



Revista de Investigaciones Veterinarias

del Perú, RIVEP

ISSN: 1682-3419

rivepsm@gmail.com

Universidad Nacional Mayor de San
Marcos
Perú

Silvera C., Elvis; Perales C., Rosa; Rodríguez B., Jorge; López U., Teresa; Gavidia C.,
César; Agapito P., Juan; Palacios E., César

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

Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú, RIVEP, vol. 23, núm. 1, enero-marzo,
2012, pp. 98-104

Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Lima, Perú

Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=371838863012>

- Cómo citar el artículo
- Número completo
- Más información del artículo
- Página de la revista en redalyc.org

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 serogrupos más importantes 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 disentérica (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 serogruppo 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>rfbO157</i>) ¹	PF8	CGTGATGATGTTGAGTTG
	PR8	AGATTGGTGGCATTACTG
Intimina (<i>eaeA</i>) ²	Int-Fc	CCGGAATTGGGATCGATTACCGTCAT
	Int-Rc	CCCAAGCTTTATTATCAGCCTTAATCTC
toxina Shiga 1 (<i>Stx1A</i>) ³	LP30	CAGTTAATGTCGTGGCGAAGG
	LP31	CACCAGACAATGTAACCGCTG
toxina Shiga 2 (<i>Stx2A</i>) ³	LP43	ATCCTATTCCCAGGGAGTTACG
	LP44	GCGTCATCGTATAACACAGGAGC

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 microcentrifuga 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 O157), *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 gene *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>yfbO157</i>)	420	20 ng DNA 2U Taq DNA 1X Buffer PCR 3 mM MgCl 0.2 μ M dNTPs 5 pmol c/cebador	95 °C por 15 min 30 ciclos (94 °C por 1 min, 53 °C por 1 min y 72 °C por 1 min) 72 °C por 5 min
Intimina (<i>eaeA</i>)	840		
Shiga toxina 1 (<i>Stx1A</i>)	348		
Shiga toxina 2 (<i>Stx2A</i>)	584		

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	gen eae		gen stx 1		gen stx 2		gen eae, stx 1		gen eae, stx 2	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
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

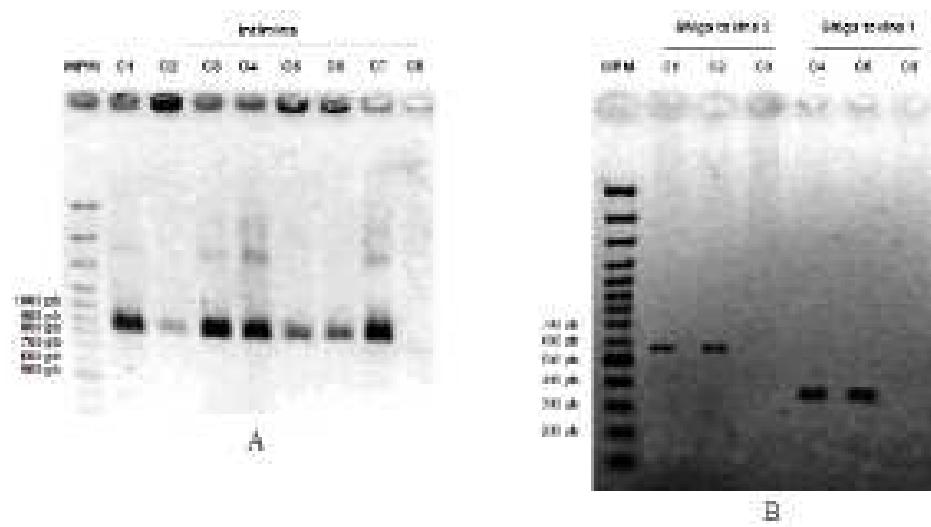


Figura 1. Amplificación de genes. A) gen eae (intimina). MPM: Marcador de peso molecular 100 bp (Fermentas), C1 a C4 (cepas con diarrea), C5 a C7 (cepas sin diarrea) amplificación del gen eae (840 pb), C8: Blanco de PCR. B) genes toxina Shiga 1(348 pb) y toxina Shiga 2 (584 pb). MPM: Marcador de peso 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 está 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, Zanial 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 en Lima (Perú). Int J Food Microbiol 114: 204-210.
19. **[OIE] Organización Mundial de Sanidad Animal.** 2004. *Escherichia coli* verotoxigenica. 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_verotoxigenica_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