

Rev Inv Vet Perú 2012; 23(1): 98-104

PRESENCIA DE *Escherichia coli* O157 EN CRÍAS DE ALPACAS (*Vicugna pacos*)

PRESENCE OF *ESCHERICHIA COLI* O157 IN YOUNG ALPACAS (*VICUGNA PACOS*)

Elvis Silvera C.¹, Rosa Perales C.^{1,6}, Jorge Rodríguez B.⁴, Teresa López U.²,
César Gavidia C.³, Juan Agapito P.⁵, César Palacios E.¹

RESUMEN

El estudio tuvo como objetivo evaluar la presencia de *E. coli* O157 (gen *rfb* O157) en crías de alpacas (*Vicugna pacos*) con y sin diarrea, así como los genes que codifican la intimina (gen *eae*), toxina *Shiga* 1 (gen *Stx1*) y toxina *Shiga* 2 (gen *Stx2*). Se utilizaron cepas de *E. coli* provenientes de un ensayo previo realizado en Puno, Perú. Se evaluaron 55 y 52 cepas de *E. coli* provenientes de crías de alpacas con y sin diarrea. Las cepas fueron procesadas mediante la prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Ambos grupos resultaron negativos a la presencia de *E. coli* O157. En el grupo de crías de alpacas sin diarrea, 7 cepas fueron positivas para el gen *eae* y 4 para *Stx2*. En el grupo de crías de alpacas con diarrea 2 cepas resultaron positivas para los genes *eae* y *Stx1*, 1 para *eae* y *Stx2*, 5 para *eae*, 1 para *Stx1* y 5 para *Stx2*. El estudio no identificó la presencia del serogrupo *E. coli* O157; sin embargo, se identificó la presencia de los genes *eae* y *Stx*, lo que demuestra que esta especie doméstica podría estar actuando como reservorio de *E. coli* enterohemorrágica.

Palabras clave: *Escherichia coli* O157, toxina *Shiga*, intimina, alpaca, *Vicugna pacos*, *rfb* O157, *eae*, *Stx*, PCR

ABSTRACT

The study aimed to evaluate the presence of *E. coli* O157 (*rfb* O157 gene) in young alpacas (*Vicugna pacos*) with and without diarrhea, and the genes that codify their main factors of virulence such as intimin (*eae* gene), *Shiga* toxin 1 (gene *Stx1*) and *Shiga* toxin 2 (*Stx2* gene). Strains of *E. coli* from a previous study in Puno, Peru were used. A total of

¹ Laboratorio de Histología, Embriología y Patología Veterinaria, ² Laboratorio de Microbiología y Parasitología Veterinaria, ³ Laboratorio de Medicina Veterinaria Preventiva, Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima

⁴ Unidad de Biotecnología Molecular, Universidad Peruana Cayetano Heredia, Lima

⁵ Laboratorio de Genómica, Instituto Peruano de Energía Nuclear, Lima

⁶ E-mail: rperales_fmv@hotmail.com

55 and 52 strains of *E. coli* from young alpacas with and without diarrhea respectively were used. Strains were processed by the polymerase chain reaction (PCR) technique. Both groups resulted negative for the presence of *E. coli* O157. In the group of alpacas without diarrhea, 7 strains were positive for the gene *eae* and 4 for *Stx2*. In the group of alpacas with diarrhea 2 strains were positive for the genes *eae* and *Stx1*, 1 for *eae* and *Stx2*, 5 for *eae*, 1 for *Stx1* and 5 for *Stx2*. The survey did not identify the presence of serogroup *E. coli* O157; however identified the presence of *Stx* and *eae* genes which shows that this species might be acting as domestic reservoir of enterohaemorrhagic *E. coli*.

Keywords: *Escherichia coli* O157, Shiga toxin, intimin, alpaca, *Vicugna pacos*, *rfbO157*, *eae*, *Stx*, PCR

INTRODUCCIÓN

Escherichia coli enterohemorrágica (EHEC) es un agente zoonótico emergente de gran impacto a nivel mundial (Armstrong *et al.*, 1996) que causa serias enfermedades en el humano como la colitis hemorrágica (CH) y el síndrome urémico hemolítico (SUH). Dentro de esta especie se encuentra como serogrupo más importante la *E. coli* O157 debido a los serotipos O157:H7 y O157:H- (Griffin y Tauxe, 1991).

E. coli O157 se transmite por vía fecal-oral y tiene una dosis infectiva muy baja (menos de 100 bacterias por gramo) (Karmali, 1989). Los vehículos más frecuentes para la infección humana son los alimentos y el agua (Tanaro *et al.*, 2006), pero se ha demostrado la transmisión de persona a persona, la transmisión en el laboratorio y por contacto directo con animales (OIE, 2004).

El primer aislamiento de *E. coli* enterohemorrágica O157:H7 en el Perú se reportó en el 2001, en un lactante de 11 meses de edad con un cuadro de diarrea disintérica (Huapaya *et al.*, 2001; Huguet *et al.*, 2002). Estudios posteriores realizados en Lima demostraron la presencia de *Escherichia coli* O157:H7 en alimentos (Mora *et al.*, 2007).

Los rumiantes son el reservorio de EHEC O157 (Armstrong *et al.*, 1996), sien-

do el ganado bovino la principal especie implicada. Este serogrupo también ha sido aislado de varias especies de mamíferos, aves y animales silvestres (OIE, 2004). En camélidos sudamericanos solo se ha reportado la presencia de *E. coli* enterohemorrágica O26:H11 en un guanaco (*Lama guanicoe*) de dos meses de edad, que presentaba una severa diarrea acuosa (Mercado *et al.*, 2004).

En el país se reportan numerosos casos de diarrea con sangre y SUH en humanos, cuadro clínico asociado a EHEC O157; sin embargo, no siempre se llega a la identificación del agente causal. Estos reportes sugieren la presencia de *E. coli* O157 en animales reservorios. El objetivo del presente estudio fue evaluar la posible presencia de *E. coli* O157 en muestras de heces de crías de alpaca (*Vicugna pacos*) con y sin diarrea, así como la caracterización genotípica de sus factores de virulencia.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se trabajó con 112 cepas de *E. coli* de crías de alpacas con diarrea (56) y sin diarrea (56), cepas que provienen de un estudio realizado en el 2007 en la empresa EPS Rural Alianza-Macusani y Huaripiña, y comunidades cercanas, ubicadas en la provincia de Carabaya (4700 msnm), departamento de Puno. Las crías de alpacas eran de ambos sexos con edades entre 1 a 60 días.

Cuadro 1. Cebadores utilizados en el estudio

Genes	Cebador	Secuencia 5' – 3'
O157 (<i>rfb</i> O157) ¹	PF8	CGTGATGATGTTGAGTTG
	PR8	AGATTGGTTGGCATTACTG
Intimina (<i>eaeA</i>) ²	Int-Fc	CCGGAATTCGGGATCGATTACCGTCAT
	Int-Rc	CCCAAGCTTTTATTTATCAGCCTTAATCTC
toxina Shiga 1 (<i>Stx1A</i>) ³	LP30	CAGTTAATGTTCGTGGCGAAGG
	LP31	CACCAGACAATGTAACCGCTG
toxina Shiga 2 (<i>Stx2A</i>) ³	LP43	ATCCTATTCCCGGGAGTTTACG
	LP44	GCGTCATCGTATACACAGGAGC

¹ Maurer *et al.* (1999); Cheng y Griffiths (1999)

² Batchelor *et al.* (1999)

³ Cebula *et al.* (1995)

Las cepas estuvieron conservadas a -20 °C desde agosto del 2007, en el Laboratorio de Bacteriología de la Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, en un medio que contenía leche descremada, glicerol y triptona.

Se comprobó la viabilidad de las cepas almacenadas mediante su inoculación en Agar tripticasa soya (TSA), incubadas a 37 °C por 24 horas, y extracción del ADN de las colonias. El ADN genómico bacteriano se extrajo utilizando el Wizard genomic DNA purification kit (PROMEGA), siguiendo las instrucciones del fabricante. La calidad y cantidad del ADN se determinó mediante espectrofotometría. El ADN genómico aislado se colocó en tubos de microcentrífuga de 1.5 mL de capacidad y se almacenó a -20 °C hasta su procesamiento.

Mediante PCR se amplificó cuatro genes de *E. coli* O157 correspondientes a los genes *rfb* O157 (antígeno somático 0157), *Stx1* (gen de la toxina *Shiga* 1), *Stx2* (gen de la toxina *Shiga* 2) y *eae* (gen de la intimina). Los cebadores, las condiciones de PCR y los ciclos termales se detallan en los cuadros 1 y 2. La

resolución de los fragmentos se hizo por electroforesis en gel de agarosa al 2% y se les visualizó mediante fluorescencia del bromuro de etidio a través de luz ultravioleta.

RESULTADOS

Se obtuvieron 107 cepas viables de las 112 disponibles, donde 55 y 52 correspondieron a cepas provenientes de crías de alpacas con y sin diarrea. La cantidad de ADN genómico obtenido a partir de 1 mL de cultivo varió entre 10.4 y 18.8 µg con una media de 16.8 µg. La pureza y calidad del ADN analizada a través de la proporción de absorbancia a 260/280 y 260/230 mostraron valores promedio de 1.8 (ADN puro) y 1.9 (ADN libre de contaminantes).

Los resultados expresados en proporción y cantidad de cepas que resultaron positivas se muestran en el Cuadro 3. El 11.2% de las 107 cepas presentaban el gen *eae*, de las cuales, siete correspondieron a cepas de alpacas sin diarrea (Fig. 1A). Asimismo, una cepa contenía el gen *stx1* y nueve cepas el gen *stx2* (Fig. 1B). No se logró identificar la presencia del gen *rfb* O157.

Cuadro 2. Protocolo de PCR y ciclos termales para tipificación molecular de *E. coli* O157

Genes	PCR (Pb)	PCR	Ciclos termales
O157 (<i>rfbO157</i>)	420	20 ng DNA	95 °C por 15 min
Intimina (<i>eaeA</i>)	840	2U Taq DNA	30 ciclos (94 °C por 1 min,
Shiga toxina 1 (<i>Stx1A</i>)	348	1X Buffer PCR	53 °C por 1 min y 72 °C
Shiga toxina 2 (<i>Stx2A</i>)	584	3 mM MgCl	por 1 min)
		0.2 µM dNTPs	72 °C por 5 min
		5 pmol c/cebador	

Osek (2001, 2002)

Cuadro 3. Número y proporción de cepas positivas a genes de *Escherichia coli* O157 provenientes de crías de alpacas con y sin diarrea en la zona de Carabaya, Puno

Diarrea	<i>gen eae</i>		<i>gen stx 1</i>		<i>gen stx 2</i>		<i>gen eae, stx 1</i>		<i>gen eae, stx 2</i>	
	N°	%	N°	%	N°	%	N°	%	N°	%
No	7	13.5	0	0	4	7.7	0	0	0	0
Sí	5	9.1	1	1.8	5	9.1	2	3.6	1	1.8
Total	12	11.2	1	0.9	9	8.4	2	1.9	1	0.9

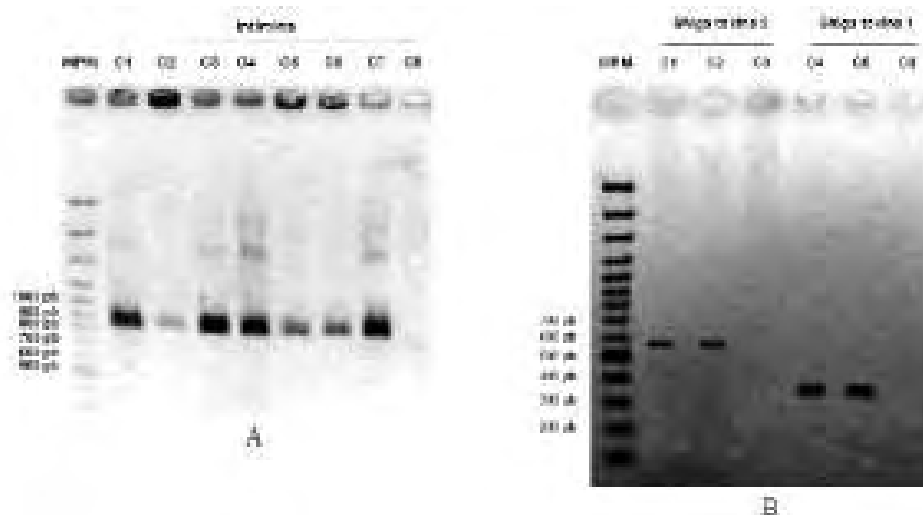


Figura 1. Amplificación de genes. A) *gen eae* (intimina). MPM: Marcador de peso molecular 100 bp (Fermentas), C1 a C4 (cepas con diarrea), C5 a C7 (cepas sin diarrea) amplificación del *gen eae* (840 pb), C8: Blanco de PCR. B) genes toxina Shiga 1(348 pb) y toxina Shiga 2 (584 pb). MPM: Marcador de peso molecular 100 bp (Fermentas), C1 y C4 (cepas con diarrea): C3 y C6: Blanco de PCR, C2 y C5 (cepas sin diarrea)

DISCUSIÓN

Existen muy pocos reportes con respecto a la presencia de serogrupo *E. coli* O157 en alpacas. No se identificó la presencia del gen *rfb* O157 que codifica el antígeno somático O157 (*E. coli* O157) en cepas de crías de alpacas, aunque ha sido reportado en esta especie (VLA, 2009). En ese estudio, las alpacas compartían espacios con ovinos, equinos y cerdos que también resultaron positivos a *E. coli* O157, lo cual podría haber favorecido la diseminación de la *E. coli* O157 (Hancock *et al.*, 2001; LeJeune *et al.*, 2001; Davis *et al.*, 2003).

En el Perú se ha identificado *E. coli* enterohemorrágica O157 proveniente de personas con diarrea sanguinolenta y síndrome urémico hemolítico (Huguet *et al.*, 2002; MINSA, 2005). Además, se ha reportado la presencia de este serogrupo en alimentos en un estudio realizado en Lima (Mora *et al.*, 2007); de allí la importancia de realizar estudios para identificar los reservorios animales.

El gen *eae* codifica una proteína de membrana externa llamada intimina que tiene como función la adherencia de la bacteria a la mucosa intestinal y esta asociado principalmente a la lesión de adhesión y borrado (AE: *attaching and effacing*) (Law, 2000). Ese gen se detectó en siete alpacas sin diarrea y cinco con diarrea, lo cual sugiere la presencia de otros grupos patógenos como la *E. coli* enteropatógena que también presenta el gen *eae* (Batchelor *et al.*, 1999).

Huguet *et al.* (2002) aislaron *E. coli* O157:H7 que no presentó ningún tipo de toxina *Shiga*, planteando la posibilidad de que estas cepas puedan haber portado en un primer momento el gen y posteriormente haberlo perdido, fenómeno similar al descrito por Feng *et al.* (2001). La toxina *Shiga* es el principal factor de virulencia de *E. coli* productor de toxina *Shiga* y de *E. coli* enterohemorrágica.

Un estudio realizado por Arainga *et al.* (2008), en Huancavelica, con muestras de hisopados rectales de alpacas jóvenes con diarrea, reportó la presencia de *Stx1* (57%) y *Stx2* (60%) en proporciones mucho más altas que las del presente estudio.

La presencia del gen *Stx2* en alpacas sin diarrea demuestra que esta especie está actuando como un reservorio de la *E. coli* productor de toxina *Shiga*; semejante a los roles desempeñados por el bovino, ovino, porcino y otras especies (OIE, 2004).

Es necesario resaltar la mayor proporción de *Stx2* en comparación con *Stx1*, en los dos grupos de muestras, ya que las cepas de *E. coli* enterohemorrágica que presentaron la toxina *Shiga 2* son más patógenas y producen un cuadro clínico más severo en humanos comparadas con las cepas que poseen toxina *Shiga 1*, y las cepas que poseen toxina *Shiga 1 y 2* (Pickering *et al.*, 1994).

CONCLUSIONES

- No se identificó la presencia de *Escherichia coli* O157 en crías de alpacas (*Vicugna pacos*) en las cepas de *E. coli* provenientes de la Empresa EPS Rural Alianza.
- Las alpacas son una fuente de *E. coli* que presentan los genes que codifican los principales factores de virulencia (*eae* y *Stx*) de la *E. coli* enterohemorrágica.
- La identificación del gen *eae* demuestran que esta especie podría ser un reservorio asintomático de *E. coli* enteropatógena.

Agradecimientos

Los autores agradecen a la International Foundation for Science (IFS), por su apoyo en el financiamiento de este trabajo de investigación.

LITERATURA CITADA

1. **Arainga MA, Taguchi T, Morales SM, Portilla KV, Villacaqui ER, Valencia N, Rivera H, Yamasaky S. 2008.** Detección de genes de *E. coli* enterohemorrágica productora de toxina *Stx1* y *Stx2* en alpacas (*Lama pacos*) con diarrea. En: XIX Congreso Nacional de Ciencias Verinarias. Perú.
2. **Armstrong GL, Hollingsworth J, Morris JG 1996.** Emerging food borne pathogens: *Escherichia coli* O157:H7 as a model of entry of a new pathogen into the food supply of the developed world. *Epidemiol Rev* 18(1): 29-51.
3. **Batchelor MS, Knutton S, Capricoli AA, Hutter V, Zaniat M, Dougen G, Frankel G. 1999.** Development of a universal intimin antiserum and PCR primers. *J Clin Microbiol* 32: 3822-3827.
4. **Cebula TW, Payne WI, Feng P. 1995.** Simultaneous identification of strains of *Escherichia coli* serotype O157:H7 and their shiga-like toxin type by mismatch amplification mutation assay-multiplex PCR. *J Clin Microbiol* 33: 248-250.
5. **Chen J, Griffiths MW. 1999.** Cloning and sequencing of the gene encoding universal stress protein from *Escherichia coli* O157:H7 isolated from Jack-in-a-Box outbreak. *Lett Appl Microbiol* 29(2): 103-107.
6. **Davis MA, Hancock DD, Rice DH, Call DR, DiGiacomo R, Samadpour M, Besser TE. 2003.** Feedstuffs as a vehicle of cattle exposure to *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enterica*. *Vet Microbiol* 95: 199-210.
7. **Feng P, Dey M, Abe A, Takeda T. 2001.** Isogenic strain of *Escherichia coli* O157:H7 that has lost both Shiga toxin 1 and 2 genes. *Clin Diagn Lab Immunol* 8: 711-717.
8. **Griffin PM, Tauxe RV. 1991.** The epidemiology of infections caused by *Escherichia coli* O157:H7, other enterohemorrhagic *E. coli*, and the associated hemolytic uremic syndrome. *Epidemiol Rev* 13: 60-98.
9. **Hancock D, Besser T, LeJeune J, Davis M, Rice D. 2001.** The control of VTEC in the animal reservoir. *Int J Food Microbiol* 66: 71-78.
10. **Huapaya B, Huguet J, Suárez V, Torres Y, Montoya Y, Salazar E, Torres Y, et al. 2001.** Primer aislamiento de *Escherichia coli* O157:H7 enterohemorrágica en el Perú. *Rev Med Exp* 18(1-2): 38-39.
11. **Huguet J, Huapaya B, Salazar E. 2002.** Determinación de factores de virulencia asociados a *Escherichia coli* enterohemorrágica en cepas peruanas aisladas entre 1999-2001. *Rev Med Exp Salud Pública* 19(2): 63-67.
12. **Karmali MA. 1989.** Infection by verocytotoxin-producing *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev* 2: 15-38.
13. **Law D. 2000.** Virulence factors of *Escherichia coli* O157 and other Shiga Toxin-producing *E. coli*. *J Appl Microbiol* 88: 729-745.
14. **LeJeune J, Besser TE, Hancock DD. 2001.** Cattle water troughs as reservoirs of *Escherichia coli* O157. *Appl Environ Microbiol* 67: 3053-3057.
15. **Maurer JJ, Schmidt D, Petrosko P, Sanchez S, Bolton L, Lee MD. 1999.** Development of primers to O-antigen biosynthesis genes for specific detection of *Escherichia coli* O157 by PCR. *Appl Environ Microbiol* 65: 2954-2960.
16. **Mercado EC, Rodríguez SM, Elizondo AM, Marcoppido G, Parreño V. 2004.** Isolation of shiga toxin-producing *Escherichia coli* from a South American camelid (*Lama guanicoe*) with diarrhea. *J Clin Microbiol* 42: 4809-4811.
17. **[MINSA] Ministerio de Salud. 2005.** Etiología de la diarrea con sangre en poblaciones de zonas de riesgo *E. coli* Enterohemorrágica (ECEH) y otras *E. coli* Shigatoxina (STEC). Perú: Ministerio de Salud. Serie Informes Técnicos N° 85.

18. **Mora A, León S, Blanco M, Blanco JE, López C, Dahbi G, Echeita A, et al. 2007.** Phage types, virulence genes and PFGE profiles of *Shiga* toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 isolated from raw beef, soft cheese and vegetables in Lima (Perú). *Int J Food Microbiol* 114: 204-210.
19. **[OIE] Organización Mundial de Sanidad Animal. 2004.** *Escherichia coli* verotoxigénica. Manual de la OIE sobre animales terrestres. Cap. 2.10.13. [Internet], [13 marzo 2009]. Disponible: www.oie.int/esp/normes/mmanual/pdf_es/2.10.13_Escherichia_coli_verociotoxigenica_ruth.pdf
20. **Osek J. 2001.** Multiplex polymerase chain reaction assay for identification of enterotoxigenic *Escherichia coli* strains. *J Vet Diagn Invest* 13: 308-311.
21. **Osek J. 2002.** Rapid and specific identification of shiga toxin producing *Escherichia coli* in faeces by multiplex pcr. *Lett Appl Microbiol* 34: 304-310.
22. **Tanaro J, Lound L, Domínguez M. 2006.** Detección de *Escherichia coli* O157:H7 en aguas abiertas, heces y rumen de bovinos en las proximidades del casco urbano. *Ciencia, Docencia y Tecnología* 32: 207-218 p.
23. **Pickering LK, Obrig TG, Stapleton FB. 1994.** Hemolytic-uremic syndrome and enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Pediatr Infect Dis J* 13: 459-476.
24. **[VLA] Veterinary Laboratories Agency. 2009.** Non-Statutory Zoonoses. Quarterly Report July – September. [Internet], [28 abril 2009]. Disponible en: www.defra.gov.uk/vla/reports/docs/rep_zoo0308.pdf