biochemical and genetic diversity of enterotoxigenic *Escherichia coli* associated with diarrhea in United States students in Cuernavaca and Guadalajara, Mexico, 2004-2007. Journal of Infectious Diseases 201(12):1831-1838.

Paredes-Paredes, MO, Pablo C.; Mohamed, Jamal A. 2011. Seasonality of Diarrheagenic Escherichia coli pathotypes in U.S. Students Acquiring Diarrhea in Mexico. Journal of Travel Medicine 18(2):121-125.

Patricia G. Valle, SP, Laura Piovano, Elizabeth Davila, Mirta Peralta. 2005. Postdiarrheal Shiga Toxin-mediated Hemolytic Uremic Syndrome Similar to septic shock. Medicina 66(5):395-401.

Pennington, H. 2010. *Escherichia coli* O157. Lancet 376(9750):1428-1435.

Peruski, LFK, Bradford A.; . 1999. Phenotypic Diversity of Enterotoxigenic *Escherichia col*i Strains from a Community-Based Study of Pediatric Diarrhea

in Periurban Egypt. Journal of Clinical Microbiology 37(9):974–2978.

R. Boom, CJS, M.M.M. Salimans, C.L. Jansen. 1990. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. Journal of Clinical Microbiology 28(3):495-503.

R. Lan, MCA, M.B. Martinez, P.R. Reeves. 2004. Molecular evolutionary relationships of enteroinvasive *Escerichia coli* and *Shigella spp* Infection and Immunity 72:5080-5088.

R.P. Anantha, KDS, M.S. Donnenberg 2000. Effects of *bfp* mutations on biogenesis of functional enteropathogenic *Escherichia coli* type IV pili. Journal of Bacteriology 182(2498-2506).

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

Reyes, DV, Samuel; Paniagua, Margarita 2010. Diarrheaagenic *Escherichia coli* markers and phenotypes among fecal *E. coli* isolates collected from Nicaraguan Infants. Journal of Clinical Microbiology 48(9):3395-3396.

Ribeiro Tiba, MFC, Marcelo. 2011. Identification of putative new *Escherichia coli* flagellar antigens from human origin using serology, PCR-RFLP and DNA sequencing methods. Brazilian Journal of Infectious iseases 15(2):144-150.

Rodas, CI, Volga; Qadri, Firrdausi; Wiklund, Gudrun; Svennerholm, Ann-Mari. 2009. Development of Multiplex PCR Assays for Detection of Enterotoxigenic *Escherichia coli* Colonization Factors and Toxins Journal of Clinical Microbiology 47(4):1218-1220.

Rodriguez-Angeles, G. 2002. Diagnosis and main charateristics of *Escherichia coli* pathogenic groups. Salud Publica Mexico 44:464-475.

Roy R. Chaudhuri, IH. 2012. The evolution of the *Escherichia coli* phylogeny. Infection, Genetics and Evolution(12):214-226.

Sacks, RB. 2011. The discovery of cholera-like enterotoxins produced by *Escherichia coli* causing secretoty diarrhoea in humans. Indian Journal of Medicine 133(2):171-180.

Savageau, MA. 1983. *Escherichia coli* habitats, cell types, and molecular mechanisms of gene control Nature(46):732-744.

Scheutz, FT, Louise D; Beutin, Lothar Beutin and collaborators 2012. Multicenter Evaluation of a Sequence-Based Protocol for Subtyping Shiga Toxins and Standardizing Stx Nomenclature. Journal of Clinical Microbiology 50(9):2951-2963.

Schmidt, HPB. 1994. Differentiation in virulence patterns of *Escherichia coli* possessing *eae* genes. Medical Microbiology and Immunology 183:23-31.

Seth T.Walk, EWA, David M. Gordon, Jeffrey L.Ram, Gary A. Toranzos, James M. Tiedje, Tomas Whittam 2009. Cryptic lineages of the genus *Escherichia*. Applied and Environmental Microbiology 75(20):6534-6544.

Shahista Nisa, KMS, Michael Donnenberg. 2013. Enteropathogenic *Escherichia coli*. In: Donnenberg MS, editor. *Escherichia coli* Pathotypes and Principles of pathogenesis. p 75-98.

Sousa, CP. 2006. The versatility strategies of *Escherichia coli* pathotypes: A mini review. Journal Venom Animal Toxins and Tropical diseases 12(3):363-373.

Stanford T. Shulman, HCF, Ronald H Simis. 2007. Theodor Escherich: The first pediatric infectious diseases physician? Infectious Diseases Society of America.

Stenutz, RW, Andrej. 2006. The stuctures of *Escherichia* coli O-polysaccharide antigens. Federation of European Microbiological Societies(30):382-403.

Sujay Chattopadhyay, EVS. 2013. *Escherichia coli* Pathotypes and Principles of pathogenesis. In: Donnenberg MS, editor. Evolution of pathogenic *Escherichia coli*. p 45-71.

Timm, CDI, K.; Gomes, T.A.T; Vieira, M.M.; Guth, B.E.C; . 2006. Virulence markers and serotypes of Shiga toxin-producing *Escherichia coli,* isolated from cattle in Rio Grande do Sul,

Brazil. Letters in Applied Microbiology 44:419-425.

Torres, AG. 2017. *Escherichia coli* diseases in Latin America—a 'One Health' multidisciplinary approach. Federation of European Microbiological Societies FEMS 75(2).

Torres, OGWLO. 2015. Toxins and virulence factors of enterotoxigenic *Escherichia coli* associated with strains isolated from indigenous children and international visitors to a rural community in Guatemala. Epidemiology Infectology 143(8):1662-1671.

Vilchez, SR, Daniel; Bucardo, Filemon. 2009. Prevalence of diarrhoeagenic *Escherichia coli* in children from Leon, Nicaragua. Journal Of Medical Microbiology(58):630-637.

Vipin Madhavan, TPS, Harry. 2015. Colonization factors of enterotoxigenis *Escherichia coli*. Advances in Applied Microbiology 90.

WHO. 1987. Manual for Laboratory investigations of acute enteric infections. World Health Organization-Programme for control of diarrheal diaseases.

WHO. 2008. Guidelines for drinking water quality. World Health Organization 1.

Zelaya, AA. 2009. Manual de Bioseguridad Laboratorios Clinicos. UNAH.

Anexos

Anexo 1. Registro y Hoja de resultado

	Universidad Nacional Autónoma de Honduras Facultad de Ciencias Escuela de microbiología Maestría en Enfermedades Infecciosas y Zoonòticas MEIZ III Promoción Proyecto de Investigación **Caracterización molecular de *Escherichia coli* aisladas de diferentes procedencias** Registro de cepario y hoja de resultados

Realizado por: Dra. Jeniffer Fiallos Versión 0	Responsable de registro: _____	Numero de pagina	

1. REGISTRO CEPARIO

1.1 Codigo cepa *Escherichia coli*: ☐ Ubicacion: Caja ☐ Freezer ☐ # de registro en caja ☐

1.2 Aislamiento de:
- ☐ Muestras diarreicas humanas
- ☐ Quesos artesanales
- ☐ Lechugas
- ☐ Agua
- ☐ Carne molida

1.3Condición de cepa:
- ☐ Viable
- ☐ No viable

1.4 Fecha verificación de viabilidad
DIA ☐ MES ☐ AÑO ☐

1.5 Fecha extracción de ADN
DIA ☐ MES ☐ AÑO ☐

1.6 Pruebas adicionales
- ☐ Indol (+)
- ☐ Rojo de metilo(+)
- ☐ Voges Proskauer(-)
- ☐ Citrato(-)
- ☐ API 20E

1.7 Serotipo:
O: ☐ H: ☐

2. REGISTRO RESULTADOS PCR

2.1 PCR Multiplex 1- Genes patotipos

eae	
bfpA	
aggR	
elt	
est	
ipaH	
stx1	
stx2	

Resultado patotipo: ☐

2.2 PCR Multiplex 2- Genes filogenia

arpA	
chuA	
yjaA	
TspE4.C2	

Resultado grupo filogenetico: ☐

Anexo 2. Formulario de registro de caja

Universidad Nacional Autónoma de Honduras
Facultad de Ciencias
Escuela de Microbiología
Maestría en Enfermedades Infecciosas y Zoonoticas III Promoción
Registro de cepario *Escherichia coli*

Pagina _____

Realizado por: Dra. Jeniffer Fiallos

Versión 0

Responsable de registro:_____
Identificación de caja:_____
_____
_____
_____

Ubicación en laboratorio: _____

Nº	Código de cepa	Fecha de preservación	Replicas existentes
1			
2			
3			
4			
5			
6			
7			
8			
9			
10			
11			
12			
13			
14			
15			
16			
17			
18			
19			
20			
21			
22			
23			
24			
25			
26			
27			
28			
29			
30			

Nº	Código de cepa	Fecha de preservación	Replicas existentes
31			
32			
33			
34			
35			
36			
37			
38			
39			
40			
41			
42			
43			
44			
45			
46			
47			
48			
49			
50			
51			
52			
53			
54			
55			
56			
57			
58			
59			
60			

Anexo 3. Registro de cepario de Enterobacterias Laboratorio Teasdale-Corti

Universidad Nacional Autónoma de Honduras
Facultad de Ciencias
Escuela de Microbiología
Maestría en Enfermedades Infecciosas y Zoonoticas III Promoción
Registro de cepario *Escherichia coli*

Pagina 1

Realizado por: Dra. Jeniffer Fiallos

Versión 0

Responsable de registro: Jeniffer Fiallos
Identificación de caja: **CGEC-CA-01-01**
Cepas ambientales. *E. coli* CA
Reactivadas por: Adonis Ramos, Dorielissa Carcamo
III Periodo 2015 30/10/15
Ubicación en laboratorio: _____

Nº	Código de cepa	Fecha de preservación	Replicas existentes
1	CA-02(1)	30/10/15	1
2	CA-02	7/4/16	2
3	CA-03(1)	30/10/15	1
4	CA-03	7/4/16	2
5	CA-03(3)	30/10/15	2
6	CA-04(2)	30/10/15	3
7	CA-04	7/4/16	2
8	CA-05(1)	30/10/15	2
9	CA-05(2)	30/10/15	2
10	CA-07(1)	30/10/15	1
11	CA-07(2)	30/10/15	2
12	CA-07	7/4/16	2
13	CA-08(1)	30/10/15	1
14	CA-08(2)	30/10/15	2
15	CA-08(3)	30/10/15	2
16	CA-09(1)	30/10/15	1
17	CA-09(3)	30/10/15	2
18	CA-09	10/2/16	2
19	CA-09	7/4/16	2
20	CA-10(2)	30/10/15	4
21	CA-10-2	28/4/16	2
22	CA-10(3)	30/10/15	1
23	CA-10-3	28/4/16	2
24	CA-12-1	28/4/16	2
25	CA-12-2	28/4/16	2
26	CA-12(3)	30/10/15	3
27	CA-12-3	28/4/16	2
28	CA-12	7/4/16	2
29	CA-13(1)	30/10/15	2
30	CA-13-1	28/4/16	2

Nº	Código de cepa	Fecha de preservación	Replicas existentes
31	CA-013(2)	30/10/15	1
32	CA-13(3)	30/10/15	2
33	CA-013	7/4/16	2
34	CA-16(1)	30/10/15	3
35	CA-16(2)	30/10/15	2
36	CA-16(3)	30/10/15	4
37	CA-016	7/4/15	2
38	CA-17(2)	30/10/15	1
39	CA-17(3)	30/10/15	2
40	CA-017	12/2/16	1
41	CA-017	7/4/16	2
42	CA-018(2)	30/10/15	1
43			
44			
45			
46			
47			
48			
49			
50			
51			
52			
53			
54			
55			
56			
57			
58			
59			
60			

NOTA: Se conservaron en caldo infusión cerebro corazón los códigos recuperados el 2016; los códigos recuperados el 2015 conservados en caldo Luria Bertani
13 DISTINTOS CODIGOS
81 VIALES

Universidad Nacional Autónoma de Honduras
Facultad de Ciencias
Escuela de Microbiología
Maestría en Enfermedades Infecciosas y Zoonoticas III Promoción
Registro de cepario *Escherichia coli*

Realizado por: Dra. Jeniffer Fiallos

Versión 0

Responsable de registro: Jeniffer Fiallos
Identificación de caja: **CGEC-CA-02-02**
Cepas ambientales. *E. coli*/ CA
Reactivadas por: Adonis Ramos, Dorielissa Carcamo
III Periodo 2015 30/10/15
Ubicación en laboratorio: _____

Nº	Código de cepa	Fecha de preservación	Replicas existentes
1	CA-018	7/4/16	2
2	CA-19(1)	30/10/15	2
3	CA-19(2)	30/10/15	2
4	CA-019	7/4/16	2
5	CA-022(1)	30/10/15	2
6	CA-022(2)	30/10/15	2
7	CA-022	7/4/16	2
8	CA-023	10/2/16	1
9	CA-023	7/4/16	2
10	CA-024(1)	30/10/15	1
11	CA-024(2)	30/10/15	2
12	CA-024	12/2/16	2
13	CA-024	7/4/16	2
14	CA-025(1)	30/10/15	2
15	CA-025(2)	30/10/15	2
16	CA-025	12/2/16	1
17	CA-025	7/4/16	2
18	CA-026(1)	30/10/15	2
19	CA-026(2)	30/10/15	1
20	CA-026(3)	30/10/15	3
21	CA-026	16/2/16	2
22	CA-026	7/4/16	2
23	CA-027(1)	30/10/15	2
24	CA-027(2)	30/10/15	1
25	CA-027(3)	30/10/15	2
26	CA-027	7/4/16	2
27			
28			
29	E.coli 12407 Alim I	28/4/16	2
30	E.coli Alim I	28/4/16	2

Nº	Código de cepa	Fecha de preservación	Replicas existentes
31			
32			
33			
34			
35			
36			
37			
38			
39			
40			
41			
42			
43			
44			
45			
46			
47			
48			
49			
50			
51			
52			
53			
54			
55			
56	NOTA: Se conservamo en caldo infusión cerebro corazón los códigos recuperados el 2016; los códigos recuperados el 2015 conservados en caldo Luria Bertani		
57			
58			
59	10 DISTINTOS CÓDIGOS		
60	51 VIALES		

Universidad Nacional Autónoma de Honduras
Facultad de Ciencias
Escuela de Microbiología
Maestría en Enfermedades Infecciosas y Zoonoticas III Promoción
Registro de cepario *Escherichia coli*

Realizado por: Dra. Jeniffer Fiallos

Versión 0

Responsable de registro: Jeniffer Fiallos
Identificación de caja: **CGEC-CM-01-03**
Cepas de muestras de Carne molida/CM
Analistas: Alvaro, Jahir y Kelly
III Periodo 2015
Ubicación en laboratorio: _____

Nº	Código de cepa	Fecha de preservación	Replicas existentes
1	CM-001 37C E.coli	28/10/15	1
2	CM-001 37C	7/4/16	2
3	CM-001 44.5C	7/4/16	2
4	CM-002 44.5C	26/11/15	1
5	CM-002 44.5C	7/4/16	2
6	CM-002 37C	28/10/15	1
7	CM-003 37C	31/10/15 JK	2
8	CM-004 37C	31/10/15 JK	1
9	CM-004 37C	26/11/15	2
10	CM-004 37C	7/4/16	2
11	CM-004 44.5C	26/11/15	1
12	CM-004 44.5C	7/4/16	2
13	CM-005 37C	7/4/16	2
14	CM-005 44.5C	26/11/15	1
15	CM-005 44.5C	7/4/16	2
16	CM-007 37C	26/11/15	1
17	CM-008 44.5C	26/11/15	1
18	CM-008 44.5C	7/4/16	2
19	CM-009 44.5C	26/11/15	1
20			
21	Enterobacteriaceae 37C	26/11/15	6
22	Enterobacteriaceae 37C	31/10/15	2
23	Enterobacteriaceae 44.5C	26/11/15	2
24	Enterobacteriaceae 44.5C	28/10/15	1
25			
26			
27			
28			
29			
30			

Nº	Código de cepa	Fecha de preservación	Replicas existentes
31			
32			
33			
34			
35			
36			
37			
38			
39			
40			
41			
42			
43			
44			
45			
46			
47			
48			
49			
50			
51			
52			
53			
54			
55			
56			
57			
58	NOTA: Los códigos recuperados el 2016 se		
59	conservaron en caldo infusión cerebro corazón.		
60	~~13 DISTINTOS CÓDIGOS~~ 29 VIALES		

Universidad Nacional Autónoma de Honduras
Facultad de Ciencias
Escuela de Microbiología
Maestría en Enfermedades Infecciosas y Zoonoticas III Promoción
Registro de cepario *Escherichia coli*

Realizado por: Dra. Jeniffer Fiallos

Versión 0

Responsable de registro: Jeniffer Fiallos
Identificación de caja: **CGEC-Ct-01-04**
Cepas de muestras diarreicas. *E. coli*
Codigos Ct. Recuperadas Marzo 2016
Analista: Isaac Sabillon
Ubicación en laboratorio: _____

Nº	Código de cepa	Fecha de preservación	Replicas existentes
1	Ct-01-3	12/4/16	2
2	Ct-01-3	12/4/16	2
3	Ct-01-4	12/4/16	2
4	Ct-01-4	12/4/16	2
5	Ct-01-5	12/4/16	2
6	Ct-01-5	12/4/16	2
7	Ct-02-1	12/4/16	2
8	Ct-02-1	12/4/16	2
9	Ct-02-4	12/4/16	2
10	Ct-02-4	12/4/16	2
11	Ct-02-5	12/4/16	2
12	Ct-02-5	12/4/16	2
13	Ct-03-2	12/4/16	2
14	Ct-03-2	12/4/16	2
15	Ct-03-3	12/4/16	2
16	Ct-03-3	12/4/16	2
17	Ct-03-4	12/4/16	2
18	Ct-03-4	12/4/16	2
19	Ct-04-1	12/4/16	2
20	Ct-04-1	12/4/16	2
21	Ct-04-2	12/4/16	2
22	Ct-04-2	12/4/16	2
23	Ct-04-3	12/4/16	2
24	Ct-04-3	12/4/16	2
25	Ct-04-4	12/4/16	2
26	Ct-04-4	12/4/16	2
27	Ct-04-5	12/4/16	2
28	Ct-04-5	12/4/16	2
29			
30			

Nº	Código de cepa	Fecha de preservación	Replicas existentes
31			
32			
33			
34			
35			
36			
37			
38			
39			
40			
41			
42			
43			
44			
45			
46			
47			
48			
49			
50			
51			
52			
53			
54			
55			
56			
57			
58	NOTA: Se conservaron en caldo infusión cerebro corazón.		
59	14 DISTINTOS CÓDIGOS		
60	56 VIALES		

Universidad Nacional Autónoma de Honduras
Facultad de Ciencias
Escuela de Microbiología
Maestría en Enfermedades Infecciosas y Zoonoticas III Promoción
Registro de cepario *Escherichia coli*

Realizado por: Dra. Jeniffer Fiallos

Versión 0

Responsable de registro: Jeniffer Fiallos
Identificación de caja: **CGEC-C-01-05**
Cepas ETEC/ *E. coli* Codigos C
Reactivadas por: Adonis Ramos y Dorielissa Carcamo
24/11/15
Ubicación en laboratorio: _____

Nº	Código de cepa	Fecha de preservación	Replicas existentes
1	1-*E. coli*	24/11/15	2
2	1	24/11/15	2
3	2	24/11/15	2
4	3	24/11/15	2
5	3-*E. coli*	24/11/15	2
6	4-*E. coli*	24/11/15	2
7	5-*E. coli*	24/11/15	2
8	6-*E. coli*	24/11/15	2
9	C-12	24/11/15	2
10	C-17	24/11/15	2
11	C-17 *E. coli*	24/11/15	2
12	18	24/11/15	2
13	C-18	24/11/15	2
14	C-19	24/11/15	2
15	C-19	24/11/15	2
16	C-110	24/11/15	4
17	C-111	24/11/15	2
18	C-112 *E. coli*	24/11/15	2
19	C-113	24/11/15	2
20			
21			
22			
23			
24			
25			
26			
27			
28			
29			
30			

Nº	Código de cepa	Fecha de preservación	Replicas existentes
31			
32			
33			
34			
35			
36			
37			
38			
39			
40			
41			
42			
43			
44			
45			
46			
47			
48			
49			
50			
51			
52			
53			
54			
55			
56			
57	NOTA: Se conservaron en caldo Luria Bertani.		
58	Estos códigos están en registros de Dorielissa y Adonis Crtl.		
59	18 DISTINTOS CÓDIGOS		
60	40 VIALES		

Universidad Nacional Autónoma de Honduras
Facultad de Ciencias
Escuela de Microbiología
Maestría en Enfermedades Infecciosas y Zoonoticas III Promoción
Registro de cepario *Escherichia coli*

Realizado por: Dra. Jeniffer Fiallos

Versión 0

Responsable de registro:Jeniffer Fiallos
Identificación de caja: **CGEC-QM-01-06**
Cepas de muestras de quesos/QM
Reactivadas por Dorielissa Carcamo y Adonis Ramos
III Periodo 2015 30/10/15
Ubicación en laboratorio: _____

Nº	Código de cepa	Fecha de preservación	Replicas existentes
1	QM-001 *E. coli*	24/11/15	1
2	QM-001	7/4/16	2
3	QM-002 *E. coli*	24/11/15	1
4	QM-002	7/4/16	2
5	QM-003 *E. coli*	24/11/15	1
6	QM-003	7/4/16	2
7	QM-004 *E. coli*	24/11/15	1
8	QM-004	7/4/16	2
9	QM-005 *E. coli*	24/11/15	1
10	QM-005	7/4/16	2
11	QM-006 *E. coli*	24/11/15	1
12	QM-006	7/4/16	2
13	QM-007 *E. coli*	24/11/15	1
14	QM-007	7/4/16	2
15	QM-008 *E. coli*	24/11/15	1
16	QM-008	7/4/16	2
17	QM-009 *E. coli*	24/11/15	1
18	QM-009	7/4/16	2
19	QM-010 *E. coli*	24/11/15	1
20	QM-010	7/4/16	2
21	QM-011 *E. coli*	24/11/15	1
22	QM-011	7/4/16	2
23	QM-012 *E. coli*	24/11/15	1
24	QM-012	7/4/16	2
25	QM-013 *E. coli*	24/11/15	1
26	QM-013	7/4/16	2
27	QM-014 *E. coli*	24/11/15	1
28	QM-014	7/4/16	2
29	QM-015 *E. coli*	24/11/15	1
30	QM-015	7/4/15	2

Nº	Código de cepa	Fecha de preservación	Replicas existentes
31	QM-016 *E. coli*	24/11/15	1
32	QM-016	7/4/15	2
33	QM-017 *E. coli*	24/11/15	1
34	QM-018 *E. coli*	24/11/15	1
35	QM-018	7/4/15	2
36	QM-019 *E. coli*	24/11/15	1
37	QM-019	7/4/16	2
38	QM-020 *E. coli*	24/11/15	1
39	QM.020	7/4/16	2
40	QM-021 *E. coli*	24/11/15	1
41	QM-021	7/4/16	2
42	QM-022 *E. coli*	24/11/15	1
43	QM-022	7/4/16	2
44	QM-023 *E. coli*	24/11/15	1
45	QM-023	7/4/16	2
46	QM-024 *E. coli*	24/11/15	1
47	QM-025 *E. coli*	24/11/15	1
48	QM-026 *E. coli*	24/11/15	1
49	QM-026	7/4/16	2
50	QM-027 *E. coli*	24/11/15	1
51	QM-027	7/416	2
52	QM-028 *E. coli*	24/11/15	1
53	QM-029 *E. coli*	24/11/15	1
54	QM-030 *E. coli*		1
55			
56			
57			
58			
59			
60			

NOTA: Las cepas del año 2015 están conservadas en caldo Luria Bertani y las cepas del año 2016 se conservaron en caldo infusión cerebro corazón.
30 DISTINTOS CÓDIGOS
78 VIALES

Universidad Nacional Autónoma de Honduras
Facultad de Ciencias
Escuela de Microbiología
Maestría en Enfermedades Infecciosas y Zoonoticas III Promoción
Registro de cepario *Escherichia coli*

Realizado por: Dra. Jeniffer Fiallos

Versión 0

Responsable de registro: Jeniffer Fiallos
Identificación de caja: **CGEC-L-01-07**
Cepas de muestras de lechugas/L,LIII
Analistas: Alvaro, Jahir y Kelly
III Periodo 2015
Ubicación en laboratorio: _____

Nº	Código de cepa	Fecha de preservación	Replicas existentes
1	LIII-001 *E. coli*37 C	28/10/15	2
2	L-III-001 *E. coli*44C	28/10/15	2
3	L-02 *E.coli* ADGG	9/7/15	1
4	L-02	7/4/16	2
5	L-03 *E. coli* ADGG	9/7/15	1
6	L-03	7/4/16	2
7	L-04 *E. coli* ADGG	9/7/15	1
8	L-04	7/4/16	2
9	L-III-004 44C *E.coli*	26/11/15	3
10	L-III-004 44.5C	26/11/15	2
11	L-III-005 44.5C	26/11/15	1
12	L-05 *E. coli* ADGG	31/7/15	1
13	L-05A 37C	7/4/16	2
14	L-05B ADGG *E.coli*	31/7/15	1
15	L-05B 44C	7/4/16	2
16	L-07A ADGG *E.coli*	31/7/15	1
17	L-07A 37C	7/4/16	2
18	L-07B ADGG *E.coli*	31/7/15	1
19	L-07B 44.5C	7/4/16	2
20	L-013A 37C	7/4/15	2
21	L-013B*E.coli*ADGG	31/7/15	1
22	L-013B 44.5 C	7/4/16	2
23	L-013C*E.coli*ADGG	31/7/15	1
24	L-015A 44.5C	7/4/16	2
25	L-015B*E.coli*ADGG	13/8/15	2
26	L-015B 37C	7/4/16	2
27	L-016A*E.coli*ADGG	13/8/15	1
28	L-016A 37C	7/4/16	2
29	L-016B*E.coli*ADGG	13/8/15	1
30	L-016B 44.5C	7/4/16	2

Nº	Código de cepa	Fecha de preservación	Replicas existentes
31	L-017A*E.coli*ADGG	13/8/15	1
32	L-017A 37C	7/4/16	2
33	L-019A*E.coli*ADGG	13/8/15	2
34	L-019A 37C	7/4/16	3
35	L-019B*E.coli*ADGG	13/8/15	3
36	L-019B 44.5C	7/4/16	2
37			
38	L-04ADGG *Pseudo*	31/7/15	3
39			
40			
41			
42			
43			
44			
45			
46			
47			
48			
49			
50			
51			
52			
53			
54			
55			
56			
57			
58			
59			
60			

NOTA: Las cepas del año 2015 están conservadas en caldo Luria Bertani y las cepas del año 2016 se conservaron en caldo infusión cerebro corazón.
36 DISTINTOS CÓDIGOS
59 VIALES

Universidad Nacional Autónoma de Honduras
Facultad de Ciencias
Escuela de Microbiología
Maestría en Enfermedades Infecciosas y Zoonoticas III Promoción
Registro de cepario *Escherichia coli*

Realizado por: Dra. Jeniffer Fiallos

Versión 0

Responsable de registro: Jeniffer Fiallos
Identificación de caja: **CGEC-DA-01-08**
Cepas de muestras diarreicas. *E. coli* DA
Analistas: Isaac Sabillon, Joselyne Hernandez
I Periodo 2016
Ubicación en laboratorio: _____

Nº	Código de cepa	Fecha de preservación	Replicas existentes
1	DA-001	20/4/16	2
2	DA-002	20/4/16	2
3	DA-003	20/4/16	2
4	DA-004	20/4/16	2
5	DA-005	20/4/16	2
6	DA-006	20/4/16	2
7	DA-007	20/4/16	2
8	DA-009	20/4/16	2
9	DA-010	20/4/16	2
10	DA-015	20/4/16	2
11	DA-019	20/4/16	2
12	DA-021	20/4/16	2
13	DA-022	20/4/16	2
14	DA-025	20/4/16	2
15	DA-027	20/4/16	2
16	DA-028	20/4/16	2
17	DA-029	20/4/16	2
18	DA-030	20/4/16	2
19	DA-031	20/4/16	2
20	DA-033	20/4/16	2
21	DA-035	20/4/16	2
22	DA-038	20/4/16	2
23	DA-039	20/4/16	2
24	DA-040	20/4/16	2
25	DA-041	20/4/16	2
26	DA-042	20/4/16	2
27	DA-043	20/4/16	2
28	DA-044	20/4/16	2
29	DA-045	20/4/16	2
30	DA-046	20/4/16	2

Nº	Código de cepa	Fecha de preservación	Replicas existentes
31	DA-047	20/4/16	2
32	DA-048	20/4/16	2
33	DA-051	20/4/16	2
34	DA-053	20/4/16	2
35	DA-054	20/4/16	2
36	DA-055	20/4/16	2
37	DA-056	20/4/16	2
38	DA-058	20/4/16	2
39	DA-059	20/4/16	2
40	DA-060	20/4/16	2
41	DA-061	20/4/16	2
42	DA-062	20/4/16	2
43	DA-064	20/4/16	2
44	DA-065	20/4/16	2
45	DA-066	20/4/16	2
46	DA-069	20/4/16	2
47	DA-071	20/4/16	2
48	DA-072	20/4/16	2
49	DA-073	20/4/16	2
50	DA-075	20/4/16	2
51			
52			
53			
54			
55			
56			
57			
58			
59			
60			

Universidad Nacional Autónoma de Honduras
Facultad de Ciencias
Escuela de Microbiología
Maestría en Enfermedades Infecciosas y Zoonoticas III Promoción
Registro de cepario *Escherichia coli*

Realizado por: Dra. Jeniffer Fiallos

Versión 0

Responsable de registro: Jeniffer Fiallos
Identificación de caja: **CGEC-DA-02-09**
Cepas de muestras diarreicas. *E. coli* DA
Analistas: Isaac Sabillon, Joselyne Hernandez
I Periodo 2016
Ubicación en laboratorio: _____

Nº	Código de cepa	Fecha de preservación	Replicas existentes
1	DA-076	20/4/16	2
2	DA-077	20/4/16	2
3	DA-078	20/4/16	2
4	DA-079	20/4/16	2
5	DA-082	20/4/16	2
6	DA-084	20/4/16	2
7	DA-085	20/4/16	2
8	DA-086	20/4/16	2
9	DA-087	20/4/16	2
10	DA-088	20/4/16	2
11	DA-089	20/4/16	2
12	DA-090	20/4/16	2
13	DA-091	20/4/16	2
14	DA-092	20/4/16	2
15	DA-093	20/4/16	2
16	DA-094	20/4/16	2
17	DA-098	20/4/16	2
18	DA-129	20/4/16	2
19			
20			
21			
22			
23			
24			
25			
26			
27			
28			
29			
30			

Nº	Código de cepa	Fecha de preservación	Replicas existentes
31			
32			
33			
34			
35			
36			
37			
38			
39			
40			
41			
42			
43			
44			
45			
46			
47			
48			
49			
50			
51			
52			
53			
54			
55			
56			
57			
58	NOTA: Se conservaron en caldo infusión cerebro corazón.		
59	68 DISTINTOS CÓDIGOS		
60	136 VIALES		

Universidad Nacional Autónoma de Honduras
Facultad de Ciencias
Escuela de Microbiología
Maestría en Enfermedades Infecciosas y Zoonoticas III Promoción
Registro de ceparío *Escherichia coli*

Realizado por: Dra. Jeniffer Fiallos

Versión 0

Responsable de registro: Jeniffer Fiallos
Identificación de caja: **CGEC-MX-01-010**
Cepas ambientales. *E. coli*/ MX,CEPA,E.coli
Reactivadas por: Adonis Ramos, Dorielissa Carcamo
III Periodo 2015 12/11/15
Ubicación en laboratorio: _____

Nº	Código de cepa	Fecha de preservación	Replicas existentes
1	MX-1 44C VIAL#1	12/11/15	3
2	MX-1 44C VIAL#2	12/11/15	2
3	MX-1 44C VIAL#3	12/11/15	1
4	MX-1 44C	7/4/16	2
5	CEPA MX-2 VIAL#1	12/11/15	1
6	MUESTRA 2 VIAL2	12/11/15	2
7	MUESTRA 2 VIAL3	12/11/15	2
8	MUESTRA 2	12/11/15	2
9	CEPA MX-3	12/11/15	1
10	CEPA MX-3	7/4/16	2
11	MX-4 VIAL#1	12/11/15	2
12	CEPA MX-4	12/11/15	1
13	MX-4 VIAL#2	12/11/15	2
14	CEPA MX-4 VIAL 3	12/11/15	2
15	CEPA-MX-4	7/4/16	2
16	CEPA MX-5 VIAL#1	12/11/15	2
17	MX-5 VIAL#2	12/11/15	2
18	CEPA MX-5 VIAL#3	12/11/15	1
19	CEPA MX-5	7/4/16	2
20	*E.coli* MX-9-4 (1)	5/2/16	2
21	*E.coli* MX-9-4 (2)	5/2/16	2
22	*E.coli* MX-9-5	5/2/16	2
23	*E.coli* MX-10-2	5/2/16	2
24	*E.coli* MX-10-3	5/2/16	2
25	*E.coli* MX-10-3	5/2/16	2
26	*E.coli* MX-10-4	5/2/16	2
27	*E.coli* MX-10-5	5/2/16	2
28	MUESTRA #12	12/11/15	4
29	CEPA 12-12-12	12/11/15	2
30	CEPA 12-12-12 #2	12/11/15	2

Nº	Código de cepa	Fecha de preservación	Replicas existentes
31	CEPA 12-12-12 #3	12/11/15	2
32	CEPA#3 VIAL#3	12/11/15	2
33			
34			
35			
36			
37			
38			
39			
40			
41			
42			
43			
44			
45			
46			
47			
48			
49			
50			
51			
52			
53			
54			
55			
56			
57			
58			
59			
60			

NOTA: Se conservaron en caldo infusión cerebro corazón los códigos recuperados el 2016; los códigos recuperados el 2015 conservados en caldo Luria Bertani
9 DISTINTOS CODIGOS
62 VIALES

Universidad Nacional Autónoma de Honduras
Facultad de Ciencias
Escuela de Microbiología
Maestría en Enfermedades Infecciosas y Zoonoticas III Promoción
Registro de cepario *Escherichia coli*

Realizado por: Dra. Jeniffer Fiallos

Versión 0

Responsable de registro: Jeniffer Fiallos
Identificación de caja: **CGEC-MX-02-011**
Cepas ambientales. *E. coli*/ MX,CEPA,E.coli
Reactivadas por: Adonis Ramos, Dorielissa Carcamo
III Periodo 2015 12/11/15
Ubicación en laboratorio: _____

Nº	Código de cepa	Fecha de preservación	Replicas existentes
1	*E.coli* #1	7/4/16	2
2	*E.coli* #1 VIAL#1	12/11/15	1
3	*E.coli* #1 VIAL#2	12/11/15	2
4	*E.coli* #1 VIAL#3	12/11/15	2
5	*E.coli* #2 VIAL#1	12/11/15	2
6	*E.coli* #2 VIAL#2	12/11/15	2
7	*E.coli* #2 VIAL#3	12/11/15	1
8	*E.coli* #2	12/11/15	4
9	*E.coli* #3 VIAL#1	12/11/15	2
10	*E.coli* #3	12/11/15	2
11	*E.coli* #4	12/11/15	3
12	*E.coli* #4 VIAL#3	12/11/15	2
13	*E.coli* #4 VIAL#4	12/11/15	2
14	*E.coli* #4	7/4/16	2
15	*E.coli* #5 VIAL#1	12/11/15	2
16	*E.coli* #5 VIAL#2	12/11/15	2
17	*E.coli* #5 VIAL#3	12/11/15	2
18	*E.coli* #5	12/11/15	1
19	*E.coli* #5	7/4/16	2
20	CEPA 59A VIAL#1	12/11/15	2
21	CEPA 59A VIAL#2	12/11/15	2
22	CEPA 59A VIAL#3	12/11/15	1
23	CEPA 59A (5)	12/11/15	2
24	CEPA 59A	7/4/16	2
25	CEPA 60A VIAL#1	12/11/15	1
26	CEPA 60A VIAL#2	12/11/15	2
27	CEPA 60A VIAL#3	12/11/15	1
28	CEPA 60A (5)	12/11/15	2
29	CEPA 62A VIAL#1	12/11/15	2
30	CEPA 62A VIAL#2	12/11/15	2

Nº	Código de cepa	Fecha de preservación	Replicas existentes
31	CEPA 62A VIAL#3	12/11/15	1
32	CEPA 62A (5)	12/11/15	4
33	CEPA 62A	7/4/16	2
34	CEPA 64A VIAL#1	12/11/15	1
35	CEPA 64A VIAL#2	12/11/15	2
36	CEPA 64A VIAL#3	12/11/15	2
37	CEPA 64A	7/4/16	2
38	6 Y A (3)	12/11/15	2
39			
40			
41			
42			
43			
44			
45			
46			
47			
48			
49			
50			
51			
52			
53			
54			
55			
56			
57			
58			
59			
60			

NOTA: Se conservaron en caldo infusión cerebro corazón los códigos recuperados el 2016; los códigos recuperados el 2015 conservados en caldo Luria Bertani y CST
9 DISTINTOS CÓDIGOS
73 VIALES

Universidad Nacional Autónoma de Honduras
Facultad de Ciencias
Escuela de Microbiología
Maestría en Enfermedades Infecciosas y Zoonoticas III Promoción
Registro de cepario *Escherichia coli*

Realizado por: Dra. Jeniffer Fiallos

Versión 0

Responsable de registro: Jeniffer Fiallos
Identificación de caja: **CGEC-IL-01-12 / CGEC-IL-02-13**
Cepas de muestras de quesos/ IL
Analistas: Brayan D, Montoya, Lilian Galeano
Agosto 2015
Ubicación en laboratorio: _____

Nº	Código de cepa	Fecha de preservación	Replicas existentes
1	IL-001 5/6/15	12/4/16	3
2	IL-001 O157 C-4	12/4/16	3
3	IL-001	12/4/16	3
4	IL-003	12/4/16	3
5	IL-005	12/4/16	3
6	IL-006	12/4/16	3
7	IL-007	12/4/16	3
8	IL-009	12/4/16	3
9	IL-011	12/4/16	3
10	IL-012	12/4/16	3
11	IL-013	12/4/16	3
12	IL-014	12/4/16	3
13	IL-015	12/4/16	3
14	IL-016	12/4/16	3
15	IL-017	12/4/16	3
16	IL-018	12/4/16	3
17	IL-019	12/4/16	3
18	IL-020	12/4/16	3
19	IL-021	12/4/16	3
20	IL-023	12/4/16	3
21	IL-024	12/4/16	3
22	IL-027	12/4/16	3
23	IL-028	12/4/16	3
24	IL-029	12/4/16	3
25	IL-030	12/4/16	3
26	IL-032	12/4/16	3
27	IL-036	12/4/16	3
28	IL-038	12/4/16	3
29	IL-039	12/4/16	3
30	IL-043	12/4/16	3

Nº	Código de cepa	Fecha de preservación	Replicas existentes
31	IL-045	12/4/16	3
32	IL-046	12/4/16	3
33	IL-047	12/4/16	3
34	IL-048	12/4/16	3
35	IL-049	12/4/16	3
36	IL-050	12/4/16	3
37	IL-051	12/4/16	3
38	IL-053	12/4/16	3
39	IL-054	12/4/16	3
40	IL-055	12/4/16	3
41	IL-056	12/4/16	3
42	IL-057	12/4/16	3
43	IL-058	12/4/16	3
44	IL-059	12/4/16	3
45			
46	IL-038 Cronobacter	12/4/16	3
47			
48			
49			
50			
51			
52			
53			
54			
55			
56			
57			
58	NOTA: Se conservaron en caldo infusión cerebro corazón.		
59	45 DISTINTOS CÓDIGOS		
60	135 VIALES		

Universidad Nacional Autónoma de Honduras
Facultad de Ciencias
Escuela de Microbiología
Maestría en Enfermedades Infecciosas y Zoonoticas III Promoción
Registro de ceparo *Escherichia coli*

Realizado por: Dra. Jeniffer Fiallos

Versión 0

Responsable de registro: Jeniffer Fiallos
Identificación de caja: **CGEC-CA-01-014**
Cepas ambientales
Codigos CA Noviembre 2015
Ubicación en laboratorio: _____

Nº	Código de cepa	Fecha de preservación	Replicas existentes
1	CA-2-2 VIAL#1	25/11/15	3
2	CA-03-01	11/15/17	4
3	CA-03-02 VIAL#1	25/11/15	6
4	CA-03-02 VIAL #3	25/11/15	3
5	CA-03-02	11/5/17	3
6	CA-03-03 VIAL #X	25/11/15	3
7	CA-03-03 VIAL #3	25/11/15	3
8	CA-03-03	11/5/17	3
9	CA-04-01 VIAL #4	25/11/15	3
10	CA-04-02 VIAL #1	25/11/15	3
11	CA-04-02	11/5/17	3
12	CA-04-03	11/5/17	3
13	CA-05-02 VIAL #1	25/11/15	3
14	CA-05-02 VIAL #2	25/11/15	3
15	CA-05-02	11/5/17	3
16	CA-05-03 VIAL #3	25/11/15	3
17	CA-05-03	11/5/17	3
18	CA-09-03 VIAL #1	25/11/15	3
19	CA-09-03 VIAL #2	25/11/15	3
20	CA-09-03	11/5/17	4
21	CA-10-03	11/5/17	3
22	CA-12-02	11/5/17	4
23			
24			
25			
26			
27			
28			
29			
30			

Nº	Código de cepa	Fecha de preservación	Replicas existentes
31			
32			
33			
34			
35			
36			
37			
38			
39			
40			
41			
42			
43			
44			
45			
46			
47			
48			
49			
50			
51			
52			
53			
54			
55			
56			
57			
58			
59			
60			

NOTA. Se conservaron en caldo infusión cerebro corazón. Estos códigos no están en registros de Dorielissa y Adonis. NO se sabe si son E. coli por esta razón se separaron en otra caja
~~12 DISTINTOS CÓDIGOS~~
72 VIALES

Universidad Nacional Autónoma de Honduras
Facultad de Ciencias
Escuela de Microbiología
Maestría en Enfermedades Infecciosas y Zoonoticas III Promoción
Registro de cepario *Escherichia coli*

Realizado por: Dra. Jeniffer Fiallos

Responsable de registro: Jeniffer Fiallos

Identificación de caja: **CGEC-Rf-01-015**

Versión 0

Cepas control de patotipos *E. coli*
cepas enviadas de Brasil

Ubicación en laboratorio: _____

Nº	Código de cepa	Fecha de preservación	Replicas existentes
1	EHEC EDL-933	2/2/16	5-Rosado
2	ETEC H10407	2/2/16	6-Gris
3	EPEC E2393169	2/2/16	6-Verde
4	EAEC 042	2/2/16	6-Blanco
5	EIEC 2515	2/2/16	6-Azul
6			
7	*L. monocytogenes*		6
8	E. coli ATCC 49766	BDM	3
9			
10			
11			
12			
13			
14			
15			
16			
17			
18			
19			
20			
21			
22			
23			
24			
25			
26			
27			
28			
29			
30			

Nº	Código de cepa	Fecha de preservación	Replicas existentes
31			
32			
33			
34			
35			
36			
37			
38			
39			
40			
41			
42			
43			
44			
45			
46			
47			
48			
49			
50			
51			
52			
53			
54			
55			
56			
57			
58	NOTA: Se conservaron en caldo infusión cerebro corazón.		
59	5 DISTINTOS CODIGOS		
60	29 VIALES		

Universidad Nacional Autónoma de Honduras
Facultad de Ciencias
Escuela de Microbiología
Maestría en Enfermedades Infecciosas y Zoonoticas III Promoción
Registro de cepario *Escherichia coli*

Realizado por: Dra. Jeniffer Fiallos

Versión 0

Responsable de registro: Jeniffer Fiallos
Identificación de caja: **CGEC-NO E.coli-01-016**
Códigos DA-NO *E. coli* según registro Abril 2016
Ubicación en laboratorio: _____

Nº	Código de cepa	Fecha de preservación	Replicas existentes
1	DA-003 (2)	Octubre 2012	2
2	DA-003 (4)	Octubre 2012	2
3	DA-003 (5)	Octubre 2012	2
4	DA-005 (2)	Octubre 2012	2
5	DA-005 (3)	Octubre 2012	2
6	DA-005 (4)	Octubre 2012	2
7	DA-005 (5)	Octubre 2012	2
8	DA-015 (2)	Octubre 2012	2
9	DA-015 (4)	Octubre 2012	2
10	DA-019 (4)	Octubre 2012	2
11	DA-019 (5)	Octubre 2012	2
12	DA-021 (4)	Octubre 2012	2
13	DA-022 (4)	Octubre 2012	2
14	DA-027 (2)	Octubre 2012	2
15	DA-027 (3)	Octubre 2012	2
16	DA-027 (4)	Octubre 2012	2
17	DA-027 (5)	Octubre 2012	2
18	DA-027 (X)	Octubre 2012	2
19	DA-028 (1)	Octubre 2012	1
20	DA-028 (4)	Octubre 2012	2
21	DA-029 (1)	Octubre 2012	1
22	DA-029 (3)	Octubre 2012	2
23	DA-030 (3)	Octubre 2012	2
24	DA-031 (2)	Octubre 2012	2
25	DA-033 (4)	Octubre 2012	2
26	DA-033 (5)	Octubre 2012	1
27	DA-035 (1)	Octubre 2012	1
28	DA-035 (2)	Octubre 2012	1
29	DA-035 (5)	Octubre 2012	2
30	DA-038 (1)	Octubre 2012	1

Nº	Código de cepa	Fecha de preservación	Replicas existentes
31	DA-038 (2)	Octubre 2012	2
32	DA-038 (3)	Octubre 2012	2
33	DA-040 (4)	Octubre 2012	2
34	DA-040 (X)	Octubre 2012	3
35	DA-041 (4)	Octubre 2012	2
36	DA-041 (5)	Octubre 2012	2
37	DA-045 (2)	Octubre 2012	2
38	DA-045 (3)	Octubre 2012	2
39	DA-045 (4)	Octubre 2012	2
40	DA-045 (5)	Octubre 2012	2
41	DA-046 (1)	Octubre 2012	1
42	DA-046 (2)	Octubre 2012	2
43	DA-046 (4)	Octubre 2012	2
44	DA-046 (5)	Octubre 2012	2
45	DA-049 (1)	Octubre 2012	1
46	DA-049 (3)	Octubre 2012	2
47	DA-049 (4)	Octubre 2012	2
48	DA-049 (5)	Octubre 2012	2
49	DA-051 (2)	Octubre 2012	2
50	DA-053 (1)	Octubre 2012	1
51	DA-055 (1)	Octubre 2012	1
52	DA-055 (4)	Octubre 2012	2
53	DA-055 (5)	Octubre 2012	2
54	DA-055 (X)	Octubre 2012	2
55			
56			
57			
58	NO EXISTE INFORMACIÓN DE CALDO		
59	DONDE SE PRESERVARON		
60	~~54 CÓDIGOS~~ 99 VIALES		

Universidad Nacional Autónoma de Honduras
Facultad de Ciencias
Escuela de Microbiología
Maestría en Enfermedades Infecciosas y Zoonoticas III Promoción
Registro de cepario *Escherichia coli*

Realizado por: Dra. Jeniffer Fiallos

Versión 0

Responsable de registro: Jeniffer Fiallos
Identificación de caja: **CGEC-NO E.coli-01-017**
Códigos DA-NO E. coli según registro Abril 2016

Ubicación en laboratorio: _____

Nº	Código de cepa	Fecha de preservación	Replicas existentes
1	DA-057 (1)	Octubre 2012	2
2	DA-057 (2)	Octubre 2012	2
3	DA-063 (X)	Octubre 2012	2
4	DA-064 (1)	Octubre 2012	1
5	DA-073 (2)	Octubre 2012	1
6	DA-073 (2)	Octubre 2012	2
7	DA-073 (4)	Octubre 2012	2
8	DA-078 (3)	Octubre 2012	7
9	DA-078 (4)	Octubre 2012	2
10	DA-078 (5)	Octubre 2012	1
11	DA-082 (2)	Octubre 2012	1
12	DA-082 (3)	Octubre 2012	2
13	DA-082 (5)	Octubre 2012	2
14	DA-087 (4)	Octubre 2012	2
15	DA-087 (5)	Octubre 2012	2
16	DA-088 (1)	Octubre 2012	1
17	DA-088 (2)	Octubre 2012	1
18	DA-088 (3)	Octubre 2012	1
19	DA-088 (5)	Octubre 2012	2
20			
21			
22			
23			
24			
25			
26			
27			
28			
29			
30			

Nº	Código de cepa	Fecha de preservación	Replicas existentes
31			
32			
33			
34			
35			
36			
37			
38			
39			
40			
41			
42			
43			
44			
45			
46			
47			
48			
49			
50			
51			
52			
53			
54			
55			
56			
57			
58	NO EXISTE INFORMACIÓN DE CALDO DONDE SE PRESERVARON		
59	19 CÓDIGOS		
60	36 VIALES		

Universidad Nacional Autónoma de Honduras
Facultad de Ciencias
Escuela de Microbiología
Maestría en Enfermedades Infecciosas y Zoonoticas III Promoción
Registro de cepario *Escherichia coli*

Realizado por: Dra. Jeniffer Fiallos

Versión 0

Responsable de registro: Jeniffer Fiallos
Identificación de caja: **CGEC-Rf-02-018**

Ubicación en laboratorio: _____

Nº	Código de cepa	Fecha de preservación	Replicas existentes
1	E. coli 10407	15/4/15	5
2	E. coli 10407	27/4/17	3
3	E. coli 2348/69	27/4/17	7
4	E. coli 2348/69	28/4/16	2
5	E. coli 2348/69	15/4/15	6
6	EDL-933	27/4/17	3
7	EDL-933	28/4/16	2
8	EDL-933	15/4/15	6
9	E. coli Lt-83	27/4/17	7
10	ETEC Lt-83	28/4/16	3
11	E. coli ATCC 43889	27/4/17	3
12	E. coli ATCC 43890	27/4/17	3
13	E. coli ATCC 35401	27/4/17	3
14	E. coli Stp-59	27/4/17	3
15	E. coli Lt-5	27/4/17	3
16	E. coli Lt-Sth 71	27/4/17	7
17	E. coli EPEC 111	27/4/17	7
18	E. coli EPEC 128	27/4/17	7
19			
20			
21			
22			
23			
24			
25			
26			
27			
28			
29			
30			

Nº	Código de cepa	Fecha de preservación	Replicas existentes
31			
32			
33			
34			
35			
36			
37			
38			
39			
40			
41			
42			
43			
44			
45			
46			
47			
48			
49			
50			
51			
52			
53			
54			
55			
56			
57			
58	NO EXISTE INFORMACIÓN DE CALDO DONDE SE PRESERVARON 12 CÓDIGOS 80 VIALES		
59			
60			

Universidad Nacional Autónoma de Honduras
Facultad de Ciencias
Escuela de Microbiología
Maestría en Enfermedades Infecciosas y Zoonoticas III Promoción
Registro de ceparío *Escherichia coli*

Realizado por: Dra. Jeniffer Fiallos

Versión 0

Responsable de registro: Jeniffer Fiallos
Identificación de caja: **CGEC-Rf-03-019**
Ceparío *E. coli*
Fecha 13/3/14 Conservadas en TSB y glicerol al 20%
Ubicación en laboratorio: _____

Nº	Código de cepa	Fecha de preservación	Replicas existentes
1	ATCC #1 A	13/3/14	
2	ATCC #1 B		
3	ATCC #1 C		
4	ATCC #1 D		2
5	ATCC #2 A		
6	ATCC #2 B		
7	ATCC #2 C		
8	ATCC #2 D		
9	ATCC #3 A		
10	ATCC #3 B		
11	ATCC #3 C		
12	ATCC #3 D		
13	ATCC #4 A		
14	ATCC #4 B		
15	ATCC #4 C		
16	ATCC #4 D		
17	ATCC #5 A		
18	ATCC #5 B		
19	ATCC #5 C		
20	ATCC #5 D		
21	ATCC #6 A		
22	ATCC #6 B		
23	ATCC #6 C		
24	ATCC #6 D		
25	ATCC #7 A		
26	ATCC #7 B		
27	ATCC #7 C		
28	ATCC #7 D		
29	ATCC #8 A		
30	ATCC #8 B		

Nº	Código de cepa	Fecha de preservación	Replicas existentes
31	ATCC #8 C		
32	ATCC #8 D		
33	ATCC #9 A		
34	ATCC #9 B		
35	ATCC #9 C		
36	ATCC #9 D		
37	ATCC #10 A		
38	ATCC #10 B		
39	ATCC #10 C		
40	ATCC #10 D		
41	ATCC #11 A		
42	ATCC #11 B		
43	ATCC #11 C		
44	ATCC #11 D		
45	ATCC #12 A		
46	ATCC #12 B		
47	ATCC #12 C		
48	ATCC #12 D		
49	ATCC #13 A		
50	ATCC #13 B		
51	ATCC #13 C		
52	ATCC #13 D		
53			
54			
55			
56			
57		No se sabe el medio en que se conservaron estas cepas ni a que código corresponde cada numero, ni su fecha.	
58			
59			
60		13 ~~CÓDIGOS~~ 52 VIALES	

Universidad Nacional Autónoma de Honduras
Facultad de Ciencias
Escuela de Microbiología
Maestría en Enfermedades Infecciosas y Zoonoticas III Promoción
Registro de cepario *Escherichia coli*

Realizado por: Dra. Jeniffer Fiallos

Versión 0

Responsable de registro: Jeniffer Fiallos
Identificación de caja: **CGEC-E. coli-01-020**
Cepas de origen de carne molida y lechuga.
Investigación Mario M. y Argelia 2016

Ubicación en laboratorio: _____

Nº	Código de cepa	Fecha de preservación	Replicas existentes
1	*E. coli* # 1	21/9/16	4
2	*E. coli* # 2	21/9/16	4
3	*E. coli* # 3	21/9/16	4
4	*E. coli* # 4	21/9/16	5
5	*E. coli* # 5	21/9/16	5
6	*E. coli* # 6	21/9/16	4
7	*E. coli* # 7	21/9/16	4
8	*E. coli* # 8	21/9/16	4
9	*E. coli* # 9	21/9/16	4
10	*E. coli* # 10	21/9/16	3
11	*E. coli* # 11	21/9/16	3
12	*E. coli* # 12	21/9/16	3
13	*E. coli* # 13	21/9/16	3
14	*E. coli* # 14	21/9/16	2
15	*E. coli* # 15	21/9/16	2
16	*E. coli* # 16	21/9/16	2
17	*E. coli* # 17	21/9/16	1
18	*E. coli* # 18	21/9/16	1
19	*E. coli* # 19	21/9/16	2
20			
21			
22			
23			
24			
25			
26			
27			
28			
29			
30			

Nº	Código de cepa	Fecha de preservación	Replicas existentes
31			
32			
33			
34			
35			
36			
37			
38			
39			
40			
41			
42			
43			
44			
45			
46			
47			
48			
49			
50			
51			
52			
53			
54			
55			
56			
57			
58			
59			
60			

No se sabe el medio en que se conservaron estas cepas y los registros de origen estan en los formatos por cada cepa.
19 CÓDIGOS
60 VIALES

Universidad Nacional Autónoma de Honduras
Facultad de Ciencias
Escuela de Microbiología
Maestría en Enfermedades Infecciosas y Zoonoticas III Promoción
Registro de cepario *Escherichia coli*

Pagina _____

Realizado por: Dra. Jeniffer Fiallos

Versión 0

Responsable de registro:_____
Identificación de caja: **CGEC-Rf-04-020**
Replicas ATCC-Cepas control ATCC

Ubicación en laboratorio: _____

Nº	Código de cepa	Fecha de preservación	Replicas existentes
1	*E. coli* ATCC 23922	4/2/16	4
2	*E. coli* ATCC 23922	10/11/15	24
3	*E. coli* ATCC 23922	18/12/14	1
4	*E. coli* ATCC 23922	24/7/14	1
5	*E. coli* ATCC 23922	4/11/15	17
6	*E. coli* ATCC 23922	16/2/16	2
7	EDL-EHEC- 933	11/5/17	11
8			
9			
10			
11			
12			
13			
14			
15			
16			
17			
18			
19			
20			
21			
22			
23			
24			
25			
26			
27			
28			
29			
30			

Nº	Código de cepa	Fecha de preservación	Replicas existentes
31			
32			
33			
34			
35			
36			
37			
38			
39			
40			
41			
42			
43			
44			
45			
46			
47			
48			
49			
50			
51			
52			
53			
54			
55			
56			
57			
58			
59			
60			

Universidad Nacional Autónoma de Honduras
Facultad de Ciencias
Escuela de Microbiología
Maestría en Enfermedades Infecciosas y Zoonoticas III Promoción
Registro de cepario *Escherichia coli*

Pagina _____

Realizado por: Dra. Jeniffer Fiallos

Versión 0

Responsable de registro:_____
Identificación de caja: **CGEC-IL-03-22**
Replicas de cepas de queso/IL BDMT
Analista Kellyn Escobar 2016

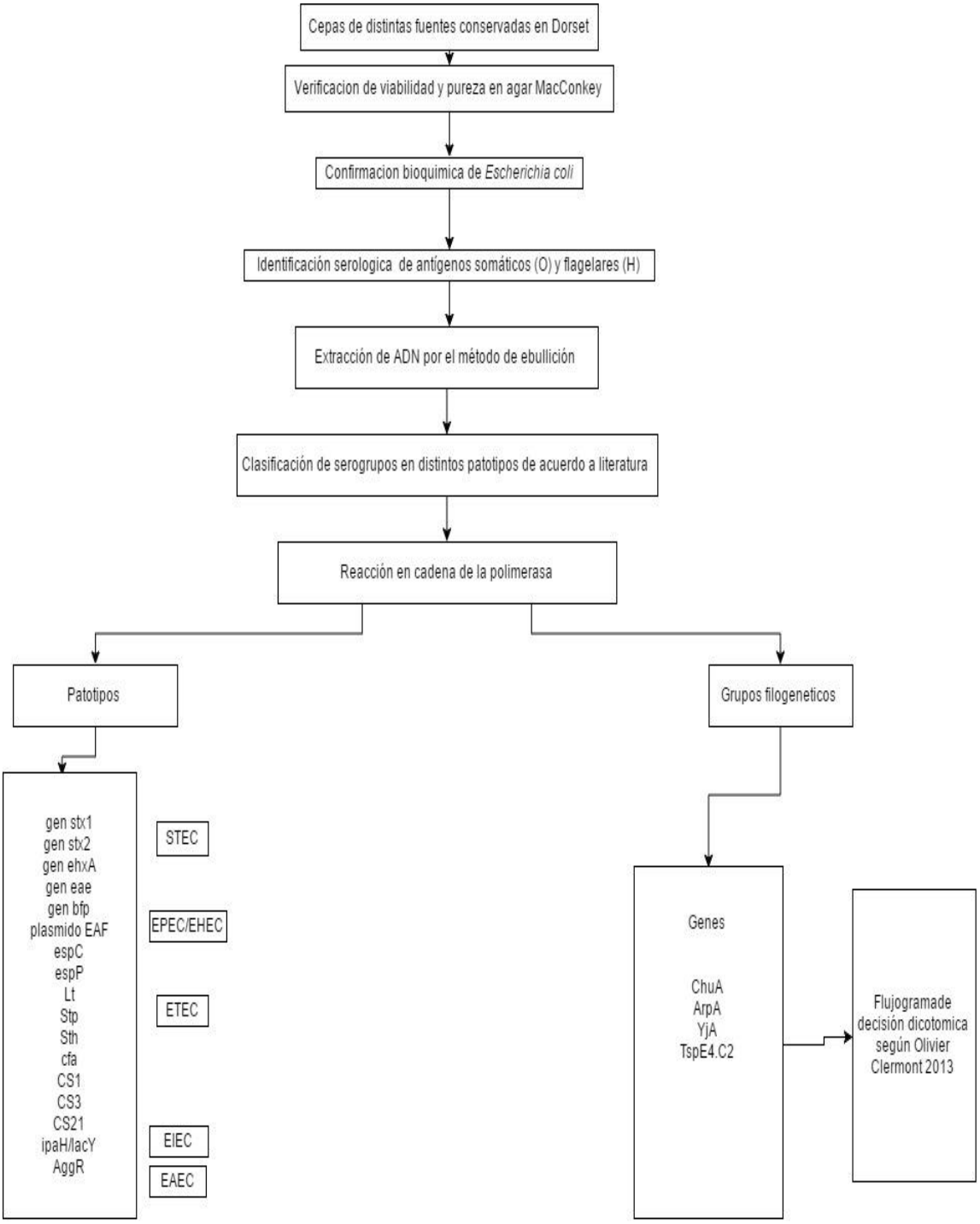
Ubicación en laboratorio: _____

Nº	Código de cepa	Fecha de preservación	Replicas existentes
1	IL-001-C40157NH7	NOV 2015	1
2	IL-001 *E. coli*	4/2/16	2
3	IL-015b *E. coli*	4/2/16	2
4	IL-019 BDMT	NOV 2015	1
5	IL-019 *E. coli*	4/2/16	2
6	IL-019a *E. coli*	4/2/16	2
7	IL-019b *E. coli*	4/2/16	2
8	IL-021 BDMT	NOV 2015	1
9	IL-021 *E. coli*	4/2/16	2
10	IL-024 BDMT	NOV 2015	1
11	IL-024 *E. coli*	4/2/16	2
12	IL-029 BDMT	NOV 2015	1
13	IL-029 *E. coli*	4/2/16	2
14	IL-030 BDMT	NOV 2015	1
15	IL-030 *E. coli*	4/2/16	2
16	IL-032 BDMT	NOV 2015	1
17	IL-032 *E. coli*	4/2/16	2
18	IL-036 BDMT	NOV 2015	1
19	IL-036 *E. coli*	4/2/16	2
20	IL-046 BDMT	NOV 2015	1
21	IL-046 *E. coli*	4/2/16	2
22	IL-047 BDMT	NOV 2015	1
23	IL-047 *E. coli*	4/2/16	2
24	IL-048 BDMT	NOV 2015	1
25	IL-048 *E. coli*	4/2/16	2
26	IL-053 BDMT	NOV 2015	1
27	IL-053 *E. coli*	4/2/16	2
28	IL-055 BDMT*i*	NOV 2015	1
29	IL-055 *E. coli*	4/2/16	2
30	IL-057 BDMT	NOV 2015	1

Nº	Código de cepa	Fecha de preservación	Replicas existentes
31	IL-001 *E. coli*	4/2/16	2
32			
33			
34			
35			
36			
37			
38			
39			
40			
41			
42			
43			
44			
45			
46			
47			
48			
49			
50			
51			
52			
53			
54			
55			
56			
57			
58			
59			
60			

Conservados en Infusión cerebro corazón
15 CODIGOS
48 VIALES

Anexo 4. Flujograma de trabajo



Anexo 5. Códigos de cepas enviadas a UNAM

Universidad Nacional Autónoma de Honduras
Facultad de Ciencias
Escuela de Microbiología
Maestría en Enfermedades Infecciosas y Zoonoticas III Promoción
Registro de cepario *Escherichia coli*
Codigos enviados a UNAM

1.- Mx 1 44ºC
2.- Cepa Mx 3
3.- Cepa Mx 4
4.- Cepa Mx 5
5.- E. coli #1 vial 1
6.- E. coli #4
7.- E. coli #5
8.- Cepa 59 A
9.- Cepa 62 A
10.- Cepa 64 A
11.- QM-001
12.- QM-002
13.- QM-003
14.- QM-004
15.- QM-005
16.- QM-006
17.- QM-007
18.- QM-008
19.- QM-009
20.- QM-010
21.- QM-011
22.- QM-012
23.- QM-013
24.- QM-014
25.- QM-015
26.- QM-016
27.- QM-018
28.- QM-019
29.- QM-020
30.- QM-021
31.- QM-022
32.- QM-023
33.- QM-026
34.- QM-027
35.- L-02
36.- L-03
37.- L-04
38.- L-05 A 37ºC
39.- L-05 B 44.5ºC
40.- L-07 A 37ºC
41.- L-07 B 44.5ºC
42.- L-13 A 37ºC
43.- L-13 B 44.5ºC
44.- L-15 A 37ºC
45.- L-15 B 44.5ºC
46.- L-16 A 37ºC
47.- L-16 B 44.5ºC
48.- L-17 A 37ºC
49.- L-19 A 37ºC
50.- L19 B 44.5ºC
51.- CM-001 37ºC
52.- CM-001 44ºC
53.- CM-002 44.5ºC
54.- CM-004 37ºC
55.- CM-004 44.5ºC
56.- CM-005 37ºC
57.- CM-005 44.5ºC
58.- CM-008 44.5ºC
59.- CM-009 44.5ºC
60.- CA-02
61.- CA-03
62.- CA-04
63.- CA-07
64.- CA-09
65.- CA-12
66.- CA-13
67.- CA-16
68.- CA-17
69.- CA-18
70.- CA-19
71.- CA-22
72.- CA-23
73.- CA-24
74.- CA-25
75.- CA-26
76.- CA-27
77.- Ct-01(3)
78.- Ct-01(4)
79.- Ct-01(5)
80.- Ct-02(1)
81.- Ct-02(4)
82.- Ct-02(5)
83.- Ct-03(2)
84.- Ct-03(3)
85.- Ct-03(4)
86.- Ct-04(1)
87.- Ct-04(2)
88.- Ct-04(3)
89.- Ct-04(4)
90.- Ct-04(5)
91.- IL-001
92.- IL-003
93.- IL-005
94.- IL-006
95.- IL-007
96.- IL-009
97.- IL-011
98.- IL-012
99.- IL-013
100.- IL-014
101.- IL-015
102.- IL-016
103.- IL-017
104.- IL-018
105.- IL-019
106.- IL-020
107.- IL-021
108.- IL-023
109.- IL-024
110.- IL-027
111.- IL-028
112.- IL-029
113.- IL-030
114.- IL-032
115.- IL-036
116.- IL-039
117.- IL-043
118.- IL-045
119.- IL-046
120.- IL-047
121.- IL-048
122.- IL-049
123.- IL-050
124.- IL-051
125.- IL-053
126.- IL-054
127.- IL-055
128.- IL-056
129.- IL-057
130.- IL-058
131.- IL-059
132.- DA-001
133.- DA-002
134.- DA-003
135.- DA-004
136.- DA-005
137.- DA-006
138.- DA-007
139.- DA-009
140.- DA-010
141.- DA-015
142.- DA-019
143.- DA-021
144.- DA-022
145.- DA-025
146.- DA-027
147.- DA-028
148.- DA-029
149.- DA-030
150.- DA-031
151.- DA-033
152.- DA-035
153.- DA-038
154.- DA-039
155.- DA-040
156.- DA-041
157.- DA-042
158.- DA-043
159.- DA-044
160.- DA-045
161.- DA-046
162.- DA-047
163.- DA-048
164.- DA-051
165.- DA-053
166.- DA-054
167.- DA-055
168.- DA-056
169.- DA-058
170.- DA-059
171.- DA-060
172.- DA-061
173.- DA-062
174.- DA-064
175.- DA-065
176.- DA-066
177.- DA-069
178.- DA-071
179.- DA-072
180.- DA-073
181.- DA-075
182.- DA-076
183.- DA-077
184.- DA-078
185.- DA-079
186.- DA-082
187.- DA-084
188.- DA-085
189.- DA-086
190.- DA-087
191.- DA-088
192.- DA-089
193.- DA-090
194.- DA-091
195.- DA-092
196.- DA-093
197.- DA-094
198.- DA-098
199.- DA-129
200.- ----------

NOTAS:
CÓDIGOS DE 1-10: ORIGEN DE AGUA
CÓDIGOS QM #11-34: ORIGEN DE QUESOS
CÓDIGOS L #35-50: ORIGEN LECHUGAS
CÓDIGOS CM #51-59-ORIGEN CARNE MOLIDA
CÓDIGOS CA #60-76- CEPAS AMBIENTALES
CÓDIGOS Ct # 77-90- CONTROLES DA
CÓDIGOS IL #91-131- ORIGEN DE QUESOS
CÓDIGOS DA #132-199-ORIGEN DIARREAS (menores de 3 años)

Elaboración de registro 5 de Abril 2016

Anexo 6. Procedimiento Serología

- Antígeno somático (O)

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

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

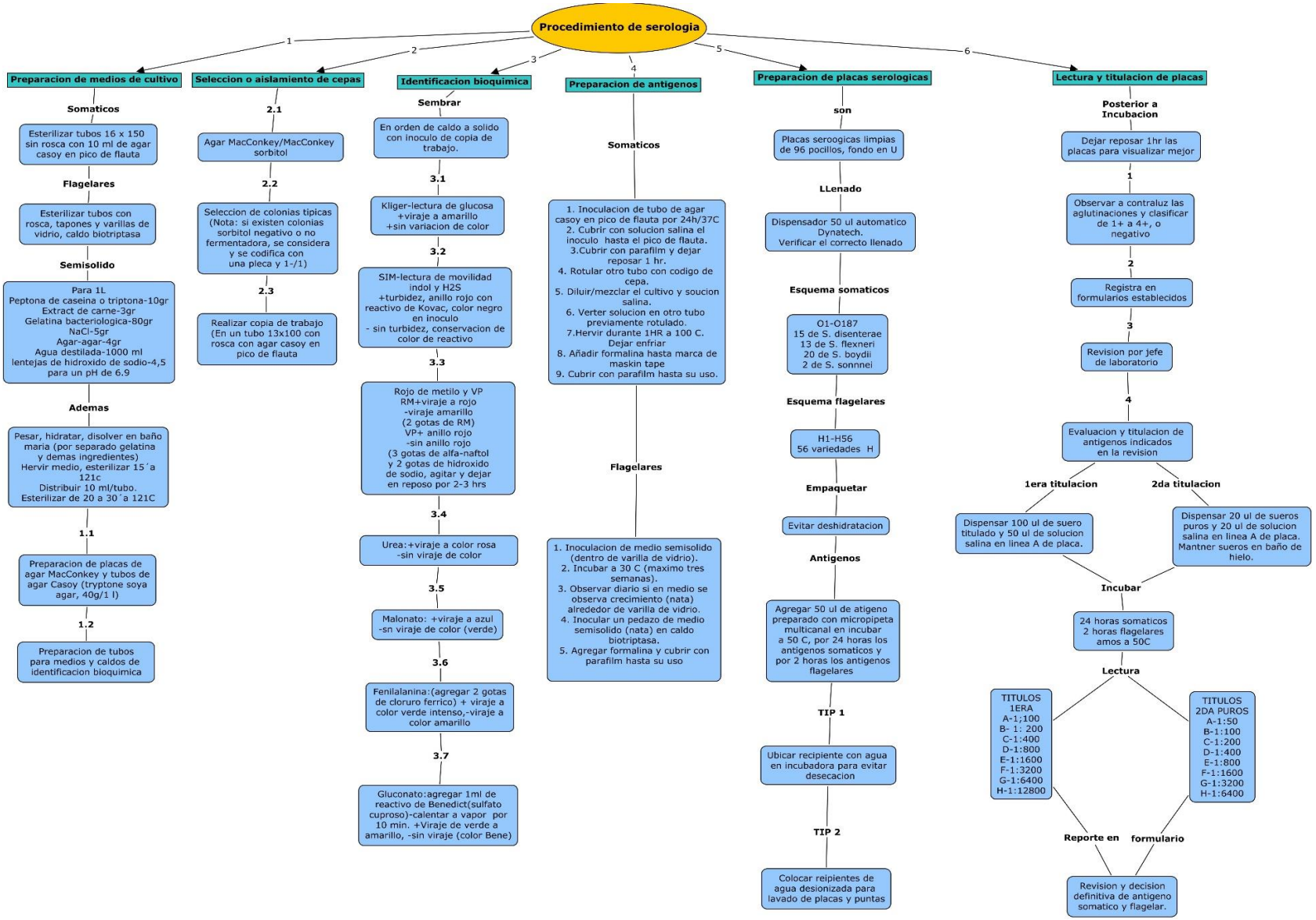
  Se procedió a la lectura y registro de aglutinación cualitativa de cada una de las tres placas por cepa. Una vez registradas las aglutinaciones se procedió a realizar diluciones seriada al doble iniciando con una dilución de 1:100 y finaliza en 1:2800. Al agregar el antígeno se incubaron de nuevo a 50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

- Antígeno flagelar (H)

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

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

  Al terminar la incubación, se registraron los títulos hasta los cuales hubo reacción positiva con el antígeno flagelar de las cepas, para establecer el serotipo el titulo de los sueros anti H con su antígeno homologo se comparó con el título del suero determinado con el antígeno H de las cepas. Cuando los anti-sueros mostraron títulos semejantes, se realizó el mismo procedimiento de diluciones seriadas al doble previamente descritos con diluciones desde 1:50 hasta 1:6400, si el anti-suero presento un título similar al título homologo fue el que se consideró para determinar el antígeno H de la cepa.

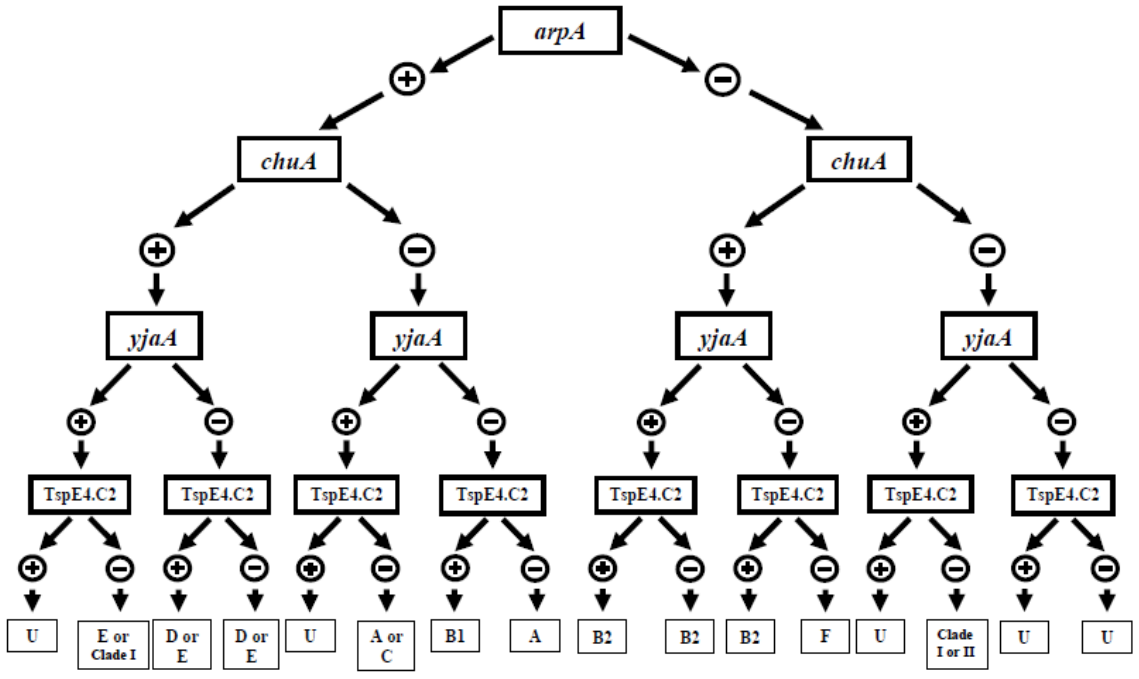

Procedimiento de serologia
1
2
3
4
5
6
Preparacion de medios de cultivo
Somaticos
Esterilizar tubos 16 x 150 sin rosca con 10 ml de agar casoy en pico de flauta
Flagelares
Esterilizar tubos con rosca, tapones y varillas de vidrio, caldo biotriptasa
Semisolido
Para 1L
Peptona de caseina o triptona-10gr
Extract de carne-3gr
Gelatina bacteriologica-80gr
NaCl-5gr
Agar-agar-4gr
Agua destilada-1000 ml
lentejas de hidroxido de sodio-4,5
para un pH de 6.9
Ademas
Pesar, hidratar, disolver en baño maria (por separado gelatina y demas ingredientes)
Hervir medio, esterilizar 15´a 121c
Distribuir 10 ml/tubo.
Esterilizar de 20 a 30´a 121C
1.1
Preparacion de placas de agar MacConkey y tubos de agar Casoy (tryptone soya agar, 40g/1 l)
1.2
Preparacion de tubos para medios y caldos de identificacion bioquimica
Seleccion o aislamiento de cepas
2.1
Agar MacConkey/MacConkey sorbitol
2.2
Seleccion de colonias tipicas (Nota: si existen colonias sorbitol negativo o no fermentadora, se considera y se codifica con una pleca y 1-/1)
2.3
Realizar copia de trabajo (En un tubo 13x100 con rosca con agar casoy en pico de flauta
Identificacion bioquimica
Sembrar
En orden de caldo a solido con inoculo de copia de trabajo.
3.1
Kliger-lectura de glucosa +viraje a amarillo +sin variacion de color
3.2
SIM-lectura de movilidad indol y H2S +turbidez, anillo rojo con reactivo de Kovac, color negro en inoculo - sin turbidez, conservacion de color de reactivo
3.3
Rojo de metilo y VP RM+viraje a rojo -viraje amarillo (2 gotas de RM) VP+ anillo rojo -sin anillo rojo (3 gotas de alfa-naftol y 2 gotas de hidroxido de sodio, agitar y dejar en reposo por 2-3 hrs
3.4
Urea:+viraje a color rosa -sin viraje de color
3.5
Malonato: +viraje a azul -sn viraje de color (verde)
3.6
Fenilalanina:(agregar 2 gotas de cloruro ferrico) + viraje a color verde intenso,-viraje a color amarillo
3.7
Gluconato:agregar 1ml de reactivo de Benedict(sulfato cuproso)-calentar a vapor por 10 min. +Viraje de verde a amarillo, -sin viraje (color Bene)
Preparacion de antigenos
Somaticos
1. Inoculacion de tubo de agar casoy en pico de flauta por 24h/37C
2. Cubrir con solucion salina el inoculo hasta el pico de flauta.
3.Cubrir con parafilm y dejar reposar 1 hr.
4. Rotular otro tubo con codigo de cepa.
5. Diluir/mezclar el cultivo y soucion salina.
6. Verter solucion en otro tubo previamente rotulado.
7.Hervir durante 1HR a 100 C. Dejar enfriar
8. Añadir formalina hasta marca de maskin tape
9. Cubrir con parafilm hasta su uso.
Flagelares
1. Inoculacion de medio semisolido (dentro de varilla de vidrio).
2. Incubar a 30 C (maximo tres semanas).
3. Observar diario si en medio se observa crecimiento (nata) alrededor de varilla de vidrio.
4. Inocular un pedazo de medio semisolido (nata) en caldo biotriptasa.
5. Agregar formalina y cubrir con parafilm hasta su uso
Preparacion de placas serologicas
son
Placas seroogicas limpias de 96 pocillos, fondo en U
LLenado
Dispensador 50 ul automatico Dynatech.
Verificar el correcto llenado
Esquema somaticos
O1-O187
15 de S. disenterae
13 de S. flexneri
20 de S. boydii
2 de S. sonnnei
Esquema flagelares
H1-H56
56 variedades H
Empaquetar
Evitar deshidratacion
Antigenos
Agregar 50 ul de atigeno preparado con micropipeta multicanal en incubar a 50 C, por 24 horas los antigenos somaticos y por 2 horas los antigenos flagelares
TIP 1
Ubicar recipiente con agua en incubadora para evitar desecacion
TIP 2
Colocar reipientes de agua desionizada para lavado de placas y puntas
Lectura y titulacion de placas
Posterior a Incubacion
Dejar reposar 1hr las placas para visualizar mejor
1
Observar a contraluz las aglutinaciones y clasificar de 1+ a 4+, o negativo
2
Registra en formularios establecidos
3
Revision por jefe de laboratorio
4
Evaluacion y titulacion de antigenos indicados en la revision
1era titulacion
2da titulacion
Dispensar 100 ul de suero titulado y 50 ul de solucion salina en linea A de placa.
Dispensar 20 ul de sueros puros y 20 ul de solucion salina en linea A de placa. Mantner sueros en baño de hielo.
Incubar
24 horas somaticos
2 horas flagelares
amos a 50C
Lectura
TITULOS 1ERA
A-1;100
B- 1: 200
C-1:400
D-1:800
E-1:1600
F-1:3200
G-1:6400
H-1:12800
TITULOS 2DA PUROS
A-1:50
B-1:100
C-1:200
D-1:400
E-1:800
F-1:1600
G-1:3200
H-1:6400
Reporte en formulario
Revision y decision definitiva de antigeno somatico y flagelar.

Anexo 7. Protocolo de extracción de ADN/Método de ebullición

- Técnica Extracción de ADN (Hervido)-29 JULIO 2010. UNAM

I. Crecer el cultivo en caldo LB (2 mL) aunque con 1 mL es suficiente.
II. Pasar 1 mL de caldo a un tubo eppendorf (1.5 mL)
III. Centrifugar a 13rpm /5 min
IV. Decantar el sobrenadante y escurrir bien sobre un papel secante o retirar con micro pipeta.
V. Adicionar 200 µL de agua ultra pura.
VI. Remover y re suspender muy bien el pellet con un rascado sobre micro placa y después en vórtex. Tapar bien los tubos.
VII. Hervir durante 10 minutos.
VIII. Pasar rápidamente a hielo por unos 5 minutos.
IX. Volver a rascar sobre la micro placa y vórtex, poner en hielo y centrifugar a 13rpm/10 minutos.
X. Pasar 100 ul del sobrenadante con cuidado a otro tubo nuevo, refrigerar para un uso inmediato o congelar para uso futuro.
XI. Rotular con ADN, CÓDIGO y fecha de extracción.

Anexo 8. Flujograma de decisión dicotómica Olivier Clermont



***U**= se refiere a grupo desconocido, no se puede diferenciar mediante la técnica cuádruplex.*

Anexo 9. Protocolos PCR UNAM

Universidad Nacional Autónoma de México **Facultad de ciencias Medicas** **Departamento de Salud Publica** **Laboratorio de Referencia de Serología**	
PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTÁNDAR **PARA PCR STEC (stx1, vtx1)**	**Página** 1/1
Elaborado por: Biol. Delia Licona Supervisado por: Fecha: __/__/__ Firma_____	Aprobado por: PhD. Armando Navarro Fecha: __/__/__ Firma_____

Objetivo

Estandarizar técnica múltiplex para categorizar cepas de *E. coli* en patotipo diarreogénico y determinar su frecuencia.

Alcance

Esta técnica será de ayuda para el mejor entendimiento de los patotipos y su distribución en el ambiente de patotipos de *E. coli*.

Primers

Los marcadores de virulencia a utilizar son

Gen	Secuencia 5´a 3´	Peso molecular (pb)	Cepa de referencia
Vtx-det-F1	GTACGGGGATGCAGATAAATCGC	209	87657 108287
Vtx1-det-R1	AGCAGTCATTACATAAGAACGYCCACT		

Contenido de reacción

Elemento	Descripción	()final	µl/tubo	# tubos	µl total
Buffer	**10X**	**1X**	1.5µL		
Dntp´s	**2.5mM**	**0.2mM**	0.6µL		
Primer 1	**Vtx1 frw 100µM**	**1.2 µ M**	0.6µL		
Primer 2	**Vtx 2 100µ M**	**1.2 µ M**	0.6µL		
Primer 3					
Primer 4					
$MgCl_2$	**25mM**	**1.8 µ M**	0.45µL		
H_2O	**---**	**---**	10.47µL		
Otro					
Otro					
Taq Polimerasa	**5u/µl**		0.18µL		
Vol. Mezcla					
Vol. Muestra			0.6µL		
Vol. Total			15µL		

Programa de Termociclaje

Etapa	Temperatura(*C)	Tiempo	Ciclos	Programa
Desnaturalización inicial	95°C	5 minutos	35 ciclos	
Desnaturalización /extensión	94°C	50 segundos		
Hibridación	56°C	40segundos		
Elongación	72°C	60 segundos		
Extensión final	72°C	5 minutos		
Temperatura final	4°C	œ		

Electroforesis

Los productos de PCR se visualizarán en geles de agarosa al 1.5% en buffer y tinción con red gel y se identificarán los amplicones basado peso en pb del producto amplificado. Se utiliza un marcador de PM de 100 pb.

Referencia Bibliográfica

- ***[Scheutz, 2012]***

Universidad Nacional Autónoma de México Facultad de ciencias Medicas Departamento de Salud Publica Laboratorio de Referencia de Serología	
PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTÁNDAR PARA PCR STEC (stx2, vtx2)	**Página** 1/1

Elaborado por: Supervisado por: Fecha: __/__/__ Firma_____	Aprobado por: Fecha: __/__/__ Firma_____

Objetivo

Estandarizar técnica múltiplex para categorizar cepas de *E. coli* en patotipo diarreogénico y determinar su frecuencia.

Alcance

Esta técnica será de ayuda para el mejor entendimiento de los patotipos y su distribución en el ambiente de patotipos de *E. coli*.

Primers

Los marcadores de virulencia a utilizar son

Gen	Secuencia 5´a 3´	Peso molecular (pb)	Cepa de referencia
F4	GGCACTGTCTGAAACTGCTCCTGT	625-627	E32511
R1	ATTAAACTGCCACTTCAGCAAATCC		
F4.f	CGCTGTCTGAGGCATCTCCGCT		
R1-e/f	TAAACTTCACCTGGGAAAGCC		

Contenido de reacción

Elemento	Descripción	()final	µl/tubo	# tubos	µl total
Buffer	10X	1X	1.5µL		
Dntp´s	2.5mM	0.2mM	1.5µL		
Primer 1	F4 100µM	1.2 µ M	0.6µL		
Primer 2	R1 100µ M	1.2 µ M	0.6µL		
Primer 3	F4.F 100 µ M	0.4 µ M	0.6µL		
Primer 4	R1-e/f 100 µ M	0.4 µ M	0.6µL		
$MgCl_2$	25mM	1.8 µ M	0.9µL		
H_2O	---	---	7.92µL		
Otro					
Otro					
Taq Polimerasa	5u/µl		0.18µL		
Vol. Mezcla					
Vol. Muestra			0.6µL		
Vol. Total			15µL		

Programa de Termociclaje

Etapa	Temperatura(*C)	Tiempo	Ciclos	Programa
Desnaturalización inicial	95°C	5 minutos	35 ciclos	
Desnaturalización /extensión	94°C	50 segundos		
Hibridación	56°C	40 segundos		
Elongación	72°C	60 segundos		
Extensión final	72°C	5 minutos		
Temperatura final	4°C	œ		

Electroforesis

Los productos de PCR se visualizarán en geles de agarosa al 1% en buffer y tinción con red gel y se identificarán los amplicones basado peso en pb del producto amplificado. Se utiliza un marcador de PM de 100 pb.

Referencia Bibliográfica

- *[Scheutz, 2012]*

Universidad Nacional Autónoma de México Facultad de ciencias Medicas Departamento de Salud Publica Laboratorio de Referencia de Serología	
PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTÁNDAR PARA PCR EPEC *(bfp)*	**Página** 1/1

Elaborado por: Supervisado por: Fecha: __/__/__ Firma_____	Aprobado por: Fecha: __/__/__ Firma_____

Objetivo

Estandarizar técnica múltiplex para categorizar cepas de *E. coli* en patotipo diarreogénico y determinar su frecuencia.

Alcance

Esta técnica será de ayuda para el mejor entendimiento de los patotipos y su distribución en el ambiente de patotipos de *E. coli*.

Primers

Los marcadores de virulencia a utilizar son

Gen	Secuencia 5´a 3´	Peso molecular (pb)	Cepa de referencia
bfp-F	AATGGTGCTTGCGCTTGCTGC	326	87237 E2348
bfp-R	GCCGCTTTATCCAACCTGGTA		

Contenido de reacción

Elemento	Descripción	()final	µl/tubo	# tubos	µl total
Buffer	10X	1X	1.5µL		
Dntp´s	2.5mM	0.2mM	0.3µL		
Primer 1	bfp frw 100µM	1.2 µ M	0.6µL		
Primer 2	bfp rev 100µ M	1.2 µ M	0.6µL		
Primer 3		0.4 µ M			
Primer 4		0.4 µ M			
$MgCl_2$	25mM	1.8 µ M	0.9µL		
H_2O	---	---	10.41µL		
Otro					
Otro					
Taq Polimerasa	5u/µl		0.09µL		
Vol. Mezcla					
Vol. Muestra			0.6µL		
Vol. Total			15µL		

Programa de Termociclaje

Etapa	Temperatura(*C)	Tiempo	Ciclos	Programa
Desnaturalización inicial	95°C	5 minutos	30	
Desnaturalización /extensión	72°C	2 minutos		
Hibridación	96°C	30 segundos		
Elongación	56°C	60 segundos		
Extensión final	72°C	8 minutos		
Temperatura final	4°C	Œ		

Electroforesis

Los productos de PCR se visualizarán en geles de agarosa al 1.5% en buffer y tinción con red gel y se identificarán los amplicones basado peso en pb del producto amplificado. Se utiliza un marcador de PM de 100 pb.

Referencia Bibliográfica

- *[Gunzburg, 1995]*

Universidad Nacional Autónoma de México Facultad de ciencias Medicas Departamento de Salud Publica Laboratorio de Referencia de Serología	
PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTÁNDAR PARA PCR EPEC (eae)	**Página** 1/1

Elaborado por: Supervisado por: Fecha: __/__/__ Firma_____	Aprobado por: Fecha: __/__/__ Firma_____

Objetivo

Estandarizar técnica múltiplex para categorizar cepas de *E. coli* en patotipo diarreogénico y determinar su frecuencia.

Alcance

Esta técnica será de ayuda para el mejor entendimiento de los patotipos y su distribución en el ambiente de patotipos de *E. coli*.

Primers

Los marcadores de virulencia a utilizar son

Gen	Secuencia 5´a 3´	Peso molecular (pb)	Cepa de referencia
SK1-F	CCCGAATTCGGCACSAGCATAAGC	864	87237 108287
SK2-R	CCCGGATCCGTCTGCCCAGTATTC		

Contenido de reacción

Elemento	Descripción	()final	µl/tubo	# tubos	µl total
Buffer	10X	1X	1.5µL		
Dntp´s	2.5mM	0.2mM	1.5µL		
Primer 1	SK1 frw 100µM	1.2 µ M	0.6µL		
Primer 2	SK 2rev 100µ M	1.2 µ M	0.6µL		
Primer 3		0.4 µ M			
Primer 4		0.4 µ M			
$MgCl_2$	25mM	1.8 µ M	0.9µL		
H_2O	---	---	9.21µL		
Otro					
Otro					
Taq Polimerasa	5u/µl		0.09µL		
Vol. Mezcla			0.6µL		
Vol. Muestra					
Vol. Total			15µL		

Programa de Termociclaje

Etapa	Temperatura(*C)	Tiempo	Ciclos	Programa
Desnaturalización inicial	94°C	5 minutos	30	
Desnaturalización /extensión	94°C	30 segundos		
Hibridación	55°C	60 segundos		
Elongación	72°C	2 minutos		
Extensión final	72°C	5 minutos		
Temperatura final	4°C	œ		

Electroforesis

Los productos de PCR se visualizarán en geles de agarosa al 1.2% en buffer y tinción con red gel y se identificarán los amplicones basado peso en pb del producto amplificado. Se utiliza un marcador de PM de 100 pb.

Referencia Bibliográfica

- *[Schmidt, 1994)*

Universidad Nacional Autónoma de México Facultad de ciencias Medicas Departamento de Salud Publica Laboratorio de Referencia de Serología	
PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTÁNDAR PARA PCR EPEC (eaf)	**Página** 1/1

Elaborado por: Supervisado por: Fecha: __/__/__ Firma_____	Aprobado por: Fecha: __/__/__ Firma_____

Objetivo

Estandarizar técnica múltiplex para categorizar cepas de *E. coli* en patotipo diarreogénico y determinar su frecuencia.

Alcance

Esta técnica será de ayuda para el mejor entendimiento de los patotipos y su distribución en el ambiente de patotipos de *E. coli*.

Primers

Los marcadores de virulencia a utilizar son

Gen	Secuencia 5´a 3´	Peso molecular (pb)	Cepa de referencia
EAF-F	CAGGGTAAAAGAAAGATGATAA	397	87237 E2348
EAF-R	TATGGGGACCATGTATTATCA		

Contenido de reacción

Elemento	Descripción	()final	µl/tubo	# tubos	µl total
Buffer	10X	1X	1.5µL		
Dntp´s	2.5mM	0.2mM	0.6µL		
Primer 1	eaf frw 100µM	1.2 µ M	0.3µL		
Primer 2	eaf rev 100µ M	1.2 µ M	0.3µL		
Primer 3					
Primer 4					
$MgCl_2$	25mM	1.8 µ M	0.9µL		
H_2O	---	---	10.71µL		
Otro					
Otro					
Taq Polimerasa	5u/µl		0.09µL		
Vol. Mezcla					
Vol. Muestra			0.6µL		
Vol. Total			15µL		

Programa de Termociclaje

Etapa	Temperatura(*C)	Tiempo	Ciclos	Programa
Desnaturalización inicial	95°C	5 minutos	30	
Desnaturalización /extensión	94°C	40 segundos		
Hibridación	57°C	60 segundos		
Elongación	72°C	45 segundos		
Extensión final	72°C	10 minutos		
Temperatura final	4°C	œ		

Electroforesis

Los productos de PCR se visualizarán en geles de agarosa al 1.2% en buffer y tinción con red gel y se identificarán los amplicones basado peso en pb del producto amplificado. Se utiliza un marcador de PM de 100 pb.

Referencia Bibliográfica

- *[Franke, 1994)*

Universidad Nacional Autónoma de México Facultad de ciencias Medicas Departamento de Salud Publica Laboratorio de Referencia de Serología	
PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTÁNDAR PARA PCR ETEC (Lt/stp)	**Página** 1/1

Elaborado por: Supervisado por: Fecha: __/__/__ Firma_____	Aprobado por: Fecha: __/__/__ Firma_____

Objetivo

Estandarizar técnica múltiplex para categorizar cepas de *E. coli* en patotipo diarreogénico y determinar su frecuencia.

Alcance

Esta técnica será de ayuda para el mejor entendimiento de los patotipos y su distribución en el ambiente de patotipos de *E. coli*.

Primers

Los marcadores de virulencia a utilizar son

Gen	Secuencia 5´a 3´	Peso molecular (pb)	Cepa de referencia
LtA-F	ACGGCGTTACTATCCTCTC	273	H-10407
LtA-R	TGGTCTCGGTCAGATATGTG		
Stp-F	TCTTTCCCCTCTTTTAGTCAG	166	
Stp-R	ACAGGCAGGATTACAACAAAG		

Contenido de reacción

Elemento	Descripción	()final	µl/tubo	# tubos	µl total
Buffer	10X	1X	1.5µL		
Dntp´s	2.5mM	0.2mM	0.3µL		
Primer 1	LT frw 100µM	1.2 µ M	0.6µL		
Primer 2	LT rev 100µ M	1.2 µ M	0.6µL		
Primer 3	Stp F 100 µ M	0.4 µ M	0.6µL		
Primer 4	Stp R 100 µ M	0.4 µ M	0.6µL		
$MgCl_2$	25mM	1.8 µ M	0.45µL		
H_2O	---	---	9.6 µL		
Otro					
Otro					
Taq Polimerasa	5u/µl		0.15µL		
Vol. Mezcla					
Vol. Muestra			0.6µL		
Vol. Total			15µL		

Programa de Termociclaje

Etapa	Temperatura(*C)	Tiempo	Ciclos	Programa
Desnaturalización inicial	94°C	5 minutos	40	
Desnaturalización /extensión	94°C	30 segundos		
Hibridación	54°C	30 minutos		
Elongación	72°C	30 segundos		
Extensión final	72°C	5 minutos		
Temperatura final	4°C	œ		

Electroforesis

Los productos de PCR se visualizarán en geles de agarosa al 1.8% en buffer y tinción con red gel y se identificarán los amplicones basado peso en pb del producto amplificado. Se utiliza un marcador de PM de 100 pb.

Referencia Bibliográfica

- *[Rodas, 2009)*

Universidad Nacional Autónoma de México Facultad de ciencias Medicas Departamento de Salud Publica Laboratorio de Referencia de Serología	
PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTÁNDAR PARA PCR ETEC (sth)	**Página** 1/1

Elaborado por: Supervisado por: Fecha: __/__/__ Firma_____	Aprobado por: Fecha: __/__/__ Firma_____

Objetivo

Estandarizar técnica múltiplex para categorizar cepas de *E. coli* en patotipo diarreogénico y determinar su frecuencia.

Alcance

Esta técnica será de ayuda para el mejor entendimiento de los patotipos y su distribución en el ambiente de patotipos de *E. coli*.

Primers

Los marcadores de virulencia a utilizar son

Gen	Secuencia 5´a 3´	Peso molecular (pb)	Cepa de referencia
Sth-F	CTTTCTGTATTATCTTTTTCACCTTT	185	H-10407
Sth-R	CACCCGGTACAAGCAGGATTAC		

Contenido de reacción

Elemento	Descripción	()final	µl/tubo	# tubos	µl total
Buffer	10X	1X	1.5µL		
Dntp´s	2.5mM	0.2mM	0.6µL		
Primer 1	Sth frw 100µM	1.2 µ M	0.6µL		
Primer 2	Sth rev 100µ M	1.2 µ M	0.6µL		
Primer 3					
Primer 4					
$MgCl_2$	25mM	1.8 µ M	0.9µL		
H_2O	---	---	10.08 µL		
Otro					
Otro					
Taq Polimerasa	5u/µl		0.12µL		
Vol. Mezcla					
Vol. Muestra			0.6µL		
Vol. Total			15µL		

Programa de Termociclaje

Etapa	Temperatura(*C)	Tiempo	Ciclos	Programa
Desnaturalización inicial	94°C	5 minutos	35	
Desnaturalización /extensión	94°C	60 segundos		
Hibridación	49°C	60 segundos		
Elongación	72°C	60 segundos		
Extensión final	72°C	7 minutos		
Temperatura final	4°C	œ		

Electroforesis

Los productos de PCR se visualizarán en geles de agarosa al 1.5% en buffer y tinción con red gel y se identificarán los amplicones basado peso en pb del producto amplificado. Se utiliza un marcador de PM de 100 pb.

Referencia Bibliográfica

- *Chattopadhyay, 2012]*

Universidad Nacional Autónoma de México Facultad de ciencias Medicas Departamento de Salud Publica Laboratorio de Referencia de Serología	
PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTÁNDAR PARA PCR FACTORES DE COLONIZACIÓN ETEC (Cfa)	**Página** 1/1

Elaborado por: Supervisado por: Fecha: __/__/__ Firma_____	Aprobado por: Fecha: __/__/__ Firma_____

Objetivo

Estandarizar técnica múltiplex para categorizar cepas de *E. coli* en patotipo diarreogénico y determinar su frecuencia.

Alcance

Esta técnica será de ayuda para el mejor entendimiento de los patotipos y su distribución en el ambiente de patotipos de *E. coli*.

Primers

Los marcadores de virulencia a utilizar son

Gen	Secuencia 5´a 3´	Peso molecular (pb)	Cepa de referencia
CFAI-F	GGTGCAATGGCTCTGACCACA	479	H-10407 115365
CFAI-R	GTCATTACAAGAGATACTACT		

Contenido de reacción

Elemento	Descripción	()final	µl/tubo	# tubos	µl total
Buffer	10X	1X	2.5µL		
Dntp´s	2.5mM	0.2mM	1 µL		
Primer 1	CFAI-F frw 100µM	1.2 µ M	1µL		
Primer 2	CFAI-R rev 100µ M	1.2 µ M	1µL		
Primer 3					
Primer 4					
$MgCl_2$	25mM	1.8 µ M	1.5µL		
H_2O	---	---	16.75 µL		
Otro					
Otro					
Taq Polimerasa	5u/µl		0.25µL		
Vol. Mezcla					
Vol. Muestra			1µL		
Vol. Total			25µL		

Programa de Termociclaje

Etapa	Temperatura(*C)	Tiempo	Ciclos	Programa
Desnaturalización inicial	94°C	5 minutos	30	
Desnaturalización /extensión	94°C	60 segundos		
Hibridación	51°C	60 segundos		
Elongación	72°C	60 segundos		
Extensión final	72°C	1 minutos		
Temperatura final	4°C	œ		

Electroforesis

Los productos de PCR se visualizarán en geles de agarosa al 1.5% en buffer y tinción con red gel y se identificarán los amplicones basado peso en pb del producto amplificado. Se utiliza un marcador de PM de 100 pb.

Referencia Bibliográfica

- *[Bekal, 2003]*

Universidad Nacional Autónoma de México Facultad de ciencias Medicas Departamento de Salud Publica Laboratorio de Referencia de Serología	
PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTÁNDAR PARA PCR FACTORES DE COLONIZACIÓN ETEC (CS1)	**Página** 1/1

Elaborado por: Supervisado por: Fecha: __/__/__ Firma_____	Aprobado por: Fecha: __/__/__ Firma_____

Objetivo

Estandarizar técnica múltiplex para categorizar cepas de *E. coli* en patotipo diarreogénico y determinar su frecuencia.

Alcance

Esta técnica será de ayuda para el mejor entendimiento de los patotipos y su distribución en el ambiente de patotipos de *E. coli*.

Primers

Los marcadores de virulencia a utilizar son

Gen	Secuencia 5´a 3´	Peso molecular (pb)	Cepa de referencia
Cs1-F	GCTCACACCATCAACACCGTT	321	112114
Cs1-R	CGTTGACTTAGTCAGGATAAT		

Contenido de reacción

Elemento	Descripción	()final	µl/tubo	# tubos	µl total
Buffer	10X	1X	1.5µL		
Dntp´s	2.5mM	0.2mM	0.6µL		
Primer 1	AGGR frw 100µM	1.2 µ M	0.6µL		
Primer 2	AGGR rev 100µ M	1.2 µ M	0.6µL		
Primer 3					
Primer 4					
$MgCl_2$	25mM	1.8 µ M	0.9µL		
H_2O	---	---	10.02 µL		
Otro					
Otro					
Taq Polimerasa	5u/µl		0.18µL		
Vol. Mezcla					
Vol. Muestra			0.6µL		
Vol. Total			15µL		

Programa de Termociclaje

Etapa	Temperatura(*C)	Tiempo	Ciclos	Programa
Desnaturalización inicial	94°C	5 minutos	40	
Desnaturalización /extensión	94°C	30 segundos		
Hibridación	52°C	30 segundos		
Elongación	72°C	30 segundos		
Extensión final	72°C	5 minutos		
Temperatura final	4°C	œ		

Electroforesis

Los productos de PCR se visualizarán en geles de agarosa al 1% en buffer y tinción con red gel y se identificarán los amplicones basado peso en pb del producto amplificado. Se utiliza un marcador de PM de 100 pb.

Referencia Bibliográfica

- *[Bekal, 2003]*

Universidad Nacional Autónoma de México Facultad de ciencias Medicas Departamento de Salud Publica Laboratorio de Referencia de Serología	
PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTÁNDAR PARA PCR FACTORES DE COLONIZACIÓN ETEC (CS3)	**Página** 1/1

Elaborado por: Supervisado por: Fecha: __/__/__ Firma_____	Aprobado por: Fecha: __/__/__ Firma_____

Objetivo

Estandarizar técnica múltiplex para categorizar cepas de *E. coli* en patotipo diarreogénico y determinar su frecuencia.

Alcance

Esta técnica será de ayuda para el mejor entendimiento de los patotipos y su distribución en el ambiente de patotipos de *E. coli*.

Primers

Los marcadores de virulencia a utilizar son

Gen	Secuencia 5´a 3´	Peso molecular (pb)	Cepa de referencia
CS3-F	GGGCCCACTCTAACCAAAGAA	401	112114
CS3-R	CGGTAATTACCTGAAACTAAA		

Contenido de reacción

Elemento	Descripción	()final	µl/tubo	# tubos	µl total
Buffer	10X	1X	1.5µL		
Dntp´s	2.5mM	0.2mM	0.3µL		
Primer 1	AGGR frw 100µM	1.2 µ M	0.6µL		
Primer 2	AGGR rev 100µ M	1.2 µ M	0.6µL		
Primer 3					
Primer 4					
$MgCl_2$	25mM	1.8 µ M	0.9µL		
H_2O	---	---	10.32 µL		
Otro					
Otro					
Taq Polimerasa	5u/µl		0.18µL		
Vol. Mezcla					
Vol. Muestra			0.6µL		
Vol. Total			15µL		

Programa de Termociclaje

Etapa	Temperatura(*C)	Tiempo	Ciclos	Programa
Desnaturalización inicial	94°C	5 minutos	40	
Desnaturalización /extensión	94°C	30 segundos		
Hibridación	50°C	30 segundos		
Elongación	72°C	30 segundos		
Extensión final	72°C	5 minutos		
Temperatura final	4°C	œ		

Electroforesis

Los productos de PCR se visualizarán en geles de agarosa al 1% en buffer y tinción con red gel y se identificarán los amplicones basado peso en pb del producto amplificado. Se utiliza un marcador de PM de 100 pb.

Referencia Bibliográfica

- *[Bekal, 2003]*

Universidad Nacional Autónoma de México Facultad de ciencias Medicas Departamento de Salud Publica Laboratorio de Referencia de Serología	
PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTÁNDAR PARA PCR FACTORES DE COLONIZACIÓN ETEC (CS21)	**Página** 1/1

Elaborado por: Supervisado por: Fecha: __/__/__ Firma_____	Aprobado por: Fecha: __/__/__ Firma_____

Objetivo

Estandarizar técnica múltiplex para categorizar cepas de *E. coli* en patotipo diarreogénico y determinar su frecuencia.

Alcance

Esta técnica será de ayuda para el mejor entendimiento de los patotipos y su distribución en el ambiente de patotipos de *E. coli*.

Primers

Los marcadores de virulencia a utilizar son

Gen	Secuencia 5´a 3´	Peso molecular (pb)	Cepa de referencia
CS21-F	ATGAGCCTGCTGGAAGTTATCATTG	608	9034A 115362
CS21-R	TTAACGGCTACCTAAAGTAATTGAGTT		

Contenido de reacción

Elemento	Descripción	()final	µl/tubo	# tubos	µl total
Buffer	10X	1X	1.5µL		
Dntp´s	2.5mM	0.2mM	0.6µL		
Primer 1	AGGR frw 100µM	1.2 µ M	0.6µL		
Primer 2	AGGR rev 100µ M	1.2 µ M	0.6µL		
Primer 3					
Primer 4					
$MgCl_2$	25mM	1.8 µ M	0.9µL		
H_2O	---	---	10.05 µL		
Otro					
Otro					
Taq Polimerasa	5u/µl		0.15µL		
Vol. Mezcla					
Vol. Muestra			0.6µL		
Vol. Total			15µL		

Programa de Termociclaje

Etapa	Temperatura(*C)	Tiempo	Ciclos	Programa
Desnaturalización inicial	94°C	2 minutos	35	
Desnaturalización /extensión	95°C	60 segundos		
Hibridación	62°C	60 segundos		
Elongación	72°C	60 segundos		
Extensión final	72°C	7 minutos		
Temperatura final	4°C	œ		

Electroforesis

Los productos de PCR se visualizarán en geles de agarosa al 1% en buffer y tinción con red gel y se identificarán los amplicones basado peso en pb del producto amplificado. Se utiliza un marcador de PM de 100 pb.

Referencia Bibliográfica

- *[Mazariego-Espinosa, 2010]*

Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de ciencias Medicas
Departamento de Salud Publica
Laboratorio de Referencia de Serología

PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTÁNDAR
PARA PCR EAEC (Aggr)

Página 1/1

Elaborado por:
Supervisado por:
Fecha: __/__/__ Firma_____

Aprobado por:
Fecha: __/__/__ Firma_____

Objetivo

Estandarizar técnica múltiplex para categorizar cepas de *E. coli* en patotipo diarreogénico y determinar su frecuencia.

Alcance

Esta técnica será de ayuda para el mejor entendimiento de los patotipos y su distribución en el ambiente de patotipos de *E. coli*.

Primers

Los marcadores de virulencia a utilizar son

Gen	Secuencia 5´a 3´	Peso molecular (pb)	Cepa de referencia
aggR-F	CTAATTGTACAATCGATGTA	308	49766
AggR-R	ATGAAGTAATTCTTGAAT		

Contenido de reacción

Elemento	Descripción	()final	µl/tubo	# tubos	µl total
Buffer	10X	1X	1.5µL		
Dntp´s	2.5mM	0.2mM	0.6µL		
Primer 1	AGGR frw 100µM	1.2 µ M	0.6µL		
Primer 2	AGGR rev 100µ M	1.2 µ M	0.6µL		
Primer 3					
Primer 4					
$MgCl_2$	25mM	1.8 µ M	0.45µL		
H_2O	---	---	10.53 µL		
Otro					
Otro					
Taq Polimerasa	5u/µl		0.12µL		
Vol. Mezcla					
Vol. Muestra			0.6µL		
Vol. Total			15µL		

Programa de Termociclaje

Etapa	Temperatura(*C)	Tiempo	Ciclos	Programa
Desnaturalización inicial	94°C	5 minutos	30	
Desnaturalización /extensión	94°C	60 segundos		
Hibridación	42°C	60 segundos		
Elongación	72°C	60 segundos		
Extensión final	72°C	7 minutos		
Temperatura final	4°C	œ		

Electroforesis

Los productos de PCR se visualizarán en geles de agarosa al 1.2% en buffer y tinción con red gel y se identificarán los amplicones basado peso en pb del producto amplificado. Se utiliza un marcador de PM de 100 pb.

Referencia Bibliográfica

- *Czeczulin, 1999*

Universidad Nacional Autónoma de México Facultad de ciencias Medicas Departamento de Salud Publica Laboratorio de Referencia de Serología	
PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTÁNDAR PARA PCR EIEC (IpaH/ LacY)	**Página** 1/1

Elaborado por: Supervisado por: Fecha: __/__/__ Firma_____	Aprobado por: Fecha: __/__/__ Firma_____

Objetivo

Estandarizar técnica múltiplex para categorizar cepas de *E. coli* en patotipo diarreogénico y determinar su frecuencia.

Alcance

Esta técnica será de ayuda para el mejor entendimiento de los patotipos y su distribución en el ambiente de patotipos de *E. coli*.

Primers

Los marcadores de virulencia a utilizar son

Gen	Secuencia 5´a 3´	Peso molecular (pb)	Cepa de referencia
EM_Sh ipaH_F	ATCTAATAACTTTGGATGTGTCCGA	187	DYS3 87780 (O42)
EM_Sh_ipaH _R	TTAAGATTAGAAGGCAGAGATGGAA		
EM LacY_F	CAATAATCAGTTCGTTTTCTGGC	241	
EM LacY_R	AGCAAACTGTTGGTCAAAAACAT		

Contenido de reacción

Elemento	Descripción	()final	µl/tubo	# tubos	µl total
Buffer	10X	1X	1.5µL		
Dntp´s	2.5mM	0.2mM	0.4µL		
Primer 1	IEMLACY frw 100µM	1.2 µ M	0.6µL		
Primer 2	IEMLACYrev 100µ M	1.2 µ M	0.6µL		
Primer 3	SEMSH F 100 µ M	0.4 µ M	0.6µL		
Primer 4	SEMSH R 100 µ M	0.4 µ M	0.6µL		
$MgCl_2$	25mM	1.8 µ M	0.45µL		
H_2O	---	---	9.53µL		
Otro					
Otro					
Taq Polimerasa	5u/µl		0.12µL		
Vol. Mezcla					
Vol. Muestra			0.6µL		
Vol. Total			15µL		

Programa de Termociclaje

Etapa	Temperatura(*C)	Tiempo	Ciclos	Programa
Desnaturalización inicial	94°C	90 segundos	35	
Desnaturalización /extensión	94°C	30 segundos		
Hibridación	60°C	25 segundos		
Elongación	72°C	30 segundos		
Extensión final	72°C	5 minutos		
Temperatura final	4°C	œ		

Electroforesis

Los productos de PCR se visualizarán en geles de agarosa al 1.5% en buffer y tinción con red gel y se identificarán los amplicones basado peso en pb del producto amplificado. Se utiliza un marcador de PM de 100 pb.

Referencia Bibliográfica

- *[Navarro, 2016]*

Universidad Nacional Autónoma de México Facultad de ciencias Medicas Departamento de Salud Publica Laboratorio de Referencia de Serología	
PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTÁNDAR PARA PCR Cuádruplex Filogenia	**Página** 1/1

Elaborado por: Supervisado por: Fecha: __/__/__ Firma_____	Aprobado por: Fecha: __/__/__ Firma_____

Objetivo

Estandarizar técnica múltiplex para categorizar cepas de *E. coli* en grupo filogenético y determinar su frecuencia.

Alcance

Esta técnica será de ayuda para el mejor entendimiento de los patotipos y su distribución en el ambiente de grupos filogenéticos de *E. coli*.

Primers

Los marcadores de virulencia a utilizar son

Gen	Secuencia 5´a 3´	Peso molecular (pb)	Cepa de referencia
chuA-F	ATGGTACCGGACGAACCAAC	288	K-12 (ArpA,YjaA) 116979 (chuA,YjaA,TspE) 108287 (Grupo E o D) ECOR 70 (Grupo A o C)
chuA-R	TGCCGCCCAGTACCAAAGACA		
yjaA-F	CAAACGTGAAGTGTCAGGAG	211	
yjaA-R	ATTGCGTTCCTCAACCTGTG		
TspE4-F	CACTATTCGTAAGGTCATCC	152	
TspE4-R	AGTTTATCGCTGCGGGTCGC		
arpA-F	AACGCTATTCGCCAGCTTGC	400	
arpA-R	TCTCCCCATACCGTACGCTA		
ArpAgpC-F	AGTTTTATGCCCAGTGCGAG	219	
ArpAgpC-R	TCTGCGCCGGTCACGCCC		*En PCR grupo E o D, arpA=301 pb
TrpBA-F	CGGCGATAAAGACATCTTCAC	489 (control interno)	
TrpBA-R	GCAACGCGGCCTGGCGGAAG		

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

** Corresponde al primer trpBA usado como control interno.

Contenido de reacción

Elemento	Descripción	()final	µl/tubo	# tubos	µl total
Buffer	10X	1X	1.5µL		
Dntp´s	2.5mM	0.2mM	1.5µL		
Primer 1	ChuA frw 100µM	1.2 µ M	0.6µL		
Primer 2	ChuA rev 100µ M	1.2 µ M	0.6µL		
Primer 3	YjaA F 100 µ M	0.4 µ M	0.6µL		
Primer 4	YjaA R 100 µ M	0.4 µ M	0.6µL		
Primer 5	TspE frw 100µM		0.6µL		
Primer 6	TspE rev 100µ M		0.6µL		
Primer 7	AceK F 100 µ M		0.6µL		
Primer 8	ArpA R 100 µ M		0.6µL		
$MgCl_2$	25mM	1.8 µ M	0.45µL		
H_2O	---	---	6µL		
Otro					
Otro					
Taq Polimerasa	5u/µl		0.15µL		
Vol. Mezcla					
Vol. Muestra			0.6µL		
Vol. Total			15µL		

Grupo A o C

Elemento	Descripción	()final	µl/tubo	# tubos	µl total
Buffer	10X	1X	1.5µL		
Dntp´s	2.5mM	0.2mM	1.2µL		
Primer 1	ArpA gp C- frw 100µM	1.2 µ M	0.6µL		
Primer 2	ArpA gp C-rev 100µ M	1.2 µ M	0.6µL		
Primer 3	trpBA-F 100 µ M	0.4 µ M	0.6µL		
Primer 4	trpBA- R 100 µ M	0.4 µ M	0.6µL		

$MgCl_2$	25mM	1.8 µ M	0.45µL		
H_2O	---	---	8.7µL		
Otro					
Otro					
Taq Polimerasa	5u/µl		0.15µL		
Vol. Mezcla					
Vol. Muestra			0.6µL		
Vol. Total			15µL		

Grupo E o D

Elemento	Descripción	()final	µl/tubo	# tubos	µl total
Buffer	10X	1X	1.5µL		
Dntp´s	2.5mM	0.2mM	1.2µL		
Primer 1	ArpA gp C-F100µM	1.2 µ M	0.6µL		
Primer 2	ArpA gp C-R 100µ M	1.2 µ M	0.6µL		
Primer 3	trpBA-F 100 µ M	0.4 µ M	0.6µL		
Primer 4	trpBA- R 100 µ M	0.4 µ M	0.6µL		
$MgCl_2$	25mM	1.8 µ M	0.45µL		
H_2O	---	---	8.7µL		
Otro					
Otro					
Taq Polimerasa	5u/µl		0.15µL		
Vol. Mezcla					
Vol. Muestra			0.6µL		
Vol. Total			15µL		

Programa de Termociclaje

Etapa	Temperatura(*C)	Tiempo	Ciclos	Programa
Desnaturalización inicial	94°C	4 minutos	30	3 PCR mismo
Desnaturalización /extensión	94°C	5 segundos		programa
Hibridación	58°C	20 segundos		
Elongación	72°C	40 segundos		
Extensión final	72°C	5 minutos		
Temperatura final	4°C	œ		

Electroforesis

Los productos de PCR se visualizarán en geles de agarosa al 1.5% (1.8% cuádruplex) en buffer y tinción con red gel y se identificarán los amplicones basado peso en pb del producto amplificado. Se utiliza un marcador de PM de 100 pb.

Referencia Bibliográfica

- *[Olivier Clermont, 2013]*

Anexo 10. Protocolos PCR UNAH- Laboratorio de Biología Molecular

Universidad Nacional Autónoma de Honduras
Facultad de ciencias
Maestría en Enfermedades Infecciosas y Zoonóticas (MEIZ)
Laboratorio de Biología Molecular

PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTÁNDAR
PARA PCR DÚPLEX EPEC

Página 1/1

Elaborado por:
Supervisado por:
Fecha: __/__/__ Firma_____

Aprobado por:
Fecha: __/__/__ Firma_____

Objetivo

Estandarizar técnica múltiplex para categorizar cepas de *E. coli* en cinco patotipos diarreogénicos y determinar su distribución.

Alcance

Esta técnica será de ayuda para el mejor entendimiento de los patotipos y su distribución en el ambiente de patotipos de *E. coli*

Primers

Los marcadores de virulencia a utilizar son: *eae* (gen estructural para la intimina en EPEC y EHEC), *bfpA* (en estructural para BFP de las EPEC típicas,

Gen	Secuencia 5´a 3´	Peso molecular (pb)	Cepa de referencia
eae frw	CACACGAATAAACTGACTAAAATG.	376 pb	EPEC 111
eae rev	AAAAACGCTGACCCGACCTAAAAT.		EPEC 128
bfp frw	TTCTTGGTGCTTGCGTGTCTTTT.	367 pb	
bfp rev	TTTTGTTTGTTGTATCTTTGTAA		

Contenido de reacción

Elemento	Descripción	()final	µL/tubo	# tubos	µL total
Buffer	10X	1X	2.5		
Dntp´s	2.5mM	0.2mM	2		
Primer 1	Eae frw 100µM	1.2 µ M	0.3		
Primer 2	Eae rev 100µ M	1.2 µ M	0.3		
Primer 3	Bfp F 100 µ M	0.4 µ M	0.1		
Primer 4	Bfp R 100 µ M	0.4 µ M	0.1		
$MgCl_2$	25mM	1.8 µ M	1.8		
H_2O	---	---	14.75		µ
Otro					
Otro					
Taq Polimerasa	5u/µL		0.15		
Vol. Mezcla			22		
Vol. Muestra			3		
Vol. Total			25		

Programa de Termociclaje

Etapa	Temperatura(*C)	Tiempo	Ciclos	Programa
Desnaturalización inicial	94	4 minutos	1	ETEC/EPEC
Desnaturalización /extensión	94	20 segundos	35	
Hibridación	55	30 segundos		
Elongación	62	10 segundos		
Extensión final	72	7 minutos	1	
Temperatura final	4	∞		

Electroforesis

Los productos de PCR se visualizarán en geles de agarosa al 2% en buffer y tinción con bromuro de etidio y se identificarán los amplicones basado en el producto amplificado. Se utiliza un marcador de PM de 100 pb.

Universidad Nacional Autónoma de Honduras Facultad de ciencias Maestría en Enfermedades Infecciosas y Zoonóticas (MEIZ) Laboratorio de Biología Molecular	
PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTÁNDAR PARA PCR TRIPLE ETEC	**Página** 1/1

Elaborado por: Supervisado por: Fecha: __/__/__ Firma_____	Aprobado por: Fecha: __/__/__ Firma_____

Objetivo

Estandarizar técnica múltiplex para categorizar cepas de *E. coli* en cinco patotipo diarreogénicos y determinar su distribución.

Alcance

Esta técnica será de ayuda para el mejor entendimiento de los patotipos y su distribución en el ambiente de patotipos de *E. coli*

Primers

Los marcadores de virulencia a utilizar son: *Lt* (gen estructural para toxina termolábil), *St* (gen estructural toxina termoestable porción humana), *Stp* (gen estructural toxina termoestable porción porcina)

Gen	Secuencia	Peso molecular (pb)	Cepa de referencia
Lt frw	ACGGCGTTACTATCCTCTC	234 pb	STH-LT-71
Lt rev	TGGTCTCGGTCAGATATGTG		
stp Fw	TCTTTCCCCTCTTTTAGTCAG	166 pb	STP-59
stp Rev.	ACAGGCAGGATTACAACAAAG		
St Fw	AGTGGTCCTGAAAGCATG .	64 pb	STH-LT-71
St Rev.	TACAAGCAGGATTACAACAC.		

Contenido de reacción

Elemento	Descripción	()final	µL/tubo	# tubos	µL total
Buffer	10X	1X	5		
Dntp´s	2.5mM	0.1mM	2		
Primer 1	Lt frw 100 µ M	2 u µ M	1		
Primer 2	Lt rev 100 µ M	2 u µ M	1		
Primer 3	stp F 100u µ M	2 u µ M	1		
Primer 4	stp R 100u µ M	2 u µ M	1		
$MgCl_2$	25mM	0.9 u µ M	1.8		
H_2O	---	---	30.9		
Otro	St F 100u µ M	2 u µ M	1		
Otro	St R 100u µ M	2 u µ M	1		
Taq Polimerasa	5u/µL		0.3		
Vol. Mezcla			46		
Vol. Muestra			4		
Vol. Total			50		

Programa de Termociclaje

Etapa	Temperatura(*C)	Tiempo	Ciclos	Programa
Desnaturalización inicial	94	4 minutos	1	ETEC/EPEC
Desnaturalización /extensión	94	20 segundos	35	
Hibridación	55	30 segundos		
Elongación	62	10 segundos		
Extensión final	72	7 minutos	1	
Temperatura final	4	∞		

Electroforesis

Los productos de PCR se visualizarán en geles de agarosa al 2% en buffer y tinción con bromuro de etidio y se identificarán los amplicones basado en el producto amplificado. Se utiliza un marcador de PM de 100 pb y 50 pb.

Anexo 11. Constancia de Resolución. Aprobación CEI-MEIZ

UNAH
FACULTAD DE CIENCIAS
COMITÉ DE ÉTICA DE INVESTIGACIÓN
MAESTRÍA EN ENFERMEDADES INFECCIOSAS Y ZOONÓTICAS

CONSTANCIA DE RESOLUCIÓN
PROTOCOLO DE INVESTIGACIÓN No. 08-2016

Por este medio el Comité de Ética de Investigación de la Maestría de Enfermedades Infecciosas y Zoonóticas (CEI-MEIZ) hace CONSTAR que el proyecto de investigación:

Titulo del proyecto: "Caracterización molecular de patotipos y grupos filogenéticos de cepas de *Escherichia coli* diarreogénicas circulantes en Honduras en el periodo 2012-2015"

Equipo de Investigación: María Lourdes Enríquez (Investigadora principal), Jennifer Fiallos López (Estudiante Co-investigadora) y Armando Navarro Ocaña (Co-investigador).

Institución (es): Escuela de Microbiología, Facultad de Ciencias, UNAH y Departamento de Salud Pública, Facultad de Medicina, UNAM.

Fecha de presentación al comité: 20 / 07 / 2016

Fue sometido a un proceso de revisión y análisis y en consecuencia fue **APROBADO**

Duración de la aprobación: **08 / 08 / 2016** al **08 / 08 / 2017**

Para los fines de los interesados se les extiende la presenta a los ocho días del mes de agosto de 2016.

Dra. Wendy Murillo
Presidente CEI-MEIZ

Comité de Ética de Investigación
MEIZ

Dra. Cynthia Rodríguez
Secretaria Suplente CEI-MEIZ

Anexo 12. Resultados completos serología y PCR

NO HNO	ORIGEN	Codigo UNAH	Codigo UNAM	Observacion bioquimica	IDBIOQ.	SEROO	SEROH	FILOGRUPO	PATOTIPO	FACTORES DE VIRULENCIA ENCONTRADOS			FACTORES DE COLONIZACION ENCONTRADOS		
1	AGUA	MX 1 44°C	121055		*E coli*	O184	H11	A	ND						
2	AGUA	CEPA MX 3	121056	2 scr -	*E coli*	O38	H39	E	ND						
3	AGUA	CEPA MX 4	121057		*E coli*	O40	H-	A	ND						
4	AGUA	CEPA MX 5	121058	4 scr -	*E coli*	O38	H39	E	ND						
5	AGUA	E. coli #1 vial #1	121059		*E coli*	O127	H6	B2	EPEC-atipica	EAE			ESPC		
6	AGUA	E. coli #4	121060		*E coli*	O127	H6	B2	EPEC-tipica	EAE	BFP		ESPC		
7	AGUA	E. coli #5	121061		*E coli*	O3	H2	A	EAEC	AGGR	AATA	AAPA			
8	AGUA	Cepa 59 A	121062		*E coli*	O175	H28	B1	EPEC		BFP				
9	AGUA	Cepa 62 A	121063		*E coli*	O175	H28	B1	ND						
10	AGUA	Cepa 64 A	121064		*E coli*	O9	H10	A	EPEC-tipica	EAE	BFP				
11	QUESO	QM-001	121065		*E coli*	O185	H12	A	ND						
14	QUESO	QM-004	121068		*E coli*	O103	H16	B1	ND						
35	LECHUGA	L-02	121089		*E coli*	O25	H8	B2	EPEC-tipica	EAE	BFP				
36	LECHUGA	L-03	121090		*E coli*	O102	H7	E	ND						
37	LECHUGA	L-04	121091		*E coli*	O?	H-	A	ND						
38	LECHUGA	L-05 A 37C	121092		*E coli*	O15	H8	B1	EPEC-tipica	EAE	BFP				
39	LECHUGA	L-05 B 44.5C	121093		*E coli*	O15	H8	B1	ND						
40	LECHUGA	L-07 A 37C	121094		*E coli*	O120	H?/H-	A	ND						
41	LECHUGA	L-07 B 44.5C	121095		*E coli*	O147	H32	A	ND						
42	LECHUGA	L-13 A 37C	121096	42 scr -	*E coli*	O20	H?/H-	A	ND						
43	LECHUGA	L-13 B 44.5C	121097	43 scr -	*E coli*	O20	H-	A	ND						
44	LECHUGA	L-15 A 37C	121098		*E coli*	O182	H?	A	ND						
45	LECHUGA	L-15 B 44.5C	121099		*E coli*	O182	H?	A	ND						
46	LECHUGA	L-16 A 37C	121100		*E coli*	O150	H8	B1	ND						
47	LECHUGA	L-16 B 44.5C	121101		*E coli*	O150	H8	B1	ND						
48	LECHUGA	L-17 A 37C	121102		*E coli*	O182	H?	A	ND						
49	LECHUGA	L-19 A 37C	121103	49 scr -	*E coli*	O125ab	H5	B2	EPEC-atipica	EAE			ESPC		
50	LECHUGA	L-19 B 44.5C	121104	50 scr -	*E coli*	O125ab	H?	B2	EPEC-atipica	EAE			ESPC		
51	CARNE MOLIDA	CM-001 37C	121105		*E coli*	O174	H3	C	ND						
52	CARNE MOLIDA	CM-001 44C	121106	52 scr -	*E coli*	O?	H10	B1	ND						
53	CARNE MOLIDA	CM-002 44.5C	121107	53 scr -	*E coli*	O70	H11	A	ND						
	CARNE MOLIDA		121107/1	53 scr +	*E coli*	O70	H11	D	ND						
54	CARNE MOLIDA	CM-004 37C	121108		*E coli*	O140	H21	B1	EPEC-atipica	EAE					
55	CARNE MOLIDA	CM-004 44.5C	121109		*E coli*	O103	H16	B1	ND						
57	CARNE MOLIDA	CM-005 44.5C	121111		*E coli*	O88	H8	B1	ND						
60	LAGO DE YOJOA	CA-02	121114	60 scr -	*E coli*	O111ab	H?/H-	B1	EPEC-tipica	EAE	BFP	EAF			
61	LAGO DE YOJOA	CA-03	121115		*E coli*	O111ab	H?	B1	EPEC-tipica	EAE	BFP	EAF			
62	LAGO DE YOJOA	CA-04	121116	62 scr -	*E coli*	O111ab	H?/H-	B1	EPEC-tipica	EAE	BFP	EAF			
63	LAGO DE YOJOA	CA-07	121117		*E coli*	O40	H10	A	EPEC-tipica	EAE	BFP				
64	LAGO DE YOJOA	CA-09	121118	64 scr -	*E coli*	O40	H10	B1	ND						
	LAGO DE YOJOA		121118/1	64 scr +	*E coli*	O40	H10	B1	ND						
65	LAGO DE YOJOA	CA-12	121119	65 scr -	*E coli*	O111ab	H-	B1	EPEC-tipica	EAE	BFP	EAF			
66	LAGO DE YOJOA	CA-13	121120	66 scr -	*E coli*	O111ab	H-	B1	EPEC-tipica	EAE	BFP	EAF			

NO HNO	ORIGEN	Codigo UNAH	Codigo UNAM	Observacion bioquimica	IDBIOQ	SEROO	SEROH	FILOGRUPO	PATOTIPO	FACTORES DE VIRULENCIA ENCONTRADOS			FACTORES DE COLONZACION ENCONTRADOS		
67	LAGO DE YOJOA	CA-16	121121		*E coli*	O6	H16	A	ETEC	LT	STH		CSI	CS3	
68	LAGO DE YOJOA	CA-17	121122		*E coli*	O6	H16	A	ETEC	LT	STH		CSI	CS3	CFA
69	LAGO DE YOJOA	CA-18	121123	69 ssr -	*E coli*	O128ab	H2	U	EPEC-tipica	EAE	BFP	EAF			
70	LAGO DE YOJOA	CA-19	121124	70 ssr -	*E coli*	O11ab	H-	A	EPEC-atipica	EAE					
71	LAGO DE YOJOA	CA-22	121125	71 ssr -	*E coli*	O11ab	H2	B1	EPEC-tipica	EAE	BFP	EAF			
72	LAGO DE YOJOA	CA-23	121126	72 ssr -	*E coli*	O128ab	H2	U	EPEC-tipica	EAE	BFP	EAF			
73	LAGO DE YOJOA	CA-24	121127		*E coli*	O8	H9	C	ETEC	LT	STH		CS21		
74	LAGO DE YOJOA	CA-25	121128		*E coli*	O6	H16	A	ETEC	LT	STH		CSI	CS3	CFA
75	LAGO DE YOJOA	CA-26	121129		*E coli*	O159	H21	D	ETEC	LT	STH				
76	LAGO DE YOJOA	CA-27	121130		*E coli*	O6	H16	A	ETEC	LT	STH		CSI	CS3	CFA
77	HUMANO	CT-01(3)	121131		*E coli*	OR	H33	A	ND						
78	HUMANO	CT-01(4)	121132		*E coli*	O52	H33	A	ND						
79	HUMANO	CT-01(5)	121133		*E coli*	O52	H33	A	ND						
80	HUMANO	CT-02(1)	121134		*E coli*	O?	H-	A	ND						
81	HUMANO	CT-02(4)	121135	81 ssr -	*E coli*	O150	H8	B1	EPEC-tipica	EAE	BFP				
82	HUMANO	CT-02(5)	121136	82 ssr -	*E coli*	O150	H8	B1	ND						
83	HUMANO	CT-03(2)	121137		*E coli*	O?	H2/H-	A	ND						
84	HUMANO	CT-03(3)	121138		*E coli*	O154	H45	E	ND						
85	HUMANO	CT-03(4)	121139		*E coli*	O20	H2/H-	A	ND				CFA		
86	HUMANO	CT-04(1)	121140		*E coli*	O173	H51	B1	EPEC-atipica	EAE					
87	HUMANO	CT-04(2)	121141		*E coli*	O173	H51	B1	EPEC-atipica	EAE					
88	HUMANO	CT-04(3)	121142		*E coli*	O173	H51	B1	EPEC-atipica	EAE					
89	HUMANO	CT-04(4)	121143		*E coli*	O173	H51	B1	EPEC-atipica	EAE					
90	HUMANO	CT-04(5)	121144		*E coli*	O173	H51	B1	EPEC-tipica	EAE	BFP				
91	QUESO	IL-001	121145		*E coli*	O159	H21	U	ETEC	LT	STH				
92	QUESO	IL-003	121146		*E coli*	O101	H9	A	EPEC-atipica	EAE					
93	QUESO	IL-005	121147		*E coli*	O101	H9	U	EPEC-atipica	EAE					
94	QUESO	IL-006	121148		*E coli*	O159	H21	B1	ETEC	LT	STH				
95	QUESO	IL-007	121149	95 ssr -	*E coli*	O8	H12	B1	ND				CFA		
96	QUESO	IL-009	121150		*E coli*	O6	H2	U	ETEC	LT	STH		CFA		
97	QUESO	IL-011	121151	97 ssr -	*E coli*	O8	H21	B1	EPEC-tipica	EAE	BFP				
98	QUESO	IL-012	121152	98 ssr -	*E coli*	O8	H12	U	EPEC-tipica	EAE	BFP				
	QUESO		121152/1	98 ssr +	*E coli*	O8	H12	B1	EPEC-tipica	EAE	BFP				
99	QUESO	IL-013	121153		*E coli*	O159	H12	U	ETEC	LT	STH		CSI	CS21	CS3
100	QUESO	IL-014	121154		*E coli*	O6	H16	A D C	ETEC	LT	STH		CSI	CS21	CS3
101	QUESO	IL-015	121155	101 ssr -	*E coli*	O40	H4	A	ETEC	LT	STH				
	QUESO		121155/1	101 ssr +	*E coli*	O129	H30	A	EPEC-atipica	EAE					
102	QUESO	IL-016	121156		*E coli*	O159	H21	B1	EPEC-atipica	EAE					
103	QUESO	IL-017	121157	103 ssr -	*E coli*	O8	H12	B1	ND						
	QUESO		121157/1	103 ssr +	*E coli*	O102	H7	E	EPEC-atipica	EAE					
104	QUESO	IL-018	121158		*E coli*	O6	H9	B1	ETEC	LT	STH				
105	QUESO	IL-019	121159		*E coli*	O8	H9	C	ETEC	LT	STH				
106	QUESO	IL-020	121160		*E coli*	O6	H1	B2	ETEC	LT	STH				
107	QUESO	IL-021	121161		*E coli*	49766	H10	B1	ND						

NO HNO	ORIGEN	Codigo UNAM	Codigo UNAM	Observacion bioquimica	IDBIOQ	SEROO	SEROH	FILOGRUPO	PATOTIPO	FACTORES DE VIRULENCIA ENCONTRADOS			FACTORES DE COLONZACION ENCONTRADOS		
108	QUESO	IL-023	121162	108 ssr -	*E coli*	O111ab	H2	B1	EPEC-atipica	EAE					
	QUESO		121162/1	108 ssr +	*E coli*	49766	H10	B1	ND						
109	QUESO	IL-024	121163		*E coli*	O159	H21	B1	EPEC-atipica	EAE					
110	QUESO	IL-027	121164		*E coli*	O129	H30	A	ND						
111	QUESO	IL-028	121165		*E coli*	O20	H21	CLADO I	ND						
112	QUESO	IL-029	121166		*E coli*	O125ab	H37	B2	ND				ESPC		
113	QUESO	IL-030	121167		*E coli*	O159	H11	D	ETEC	LT	STH				
114	QUESO	IL-032	121168		*E coli*	O20	H11	A	ND						
115	QUESO	IL-036	121169		*E coli*	O129	H30	A	ND						
116	QUESO	IL-039	121170		*E coli*	O41	H10	A	ND						
117	QUESO	IL-043	121171		*E coli*	O25	H21	B1	ND				CFA		
118	QUESO	IL-045	121172		*E coli*	O176	H30	A	ND						
119	QUESO	IL-046	121173	119 ssr -	*E coli*	O124	H38	B1	ND						
	QUESO		121173/1	119 ssr +	*E coli*	O6	H2	B1	ND						
120	QUESO	IL-047	121174		*E coli*	O6	H?	B1	ND						
121	QUESO	IL-048	121175	121 ssr -	*E coli*	O8	H21	B1	ND						
	QUESO		121175/1	121 ssr +	*E coli*	O129	H30	B1	ND						
122	QUESO	IL-049	121176		*E coli*	O8	H9	C	ETEC	LT	STH				
123	QUESO	IL-050	121177		*E coli*	O8	H9	C	ETEC	LT	STH				
124	QUESO	IL-051	121178		*E coli*	O153	H12	B1	ND						
125	QUESO	IL-053	121179		*E coli*	O40	H4	A	EPEC-atipica	EAE					
126	QUESO	IL-054	121180		*E coli*	O6	H?	B1	EPEC-tipica	EAE	BFP				
127	QUESO	IL-055	121181	127 ssr -	*E coli*	O69	H51	A	EPEC-atipica	EAE					
	QUESO		121181/1	127 ssr +	*E coli*	O6	H2	B1	ND						
128	QUESO	IL-056	121182		*E coli*	O6	H51	B1	ND						
129	QUESO	IL-057	121183		*E coli*	O159	H?/HR	B1	ETEC	LT	STH				
130	QUESO	IL-058	121184		*E coli*	O6	H?/HR	B1	EPEC-tipica	EAE	BFP				
131	QUESO	IL-059	121185		*E coli*	O6	H?/HR	B1	EPEC-tipica	EAE	BFP				
132	HUMANO	DA-001	121186		*E coli*	O176	H10	A	EPEC-atipica	EAE					
133	HUMANO	DA-002	121187	133 ssr -	*E coli*	O60	H-	A	EPEC-atipica	EAE					
	HUMANO		121187/1	133 ssr +	*E coli*	O?	H-	A	ND						
134	HUMANO	DA-003	121188	134 ssr -	*E coli*	O?	H10	A	EAEC	AGGR	AATA				
	HUMANO		121188/1	134 ssr +	*E coli*	O65	H32	A	ND						
135	HUMANO	DA-004	121189		*E coli*	O100	H31	B2	EPEC-atipica	EAE					
136	HUMANO	DA-005	121190		*E coli*	O20	H30	A	ND						
137	HUMANO	DA-006	121191		*E coli*	O6	H1	B2	ND						
138	HUMANO	DA-007	121192	138 ssr -	*E coli*	O65	H32	A	ND						
139	HUMANO	DA-009	121193		*E coli*	O60	H-	A	EPEC-atipica	EAE					
140	HUMANO	DA-010	121194		*E coli*	o(st)5	H10	B1	ETEC	LT	STH				
141	HUMANO	DA-015	121195		*E coli*	O101	H9	A	ND						
142	HUMANO	DA-019	121196		*E coli*	O?	H?/H-	A	ND						
143	HUMANO	DA-021	121197		*E coli*	O27	H6	A	ND						
144	HUMANO	DA-022	121198		*E coli*	O15	H18	D	EAEC	AGGR	AATA	AAPA			
145	HUMANO	DA-025	121199		*E coli*	O86	H18	D	EAEC	AGGR		AAPA			

NO HND	ORIGEN	Codigo UNAH	Codigo UNAM	Observacion bioquimica	IDBIOQ	SEROO	SEROH	FILOGRUPO	PATOTIPO	FACTORES DE VIRULENCIA ENCONTRADOS			FACTORES DE COLONIZACION ENCONTRADOS		
146	HUMANO	DA-027	121200		*E coli*	O86	H34	D	EAEC	AGGR		AAPA			
147	HUMANO	DA-028	121201		*E coli*	O27	H6	A	ND						
148	HUMANO	DA-029	121202		*E coli*	O?	H?/H-	A	ND						
149	HUMANO	DA-030	121203		*E coli*	O92	H10	A	EAEC	AAPA					
150	HUMANO	DA-031	121204		*E coli*	O8	H19	B1	ETEC	STP					
151	HUMANO	DA-033	121205		*E coli*	OR	H27	B1	ND						
152	HUMANO	DA-035	121206		*E coli*	O101	H9	A	EPEC-atipica	EAE					
153	HUMANO	DA-038	121207		*E coli*	O169	HA1	E	EPEC-tipica	EAE	BFP				
154	HUMANO	DA-039	121208		*E coli*	O113	H10	B1	STEC	STX1					
155	HUMANO	DA-040	121209		*E coli*	O8	H19	B1	ETEC	STP					
156	HUMANO	DA-041	121210		*E coli*	dys 6	H26	A	ND						
157	HUMANO	DA-042	121211		*E coli*	O88	H8	B1	EPEC-tipica	EAE	BFP				
158	HUMANO	DA-043	121212		*E coli*	O16	HA8	A	EIEC	IPAH					
159	HUMANO	DA-044	121213		*E coli*	O76	O145M45	A	EPEC-atipica	EAE					
160	HUMANO	DA-045	121214		*E coli*	O20	H30	A	ND						
161	HUMANO	DA-046	121215		*E coli*	O166	H15	U	EPEC-atipica	EAE					
162	HUMANO	DA-047	121216		*E coli*	O2	H6	B2	ND	-					
163	HUMANO	DA-048	121217		*E coli*	O8	H19	B1	ETEC	STP					
164	HUMANO	DA-051	121218		*E coli*	O25	HA	B2	ETEC	STP					
165	HUMANO	DA-053	121219		*E coli*	O2	H6	B2	EPEC-atipica	EAE	AAPA				
166	HUMANO	DA-054	121220		*E coli*	O92	H10	A	ND						
167	HUMANO	DA-055	121221		*E coli*	O44	H18	D	EPEC-atipica	EAE					
168	HUMANO	DA-056	121222	168 ssr -	*E coli*	O65	H32	A	EPEC-tipica	EAE	BFP				
169	HUMANO	DA-058	121223		*E coli*	O20	HA1	A	EPEC-atipica	EAE					
170	HUMANO	DA-059	121224		*E coli*	O20	H30	A	ETEC	LT	STH				
171	HUMANO	DA-060	121225		*E coli*	O8	H9	C	ND						
172	HUMANO	DA-061	121226		*E coli*	O6	H1	B2	ND						
173	HUMANO	DA-062	121227		*E coli*	O6	H10	A	ND						
174	HUMANO	DA-064	121228		*E coli*	O20	H1	C	ND						
175	HUMANO	DA-065	121229		*E coli*	O20	H18	F	EAEC	AGGR	AATA	AAPA			
176	HUMANO	DA-066	121230		*E coli*	O44	H-	E	EAEC	AGGR	AATA	AAPA			
177	HUMANO	DA-069	121231		*E coli*	O?	H9	A	EPEC-atipica	EAE					
178	HUMANO	DA-071	121232		*E coli*	O25	HA	B2	ND						
179	HUMANO	DA-072	121233		*E coli*	O?	H10	A	EAEC	AGGR	AATA	AAPA			
180	HUMANO	DA-073	121234		*E coli*	O?	HA	A	ND						
181	HUMANO	DA-075	121235		*E coli*	O?	HA	A	ND						
182	HUMANO	DA-076	121236		*E coli*	O86	H2	D	EPEC-atipica	EAE					
183	HUMANO	DA-077	121237	183 lac +	*E coli*	O91	H21	B2	ND						
	HUMANO		121237/1	183 lac -	*E coli*	O?	H?/H-	D	ND						
184	HUMANO	DA-078	121238		*E coli*	O86	H2	D	EPEC/EAEC	EAE	AGGR	AAPA			
185	HUMANO	DA-079	121239		*E coli*	O159	H21	B1	ETEC	LT	STH				
186	HUMANO	DA-082	121240		*E coli*	O166	H15	D	ND						
187	HUMANO	DA-084	121241		*E coli*	O88	H8	B1	EPEC-atipica	EAE					
188	HUMANO	DA-085	121242		*E coli*	O171	H10	A	EPEC-atipica	EAE					

NO HNO	ORIGEN	Codigo UNAM	Codigo UNAH	Observacion bioquimica	IOBIOD	SEROD	SEROH	FILOGRUPO	PATOTIPO	FACTORES DE VIRULENCIA ENCONTRADOS			FACTORES DE COLONZACION ENCONTRADOS		
189	HUMANO	DA-086	121243		*E coli*	O8	H16	B1	ND						
190	HUMANO	DA-087	121244		*E coli*	O109	H21	B1	EPEC-tipica	EAE	BFP				
191	HUMANO	DA-088	121245		*E coli*	O1	H?	D							
192	HUMANO	DA-089	121246	192 lac +	*E coli*	O73	H18	D	EPEC-atipica	EAE					
	HUMANO		121246/1	192 lac -	*E coli*	O6	H1	B2	ND						
193	HUMANO	DA-090	121247		*E coli*	dysI5	H10	B1	ETEC	LT	STH				
194	HUMANO	DA-091	121248		*E coli*	O23	H25	D	ND						
195	HUMANO	DA-092	121249		*E coli*	O23	H25	B1	EPEC-tipica	EAE	BFP				
196	HUMANO	DA-093	121250		*E coli*	O25	H4	B2	ND						
197	HUMANO	DA-094	121251		*E coli*	O128ab	H-	A	EPEC-atipica	EAE					
198	HUMANO	DA-098	121252		*E coli*	O73	H18	D	ETEC	STH					
199	HUMANO	DA-129	121253		*E coli*	O8	H31	B1	ETEC	LT	STH				
200	AGUA	MX 9-5	121401		*E coli*	O129	H45	D	EPEC-atipica	EAE					
201	AGUA	MX 10-2	121404		*E coli*	O129	H45	E	EPEC-tipica	EAE	BFP	EAF			
204	QUESO	IL-001 O157	121400		*E coli*	O159	H21	B1	ETEC	LT	STH				
205	QUESO	IL-001 5/6/15	121403		*E coli*	O159	H21	B1	ETEC	LT	STH				
207	AGUA	MX 10-4	121402		*E coli*	O159	H21	B1	EPEC-atipica	EAE					
209	AGUA	E coli #2	121398		*E coli*	O3	H2	CLADO I O 2	EAEC	AGGR	AATA	AAPA			
210	AGUA	E coli #3	121399		*E coli*	O3	H?	CLADO I O 2	EAEC	AGGR	AATA	AAPA			

Leyenda de cuadro

*Las letras ND significan NO DETERMINADO aunque se hayan realizado las PCR para su seropatotipo.

*Se han incluido los codigos de la UNAM ya que alli se realizo toda la parte experimental de serotipos, patotipos y filogrupo

*

Resultados patotipos

Un total de 106 amplificaron para mas de uno de los factores de virulencia de los diferentes patotipos

62 pertenecen a EPEC

36 de ellas son EPEC atipicas y 26 son EPEC tipicas

30 cepas se diferenciaron en ETEC

12 son EAEC

1 STEC

1 EIEC

Resultados grupos filogeneticos

un total de 180 cepas analizadas se lograron clasificar en grupos filogeneticos

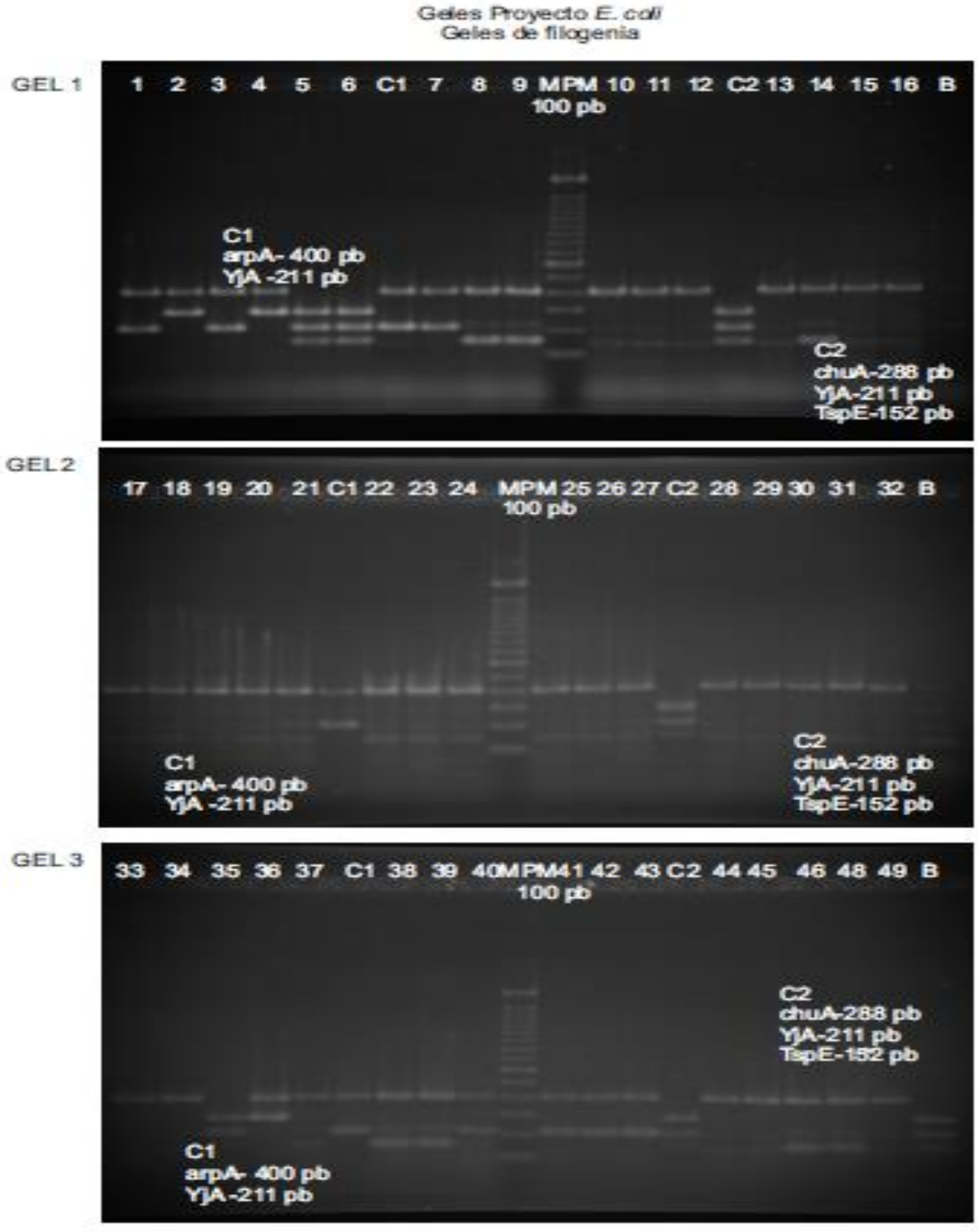
Grupo A= 65 Grupo C=8

Grupo B1=63 Grupo E=8

Grupo B2=17 Unidentified=8

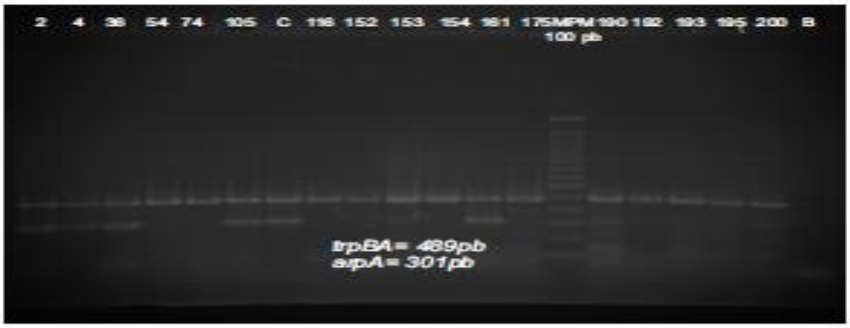
Grupo D=15 Clado 1 y 2=3

Anexo 13. Fotografías geles de agarosa (distintos PCR)



SUBGRUPOS D O E DE PCR CUÁDRUPLEX FILOGENIA

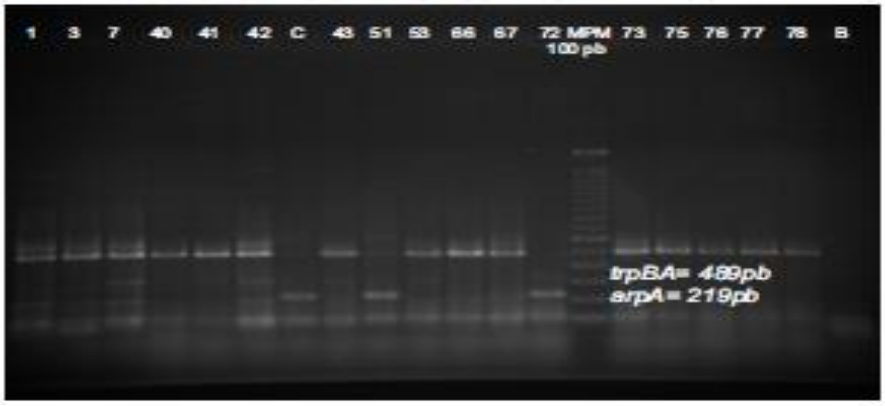
GEL 1



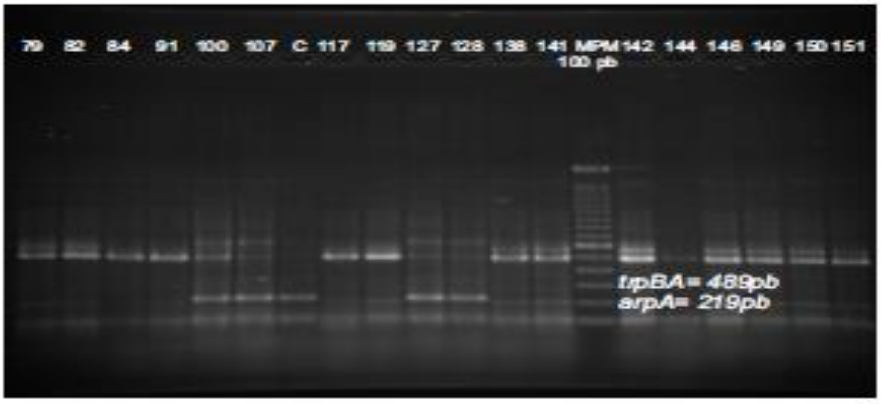
GEL 2

SUBGRUPOS A O C DE PCR CUÁDRUPLEX FILOGENIA

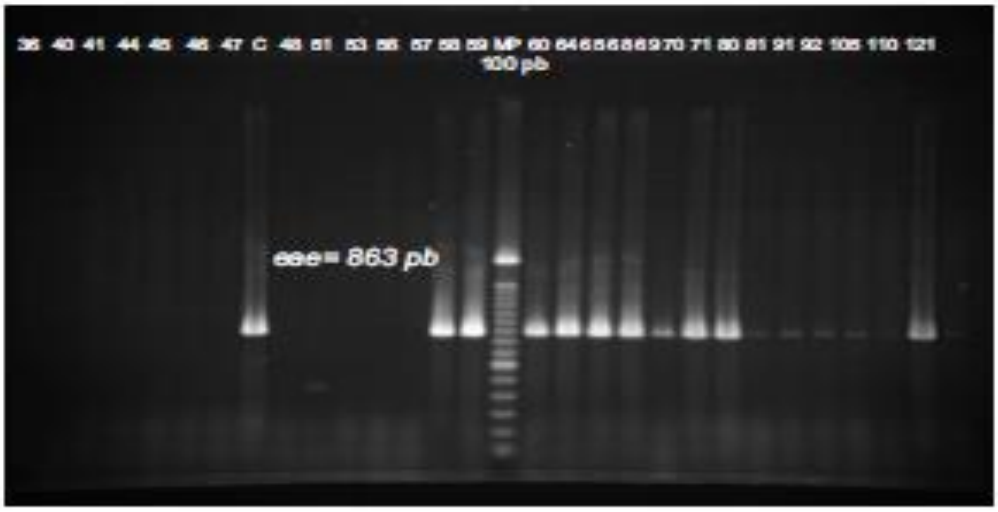
GEL 1

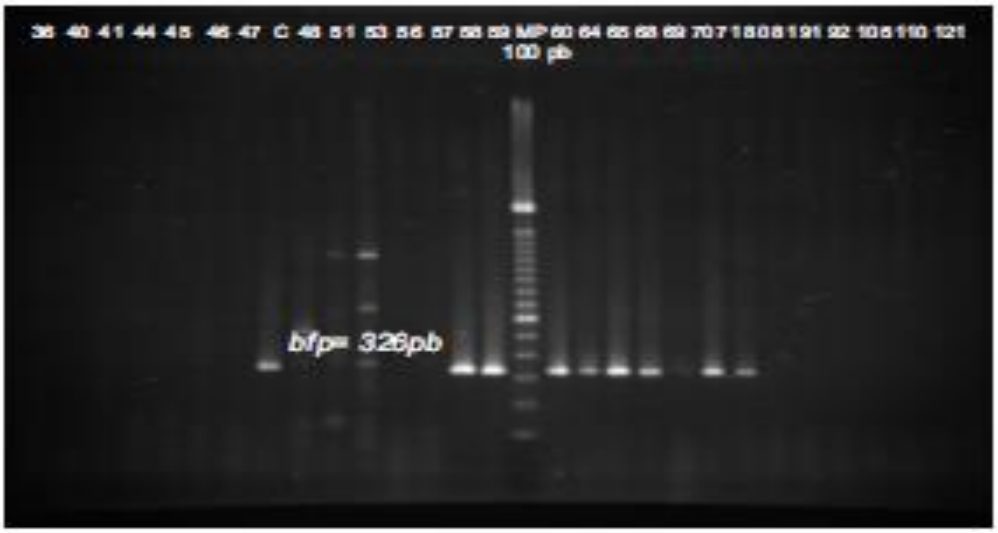


GEL 2

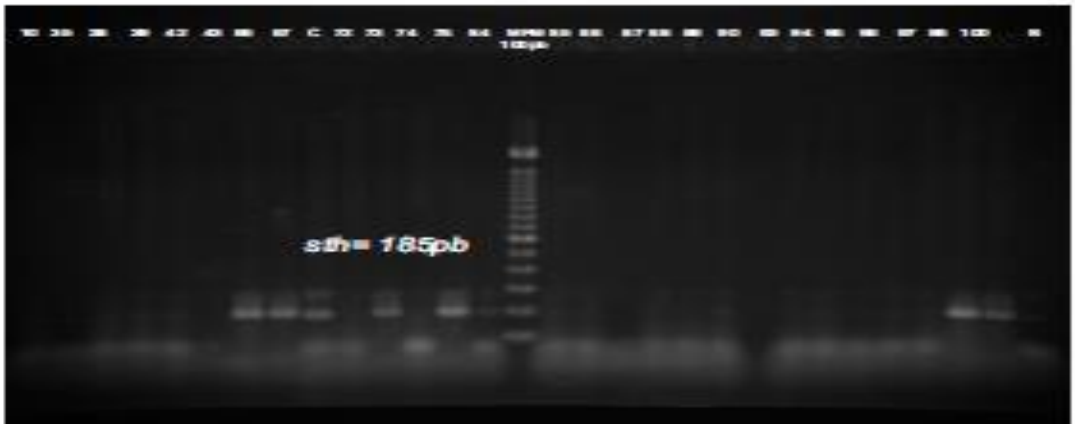


44 70 C 71 110 MPM 162 209
stx1 +=209 pb

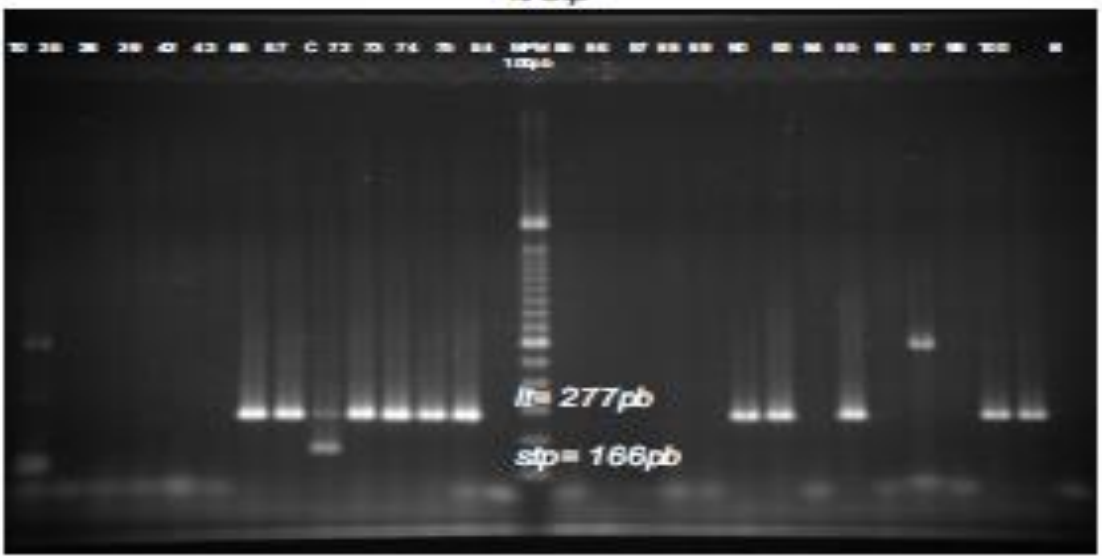

100 pb
eae= 863 pb


100 pb
bfp= 326pb

GELES ETEC
Sth

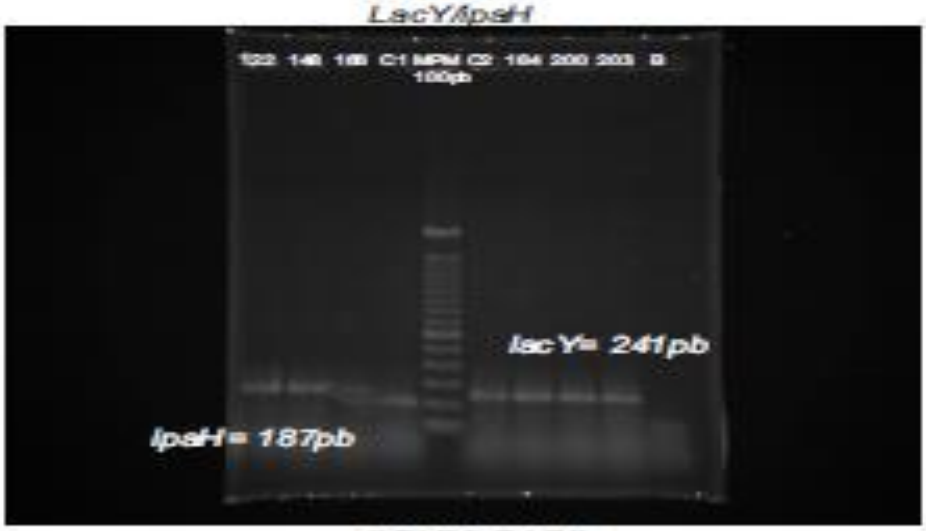


GELES ETEC
lt/Stp



GELEIEC

LacY/ipaH



GELES EAEC

aggR

Anexo 14. Resultados de quesos artesanales por departamento y tipo de queso

NO HND	COD CEPA	SEROO	SEROH	RLOGRUPO	ST X 1	ST X 2	eae	bfp	eaf	CS1	CS2I	CS3	cfa	LT	ST p	Sth	Origen depto	Tipo de queso
91	IL-001	0159	H21	U	F	F	F	F	F	-	-	-	-	POSITIVO	-	POSITIVO	Olancho	Semiseco
92	IL-003	0101	H9	A	-	-	POSITIVO	-	-								Olancho	Semiseco
93	IL-005	0101	H9	U	-	-	POSITIVO	-	-								Olancho	Semiseco
94	IL-006	0159	H21	BI	F	F	F	F	F	-	-	-	-	POSITIVO	-	POSITIVO	Olancho	Semiseco
95	IL-007	08	H12	BI						-	-	-	POSITIVO	-	-	-	Olancho	Semiseco
96	IL-009	06	H2	U						-	-	-	POSITIVO	POSITIVO		POSITIVO	Atlantida	Semiseco
97	IL-011	08	H21	BI			POSITIVO	POSITIVO	F	-	-	-	-	-	-	-	Yoro	Semiseco
98	IL-012	08	H12	U			POSITIVO	POSITIVO		-	-	-	-	-	-	-	Atlantida	Semiseco
	il-12	08	H12	BI			POSITIVO	POSITIVO		-	-	-	-	-	-	-	Atlantida	Semiseco
99	IL-013	0159	H12	U	F	F	F	F	F	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	-	POSITIVO	-	POSITIVO	Atlantida	Semiseco
100	IL-014	06	H16	C						POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	-	POSITIVO	-	POSITIVO	Atlantida	Semiseco
101	IL-015	040	H4	A						-	-	-	-	POSITIVO	-	POSITIVO	Yoro	Semiseco
	il-15	0129	H30	A	-	-	POSITIVO	-	F								Yoro	Semiseco
102	IL-016	0159	H21	BI	F	F	POSITIVO	-	F	-	-	-	-	-	-	-	Yoro	Semiseco
103	IL-017	08	H12	BI			-	-		-	-	-	-	-	-	-	Yoro	Semiseco
	il-17	0102	H7	E	-	-	POSITIVO	-	-								Yoro	Semiseco
104	IL-018	06	H9	BI						-	-	-	-	POSITIVO	-	POSITIVO	Yoro	Semiseco
105	IL-019	08	H9	C						-	-	-	-	POSITIVO	-	POSITIVO	Yoro	Semiseco
106	IL-020	06	HI	B2						-	-	-	-	POSITIVO	-	POSITIVO	Yoro	Semiseco
107	IL-021	49766	H10	BI													Yoro	Semiseco
108	IL-023	0111ab	H2	BI	-	-	POSITIVO	-	-								Yoro	Semiseco
	il-23	49766	H10	BI													Yoro	Semiseco
109	IL-024	0159	H21	BI	F	F	POSITIVO	-	F	-	-	-	-	-	-	-	Yoro	Semiseco
110	IL-027	0129	H30	A	-	-	-	-	F								Valle	Seco
111	IL-028	020	H21	CLADO 1			-	-		-	-	-	-	-	-	-	Valle	Semiseco
112	IL-029	0125ab	H37	B2	F	F	-	-	F								Valle	Semiseco
113	IL-030	0159	H11	D	F	F	F	F	F	-	-	-	-	POSITIVO	-	POSITIVO	Yoro	Semiseco
114	IL-032	020	H11	A			-	-		-	-	-	-	-	-	-	Yoro	Queso fresco
115	IL-036	0129	H30	A	-	-	-	-	F								Yoro	Semiseco
116	IL-039	041	H10	A													Yoro	Semiseco
117	IL-043	025	H21	BI			-	-		-	-	-	POSITIVO	-	-	-	Yoro	Seco
118	IL-045	0176	H30	A	-	-	-	-	-					-	-	-	Yoro	Semiseco
119	IL-046	0124	H38	BI			-	-		-	-	-	-	-	-	-	El Paraiso	Semiseco
	il-46	06	H2	BI			-	-		-	-	-	-	-	-	-	El Paraiso	Semiseco
120	IL-047	06	H?	BI			-	-		-	-	-	-	-	-	-	El Paraiso	Semiseco
121	IL-048	08	H21	BI			-	-		-	-	-	-	-	-	-	El Paraiso	Seco
	il-48	0129	H30	BI	-	-	-	-	F								El Paraiso	Seco
122	IL-049	08	H9	C						-	-	-	-	POSITIVO	-	POSITIVO	Olancho	Semiseco
123	IL-050	08	H9	C						-	-	-	-	POSITIVO	-	POSITIVO	Olancho	Semiseco
124	IL-051	0153	H12	BI			-	-		-	-	-	-	-	-	-	El Paraiso	Semiseco
125	IL-053	040	H4	A			POSITIVO	-		-	-	-	-	-	-	-	El Paraiso	Semiseco
126	IL-054	06	H?	BI			POSITIVO	POSITIVO		-	-	-	-	-	-	-	Olancho	Semiseco
127	IL-055	069	H51	A	-	-	POSITIVO	-	-								El Paraiso	Semiseco
	il-55	06	H2	BI			-	-		-	-	-	-	-	-	-	El Paraiso	Semiseco
128	IL-056	06	H51	BI			-	-		-	-	-	-	-	-	-	El Paraiso	Semiseco
129	IL-057	0159	H?/HR	BI	F	F	F	F	F	-	-	-	-	POSITIVO	-	POSITIVO	El Paraiso	Semiseco
130	IL-058	06	H?/HR	BI			POSITIVO	POSITIVO		-	-	-	-	-	-	-	Ocotepeque	Queso fresco
131	IL-059	06	H?/HR	BI			POSITIVO	POSITIVO		-	-	-	-	-	-	-	Ocotepeque	Queso fresco

Tabla 11. Resultados completos de quesos artesanales.

Tipo de queso	Localidad	Serotipo	N	Grupo	Patotipo	Gen	
Semiseco	El Paraiso	O40:H4	1	A	a-EPEC	*eae+*	
		O69:H51	1				
	Yoro	O129:H30	1				
	Olanncho	O101:H9	2	A,U			
	Yoro	O111ab:H2	1	B1			
		O159:H21	2				
		O102:H7	1	E			
queso fresco(2), semiseco (1)	Olancho,Ocotepeque(2)	O6:H?/HR	3	B1	t-EPEC	*eae+,bfp+*	
Semiseco	Yoro	O8:H21	1				
	Atlantida	O8:H12	2	B1,U			
	Yoro	O40:H4	1	A	ETEC	*lt+,sth+*	
	El Paraiso	O159:H?/HR	1	B1			
	Yoro	O6:H9	1	B1			
	Olancho	O159:H21	2	B1,U			
	Yoro	O6:H1	1	B2			
	Yoro(1),Olancho(2)	O8:H9	3	C			
	Atlantida	O6:H16	1	C		*lt+,sth+,cs1+,cs21+,cs3+*	
	Yoro	O159:H11	1	D		*lt+,sth+*	
	Atlantida	O6:H2	1	U			
		O159:H12	1	U		*lt+,sth+,cs1+,cs21+,cs3+*	
		Total	28				

Tabla 12. Resultados de patotipos de quesos artesanales y su origen.

Anexo 15. Resultados de origen hídrico por localidad.

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

Tabla 13. Resultados cepas de agua y su localidad y temperatura

									PROMEDIO	
Fecha	Época	No. De Muestreo	Estación	Codigo cepa	Serotipo	Filogrupo	Patotipo	Observacion	T* ambiental	T* sup agua
		1	2	CA-2		B1	t-EPEC			
			3	CA-3		B1	t-EPEC			
31/03/14	Al final de la epoca seca e inicios de la epoca lluviosa		4	CA-4		A	t-EPEC		30.2	28.6
		2	1	CA-7		B1	t-EPEC			
			3	CA-9		B1	NEGATIVA			
12/07/14	Canicula		6	CA-12		B1	t-EPEC		26.2	27.4
		3	1	CA-13		B1	t-EPEC			
			4	CA-16		A	ETEC	CS1,CS3		
			5	CA-17		A	ETEC	CS1,CS3,cfa		
27/09/14	Epoca lluviosa		6	CA-18		U	t-EPEC		30.3	28.8
		4	1	CA-19		A	a-EPEC			
			4	CA-22		B1	t-EPEC			
			5	CA-23		U	t-EPEC			
01/11/15	Final de la epoca lluviosa e inicio de epoca seca		6	CA-24		C	ETEC	CS21	23.4	25.5
		5	1	CA-25		A	ETEC	CS1,CS3,cfa		
			3	CA-26		D	ETEC			
24/05/15	Epoca seca		4	CA-27		A	ETEC	CS1,CS3,cfa	22.4	23.3

Tabla 14. Cepas de Lago de Yojoa y distribución por época.

Anexo 16. Resultados de origen alimenticio

Procedencia	Serotipo	N	Grupo
L-MERCADO	O?:H-	1	A
LSUPER	O120:H?/H-	1	
L-SUPER	O147:H32	1	
L-MERCADO	O182:H?	3	
L-SUPER	O20:H?/H-	2	
CM	O70:H11	1	
CM	O?:H10	1	B1
CM	O103:H16	1	
CM	O140:H21	1	
L-SUPER	O15:H8	2	
L-MERCADO	O150:H8	2	
CM	O88:H8	1	
L-SUPER	O25:H8	1	B2
L-MERCADO	O125ab:H5	1	
L-MERCADO	O125ab:H?	1	
CM	O174:H3	1	C
L-MERCADO	O102:H7	1	E
	TOTAL	22	

Tabla 15. Resultados de alimentos por fuente.

Procedencia	Serotipo	N	Grupo	Patotipo	Gen
CM	O140:H21	1	B1	a-EPEC	*eae+*
L-MERCADO	O125ab:H5	2	B2		
L-SUPER	O15:H8	1	B1	t-EPEC	*eae+,bfp+*
L-SUPER	O25:H8	1	B2		
	TOTAL	5			

Tabla 16. Resultados de patotipos en alimentos por fuente.

GRUPO FILOGENÉTICO	PATOTIPO	FRECUENCIA (N)	PORCENTAJE POR PATOTIPO (%)	FRECUENCIA POR GRUPO (N)	PORCENTAJE TOTAL POR GRUPO (%)
A	a-EPEC	14	7	29	15
	t-EPEC	4	2		
	ETEC	6	3		
	EAEC	4	2		
	EIEC	1	1		
B1	a-EPEC	10	5	38	20
	t-EPEC	17	9		
	ETEC	10	5		
	STEC	1	1		
B2	a-EPEC	5	3	9	5
	t-EPEC	2	1		
	ETEC	2	1		
C	ETEC	6	3	6	3
D	a-EPEC	4	2	11	6
	ETEC	3	2		
	EAEC	4	2		
E	a-EPEC	1	1	3	2
	t-EPEC	1	1		
	EAEC	1	1		
F	EAEC	1	1	1	1
U	a-EPEC	2	1	7	4
	t-EPEC	3	2		
	ETEC	2	1		

CLADO 1 O 2	EAEC	2	1	2	1
TOTAL		106	56	106	56

Tabla 17. Frecuencias y porcentajes de patotipos de acuerdo a grupos filogenéticos.

Anexo 17. Serotipos de *E. coli* causantes de diarrea.

SEROTIPOS Y SEROGRUPOS MÁS COMUNES DE ESCHERICHIA COLI CAUSANTE DE DIARREA

ETEC	*EIEC*	*EPEC*	*EAEC*	*STEC*				
O6:H-	O28ac:H-	O18	O3:H2	O1:MN	O23:H7	O85:H10	O117:H7	O165:H-
O6:H16	O29:H-	O26:H-	O15:H18	O1:H1	O23:H16	O85:H23	O117:H7:K1	O165:H10
O8:H-	O112ac:H-	O26:H11	O44:H18	O1:H2	O25:H-	O86:H10	O117:H14	O165:H19
O11:H27	O124:H-	O55:H-	O77:H18	O1:H20	O25:H11	O88:H-	O117:H19	O165:H25
O15:H11	O124:H7	O55:H6	O86:H-	O1:HNT	O26:H-	O91:H-	O118:H16	O166:H15
O20:H-	O124:H30	O55:H7	O111:H21	O2:H1	O26:H2	O91:H10	O118:H30	O166:H28
O25:H-	O135:H-	O86:H-	O127:H2	O2:H2:K1	O26:H8	O91:H14	O119:H-	O168:H-
O27:H-	O143:H-	O86:H34	ONT:H10	O2:H6	O26:H11	O91:H21	O119:H5	O169:H-
O27:H7	O144:H-	O111:H-		O2:H7	O26:H21	O98:H-	O120:H19	O171:H2
O27.H20	O152.H-	O111ab:H2		O2:H27	O26.H32	O98.H-	O121.H-	O172.H-
O80	O167:H5	O119:H6		O4:H40	O27:H-	O98:H8	O121:H8	OX3:H2
O85:H7		O125ac:H21		O5:H-	O39:H4	103:H-	O126:H-	ONT:H21
O114:H21		O126:H-		O5:H16	O39:H8	O103:H2	O126:H2	ONT:H25
O115:H21		O126:H2		O6:H-	O45:H-	O103:H4	O126:H8	ONT:H28
O126:H9		O126:H27		O6:H1	O45:H2	O103:H6	O126:H21	ONT:H47
O128ac:H27		O127:H21		O6:H29	O45:H7	O103:H25	O126:H27	OR:H-
O139		O128ab:H2		O8:H-	O50:H-	O104:H7	O128:H12	OR:H20
O148:H28		O128:H12		O8:H14	O55:H-	O109:H2	O137:H41	OR:H21
O149:H4		O142:H6		O8:H21	O55:H6	O110:H-	O141:H-	
O149:H10		O158:H23		O9ab:H-	O55:H7	O110:H19	O144:H-	
O153:H45				O11:H49	O55:H10	O111ab:H-	O145:H-	
O159:H-				O14:H-	O55:H?	O111:H2	O145:H16	
O159:H4				O15:H-	O60:H-	O111:H7	O145:H25	
O159:H20				O15:H27	O65:H16	O111ab:H8	O145:H28	
O166:H27				O16:H-	O70:H11	O111:H34	O146:H-	
O167:H5				O16:H6	O73:H34	O111:HNT	O146:H21	
O169:H41				O17:H18	O75:H-	O112:H21	O146:H28	
O173.H-				O18.H-	O75.H5	O113.H2	O150.H10	
				O18:H?	O76:H19	O113:H4	O153:H2	
				O20:H7	O79:H7	O113:H53	O153:H25	
				O21:H5	O80:H-	O114:H4	O154:H-	
				O22:H	O82:H	O114:H48	O157:H	
				O22:H1	O82:H8	O115:H18	O157:H7	
				O22:H8	O83:H1	O116:H19	O161:H-	
				O22:H40	O84:H2	O117:H-	O163:H19	

ETEC E. coli enterotoxigénica
EIEC E. coli enteroinvasiva
NT: no tipificable. EPEC E. coli enteropatógena
EAEC E. coli enteroagregativa
R: rugosa
STEC E. coli productora de toxina shiga

Anexo 18. Hoja de bioseguridad *Escherichia coli* enterohemorrágica

ESCHERICHIA COLI
PATHOGEN SAFETY DATA SHEET - INFECTIOUS SUBSTANCES

SECTION I - INFECTIOUS AGENT

NAME: *Escherichia coli,* enterohemorrhagic

SYNONYM OR CROSS REFERENCE: Enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC), Verotoxin producing *Escherichia coli* (VTEC), Shiga toxin producing *Escherichia coli* (STEC)

CHARACTERISTICS: Gram negative rod; motile, aerobic; produce Vero / Shiga toxins (VT/STx), 2 types, VT1/Stx1 and VT2/Stx2; serotyping to determine somatic and flagellar antigens

SECTION II - HEALTH HAZARD

PATHOGENICITY: Hemorrhagic colitis, intestinal disease accompanied by cramps and abdominal pain; initially watery, followed by bloody diarrhea; low grade fever; last about 8 days; 5-10% of hemorrhagic colitis victims may develop hemolytic uremic syndrome (HUS); affects all ages, higher death rates occur in elderly and young; can cause thrombocytopenic purpura (TTP) in elderly

EPIDEMIOLOGY: Sporadic and in outbreaks of bloody diarrhea; associated with 15-30% of patients where no other pathogen has been identified; main EHEC serotype in North America from infections is *E. coli* 0157:H7

HOST RANGE: Humans; animals (O157:H7 - piglets, calves and cattle)

INFECTIOUS DOSE: Appears to have low infectious dose, may be similar to that of *Shigella* spp.,10 organisms by ingestion

MODE OF TRANSMISSION: Ingestion of contaminated food (undercooked hamburger meat, unpasteurized milk); fecal-oral transmission; person-to-person transmission (extremely high)

INCUBATION PERIOD: 2-8 days (median of 3-4 days)

COMMUNICABILITY: Communicable for duration of fecal excretion (7-9 days); 3 weeks in one third of children.

SECTION III - DISSEMINATION

RESERVOIR: Infected persons, animals (sheep, goats, pigs, poultry, calves, cattle)

ZOONOSIS: Yes - direct or indirect contact with infected animal and waste

VECTORS: birds may be a vector

SECTION IV –STABILITY AND VIABILITY

DRUG SUSCEPTIBILITY: Sensitive to a wide spectrum of antibiotics

SUSCEPTIBILITY TO DISINFECTANTS: Susceptible to many disinfectants - 1% sodium hypochlorite, 70% ethanol, phenolics, glutaraldehyde, iodines, formaldehyde

PHYSICAL INACTIVATION: Heat sensitive, inactivated by moist heat (121° C for at least 15 min) and dry heat (160-170° C for at least 1 hour)

SURVIVAL OUTSIDE HOST: Butter - up to 50 min; cream - 10 days; hamburger meat - survives well; does not survive long in slurry systems (innoculum of 10^8cfu/mL became undetectable after 9 days); survives well in contaminated feces and soil, only small reduction in organism number over 2 months.

SECTION V –FIRST AID/MEDICAL

SURVEILLANCE: Monitor for symptoms; confirm bacteriologically, DNA probe to detect Verotoxins VT1 and VT2

FIRST AID/TREATMENT: Electrolyte fluid therapy; antibiotics may be administered in very severe cases

IMMUNIZATION: None

PROPHYLAXIS: Not usually administered.

SECTION VI - LABORATORY HAZARDS

LABORATORY-ACQUIRED INFECTIONS: 4 reported cases of laboratory infections with *E. coli* since 1981

SOURCES/SPECIMENS: Contaminated food (raw milk, hamburger, apple juice and water); feces

PRIMARY HAZARDS: Ingestion

SPECIAL HAZARDS: None

SECTION VII –EXPOSURE CONTROLS/PERSONAL PROTECTION

CONTAINMENT REQUIREMENTS: Biosafety level 2 practices, containment equipment and facilities for activities involving cultures and infected clinical materials

PROTECTIVE CLOTHING: Laboratory coat; gloves when contact with infectious materials is unavoidable

OTHER PRECAUTIONS: Good personal hygiene and frequent handwashing essential.

SECTION VIII - HANDLING INFORMATION

SPILLS: Allow aerosols to settle; wearing protective clothing, gently cover spill with absorbent paper towel and apply 1% sodium hypochlorite, starting at perimeter and working towards the centre; allow sufficient contact time (30 min) before clean up

DISPOSAL: Decontaminate before disposal; steam sterilization, chemical disinfection
STORAGE: **In sealed containers that are appropriately labelled**

SECTION IX - REGULATORY AND OTHER INFORMATION

Date prepared: January, 2001

Prepared by: Office of Laboratory Security, PHAC

Although the information, opinions and recommendations contained in this Material Safety Data Sheet are compiled from sources believed to be reliable, we accept no responsibility for the accuracy, sufficiency, or reliability or for any loss or injury resulting from the use of the information. Newly discovered hazards are frequent and this information may not be completely up to date.

Copyright ©
Health. Canadá, 2001

Anexo 19. Hoja de bioseguridad *Escherichia coli* enteroinvasiva

ESCHERICHIA COLI
PATHOGEN SAFETY DATA SHEET - INFECTIOUS SUBSTANCES

SECTION I - INFECTIOUS AGENT

NAME: *Escherichia coli*, enteroinvasive

SYNONYM OR CROSS REFERENCE: EIEC, intestinal pathogenic *E. coli*, bacillary dysentery.

CHARACTERISTICS: Enteroinvasive *Escherichia coli* (EIEC) are in the family Enterobacteriaceae. They are Gram negative, rod shaped, non-spore forming, motile with peritrichous flagella or nonmotile, grow on MacConkey agar (colonies are 2 to 3 mm in diameter and red or colorless), and are capable of aerobic or anaerobic growth. Strains belonging to EIEC are biochemically, genetically, and pathogenically closely related to *Shigella* spp.

SECTION II - HEALTH HAZARD

PATHOGENICITY/TOXICITY: EIEC causes bacillary dysentery, an acute ulcerative infection of the large intestine. EIEC invade cells of the colon and causes watery diarrhea (might be bloody), fever, and abdominal cramps. In severe cases, the bacteria may attack the colonic mucosa, invading epithelial cells, multiplying, and causing ulceration of the bowel.

EPIDEMIOLOGY: EIEC is endemic in most developing countries and may cause occasional outbreaks in industrialized countries. Species of *Shigella* are the major cause of bacillary dysentery, although up to 10% of cases are caused by enteroinvasive *E. coli*. EIEC are rare in United States and Canada, and are less common than ETEC and EPEC strains in the developing world. Three large outbreaks in the United States have been reported. EIEC infections primarily affect children under 5 years living in developing countries.

HOST RANGE: Humans.

INFECTIOUS DOSE: 10^6-10^{10} organisms.

MODE OF TRANSMISSION: EIEC are spread by the fecal/oral route. Contaminated food and water are the usual vehicles for the spread. Food-borne outbreaks have occurred. Person-to person transmission can also occur.

INCUBATION PERIOD: The incubation period is between 2-48 hours with an average of about 18 hours.

COMMUNICABILITY: Yes. Person-to-person transmission is possible but is uncommon.

SECTION III - DISSEMINATION

RESERVOIR: Humans are the only known reservoir.

ZOONOSIS: None reported.

VECTORS: None.

SECTION IV –STABILITY AND VIABILITY

DRUG SUSCEPTIBILITY/RESISTANCE: Susceptible to carbapenem, fosfomycin-trometanol and nitrofurantoin. *E. coli* can be resistant to chloramphenicol, β lactams, nalidixic acid, ampicillin and ciprofloxacin. Fluoroquinolones such as ciprofloxacin enhance toxin production.

SUSCEPTIBILITY TO DISINFECTANTS: Susceptible to a combination of 2,2-dibromo-2-cyanoacetamide (DBA) with sodium iodide (20:80 parts), iodine, 2 % glutaraldehyde, quaternary ammonium (20°C, 0.5 min), hypochlorite (0.525%, 20°C, 0.5 min), phenolics (20°C, 0.5 min), and ethyl alcohol (70%, 20°C, 0.5 min).

PHYSICAL INACTIVATION: Ozone can inactivate *E. coli*. *E. coli* are also sensitive to heat treatment, especially at temperatures of 70°C or higher.

SURVIVAL OUTSIDE HOST: Food and water. *E. coli* can survive for 1.5 hours to 16 months on dry inanimate surfaces.

SECTION V –FIRST AID/MEDICAL

SURVEILLANCE: Monitor for symptoms. Stool culture, immunoassays, and nucleic acid-based assays are used for detection of EIEC. As with *Shigella* spp., the loci most frequently sought in molecular tests (PCR and DNA hybridization methods) are *IpaH* and the invasion-associated locus (ial).

Note: All diagnostic methods are not necessarily available in all countries.

FIRST AID TREATMENT: Treatment with trimethoprim/sulfamethoxazole (TMP-SMX) or quinolones reduces the duration of diarrhea. Treatment of fluid and electrolyte loss is usually achieved through oral rehydration. The use of the World Health Organization Oral Rehydration Salts (ORS) solution has been recommended. Intravenous rehydration may be necessary for infants, individuals with excessive vomiting, or those with severe dehydration. Bismuth subsalicylate may decrease the amount of diarrhea and the duration of disease. Antimicrobial therapy is generally not indicated, because of the self-limited nature of this disease.

IMMUNIZATION: None.

PROPHYLAXIS: TMP-SMX is recommended for a short term (< 2 weeks) for those at a high risk of disease. Bismuth subsalicylate provides some prophylactic benefit, but should not be used as a substitute for other preventive measures.

SECTION VI - LABORATORY HAZARDS

LABORATORY ACQUIRED INFECTIONS: Twelve cases of laboratory acquired infections with *E. coli* have been reported, the majority of which have been caused by *E. coli* enterohemorrhagic (EHEC).

SOURCES / SPECIMENS: Stool, food, and water.

PRIMARY HAZARD: Ingestion.

SPECIAL HAZARD: None.

SECTION VII –EXPOSURE CONTROLS/PERSONAL PROTECTION

RISK GROUP CLASSIFICATION: Risk Group 2.

CONTAINMENT REQUIREMENTS: Containment Level 2 facilities, equipment, and operational practices for work involving infectious or potentially infectious materials, animals, or cultures.

PROTECTIVE CLOTHING: Lab coat. Gloves when direct skin contact with infected materials or animals is unavoidable. Eye protection must be used where there is a known or potential risk of exposure to splashes.

OTHER PRECAUTIONS: All procedures that may produce aerosols, or involve high concentrations or large volumes should be conducted in a biological safety cabinet (BSC). The use of needles, syringes, and other sharp objects should be strictly limited. Additional precautions should be considered with work involving animals or large scale activities.

SECTION VIII - HANDLING AND STORAGE

SPILLS: Allow aerosols to settle and, wearing protective clothing, gently cover spill with paper towels and apply an appropriate disinfectant, starting at the perimeter and working towards the centre. Allow sufficient contact time before clean up.

DISPOSAL: Decontaminate all wastes that contain or have come in contact with the infectious organism by autoclave, chemical disinfection, gamma irradiation, or incineration before disposing.

STORAGE: The infectious agent should be stored in leak-proof containers that are appropriately labeled.

SECTION IX - REGULATORY AND OTHER INFORMATION

REGULATORY INFORMATION: The import, transport, and use of pathogens in Canada is regulated under many regulatory bodies, including the Public Health Agency of Canada, Health Canada, Canadian Food Inspection Agency, Environment Canada, and Transport Canada. Users are responsible for ensuring they are compliant with all relevant acts, regulations, guidelines, and standards.

UPDATED: December 2011

PREPARED BY: Pathogen Regulation Directorate, Public Health Agency of Canada

Although the information, opinions and recommendations contained in this Pathogen Safety Data Sheet are compiled from sources believed to be reliable, we accept no responsibility for the accuracy, sufficiency, or reliability or for any loss or injury resulting from the use of the information. Newly discovered hazards are frequent and this information may not be completely up to date.

REFERENCES

- Baylis, C. L., Penn, C. W., Thielman, N. M., Guerrant, R. L., Jenkins, C., & Gillespie, S. H. (2006). *Escherichia coli* and *Shigella* spp. In S. H. Gillespie, & P. M. Hawkey (Eds.), *Principles and Practice of Clinical Bacteriology* (2nd ed., pp. 347-365). England, UK: John Wiley and Sons Ltd.
- Nataro, J. P., Bopp, C. A., Fields, P. I., Kaper, J. B., &Strockbine, N. A. (2007). Escherichia, Shigella and Salmonella. In P. R. Murray, E. J. Baron, J. H. Jorgensen, M. L. Landry & M. A. Pfaller (Eds.), *Manual of Clinical Microbiology* (9th ed., pp. 670-687). Washington, DC, USA: ASM press.
- Farmer, J. J., Boatwright, K. D., &Janda, J. M. (2007). *Enterobacteriaceae:* Introduction and Identification. In P. R. Murray, E. J. Baron, J. H. Jorgensen, M. L. Landry & M. A. Pfaller (Eds.), *Manual of Clinical Microbiology* (9th ed., pp. 649-669). Washington, DC: ASM press.
- Hsu, B. -. Wu, S. -. Huang, S. -., Tseng, Y. -., Ji, D. -., Chen, J. -., & Shih, F. -. (2010). Differentiation and identification of Shigella spp. and enteroinvasive *Escherichia coli* in environmental waters by a molecular method and biochemical test. *Water Research, 44*(3), 949-955.
- Jones, T. F. (2007). Investigation of Foodborne and Waterborne Disease Outbreaks. In P. R. Murray, E. J. Baron, J. H. Jorgensen, M. L. Landry & M. A. Pfaller (Eds.), *Manual of Clinical Microbiology* (9th ed., pp. 152-169). Washignton, DC: ASM press.
- Ryan, K. J. (2004). Enterobacteriaceae. In K. J. Ryan, & C. G. Ray (Eds.), *Sherris Medical Microbiology: Introduction to infectious diseases* (4th ed., pp. 343-371). USA: McGraw Hill.
- Wilson, W. R., Sande, M. A., & Drew, W. L. (2001). *Current diagnosis & treatment in infectious diseases*. New York: Lange Medical Books/McGraw-Hill. Retrieved from http://online.statref.com/document.aspx?FxId=66&DocID=1&grpalias=
- Jay, J. M., Loessner, M. J., & Golden, D. A. (2005). Foodborne Gastroenteritis Caused by *Escherichia coli*. *Modern food microbiology* (7th ed., pp. 637-656). NY, USA: Springer Science.
- Krauss, H., Weber, A., Appel, M., Enders, B., Isenberg, H. D., Schiefer, H. G., Slenczka, W., Graevenitz, A. V., & Zahner, H. (2003). Bacterial Zoonoses.*Zoonoses: Infectious diseases transmissible from animals to humans* (3rd ed., pp. 196-200). Washington DC: ASM press.
- Lehmann, R. H. (2001). Synergism in Disinfectant Formulation. In S. S. Block (Ed.), *Disinfectant, sterilization and preservation* (5th ed., pp. 459-472). PA, USA: Lipincott Williams and Wilkins.

Copyright ©
Health. Canadá, 2001

Anexo 20. Hoja de bioseguridad *Escherichia coli* enteropatogénica

ESCHERICHIA COLI
PATHOGEN SAFETY DATA SHEET - INFECTIOUS SUBSTANCES

SECTION I - INFECTIOUS AGENT

NAME: *Escherichia coli*, enteropathogenic

SYNONYM OR CROSS REFERENCE: EPEC, intestinal pathogenic *E coli*, acute and protracted infant diarrhea.

CHARACTERISTICS: Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) are in the family Enterobacteriaceae. The bacteria are gram negative, rod shaped, non-spore forming, motile with peritrichous flagella or nonmotile, and grow on MacConkey agar (colonies are 2 to 3 mm in diameter and red or colorless). They can grow under aerobic and anaerobic conditions and do not produce enterotoxins.

SECTION II - HEALTH HAZARD

PATHOGENICITY/TOXICITY: EPEC cause acute, profuse, watery diarrhea, which rarely becomes persistent. Stools are typically not bloody, mucoid, or dysenteric. Low-grade fever with nausea and vomiting may be present. EPEC is characterized by the formation of attaching-and-effacing lesions in the involved intestinal areas. Two groups of EPEC are now recognized, typical EPEC and atypical EPEC. Typical EPEC, a leading cause of infantile diarrhea in developing countries, is rare in industrialized countries, where atypical EPEC seems to be a more important cause of diarrhea. Typical and atypical EPEC also differ in genetic characteristics, serotypes, and virulence properties. Atypical EPEC is more closely related to Shiga toxin–producing *E. coli* (STEC), and like STEC these strains appear to be emerging pathogens. The atypical EPEC strains may be less virulent than the typical ones. One reason may be the lack of the EPEC adherence factor (EAF) plasmid.

EPIDEMIOLOGY: Typical EPEC primarily causes disease in neonates and young children, with most cases occurring in children < 2 years old and particularly in those < 6 months old. Disease may occur in adults if sufficiently high inocula are ingested. Outbreaks have occurred in pediatric wards, nurseries, and day care centers and in adults that have consumed contaminated food from a buffet. In developing countries, EPEC are highly prevalent and are an important cause of childhood diarrheal disease and dehydration-associated deaths. Studies in Brazil, Mexico, and South Africa have shown that 30–40% of infant diarrhea can be attributed to EPEC. Atypical EPEC are prevalent in both developed and developing countries. They appear to cause disease in a broader range of ages and have been associated with outbreaks in developed countries. However, the enteropathogenicity and the role of certain atypical EPEC strains is controversial. At least two case-control studies showed no statistical difference in infection rates between cases and matched controls suggesting they may be part of the normal human flora. It is likely that EPEC and atypical EPEC in particular, are vastly underreported.

HOST RANGE: Humans and animals, including cattle and horses.

INFECTIOUS DOSE: The infectious dose of EPEC in healthy adults is estimated to be 10^6organisms.

MODE OF TRANSMISSION: Contaminated food, water, and fomites serve as vehicles for the fecal/oral transmission of EPEC.

INCUBATION PERIOD: The incubation period is between 6-48 hours.

COMMUNICABILITY: Can be transmitted through direct contact with infected persons.

SECTION III - DISSEMINATION

RESERVOIR: Typical EPEC: Humans. Atypical EPEC: dogs, cats, cattle, sheep, rabbits, monkeys and humans.

ZOONOSIS: Yes. May be transmitted when handling infected cattle, dogs, cats, sheep, rabbits, and horses.

VECTORS: None.

SECTION IV – STABILITY AND VIABILITY

DRUG SUSCEPTIBILITY/RESISTANCE: Susceptible to carbapenem, fosfomycin-trometanol, nitrofurantoin, and bovine apo-lactoferrin. *E. coli* can be resistant to chloramphenicol, β lactams, nalidixic acid, ampicillin and ciprofloxacin. Fluoroquinolones such as ciprofloxacin enhance toxin production.

SUSCEPTIBILITY TO DISINFECTANTS: Susceptible to a combination of 2,2-dibromo-2-cyanoacetamide (DBA) with sodium iodide (20:80 parts), iodine, 2 % glutaraldehyde, quaternary ammonium (20°C, 0.5 min), hypochlorite (0.525%, 20°C, 0.5 min), phenolics (20°C, 0.5 min), and ethyl alcohol (70%, 20°C, 0.5 min).

PHYSICAL INACTIVATION: Ozone can inactivate *E. coli*. *E. coli* is also sensitive to heat treatment, especially at temperatures of 70°C or higher.

SURVIVAL OUTSIDE HOST: *E. coli* can survive for 1.5 hours to 16 months on dry inanimate surfaces.

SECTION V – FIRST AID/MEDICAL

SURVEILLANCE: Monitor for symptoms. Stool culture is a common method used to identify *E. coli*. DNA probes and techniques such as PCR can be applied directly to clinical samples and food. Both typical and atypical EPEC are most frequently identified by detection of the *eae* gene encoding the intimin protein. The presence of the *eae* gene and demonstration of the absence of the verotoxin (enterotoxin) gene are absolutely required for the molecular identification of EPEC. To identify typical EPEC, PCR or DNA hybridization methods can be used for detection of the EAF plasmid and the gene encoding *bfp*. Additional tests that may be performed in some situations are the fluorescent actin staining test and adherence tests showing localized adherence (LA).

Note: All diagnostic methods are not necessarily available in all countries.

FIRST AID TREATMENT: Treatment with trimethoprim/sulfamethoxazole (TMP-SMX) or quinolones reduces the duration of diarrhea. Treatment of fluid and electrolyte loss is usually achieved through oral rehydration. The use of the World Health Organization Oral Rehydration Salts (ORS) solution has been recommended. Intravenous rehydration may be necessary for infants, individuals with excessive vomiting, or those with severe dehydration. Bismuth subsalicylate may decrease the amount of diarrhea and the duration of disease. Antimicrobial therapy is generally not indicated, because of the self-limited nature of most of these diseases.

IMMUNIZATION: There are currently no vaccines approved for human use against diarrheagenic *E. coli*.

PROPHYLAXIS: TMP-SMX is recommended for short term use (< 2 weeks) for those at a high risk of disease. Bismuth subsalicylate provides some prophylactic benefit, but should not be used as a substitute for other preventive measures.

SECTION VI - LABORATORY HAZARDS

LABORATORY ACQUIRED INFECTIONS: 12 cases of laboratory acquired infections with *E. coli* have been reported, the majority of which have been caused by enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC).

SOURCES / SPECIMENS: Stools and fecally contaminated material.

PRIMARY HAZARD: Ingestion.

SPECIAL HAZARD: None.

SECTION VII – EXPOSURE CONTROLS/PERSONAL PROTECTION

RISK GROUP CLASSIFICATION: Risk Group 2.

CONTAINMENT REQUIREMENTS: Containment Level 2 facilities, equipment, and operational practices for work involving infectious or potentially infectious materials, animals, or cultures.

PROTECTIVE CLOTHING: Lab coat. Gloves when direct skin contact with infected materials or animals is unavoidable. Eye protection must be used where there is a known or potential risk of exposure to splashes.

OTHER PRECAUTIONS: All procedures that may produce aerosols, or involve high concentrations or large volumes should be conducted in a biological safety cabinet (BSC). The use of needles, syringes, and other sharp objects should be strictly limited. Additional precautions should be considered with work involving animals or large scale activities.

SECTION VIII - HANDLING AND STORAGE

SPILLS: Allow aerosols to settle and, wearing protective clothing, gently cover spill with paper towels and apply an appropriate disinfectant, starting at the perimeter and working towards the centre. Allow sufficient contact time before clean up.

DISPOSAL: Decontaminate all wastes that contain or have come in contact with the infectious organism by autoclave, chemical disinfection, gamma irradiation, or incineration before disposing.

STORAGE: The infectious agent should be stored in leak-proof containers that are appropriately labeled.

SECTION IX - REGULATORY AND OTHER INFORMATION

SECTION IX - REGULATORY AND OTHER INFORMATION

REGULATORY INFORMATION: The import, transport, and use of pathogens in Canada is regulated under many regulatory bodies, including the Public Health Agency of Canada, Health Canada, Canadian Food Inspection Agency, Environment Canada, and Transport Canada. Users are responsible for ensuring they are compliant with all relevant acts, regulations, guidelines, and standards.

UPDATED: December 2011

PREPARED BY: Pathogen Regulation Directorate, Public Health Agency of Canada

Although the information, opinions and recommendations contained in this Pathogen Safety Data Sheet are compiled from sources believed to be reliable, we accept no responsibility for the accuracy, sufficiency, or reliability or for any loss or injury resulting from the use of the information. Newly discovered hazards are frequent and this information may not be completely up to date.

Copyright ©
Public Health Agency of Canada, 2011
Canada

REFERENCES

- Wilson, W. R., Sande, M. A., & Drew, W. L. (2001). *Current diagnosis & treatment in infectious diseases*. New York: Lange Medical Books/McGraw-Hill. Retrieved from http://online.statref.com/document.aspx?FxId=66&DocID=1&grpalias=
- Nataro, J. P., Bopp, C. A., Fields, P. I., Kaper, J. B., &Strockbine, N. A. (2007). Escherichia, Shigella and Salmonella. In P. R. Murray, E. J. Baron, J. H. Jorgensen, M. L. Landry & M. A. Pfaller (Eds.), *Manual of Clinical Microbiology* (9th ed., pp. 670-687). Washington, DC, USA: ASM press.
- Baylis, C. L., Penn, C. W., Thielman, N. M., Guerrant, R. L., Jenkins, C., & Gillespie, S. H. (2006). *Escherichia coli* and *Shigella* spp. In S. H. Gillespie, & P. M. Hawkey (Eds.), *Principles and Practice of Clinical Bacteriology* (2nd ed., pp. 347-365). England, UK: John Wiley and Sons Ltd.
- Levine, Myron, & Vial, Pablo. (1988). *Escherichia coli* that cause diarrhea. *Indian Journal of Pediatrics,* (2), 183-190. doi:10.1007/BF02722179
- Farmer, J. J., Boatwright, K. D., &Janda, J. M. (2007). *Enterobacteriaceae:* Introduction and Identification. In P. R. Murray, E. J. Baron, J. H. Jorgensen, M. L. Landry & M. A. Pfaller (Eds.), *Manual of Clinical Microbiology* (9th ed., pp. 649-669). Washington, DC: ASM press.
- Stenutz, R., Weintraub, A., &Widmalm, G. (2006). The structures of *Escherichia coli* O-polysaccharide antigens. *FEMS Microbiology Reviews, 30*(3), 382-403.
- Pothoulakis, C. (2009). Review article: Anti-inflammatory mechanisms of action of Saccharomyces boulardii. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics, 30*(8), 826-833.
- Trabulsi, L. R., Keller, R., &Tardelli Gomes, T. A. (2002). Typical and atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. *Emerging Infectious Diseases, 8*(5), 508-513.
- Moura, R. A., Sircili, M. P., Leomil, L., Matte, M. H., Trabulsi, L. R., Elias, W. P., Irino, K., & Pestana de Castro, A. F. (2009). Clonal relationship among atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strains isolated from different animal species and humans. *Applied and Environmental Microbiology, 75*(23), 7399-7408. doi:10.1128/AEM.00636-09
- Afset, J. E., Bruant, G., Brousseau, R., Harel, J., Anderssen, E., Bevanger, L., & Bergh, K. (2006). Identification of virulence genes linked with diarrhea due to atypical enteropathogenic *Escherichia coli* by DNA microarray analysis and PCR.*Journal of Clinical Microbiology, 44*(10), 3703-3711. doi:10.1128/JCM.00429-06.

Copyright ©
Health. Canadá, 2001

Anexo 21. Hoja de bioseguridad *Escherichia coli* enterotoxigénica

ESCHERICHIA COLI
PATHOGEN SAFETY DATA SHEET - INFECTIOUS SUBSTANCES

SECTION I - INFECTIOUS AGENT

NAME: *Escherichia coli*, enterotoxigenic

SYNONYM OR CROSS REFERENCE: ETEC, intestinal pathogenic *E. coli*, enteric pathogen.

CHARACTERISTICS: Enterotoxigenic *Escherichia coli (ETEC)* are in the family Enterobacteriaceae. The bacteria are gram negative, rod shaped, non-spore forming, motile with peritrichous flagella or nonmotile, and grow on MacConkey agar (colonies are 2 to 3 mm in diameter and red or colorless). They are able to grow under aerobic and anaerobic conditions, and produce two types of enterotoxin: heat-labile (LT) (oligomeric) and heat-stable (ST) (monomeric).

SECTION II - HEALTH HAZARD

PATHOGENICITY/TOXICITY: Patients with ETEC enteritis usually have an abrupt onset of watery diarrhea that does not contain blood, pus, or mucus (non dysenteric). The diarrhea is usually mild to moderate in severity, but some patients may have severe fluid loss. Low-grade fever, nausea, and abdominal pain may also be present. Dehydration may become severe or life threatening in neonates and children, necessitating aggressive fluid and electrolyte replacement. A self-limited course, with resolution in 2-5 days, is most common in adult travelers who acquire the disease, though some strains of the organism may produce a disease lasting much longer, with a median duration of illness of 7 days. There are an estimated 800,000 deaths each year due to ETEC.

EPIDEMIOLOGY: Human diarrhea caused by ETEC is the most common disease caused by pathogenic *E. coli* strains. It is estimated that there are more than 650 million cases of ETEC infection each year. ETEC infections are most common in developing countries that lack appropriate sanitation and drinking-water treatment facilities but are now considered a re-emerging food- and water-borne disease in developed nations as well. In developing nations disease occurs at any time of the year, but incidence peaks in the warm, wet seasons that favor environmental bacterial replication. ETEC is a disease of young children in developing nations**.** The percentage of ETEC in children with diarrhoea varies from 10-30%. In endemic areas, 20–40% of diarrhea cases are due to ETEC. Several studies suggest that 20–60% of travellers from developed countries experience diarrhoea when visiting the areas where ETEC infection is endemic. Furthermore, several outbreaks have occurred on cruise ships, which appear to constitute a fairly frequent setting for disease caused by this organism. Outbreaks of ETEC caused by endemic strains, rather than association with travel, have occurred in the U.S. and Denmark. As with travel-associated diarrhea, disease caused by ETEC in developed nations tends to strike older children and adults.

HOST RANGE: Humans (principally neonates and travelers from non-endemic areas) and animals (production animals and post weaning diarrhea in swine). ETEC have been strongly associated with cattle, though the role of cattle as a source of strains for human infection is currently unclear.

INFECTIOUS DOSE: The infectious dose of ETEC in adult is estimated to be at least 10^8organisms, but the young, the elderly and the infirm may be susceptible to lower numbers.

MODE OF TRANSMISSION: ETEC are spread primarily by the fecal-oral route and are most common in developing countries that lack appropriate sanitation and drinking-water treatment facilities. The most important mode of transmission is contaminated, improperly treated drinking water. Fruits and vegetables that are washed with contaminated water and not cooked also serve as vehicles of transmission. Person-to-person spread is uncommon.

INCUBATION PERIOD: The incubation period is short at between 14 and 30 hours.

COMMUNICABILITY: Person-to-person infection can occur, but is uncommon because the infectious dose is high.

SECTION III - DISSEMINATION

RESERVOIR: Humans and animals (especially post weaning pigs).

ZOONOSIS: None reported.

VECTORS: None.

SECTION IV – STABILITY AND VIABILITY

DRUG SUSCEPTIBILITY/RESISTANCE: Susceptible to carbapenem, fosfomycin-trometanol, nitrofurantoin, and bovine apo-lactoferrin. *E. coli* can be resistant to chloramphenicol, β lactams, nalidixic acid, ampicillin, and ciprofloxacin. Fluoroquinolones such as ciprofloxacin enhance toxin production.

SUSCEPTIBILITY TO DISINFECTANTS: Susceptible to a combination of 2,2-dibromo-2-cyanoacetamide (DBA) with sodium iodide (20:80 parts), iodine, 2 % glutaraldehyde, quaternary ammonium (20°C, 0.5 min), hypochlorite (0.525%, 20°C, 0.5 min), phenolic (20°C, 0.5 min), and ethyl alcohol (70%, 20°C, 0.5 min).

PHYSICAL INACTIVATION: Ozone can inactivate *E. coli*. *E. coli* are also sensitive to heat treatment, especially at temperatures of 70°C or higher.

SURVIVAL OUTSIDE HOST: *E. coli* can survive for 1.5 hours to 16 months on dry inanimate surfaces.

SECTION V – FIRST AID/MEDICAL

SURVEILLANCE: Monitor for symptoms. Stool culture is a common method used to identify *E. coli*. ETEC can be detected using non-radioactively labeled oligonucleotides DNA probes and PCR targeted against the LT and ST genes. ELISA can also be used to detect LT and ST.

Note: All diagnostic methods are not necessarily available in all countries.

FIRST AID TREATMENT: Treatment with trimethoprim/sulfamethoxazole (TMP-SMX) or quinolones reduces the duration of diarrhea. Treatment of fluid and electrolyte loss is usually achieved through oral rehydration. The use of the World Health Organization Oral Rehydration Salts (ORS) solution has been recommended. Intravenous rehydration may be necessary for infants, individuals with excessive vomiting, or those with severe dehydration. Bismuth subsalicylate may decrease the amount of diarrhea and the duration of disease. Antimicrobial therapy is generally not indicated, because of the self-limited nature of this disease.

IMMUNIZATION: There are currently no vaccines approved for human use against the diarrheagenic *E coli*.

PROPHYLAXIS: TMP-SMX is recommended for a short term (< 2 weeks) for those at a high risk of disease. Bismuth subsalicylate provides some prophylactic benefit, but should not be used as a substitute for other preventive measures.

SECTION VI - LABORATORY HAZARDS

LABORATORY ACQUIRED INFECTIONS: 12 cases of laboratory acquired infections with *E. coli* have been reported, the majority have been caused by enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC).

SOURCES/SPECIMENS: Stools and fecally contaminated material.

PRIMARY HAZARD: Ingestion.

SPECIAL HAZARD: None.

SECTION VII – EXPOSURE CONTROLS/PERSONAL PROTECTION

LABORATORY ACQUIRED INFECTIONS: 12 cases of laboratory acquired infections with *E. coli* have been reported, the majority have been caused by enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC).

SOURCES/SPECIMENS: Stools and fecally contaminated material.

PRIMARY HAZARD: Ingestion.

SPECIAL HAZARD: None.

SECTION VIII - HANDLING AND STORAGE

SPILLS: Allow aerosols to settle and, wearing protective clothing, gently cover spill with paper towels and apply an appropriate disinfectant, starting at the perimeter and working towards the centre. Allow sufficient contact time before clean up.

DISPOSAL: Decontaminate all wastes that contain or have come in contact with the infectious organism by autoclave, chemical disinfection, gamma irradiation, or incineration before disposing.

STORAGE: The infectious agent should be stored in leak-proof containers that are appropriately labeled.

SECTION IX - REGULATORY AND OTHER INFORMATION

REGULATORY INFORMATION: The import, transport, and use of pathogens in Canada is regulated under many regulatory bodies, including the Public Health Agency of Canada, Health Canada, Canadian Food Inspection Agency, Environment

Canada, and Transport Canada. Users are responsible for ensuring they are compliant with all relevant acts, regulations, guidelines, and standards.

UPDATED: December 2011

PREPARED BY: Pathogen Regulation Directorate, Public Health Agency of Canada

Although the information, opinions and recommendations contained in this Pathogen Safety Data Sheet are compiled from sources believed to be reliable, we accept no responsibility for the accuracy, sufficiency, or reliability or for any loss or injury resulting from the use of the information. Newly discovered hazards are frequent and this information may not be completely up to date.

Copyright ©
Public Health Agency of Canada, 2011
Canada

REFERENCES

- Wilson, W. R., Sande, M. A., & Drew, W. L. (2001). *Current diagnosis & treatment in infectious diseases*. New York: Lange Medical Books/McGraw-Hill. Retrieved from http://online.statref.com/document.aspx?FxId=66&DocID=1&grpalias=
- Baylis, C. L., Penn, C. W., Thielman, N. M., Guerrant, R. L., Jenkins, C., & Gillespie, S. H. (2006). *Escherichia coli* and *Shigella* spp. In S. H. Gillespie, & P. M. Hawkey (Eds.), *Principles and Practice of Clinical Bacteriology* (2nd ed., pp. 347-365). England, UK: John Wiley and Sons Ltd.
- Nataro, J. P., Bopp, C. A., Fields, P. I., Kaper, J. B., &Strockbine, N. A. (2007). Escherichia, Shigella and Salmonella. In P. R. Murray, E. J. Baron, J. H. Jorgensen, M. L. Landry & M. A. Pfaller (Eds.), *Manual of Clinical Microbiology* (9th ed., pp. 670-687). Washington, DC, USA: ASM press.
- Farmer, J. J., Boatwright, K. D., &Janda, J. M. (2007). *Enterobacteriaceae:* Introduction and Identification. In P. R. Murray, E. J. Baron, J. H. Jorgensen, M. L. Landry & M. A. Pfaller (Eds.), *Manual of Clinical Microbiology* (9th ed., pp. 649-669). Washington, DC: ASM press.
- Chao, H. -. Chen, C. -., Chen, S. -., & Chiu, C. -. (2006). Bacterial enteric infections in children: Etiology, clinical manifestations and antimicrobial therapy. *Expert Review of Anti-Infective Therapy, 4*(4), 629-638.
- Yoder, J. S., Cesario, S., Plotkin, V., Ma, X., Kelly-Shannon, K., & Dworkin, M. S. (2006). Outbreak of enterotoxigenic *Escherichia coli* infection with an unusually long duration of illness. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America, 42*(11), 1513-1517. doi:10.1086/503842
- Johnson, T. J., & Nolan, L. K. (2009). Pathogenomics of the virulence plasmids of *Escherichia coli*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews, 73*(4), 750-774.
- Stenutz, R., Weintraub, A., &Widmalm, G. (2006). The structures of *Escherichia coli* O-polysaccharide antigens. *FEMS Microbiology Reviews, 30*(3), 382-403.
- Daniels, N. A., Neimann, J., Karpati, A., Parashar, U. D., Greene, K. D., Wells, J. G., Srivastava, A., Tauxe, R. V., Mintz, E. D., & Quick, R. (2000). Traveler's diarrhea at sea: three outbreaks of waterborne enterotoxigenic *Escherichia coli* on cruise ships. *The Journal of Infectious Diseases, 181*(4), 1491-1495. doi:10.1086/315397
- Beatty, M. E., Adcock, P. M., Smith, S. W., Quinlan, K., Kamimoto, L. A., Rowe, S. Y., Scott, K., Conover, C., Varchmin, T., Bopp, C. A., Greene, K. D., Bibb, B., Slutsker, L., &Mintz, E. D. (2006). Epidemic diarrhea due to enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America, 42*(3), 329-334. doi:10.1086/499246

Anexo 22. Formulario de Bioseguridad

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE HONDURAS
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE MICROBIOLOGÍA
MAESTRÍA EN ENFERMEDADES INFECCIOSAS Y ZOONÓTICAS

FORMULARIO DE BIOSEGURIDAD PROMOCIÓN 2015-2017

Si tiene alguna consulta o requiere asistencia para completar este formulario, favor contactar a la Oficial de Bioseguridad de la MEIZ al correo electrónico <lourdesenriquez10@gmail.com>

Datos Generales	
Nombre de proyecto: Caracterización molecular de cepas de *Escherichia coli* de diferentes procedencias	Departamento o unidad ejecutora:
Alumno (s) responsable de la investigación: Jeniffer Denisse Fiallos López	Asesor (s) responsable: María de Lourdes Enríquez M.Sc.
Laboratorio (s) en que se llevará a cabo la investigación: Laboratorio Teasdale-Corti, Edificio J1-UNAH Laboratorio de biología molecular, Edificio J1-UNAH	Instituciones participantes:
Naturaleza de la Investigación	
Nombre de los agentes infecciosos que manipulará: *Escherichia coli* enteropatogénica (EPEC), *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC), *Escherichia coli* enterotoxigénica(ETEC), *Escherichia coli* enteroinvasiva EIEC, *Escherichia coli*(STEC)	¿En qué nivel de riesgo están clasificados Los agentes infecciosos que manipulará? 1 ☐ 2 ☒ 3 ☐ 4 ☐

Toda muestra biológica se considera potencialmente infecciosa por lo que deberán tratarse como si lo estuvieran

¿Cuenta con las hojas de seguridad (MSDS) impresas de los agentes que manipulará?

Sí [X] No [ ]

¿Cuál es el nivel de bioseguridad con que trabaja el laboratorio en el que desarrollará la investigación?

1 [ ] 2 [X] 3 [ ] 4 [ ]

¿Utilizará reactivos químicos?

Sí [X] No [ ]

Enumere las sustancias químicas que utilizará con mayor frecuencia

Tiocianato de guanidinio

Bromuro de etidio

Agarosa

Cloro

¿Cuenta con las hojas de seguridad (MSDS) de los reactivos químicos que utilizará?

Sí [X] No [ ]

Revisar las MSDS de cada reactivo y comentar su riesgo potencial y las medidas básicas de seguridad si es necesario

Reactivos con riesgo a la salud de tipo 1 a 4, se necesita campana de gases para su uso. EPP basico: gabacha, gafas, guantes y mascarilla.

¿En qué estado manipulará el o los agentes infecciosos?

Cultivos puros en placa [X] Cultivos en tubo [X]

ADN [X] Cultivo de tejidos [ ]

Otros [ ]

No Aplica

Tipo de muestras que manipulará

Tejidos N/A

Sangre N/A

Orina N/A

Animales N/A

Heces [ ]

Otros líquidos biológicos [ ]

Muestras ambientales* [X]

Cultivos puros [X]

Otras _____

*Tipo de muestras ambientales

Cultivos de *Escherichia coli* aisladas de fuentes de agua y alimentos

Describa las técnicas que utilizará

Extraccion de acidos nucleicos de cepas de *Escherichia coli*mediante el metodo de Boom utilizando agente caotropico de tiocianato de guanidinio. Amplificacion de genes que codifican

para los factores de virulencia de cinco patotipos diarreogenicos. PCR para categorizar cepas en diferentes grupos filogeneticos de *Escherichia coli*.

CONTROLES PRIMARIOS

Controles de Ingenieria

¿El laboratorio en que desarrollarà la investigaciòn cuenta con cabina de seguridad biològica? Si [X] No [ ] Si su respuesta es negativa ¿Cómo suplirá esta carencia?	¿El laboratorio en que desarrollarà la investigaciòn cuenta con autoclave dentro del laboratorio? Si [X] No [ ] Si su respuesta es negativa ¿Cómo suplirá esta carencia?
¿El laboratorio en que desarrollarà la investigaciòn cuenta con campana de seguridad quìmica? Si [X] No [ ] Si su respuesta es negativa ¿Cómo suplirá esta carencia?	¿El laboratorio en que desarrollarà la investigaciòn cuenta con espacio adecuado para realizar la investigaciòn? Si [X] N[ ] Si su respuesta es negativa ¿Cómo suplirá esta carencia?

Equipo de Protección Personal (EPP)

¿Qué tipo Equipo y materiales de protección personal usará en su investigación?

Gabacha [X] [X] Cabina de bioseguridad [X]

Mascarilla quirúrgica [X] Mascarilla N95L[ ]s [X]

Procedimientos Operativos Estándar (POE)

¿Cuenta con los POE`s siguientes?	Si	No	No aplica
1.- Toma de muestras			X
2.- Manejo de desechos bioinfecciosos		X	
3.- Transporte de muestras			X
4.- Uso de la CSB	X		
5.- Almacenamiento de muestras	X		

6.- Puesta y quitado de EPP	X		
7.- Limpieza de derrames	X		
8.-Otro:			
Controles Administrativos			
	Si	No	No aplica
1.- ¿Ha recibido entrenamiento para el uso de la CSB?	X		
2.- ¿Ha recibido entrenamiento para el uso de la autoclave?	X		
3.- ¿Ha recibido entrenamiento para puesta y quitado de EPP?	X		
4.- ¿Ha recibido entrenamiento para limpieza de derrames?	X		
5.- ¿Ha sido vacunado contra la Hepatitis B?	X		
6.- ¿Ha recibido entrenamiento para el uso de la campana de seguridad química?	X		
7.- ¿Conoce las características químicas de los reactivos que utilizará en la investigación	X		
8.- Otros			

Este formulario será remitido la Oficial de Bioseguridad de la MEIZ, quien tendrá a su cargo asegurarse de que el proyecto sea implementado con las normas de seguridad biológica apropiadas para el nivel de riesgo. **La presentación de este formulario es requisito obligatorio antes de la aprobación del protocolo de investigación (Seminario de Tesis II).**

Para uso exclusivo de la MEIZ. UNAH

Fecha de presentación (dd/mm/aaaa)	Nombre y firma de quien revisó	Observaciones
04/02/2016		

_____

Revisión 2015 MC/LE