



INFORME BREVE

Caracterización molecular de aislamientos de *Escherichia coli* productores de toxina Shiga obtenidos en 2 establecimientos ganaderos del Paraguay



Sofía M. Rivelli Zea^a, Nora L. Padola^b, Analía I. Etcheverría^b, Melisa Florentín^a, Patricia Acuña^a, Fátima Rodríguez^a, Rocío Colello^b y Rosa M. Guillén Fretes^{a,*}

^a Departamento de Microbiología, Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud, UNA, San Lorenzo, Paraguay

^b Laboratorio de Inmunoquímica y Biotecnología, Facultad de Ciencias Veterinarias, CIVETAN-UNCPBA-CONICET-CIC, Tandil, Argentina

Recibido el 3 de enero de 2019; aceptado el 16 de julio de 2019

Disponible en Internet el 18 de octubre de 2019

PALABRAS CLAVE

Escherichia coli
productora de toxina
Shiga;
Ganado bovino;
Paraguay

KEYWORDS

Shiga toxin-producing
Escherichia coli;
Cattle;
Paraguay

Resumen *Escherichia coli* productora de toxina Shiga (STEC) es un patógeno de importancia alimentaria en los humanos, el bovino es su principal reservorio. El objetivo de este estudio fue determinar la portación de STEC en bovinos del Paraguay y analizar el perfil de virulencia y los serotipos de los aislados reunidos. Se estudiaron 197 muestras de hisopado rectal de bovinos y un promedio de 5 a 50 colonias por bovino positivo a genes *stx*₁/*stx*₂. Se amplificaron por PCR los genes *stx*₁, *stx*₂, *saa*, *ehxA* y *eae*. El 84,8% de los bovinos resultaron portadores de STEC. Los perfiles de virulencia predominantes fueron *stx*₂ y *stx*₂/*saa/ehxA*. La serotipificación se realizó por reacciones de aglutinación en 60 aislamientos seleccionados, se encontró un aislamiento del serogrupo O103, capaz de producir infecciones en humanos. Este trabajo muestra los primeros datos de portación de STEC de ganado bovino paraguayo y señala la necesidad de efectuar otros estudios con mayor cobertura territorial, para lograr una visión completa de este fenómeno.

© 2019 Asociación Argentina de Microbiología. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Este es un artículo Open Access bajo la licencia CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Molecular characterization of Shiga toxin producing *Escherichia coli* isolated from 2 livestock establishments of Paraguay

Abstract Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) is a food-borne pathogen in humans, with cattle being the main reservoir. The objective of this study was to determine the carrying of STEC in Paraguayan bovines and to analyze the virulence profile and serotypes of these isolates. A total of 197 samples of bovine fecal samples and an average of 5 to 50 colonies from

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: rmguillen@gmail.com (R.M. Guillén Fretes).

*stx*₁/*stx*₂ positive samples were studied. The *stx*₁, *stx*₂, *saa*, *ehxA* and *eae* genes were amplified by PCR. 84.8% of the cattle were carriers of STEC. The predominant virulence profiles were *stx*₂ and *stx*₂/*saa*/*ehxA*. The serotyping was performed by agglutination reactions for 60 selected isolates, resulting in isolation of serogroup O103, which could produce infections in humans. This work shows the first data of STEC carriers in Paraguayan cattle, and indicates the need for other studies with greater territorial coverage for a complete vision of this phenomenon.

© 2019 Asociación Argentina de Microbiología. Published by Elsevier España, S.L.U. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Escherichia coli productora de toxina Shiga (STEC) se caracteriza por la producción de 2 variantes de potentes citotoxinas llamadas toxinas Shiga 1 y Shiga 2. Las toxinas Shiga pueden producir graves enfermedades, como colitis hemorrágica y síndrome urémico hemolítico (SUH). Asimismo, la presencia de otros factores de virulencia puede aumentar la patogenicidad de las STEC⁸. Uno de ellos es la intimina, codificada por el gen cromosómico *eae* e implicada en la adhesión a los enterocitos, lo que provoca lesiones de adhesión y barrido. Otros 2 importantes factores de virulencia son la enterohemolisina, codificada por el gen *ehxA* e implicada en la lisis de eritrocitos, y la proteína de adhesión autoaglutinante, codificada por el gen *saa*⁸.

El ganado bovino es un reservorio natural de STEC; una de las vías de transmisión de este patógeno es el consumo de alimentos contaminados, como la carne mal cocida. La dosis infectiva para el humano es muy baja, lo que redundará en altas tasas de infección y transmisión a las personas⁷.

La industria cárnica representa uno de los ingresos más importantes del Paraguay; este país se encuentra entre los 10 primeros puestos como exportador de carne bovina a nivel mundial¹⁵. Si bien muchas acciones se centran en el aseguramiento de la sanidad animal y la inocuidad de los productos de origen animal, no existen datos sobre la portación de STEC en ganado en pie. El presente trabajo tuvo como objetivo determinar la portación de STEC en bovinos de 2 establecimientos ganaderos de distintas regiones del país y caracterizar el perfil de virulencia de dichos aislamientos, así como el serogrupo de aislamientos representativos.

Este estudio descriptivo de corte transversal contó con la aprobación de los comités científicos y de ética del IICS (código P06/2013). Las muestras fueron colectadas en el año 2013 por hisopado rectal de 197 bovinos de aptitud carnífera de 1 a 4 años, alimentados con pastura natural, pertenecientes a 2 establecimientos ganaderos de explotación extensiva localizados en los departamentos de Presidente Hayes (n = 98, raza Brangus) y Paraguari (n = 99, raza Nelore). La selección de los animales fue aleatoria simple, hasta alcanzar aproximadamente el 10% del total de cabezas de ganado de cada establecimiento.

Las muestras fueron cultivadas en medio MacConkey-sorbitol a 37 °C durante 24 h. De la zona de confluencia del cultivo se realizó la extracción de ADN y la criopreservación a -80 °C en medio BHI glicerol al 15%. La extracción de ADN se realizó por el método de ebullición descrito por Ennis

et al.⁶, con una modificación consistente en la incubación en hielo durante 5 min después de la fase de hervido.

El ADN obtenido de la zona de confluencia del cultivo del hisopado rectal se sometió a amplificación por PCR de los genes *stx*₁, *stx*₂ y *rfb*_{O157}. Aquellas muestras que resultaron positivas fueron cultivadas en medio LB agar para el aislamiento de colonias. Se analizaron de 5 a 50 colonias de *E. coli* por bovino, que fueron identificadas previamente por pruebas bioquímicas. Estas se sometieron a amplificación de los genes *stx*₁, *stx*₂, *eae*, *saa*, *ehxA* y *rfb*_{O157}. Las condiciones de PCR empleadas fueron las descritas por Padola et al.¹³. Los productos de PCR fueron visualizados por electroforesis en gel de agarosa al 2% (Thermo Scientific, Waltham, EE. UU.) con tinción de bromuro de etidio (3 µg/ml). Los tamaños de los productos se estimaron por comparación con un marcador de peso molecular de 100 pb (Bioline, Londres, Reino Unido).

Para la serotipificación se seleccionaron aislamientos STEC con perfiles de virulencia diferentes, representativos de cada bovino portador, lo que originó un total de 60 aislamientos. La determinación de los serotipos se hizo con antisueros adquiridos al laboratorio de referencia de *E. coli* de Lugo, España. El protocolo empleado para la identificación del antígeno O fue el descrito por Guinée et al.⁹. Los antisueros a los cuales se enfrentaron los aislamientos corresponden a los designados desde O1 hasta O185, con excepción de los siguientes: O2, O9, O11, O15, O16, O38, O45, O139, O143, O146, O147, O149, O152, O158, O163 y O175.

La proporción de STEC en los 197 bovinos en estudio fue del 84,8% (n = 167). La portación de los factores de virulencia mostró unas frecuencias para los genes *saa*, *ehxA* y *eae* del 77,7% (153/197), el 84,3% (166/197) y el 13,2% (26/197), respectivamente. El gen *rfb*_{O157} no fue detectado en ninguno de los bovinos. El análisis de aislamientos individuales a partir de los bovinos portadores de STEC permitió la caracterización de 13 perfiles de virulencia distintos, de los cuales 9 incluían *stx*₂; fue este el determinante genético más frecuente dentro de los factores de virulencia detectados.

En el establecimiento 1, ubicado en el departamento de Presidente Hayes, el perfil de virulencia mayoritario estuvo constituido por el gen *stx*₂ solo, que fue hallado en el 58,8% (50/85) de los aislamientos, seguido del perfil *stx*₁/*stx*₂, con el 20,0% (17/85). En el establecimiento 2, ubicado en el departamento de Paraguari, el perfil más frecuente fue

Tabla 1 Perfiles de virulencia de los aislamientos STEC obtenidos de bovinos de 2 establecimientos ganaderos del Paraguay

Perfiles de virulencia	Establecimiento 1 (Dpto. Pte. Hayes) n = 85 n (%)	Establecimiento 2 (Dpto. Paraguari) n = 82 n (%)	Total (n = 167) n (%)
<i>stx₂</i>	50(58,8)	3(3,6)	53 (31,7)
<i>stx₂/saa/ehxA</i>	3(3,5)	18(22,0)	21 (12,6)
<i>stx₁/stx₂/saa/ehxA</i>	3(3,5)	13(15,8)	16 (9,6)
<i>stx₁/stx₂</i>	17(20,0)	7(8,6)	24 (14,4)
<i>stx₂/saa</i>	7(8,2)	1(1,2)	8 (4,8)
<i>stx₂/ehxA</i>	1(1,2)	8(9,7)	9 (5,4)
<i>stx₁/stx₂/ehxA</i>	ND-	7(8,6)	7 (4,2)
<i>stx₁/stx₂/saa</i>	2(2,4)	4(4,9)	6 (3,6)
<i>stx₂/eae</i>	1(1,2)	ND-	1 (0,5)
<i>stx₂</i>	1(1,2)	7(8,6)	8 (4,8)
<i>stx₁/ehxA</i>	ND-	6(7,3)	6 (3,6)
<i>stx₁/saa/ehxA</i>	ND-	6(7,3)	6 (3,6)
<i>stx₁/saa</i>	ND-	2(2,4)	2 (1,2)

ND: no detectado.

stx₂/saa/ehxA, detectado en el 22% (18/82) de los aislamientos estudiados, seguido del perfil conformado por los genes *stx₁/stx₂/saa/ehxA*, presente en el 15,8% (13/82) de los aislamientos (tabla 1).

Se observó una gran variabilidad en cuanto a los serotipos detectados en los 60 aislamientos STEC representativos de los bovinos portadores (cuyos perfiles de virulencia también fueron diversos): se encontraron 27 serotipos diferentes, entre ellos el O103, que se encuentra dentro del grupo llamado *big six*, relacionado con brotes graves (tabla 2).

Este trabajo aporta los primeros datos de prevalencia de STEC en ganado bovino de Paraguay, que alcanzó niveles del 84,8%. Esto es ligeramente superior a lo reportado en un estudio realizado en Argentina, en el que se informa una prevalencia del 62,7%¹³.

La presencia de STEC en bovinos pone de manifiesto un potencial factor de riesgo para la salud, debido a la eventual contaminación durante los procesos de faenado y despiece, o la contaminación de agua o alimentos por contacto con la materia fecal de los bovinos portadores, entre otros¹⁰. Por lo tanto, este estudio aporta datos que fortalecen la justificación de buenas prácticas en todas las etapas de la cría y la producción cárnica.

La detección de *stx₂* como perfil de virulencia más frecuente, seguido por el perfil conformado por los genes *stx₁/stx₂*, es un hecho relevante, ya que ciertos estudios señalan que la expresión de *stx₂* potenciaría en unas 400 veces la patogenicidad con respecto a aquellas cepas que portan únicamente el gen *stx₁*. Los perfiles de virulencia hallados son similares a los reportados en Argentina por Blanco et al.¹, quienes informaron que la mayoría de las cepas STEC portaban *stx₂*. Leotta et al.¹² demostraron que la portación del gen *stx₂* reviste mayor importancia que la del gen *stx₁*, en el desarrollo de los cuadros clínicos más graves por infección con STEC.

La frecuencia de portación del gen *eae* en los aislamientos de *E. coli* alcanzó el 13,2% de las muestras analizadas y fue inferior con respecto a lo reportado en otros estudios⁶. Por otro lado, el hecho de haber encontrado solo

un aislamiento portador de la combinación *stx₂/eae* podría considerarse positivo para el país y su industria cárnica, ya que la presencia de esta combinación de genes es empleada por entidades como la *European Food Safety Authority* para categorizar los alimentos en sus 3 niveles de riesgo, así como por el *Food Safety and Inspection Service* del USDA para clasificar las STEC de acuerdo con la gravedad de las enfermedades que provocan^{5,11}. Esta pequeña proporción podría estar relacionada con la baja prevalencia del SUH que se registra en el país.

No se detectó la presencia de STEC O157 en los aislamientos obtenidos en esta investigación. Si bien no se han empleado técnicas de concentración o inmunomagnéticas, nuestros resultados se diferencian de otros obtenidos con similar metodología en Argentina, en los que se informa la presencia de STEC O157 en el 6,8% de los bovinos en estudio¹³. Este serogrupo representa uno de los más importantes dentro de los causantes de SUH en el mundo y al cual se le atribuye el mayor número de brotes graves registrados por el CDC desde 2006 hasta la actualidad¹⁴.

Aunque la República del Paraguay cuenta con un sistema de vigilancia de enfermedades diarreicas dependientes del Ministerio de Salud, la información publicada sobre la detección de STEC en humanos se restringe a un estudio puntual en niños, donde este patotipo se detectó en el 4%². Asimismo, existen pocos reportes en los que se informen casos de SUH; uno de ellos, publicado por Chamorro Noceda en 2009, da cuenta de un niño de 2 años infectado por el consumo de un alimento contaminado con el serotipo O157:H7⁴.

La incidencia de cuadros graves desencadenados por cepas no O157 ha aumentado, principalmente a causa de aislamientos del grupo denominado *big six*, que incluye los serogrupos O26, O45, O103, O111, O121 y O145³. En este trabajo se detectó en una baja frecuencia solo el serotipo O103. Sin embargo, también se detectaron otros serotipos que han sido aislados de casos de SUH (O8:H19, O91:H21 y O178:H19)⁸.

La proporción de STEC presente en el ganado bovino estudiado superó el 80%, con predominio de aislamientos

Tabla 2 Serotipos y genes de virulencia de 60 aislamientos de STEC bovino

Serotipo	Número de aislamientos	<i>stx</i> ₁	<i>stx</i> ₂	<i>eae</i>	<i>ehxA</i>	<i>saa</i>
O8:H19	1	+	+	—	+	+
O8:H19	1	+	+	—	+	—
O8:H19	1	+	+	—	—	+
O8:H19	1	+	+	+	—	+
O39:H49	4	+	+	—	+	+
O48:H7	1	+	+	—	+	+
O48:H7	1	+	—	—	+	+
O82:H7	1	+	+	+	+	+
O91:H21	3	+	+	—	+	+
O91:H21	1	+	+	+	+	+
O96:H19	1	—	+	—	+	+
O103:H42	1	+	+	—	+	+
O110:H21	1	+	+	—	+	+
O110:H28	1	+	+	—	+	—
O110:H28	1	+	—	—	+	+
O116:H21	1	+	+	—	+	+
O140:H21	1	+	+	—	+	+
O141:H49	1	—	+	—	+	+
O141:H2	1	—	+	—	+	+
O141:H16	1	+	—	—	+	+
O141:H7	1	—	+	—	+	+
O141:H7	1	+	+	—	+	+
O153:H41	1	—	+	—	+	+
O153:H41	1	+	+	—	+	+
O174:H28	1	—	+	—	+	+
O178:H19	1	—	+	—	+	+
O179:H8	1	—	+	—	+	+
O(NT):H7	2	+	+	—	+	—
O(NT):H7	1	+	+	—	—	+
O(NT):H7	1	+	+	—	+	+
O(NT):H12	1	+	—	—	+	+
O(NT):H18	2	+	—	—	+	+
O(NT):H21	3	+	+	—	+	+
O(NT):H21	1	+	—	—	—	+
O(NT):H21	1	+	+	—	—	+
O(NT):H21	1	+	+	+	+	+
O(NT):H21	1	—	+	—	+	+
O(NT):H21	1	—	+	+	+	+
O(NT):H28	2	+	+	—	+	+
O(NT):H28	2	+	—	—	+	+
O(NT):H34	2	+	+	—	+	+
O(NT):H41	1	+	—	—	+	+
O(NT):H46	1	+	+	—	+	+
O(NT):H?	1	+	—	+	+	+
O(NT):H?	1	—	+	—	—	+
O(NT):H(NM)	1	+	+	—	+	+
O(NT):H(NM)	1	+	+	—	—	+

H?: no determinado; NM: no móvil; NT: no tipable.

no O157 LEE negativos, portadores de *stx*₂. Como perspectiva, en un futuro próximo se propone realizar estudios en un mayor número de establecimientos y extendiendo la cobertura territorial, para ahondar en el análisis de la portación de STEC, así como abordar la búsqueda de otros factores de virulencia asociados a STEC LEE negativos.

Financiación

El presente trabajo contó con financiación del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), proyecto 14-INV-309, 2014.

Conflicto de intereses

Los autores del manuscrito declaran que no existe ningún potencial conflicto de interés relacionado con el artículo.

Bibliografía

1. Blanco M, Padola NL, Krüger A, Sanz ME, Blanco JE, González EA, et al. Virulence genes and intimin types of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* isolated from cattle and beef products in Argentina. *Int Microbiol*. 2004;7:269–76.
2. Canata MG, Navarro R, Velázquez G, Rivelli S, Rodríguez F, Céspedes A, et al. Molecular characterization of virulence factors of *Escherichia coli* isolates obtained from feces of children with gastroenteritis at the Institute for Social Welfare Central Hospital in 2012. *Pediatr (Asuncion)*. 2016;43:13–7.
3. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). National Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) Surveillance Overview. Atlanta, Georgia: US Department of Health and Human Services, CDC; 2012. p. 4.
4. Chamorro Noceda LA. Hemolytic uremic syndrome caused by Shiga toxin type 2 produced by enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7: First case described in Paraguay. *Pediatr (Asuncion)*. 2009;36:127–32.
5. EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ). Scientific Opinion on VTEC-seropathotype and scientific criteria regarding pathogenicity assessment. *EFSA J*. 2013;11:106.
6. Ennis C, McDowell D, Bolton DJ. The prevalence, distribution and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) serotypes and virulotypes from a cluster of bovine farms. *J Appl Microbiol*. 2012;113:1238–48.
7. Etcheverría AI, Padola NL. Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *Virulence*. 2013;4:366–72.
8. Ferreira MRA, dos S. Silva T, Stella AE, Conceição FR, dos Reis EF, Moreira CN. Detection of virulence factors and antimicrobial resistance patterns in shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolates from sheep. *Pesq Vet Bras*. 2015;35:775–80.
9. Guinée PAM, Jansen WH, Wadström T, Sellwood R. *Escherichia coli* associated with neonatal diarrhoea in piglets and calves. En: de Leeuw PW, Guinée PAM, editores. *Laboratory diagnosis in neonatal calf and pig diarrhoea*. Dordrecht: Springer; 1981. p. 126–62.
10. Hong S, Oh K-H, Cho S-H, Kim J-C, Park M-S, Lim H-S, et al. Asymptomatic healthy slaughterhouse workers in South Korea carrying Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2009;56:41–7.
11. Karmali MA, Mascarenhas M, Shen S, Ziebell K, Johnson S, Reid-Smith R, et al. Association of genomic O island 122 of *Escherichia coli* EDL 933 with verocytotoxin-producing *Escherichia coli* seropathotypes that are linked to epidemic and/or serious disease. *J Clin Microbiol*. 2003;41:4930–40.
12. Leotta GA, Miliwebsky ES, Chinen I, Espinosa EM, Azzopardi K, Tennant SM, et al. Characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 strains isolated from humans in Argentina, Australia and New Zealand. *BMC Microbiol*. 2008;8:46.
13. Padola NL, Sanz ME, Blanco JE, Blanco M, Blanco J, Etcheverría AI, et al. Serotypes and virulence genes of bovine Shigatoxigenic *Escherichia coli* (STEC) isolated from a feedlot in Argentina. *Vet Microbiol*. 2004;100:3–9.
14. Reports of selected *E. coli* outbreak investigations. [cdc.gov.net \[Internet\]](http://www.cdc.gov/ecoli/outbreaks.html). 2017 [actualizado Dic 2018; consultado Mar 2017]. Disponible en: <https://www.cdc.gov/ecoli/outbreaks.html>.
15. [Senacsa.gov.net \[Internet\]](http://www.senacsa.gov.py/index.php/areas-de-interes/productos-y-subproductos-de-origen-animal). Paraguay: SENACSA, Productos y subproductos de origen animal; 2018 [actualizado 10 Dic 2018; consultado 10 Mar 2017]. Disponible en: <http://www.senacsa.gov.py/index.php/areas-de-interes/productos-y-subproductos-de-origen-animal>.