

# Caracterización molecular del peligro de cepas de *Escherichia coli* productoras de toxina shiga recuperadas de canales bovinas



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

<sup>1</sup> [peumussio@gmail.com](mailto:peumussio@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 Lasplacas 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 Tacuarembó, Ruta 5 km. 386, Tacuarembó, Uruguay; (10) Lattitud, Fundación LATU, Av. Italia 6201, 11500, Montevideo, Uruguay; (11) Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria / INIA Tacuarembó, Ruta 5 km. 386, Tacuarembó, Uruguay

## Introducción y Objetivos

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. Sin embargo, el potencial de patogenicidad de estas cepas es altamente complejo y requiere múltiples factores de virulencia para causar una enfermedad grave (diarrea sanguinolenta, síndrome urémico hemolítico (SUH)). Algunos de estos tienen muchos subtipos o alelos, no todos los cuales parecen afectar a los humanos, y al mismo tiempo, muchos de ellos residen en elementos genéticos móviles y pueden perderse o transferirse. Como resultado, cepas del mismo serotipo pueden tener diferentes genes de virulencia y presentar un diferente riesgo para la salud. 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 relacionado con las pérdidas económicas que se generan 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. La habilidad de estas bacterias para causar enfermedad se ha relacionado clásicamente con su capacidad para producir distintas variantes de la toxina Shiga (Stx), responsables de la inhibición de la síntesis proteica en células eucariotas. Dichas variantes 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) [1]. Entre estas variantes, Stx1a, Stx2a, Stx2c y Stx2d están vinculadas a casos de enfermedad grave pero no existe una asociación definitiva ni concluyente, ya que se ha visto que tanto el tipo de fago que contiene el gen *stx*, el sitio donde se insertó, como la combinación de otros genes pueden afectar la virulencia de las cepas. Se ha postulado que sin la adherencia de las células bacterianas al epitelio intestinal, la sola producción de Stx se considera insuficiente para que STEC cause infecciones graves.

Como resultado, la presencia del gen *stx* y la capacidad de adhesión son las características críticas de STEC para determinar el curso de las infecciones y se consideran los principales rasgos de virulencia de STEC. El principal factor de adhesión es la intimina codificada por el gen *eae* que se ubica en una isla de patogenicidad denominada LEE (Locus of Enterocyte Effacement). Sin embargo, existen reporte de casos de enfermedad grave causadas por STEC LEE-negativas [2]. Es así que también resulta interesante evaluar la presencia de genes vinculados a otros mecanismos de adhesión: *aggR*, *aiiC*, *saa*, *sab*, *paa*, *efa1*, *ompA*, *lpfA*, *toxX*, así como la isla LAA (Locus of Adhesion and Autoaggregation) utilizando al gen *hes* como marcador [3,4,5,6,7]. A modo de establecer un criterio para categorizar el riesgo potencial de enfermedad grave asociada con STEC en alimentos, y poder brindar a los gestores de riesgo una herramienta de guía para el control, la FAO/OMS propone 5 niveles de riesgo basados en la combinación de genes de virulencia, que podrían ser usados para identificar metas en la gestión del riesgo [8].

El objetivo de este trabajo fue identificar y caracterizar 39 cepas de STEC aisladas de canales bovinas en Uruguay, y así evaluar su potencial patogenicidad categorizando las mismas en base al criterio de la FAO/OMS y buscar factores de virulencia que podrían ser de interés.

## Metodología

Para el aislamiento de las cepas, se analizaron muestras obtenidas en las cámaras de maduración de frigoríficos seleccionados en Uruguay, cubriendo toda la superficie de las medias canales (interior y exterior) con esponjas previamente humedecidas con solución tampón e incubadas a 41 ° C por 22 horas en caldo TSB [9]. Los caldos positivos para *stx* por qPCR fueron sembrados en Agar MacConkey y EMB Levine [10]. Las colonias morfológicamente sospechosas de *E. coli*, indol positivas y *stx1* y/o *stx2* positivas fueron conservadas a -80 ° C para su posterior estudio [11]. Se analizaron 39 cepas STEC mediante serotipificación; PCR para *stx1*, *stx2*, *eae* [12], identificación bioquímica y ensayos de susceptibilidad utilizando Microscan y disco-difusión para CAZ, AMC, CRO, CXM, FEP, CR, FOX, FOT, GM, AK, KIP, IMI, MEM, SAM y TP [13]. Posteriormente, se realizó WGS que permitió confirmar serogrupos, estudiar la presencia de otros genes de virulencia, genes de resistencia y los subtipos de *stx*.

## Resultados

Solo 2 cepas resultaron *eae* positivas (O157:H7 y O182:H25), 18 *stx1a*, 4 *stx1d*, 14 *stx2a*, 2 *stx2b*, 10 *stx2c* y 7 positivas para *stx2d*. La distribución de las cepas en los grupos de riesgo indicados por la FAO, con los serogrupos vinculados fue la siguiente: nivel 1 "*stx2a+eae/aggR*": 0 aislado; nivel 2 "*stx2a*": 7 aislados (O22:H8[2], O113:H21[1], O130:H11[2], O174:H21[2]); nivel 3 "*stx2c+eae*": 1 aislado (O157:H7); nivel 4 "*stx1a+eae*": 1 aislado (O182:H25); nivel 5 "otros subtipos de *stx*": 30 aislados. La prevalencia de los factores de virulencia adicionales fue: *aggR*(0), *aiiC*(0), *saa*(18), *sab*(8), *paa*(0), *efa1*(1) (O157:H7), *ompA*(39), *lpfA*(39), *toxX*(0) y *hes*(18 (16 del nivel 5 y 2 de nivel 2 que tienen *stx2d* sin *eae* - O174:H2)). Ninguna cepa presentó resistencia a los antibióticos ensayados. Cabe resaltar que los aislados contenían en todos los casos algún gen que podría contribuir a la adherencia de las células bacterianas al epitelio intestinal del huésped.

## 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 Argentina y Paraguay [14, 15]. La gran mayoría de los cultivos estudiados fueron negativos para *eae* y *aggR*, positivos para factores de adhesión adicionales, 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 [16]. Los serogrupos encontrados asociados al nivel 2 de riesgo, O22:H8, O174:H21 y O113:H21, han sido recuperados de pacientes con SUH [17, 18].

El riesgo de la presencia de STEC en alimentos y su posibilidad de causar diarrea, diarrea sanguinolenta o SUH puede ser mejor predicho al estudiar los genes de virulencia, no obstante, existen complejidades asociadas con la interacción y los factores del huésped que no permiten proporcionar una asociación definitiva entre una STEC y el desarrollo de SUH. La mayoría de los aislados obtenidos en este trabajo a partir de canales bovinas en Uruguay contienen genes de virulencia asociados a un menor riesgo para la salud de los consumidores.

De todos modos, todas las STEC deberían ser consideradas como potenciales diarreogénicas, a pesar de su serogrupo o el subtipo de *Stx* que produzca, especialmente en individuos susceptibles.

Este tipo de caracterización, junto con otros factores como la naturaleza intrínseca del alimento, la manipulación posterior, la preparación y las prácticas de consumo de la carne, y si los consumidores son personas de alto riesgo, podría utilizarse para determinar el riesgo potencial para la salud humana la presencia de STEC.

## Bibliografía

[1] Schuetz F, Teel LD, Beutin L, Pírdár D, Buvens G, Karch H, Mellmann A, Caprioli A, Tozzoli R, Morabito S, Strockbine NA, Melton-Celsa AR, Sanchez M, Persson S, O'Brien AD. 2012. Multicenter evaluation of a sequence-based protocol for subtyping shiga toxins and standardizing stx nomenclature. *Journal of Clinical Microbiology*, 50(9): 2951-2963. Doi: 10.1128/JCM.00860-12. [2] Newton JH, Sloan JG, Bulach DM, Seemann T, Allison CC, Tauschek M, Robins-Browne RM, Paton JC, Whittam TS, Paton AW, Hartland EL. 2009. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains negative for locus of enterocyte effacement. *Emerging Infectious Diseases*, 15(3): 372-380. Doi: 10.3201/eid1502.080631. [3] Dytoe M, T. Ismaili, A., Philpott D, J., Soni, R., Burton, J.L., & Sherman, P.M. 1994. Distinct binding properties of eaeA-negative verocytotoxin-producing *Escherichia coli* of serotype O113:H21. *Infection and Immunity*, 62(8): 2944-2950. [4] Paton, A.W., Srinanote, P., Woodrow, M.C. & Paton, J.C. 2001. Characterization of *Saa*, a novel autoagglutinating adhesin produced by locus of enterocyte effacement-negative Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains that are virulent for humans. *Infection and Immunity*, 69(11): 6999-7009. Doi: 10.1128/IAI.69.11.6999-7009.2001. [5] Herold S, Paton, J.C. & Paton, A.W. 2009. Sab, a novel autoagglutinating adhesin of locus of enterocyte effacement-negative Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* O113:H21 contributes to adherence and biofilm formation. *Infection and Immunity*, 77(8): 3234-3243. Doi: 10.1128/IAI.00031-09. [6] Kaper J.B., Nataro, J.P. & Mobley H.L.T. 2004. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Reviews in Microbiology*, 2(2): 123-140. Doi: 10.1038/nrmicro018. [7] Pollard DR, Johnson WM, Lior H, Tyler SD, Rozece KR. Rapid and specific detection of verotoxin genes in *Escherichia coli* by the polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol*, 1990 Mar 28;33(3):540-5. [12] Cáceres ME, Echeverría 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. [13] Beyi AF, File AT, Torá 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. [14] Brusa V, Restovich V, Galli I, Tellebbaum D, Signorini M, Brasasco H, Londero A, García D, Padola NL, Superno V, Sanz M, Petrolí S, Costa M, Bruzzone M, Sucari A, Ferreghini M, Linares M, Rivas. 2011. Genotypic Characterization of Non-O157 Shiga Toxin Producing *Escherichia coli* in Beef Abattoirs of Argentina. [11] Pollard DR, Johnson WM, Lior H, Tyler SD, Rozece KR. Rapid and specific detection of verotoxin genes in *Escherichia coli* by the polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol*, 1990 Mar 28;33(3):540-5. [12] Cáceres ME, Echeverría 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. [13] Beyi AF, File AT, Torá 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. [14] Brusa V, Restovich V, Galli I, Tellebbaum D, Signorini M, Brasasco H, Londero A, García D, Padola NL, Superno V, Sanz M, Petrolí S, Costa M, Bruzzone M, Sucari A, Ferreghini M, Linares M, Rivas. 2011. Genotypic Characterization of Non-O157 Shiga Toxin Producing *Escherichia coli* in Beef Abattoirs of Argentina. *PLoS One*. 2017 Aug 22;12(8). [15] Rivelli Zai S., Padola N., Echeverría A., Florenini M., Acuña P., Rodríguez F., Colella R., Guillén Frates R., Caracterización molecular de aislamientos de *Escherichia coli* productoras 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>. [16] 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. [17] <https://web.archive.org/web/20101105223858/http://www.microbiolnet.com.au/80/victable.htm> [18] Rivas M, Padola NL, Luchesi PMA, Masana M. Diarrea hemolítica *Escherichia coli* en Argentina. In: Torres AG, editor. *Pathogenic *Escherichia coli* in Latin America* 2010. p. 142. [19] Odeniz S, et al. Detección y caracterización de *Escherichia coli* productor de toxina Shiga en niños atendidos en un hospital pediátrico interzonal de la ciudad de La Plata. *Rev Argent Microbiol*. 2018.

**Tabla 1.** Combinación de genes de virulencia y estimación del potencial para causar diarrea (D), diarrea sanguinolenta (DS) y síndrome urémico hemolítico (SUH)<sup>1</sup>

Nivel	Genes	Potencial para:
1	<i>stx2a+ eae/aggR</i>	D/DS/SUH
2	<i>stx2d</i>	D/DS/SUH <sup>2</sup>
3	<i>stx2c+ eae</i>	D/DS <sup>3</sup>
4	<i>stx1a+ eae</i>	D/DS <sup>3</sup>
5	Otros <i>stx</i>	D

Notas:

- Dependiente también de la susceptibilidad del huésped y otros factores
- Asociación con SUH depende de la variante de *stx2d* y cepa
- Se han reportado subtipos causantes de DS y en raras ocasiones SUH

**Tabla 2.** Serogrupos, niveles de riesgo y detección de genes de virulencia de cepas de STEC aisladas de canales bovinas

Serotipo	Nivel de Riesgo	stx1	stx2	eae	ompA	lpfA	hes	saa	sab	efa1	toxX	aggR	aiiC	paa
O113:H21	2	a	d											
O174:H21	2		d											
O174:H21	2		d											
O22:H8	2	d												
O130:H11	2	a	d											
O22:H8	2		d											
O130:H11	2	a	d											
O157:H7	3	a	c											
O182:H25	4	a												
O130:H11	5	a												
O22:H8	5	b												
O22:H8	5	c												
O88:H25	5	d												
O156:H10	5	d												
O130:H11	5	a	a											
O74:H42	5	a	c											
O130:H11	5	a	a											
O8:H19	5	a	a											
O178:H19	5	a	a											
O174:H28	5	a												
O120:H7	5	c												
O-H21	5	a	a											
O130:H11	5	a	a											
O185:H7	5	c												
O185:H7	5	c												
O174:H28	5	a	a											
O156:H10	5	d												
O159:H28	5	a	a											
O20:H7	5													
O8:H16	5	a	a											
O6:H34	5	c												
O10:H42	5	d												
O8:H16	5													
O22:H8	5	c												
O178:H19	5	c												
O39:H7	5	a												
O171:H2	5	a												
O8:H19	5	a	a											
O174:H28	5	a	a											

## 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 Agrícola y Pesca (MGAP) y la colaboración de los establecimientos participantes.