Características fenotípicas y genotípicas de cepas de *Escherichia coli* productoras de toxina Shiga (STEC) recuperadas de media canales bovinas en Uruguay

Paula Mussio(*)[1], Santiago Ultra[1], Lucía Trujillo[2], Sylvia Vázquez[3], Armando Navarro[4], Gerardo Leotta[5], Juan Manuel Burghi[6], María de la Paz Xavier[6], Carlos Méndez[7], Fernando Massa[8], Pablo Rovira[9], Ana María Maquieira[1], Inés Martínez[10], Santiago Luzardo[11], Gustavo Varela[3]

(*) paumussio@gmail.com

(1) Laboratorio Tecnológico del Uruguay, Departamento de Microbiología, Avenida Italia 6201. CP 11500, Montevideo, Uruguay
(2) Universidad de la República, Acuicultura y Patología de Organismos Acuáticos, Facultad de Veterinaria, Alberto Laspiaces 1620-11600, Montevideo, Uruguay
(3) Universidad de la República, Bacteriología y Virología, Facultad de Medicina, Alfredo Navarro 3051, Montevideo, Uruguay
(4) Universidad Autónoma de México, Salud Pública, Medicina, Av. Universidad 3000 Ciudad Universitaria Coyoacán 04510, DF México, México
(5) Instituto de Genética Veterinaria "Ing. Fernando N. Dulout" (UNLP-CONICET LA PLATA), Facultad de Ciencias Veterinarias UNLP, La Plata, Argentina
(6) Instituto Nacional de Carnes, Gerencia de Contralor, Rincón 545, 11000, Montevideo, Uruguay
(7) Ex Instituto Nacional de Carnes, Gerencia de Contralor, Rincón 545, 11000, Montevideo, Uruguay
(8) Universidad de la República, Instituto de Estadística, Facultad de Ciencias Económicas y de Administración, Eduardo Acevedo 1139 / 11400, Montevideo, Uruguay
(9) Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria / INIA Treinta y Tres, Ruta 8 km. 281, Treinta y Tres, Uruguay
(10) Latitud, Fundación LATU, Av. Italia 6201, 11500, Montevideo, Uruguay
(11) Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria / INIA Tacuarembó, Ruta 5 km. 386, Tacuarembó, Uruguay

Introducción

Las cepas de *Escherichia coli* productoras de toxina Shiga (STEC) son un grupo heterogéneo de bacterias que incluye una variedad de serotipos asociados con enfermedades en seres humanos. Actualmente, se reconocen más de 400 serotipos (O:H) de STEC, sin embargo, no todos tienen el mismo impacto en la salud. Los serogrupos STEC se dividen clásicamente en 2 grandes grupos, O157 y no-O157 y su importancia relativa varía entre los diferentes países o zonas analizadas. En Uruguay se han recuperado cepas a partir de niños con Síndrome Urémico Hemolítico (SUH), la mayoría correspondientes a cultivos no-O157 de serogrupos claramente reconocidos como patógenos: O26 (4 aislamientos); O145 (4); O111 (1); O153 (1); OND (1) y O157 (1) [1]. La habilidad de STEC para causar enfermedad se relaciona clásicamente con su capacidad para producir distintas variantes de toxina Shiga (Stx), responsables de la inhibición de la síntesis proteica en células eucariotas. Las variantes de Stx se clasifican en dos grupos: Stx1 (que consiste en tres variantes Stx1a, Stx1c y Stx1d) y Stx2 (compuesto por siete variantes distintas Stx2a, Stx2b, Stx2c, Stx2d, Stx2e, Stx2f y Stx2g). Entre estas variantes, Stx2a, Stx2c y Stx2d son asociadas con la enfermedad grave y, Stx2b y Stx2e están vinculados a síntomas clínicos leves o presencia fecal asintomática. Además, las cepas de STEC pueden presentar rasgos de virulencia adicionales que influyen en su potencial patogénico, como la intimina, enterohemolisina, adhesina homóloga a IrgA y subtilasa citotoxina (SubAB) entre otros, que están codificados por los genes *eae, hlyA, iha y subAB*, respectivamente [2]. La presencia de STEC en carne para consumo humano se considera un peligro y tiene dos impactos negativos claramente definidos, uno sobre la salud humana y otro económico relacionado con las pérdidas que determina en esa cadena productiva. Esta situación pone de manifiesto la necesidad de avanzar en el análisis y la determinación de la potencial virulencia de las cepas STEC circulantes.

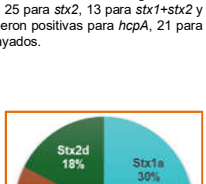
Metodología

Para el aislamiento de las cepas se analizaron muestras obtenidas de las cámaras de maduración de frigoríficos seleccionados de todo el país, cubriendo toda la superficie de las medias canales (interior y exterior) con esponjas previamente humedecidas con solución tampón e incubadas a 41ºC por 22 horas en caldo mTSB [3]. Los caldos positivos para *stx* por qPCR fueron sembrados en Agar MacConkey y EMB Levine [4]. Las colonias morfológicamente sospechosas de *E.coli*, indol positivas y *stx1* y/o *stx2* positivas fueron conservadas a -80ºC para su posterior estudio [5]. Se analizaron 49 cepas STEC mediante serotipificación; PCR para *stx1, stx2, eae, aggR, hcpA, iha, F9 y espJ* [6]; identificación bioquímica y ensayos de susceptibilidad utilizando Microscan y disco-difusión para CAZ, AMC, CRO, CXM, FEP, CR, FOX, FOT, GM, AK, CIP, IMI, MEM, SAM y TMP [7]. Se realizó WGS sobre 33 de los 49 aislamientos, que permitió confirmar serogrupos, conocer el cgMLST, la presencia de otros genes de virulencia, genes de resistencia, las variantes de *stx* y realizar análisis filogenéticos [8].

Resultados

La distribución de los serogrupos de las 49 cepas estudiadas se muestran en la Figura 1. Del estudio de los factores de virulencia por PCR se obtuvieron: 10 cepas positivas para *stx1*, 25 para *stx2*, 13 para *stx1+stx2* y solo la O157:H7 fue positiva para *stx1, stx2 y eae*. Ninguna dio positivo para *aggR*, 16 fueron positivas para *hcpA*, 21 para *iha*, 36 para *F9* y 1 para *espJ*. Ninguna cepa presentó resistencia para los antibióticos ensayados.

Tabla 1 – Distribución de genes de virulencia de los aislados analizados mediante WGS utilizando el servicio del "Center for Genomic Epidemiology" [9,10]. Para los genes *stx*, se especifica la variante detectada. "pcr" indica que solo se obtuvo resultado positivo por PCR a tiempo final.



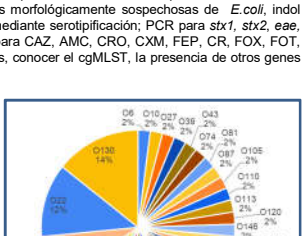
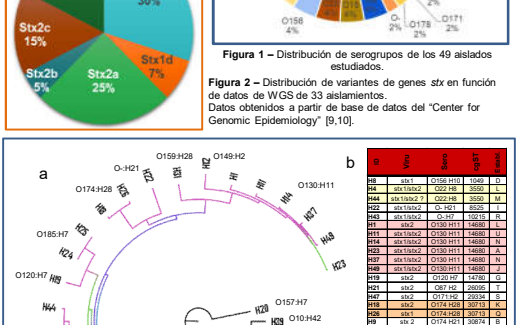


Figura 1 – Distribución de serogrupos de los 49 aislados estudiados.

Figura 2 – Distribución de variantes de genes *stx* en función de datos de WGS de 33 aislamientos.
Datos obtenidos a partir de base de datos del "Center for Genomic Epidemiology" [9,10].



ID	Virs	Sero	cgST	Serot
H8	stx1	O156 H10	1049	D
H4	stx1/stx2	O22 H8	3559	L
H44	stx1/stx2	O22 H8	3559	M
H22	stx1/stx2	O- H21	8525	T
H43	stx1/stx2	O-:H7	10215	R
H1	stx2	O130 H11	14680	L
H11	stx1/stx2	O130 H11	14680	U
H14	stx1/stx2	O130 H11	14680	N
H23	stx1/stx2	O130 H11	14680	A
H37	stx1/stx2	O130 H11	14680	N
H49	stx1/stx2	O130 H11	14680	J
H19	stx2	O120 H7	14780	G
H21	stx2	O87 H2	26095	T
H47	stx2	O171 H2	29034	B
H18	stx2	O174 H28	30713	K
H26	stx1	O174 H28	30713	Q
H9	stx 2	O174 H21	30874	B
H10	stx 2	O174 H21	30874	B
H27	stx1	O156 H10	33555	R
H35	stx2	O105ab H4	40075	F
H38	stx2	O6:H34	50876	M
H39	stx1	O10:H42	52875	I
H12	stx1	O149 H2	56563	O
H3	stx 2	O22 H8	61220	O
H30	stx 2	O22 H8	61220	I
H41	stx2	O22 H8	61220	U
H2	stx1/stx2	O113 H21	64082	C
H17	stx1/stx2	O178 H19	99162	P
H24	stx2	O185 H7	100336	H
H25	stx2	O185 H7	100336	J
H46	stx2	O39:N-	129738	C
H31	stx1/stx2	O159 H28	141562	D
H20	stx1/stx2/eae	O157:H7	143316	L

Figura 3 – a) Árbol filogenético basado en los SNP de los 33 aislados secuenciados.
b) Secuenciotipo de las 33 cepas (cgMLST) [11] y establecimiento del cuál fue aislada.

Conclusión

Se detectó la presencia de una amplia variedad de serotipos, algunos también aislados en ganado y carne en otros países de la región como en Argentina y en Paraguay [12, 13].También se encontraron cepas O22:H8 asociadas con menor frecuencia de portación de O157:H7 en el ganado [14]. Se observan fuertes asociaciones genéticas entre las cepas de mismo serotipo. La gran mayoría de los cultivos estudiados son negativos para *eae y aggR*, portadores de otros genes de virulencia accesorios, y ninguno resistente a los antibióticos ensayados. De todos los serotipos analizados, solo O157:H7 fue aislado en un SUH local [1]. Se necesitan más trabajos de recuperación y caracterización de STEC de seres humanos y animales y sobre todo continuar con otros estudios de laboratorio y bioinformáticos para profundizar en la evaluación del potencial patogénico de los cultivos recuperados en este trabajo.

Bibliografía

[1] Varela G, Schelotto F. Síndrome urémico hemolítico en Uruguay. Aspectos microbiológicos y clínicos, aportes para su conocimiento regional. Revista Facultad de Ciencias de la Salud UDES. 2015;1(1):25.
[2] Ferz L, Cernela N, Hauser E, Nüesch-Inderbinen M, Stephan R. Characteristics of Shigatoxin-Producing Strains Isolated during 2010-2014 from Human Infections in Switzerland. Front Microbiol. 2017 Aug 3;8:1471.
[3] USDA-FSIS MLG 5B.05:2014 "Detection and Isolation of non-O157 Shiga-toxin Producing *Escherichia coli* (STEC) from Meat Products" [Internet]. [cited 2018 Apr 14].
[4] Masana M.O., B.A. D'Astek, P.M. Palladino, L. Galli, L.L. Castillo, C. Carbonari, G.A. Leotta, E.Vilacoba, K.Irino and M.Rivas. 2011. Genotypic Characterization of Non-O157 Shiga Toxin Producing *Escherichia coli* in Beef Abattoirs of Argentina.
[5] Pollard DR, Johnson WM, Lior H, Tyler SD, Rozee KR. Rapid and specific detection of verotoxin genes in Escherichia coli by the polymerase chain reaction. J Clin Microbiol. 1990 Mar;28(3):540–5.
[6] Cáceres ME, Etcheverría AI, Fernández D, Rodríguez EM, Padola NL. Variation in the Distribution of Putative Virulence and Colonization Factors in Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Isolated from Different Categories of Cattle. Front Cell Infect Microbiol. 2017 Apr 28;7:147.
[7] Beyi AF, Fite AT, Tora E, Tafese A, Genu T, Kaba T, et al. Prevalence and antimicrobial susceptibility of *Escherichia coli* O157 in beef at butcher shops and restaurants in central Ethiopia. BMC Microbiol. 2017 Mar 3;17(1):49.
[8] Course Manual "Genomics and epidemiological surveillance of bacterial pathogens". 3-8 March 2019. UPCH, Lima, Perú. Wellcome Genome Campus – Advanced Courses + Scientific Conferences.
[9] Real-time whole-genome sequencing for routine typing, surveillance, and outbreak detection of verotoxigenic *Escherichia coli*. Joensen KG, Scheutz F, Lund O, Hasman H, Kaas RS, Nielsen EM, Aarestrup FM. J. Clin. Microbiol. 2014. 52(5): 1501-1510.
[10] In Silico Genotyping of *Escherichia coli* Isolates for Extraintestinal Virulence Genes by Use of Whole-Genome Sequencing Data. Malberg Tetzschner AM, Johnson JR, Johnston BD, Lund O, Scheutz F. J. Clin. Microbiol. 2020. 58(10): e01269-20. doi:10.1128/JCM.01269-20.
[11] KMA: Rapid and precise alignment of raw reads against redundant databases with KMA website Clausen P, Aarestrup F, Lund O; 2018, BMC Bioinformatics, 19:307.
[12] Brusa V, Restovich V, Galli L, Teltelbaum D, Signorini M, Brasesco H, Londero A, García D, Padola NL, Superno V, Sanz M, Petroli S, Costa M, Bruzzone M, Sucari A, Ferreghini M, Linares L, Suberbie G, Rodríguez R, Leotta GA. Isolation and characterization of non-O157 Shiga toxin-producing Escherichia coli from beef carcasses, cuts and trimmings of abattoirs in Argentina. PLoS One. 2017 Aug 22;12(8).
[13] Rivelli Zea S., Padola N., Etcheverría A., Florentín M., Acuña P., Rodríguez F., Colello R., Guilén Freies R., Caracterización molecular de aislamientos de *Escherichia coli* productores de toxina Shiga obtenidos en 2 establecimientos ganaderos del Paraguay, Revista Argentina de Microbiología, Volume 52, Issue 2, 2020, Pages 131-135, ISSN 0325-7541, https://doi.org/10.1016/j.ram.2019.07.001.
[14] Martorelli L, Albanese A, Vilte D, Cantet R, Bentancor A, Zolezzi G, Chinen I, Ibarra C, Rivas M, Mercado EC, Cataldi A. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) O22:H8 isolated from cattle reduces *E. coli* O157:H7 adherence in vitro and in vivo. Vet Microbiol. 2017 Sep;208:8-17. doi: 10.1016/j.vetmic.2017.06.021. Epub 2017 Jun 29. PMID: 28888654.

Agradecimientos

Los autores agradecen a la Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII) y al Instituto Nacional de Carnes (INAC) por la financiación del proyecto de investigación gracias al cual se desarrolló este trabajo. También reconocen el aporte del Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca (MGAP) y la colaboración de los establecimientos participantes.