

Detección y caracterización molecular de *Escherichia coli* productor de Toxina Shiga en sistemas de producción aviar

Jorge Rodríguez^{1,*}, Ysabel Koga¹, Arnaldo Alvarado¹, Katherine Porturas¹, Juan Agapito², Robert Tinoco¹

¹ Laboratorio Microbiología, Biología Molecular, Bioservice S.R.L. Av. Nicolas de Pierola 1228, Lima 35, Perú

² Laboratorio de Genómica y Biología Molecular, Instituto Peruano de Energía Nuclear, Av. Canadá 1470, Lima 41, Perú

Resumen

El objetivo del presente estudio fue determinar la presencia de factores de virulencia y patrones de resistencia antibiótica en 46 cepas de *Escherichia coli* aisladas en aves de corral (Pollos de carne - Broiler). Las 46 cepas de *Escherichia coli* fueron resistentes a ciprofloxacina, enrofloxacina, colistina, amoxicilina, florfenicol, doxiciclina, oxitetraciclina, fosfomicina y sulfatrimetropin. Análisis molecular de REP-PCR y BOXA1R confirmó la presencia de 46 cepas genéticamente diferentes obtenidas a partir de los aislados clínicos. Toxinotipificación mediante PCR para los genes de Toxina Shiga 1 (stx1), Toxina Shiga 2 (stx2) encontró solo la presencia de genes productores de Toxina Shiga 2 en 6 cepas de *Escherichia coli* (6/46; 13,04 %). El presente estudio constituye uno de los primeros reportes de *Escherichia coli* productora de shigatoxina 2 en sistemas de producción de pollos de carne en la costa peruana. En base a los resultados obtenidos, se sugiere la presencia *Escherichia coli* multidrogo resistente y productora de toxinas en cuadros clínicos aviares.

Detection and molecular characterization of *Escherichia coli* Shiga toxin-producing poultry production systems

Abstract

The aim of this study was to determine the presence of virulence factors and antibiotic resistance patterns of 46 *Escherichia coli* strains isolated from poultry. The 46 strains of *Escherichia coli* were resistant to ciprofloxacin, enrofloxacin, colistin, amoxicillin, florfenicol, doxycycline, oxytetracycline, fosfomycin and sulfatrimetropin. Molecular analysis and BOXA1R REP-PCR confirmed the presence of 46 genetically different strains obtained from clinical isolates. PCR for Shiga toxin 1 (stx 1), Shiga toxin 2 (Stx2) genes found only the presence of Shiga toxin 2 in six strains of *Escherichia coli* (6/46; 13.04 %). This study is one of the first reports of Shiga-toxin 2 producing *Escherichia coli* in poultry production systems in the Peruvian coast. Based on the results obtained, it suggests the presence multidrug resistant and toxin-producing *Escherichia coli* from avian clinical cases.

1. Introducción

Escherichia coli patogénica aviar (APEC) usualmente se asocia a infecciones extra intestinales causantes de enfermedades respiratorias, septicemia, síndrome de cabeza hinchada, celulitis entre otros, predominando los serotipos O1, O2, O35 y O78 [1]. Algunas de las propiedades que caracterizan a las APEC son la producción de pilis específicos que median la adherencia a los tejidos, la secreción de aerobactina, la resistencia a la actividad bactericida del suero, la formación de capsulas de polisacáridos entre otros [2]. Adicionalmente, las cepas de *Escherichia coli* patogénicas provenientes de mamíferos, producen citotoxinas conocidas como toxina

Shiga 1 y 2 (*Escherichia coli* verotoxigénica), las cuales poseen la capacidad de causar patologías en humanos como la colitis hemorrágica y síndrome urémico, enfermedades producidas debido principalmente al consumo de alimentos contaminados (carne y leche)[3]. Investigaciones epidemiológicas revelaron que el ganado doméstico es el principal responsable de la transmisión de *Escherichia coli* verotoxigénica [4]. Sin embargo, en la actualidad se han venido reportando la presencia de factores de virulencia como la presencia de toxinas tipo Shiga (verotoxinas) en APEC [1]

*Correspondencia autor: jorge.rodriguez.b@upch.pe

constituyendo las aves de corral una fuente potencial de producción de cepas patógenas de *Escherichia coli* para humanos. El objetivo del presente estudio fue determinar la presencia de factores de virulencia y patrones de resistencia antibiótica en 46 cepas de *Escherichia coli* aisladas a partir de casos de colibacilosis clínica en aves de corral.

2. Materiales y Método

Cuarenta y seis cepas de *Escherichia coli*, obtenidas a partir de casos clínicos de colibacilosis en aves de corral, fueron aisladas a partir de cultivo selectivo en Agar Mc Conkey y enriquecidas en caldo Tioglicolato durante 24 horas a 37 °C. Un perfil de resistencia a antibióticos de primera línea y segunda línea: ciprofloxacina, enrofloxacin, colistina, amoxicilina, florfenicol, doxiciclina, oxitetraciclina, fosfomicina y sulfatrimetropin fue realizado.

ADN genómico de *Escherichia coli* fue extraído a partir de 5 colonias utilizando el método de digestión con proteinasa K y solventes orgánicos [5]. El ADN genómico fue cuantificado por espectrofotometría y diluido a una concentración final de 10 ng/uL.

2.1 Huella genética dactilar por BOXA1R y REP-PCR

Fragmentos entre 100 y 1500 pares de bases fueron amplificados mediante BOX A1R y REP-PCR utilizando los cebadores y condiciones descritas por [6]. La reacción de PCR se realizó en un volumen final de 20 uL conteniendo 10 ng ADN genómico, 1X Buffer de PCR (20 mM Tris-HCl, 20 mM KCl, 5 mM (NH₄)₂SO₄), 2.5 mM MgCl₂, 10 pmoles de cada cebador (5'-3'):

REP1:IIIGCGCCGICATCAGGC y
 REP2:ACGTCTTATCAGGCCTAC;
 BOXA1R:CTACGGCAAGGCGACGCTGACG, 0.2 mM de dNTPs, 1U Maxima HotStart- Taq ADN polimerasa (Fermentas). Los ciclos termales utilizados para REP-PCR fueron: 1 ciclo inicial de 95 °C por 3 minutos, 30 ciclos de 90 °C por 30 segundos, 50 °C por 30 segundos, 52 °C por 1 minuto y 72 °C por 1 minuto, finalmente un ciclo de 72 °C por 8 minutos, para BOXA1R: 1 ciclo inicial de 95 °C por 3 minutos, 30 ciclos de 94 °C por 30 segundos, 50 °C por 1 minuto y 65 °C

por 1 minuto, finalmente un ciclo de 65 °C por 8 minutos, la amplificación se llevó a cabo en un termociclador Veriti Thermal Cycler (Applied Biosystems). Los productos de PCR fueron separados por electroforesis en gel de agarosa al 1 % en buffer TBE 1X (Tris, Borato, EDTA), teñidos con una solución de Bromuro de etidio (0.1 ug/mL) y visualizados mediante luz ultravioleta. Una huella dactilar genética (ADN fingerprinting) fue realizada a partir de los patrones de bandas generadas para BOX A1R y REP-PCR utilizando el programa Biodoc Analyze v2.2 (Biometra).

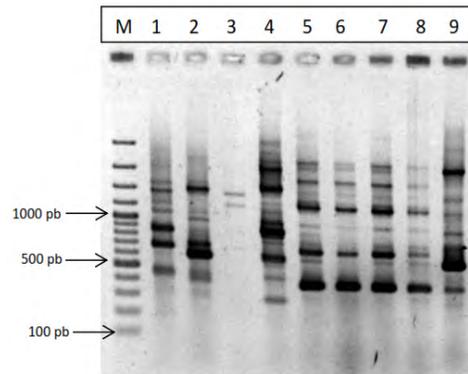


Figura 1. BOXA1R DNA fingerprinting (Huella genética de ADN) de 9 aislados de *Escherichia coli* provenientes aves comerciales (Broilers). Líneas 1-9, aislados clínicos de *Escherichia coli*, Línea M. marcador de peso molecular Generuler 100 bp plus (Fermentas), pb= pares de bases.

2.2 Amplificación del gen de Toxina Shiga1 (*stx1A*) y Toxina Shiga 2 (*stx2A*)

Fragmentos específicos para el gen de Toxina Shiga1 (*stx1A*) y Toxina Shiga 2 (*stx2A*) fueron amplificados mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando los cebadores descritos por [7] en un volumen final de 20 uL conteniendo: 10 ng ADN genómico, 1X Buffer de PCR (20 mM Tris-HCl, 20 mM KCl, 5 mM (NH₄)₂SO₄), 2 mM MgCl₂, 5 pmol de cada cebador (5'-3'):

stx1A;
 LP30:CAGTTAATGTCGTGGCGAAGG y
 LP31:CACCAGACAATGTAACCG CTG;
stx2A; LP43: ATCCTATTCCCGG
 GAGTTTACG y LP44: GCGTCAT
 CGTATACACAGGAGC, 0.2 mM de dNTPs, 0.5 U Maxima HotStart- Taq ADN polimerasa (Fermentas). Los ciclos termales fueron los siguientes: desnaturalización inicial de 94 °C por 3 minutos, seguido de 30

ciclos de 94 °C por 30 segundos, 53 °C por 60 segundos, 72 °C por 30 segundos y una extensión final de 72 °C por 5 minutos, la amplificación se llevó a cabo en un termociclador Veriti Thermal Cycler (Applied Biosystems). Los productos de PCR fueron separados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1 %, TBE 1X a 100V, teñidos con una solución de Bromuro de etidio (0.1 ug/mL) y visualizados mediante luz ultravioleta.

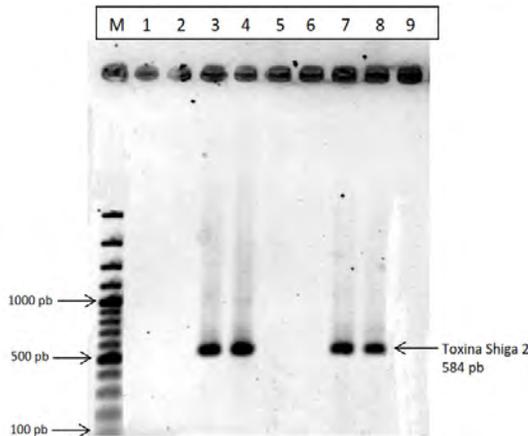


Figura 2. Amplificación por PCR del gen para Toxina Shiga 2 de 7 aislados de *Escherichia coli* provenientes aves comerciales (Broilers). Líneas 1-7, aislados clínicos de *Escherichia coli*, Línea 8. Control positivo (*Escherichia coli* verotoxigénica – Gen Toxina Shiga 2), Línea M. marcador de peso molecular Generuler 100 bp plus (Fermentas), pb= pares de bases.

3. Resultados y Discusión

Un total de 46 cepas diferentes de *Escherichia coli* fueron aisladas a partir de cornetes nasales (8/46, 17.4 %), hígado (4/46, 8.7 %), pulmón (5/46, 10.9 %), saco vitelino (6/46, 13 %), sacos aéreos (8/46, 17.4 %), senos infraorbitarios (6/46, 13 %) y tráquea (9/46, 19.5 %). La identidad de las cepas fue confirmada por la presencia de 46 patrones diferenciados de bandas amplificadas por BOXA1R y REP-PCR (Figura 1). Las 46 cepas aisladas fueron resistentes a antibióticos de primera línea y segunda línea: ciprofloxacina, enrofloxacin, colistina, amoxicilina, florfenicol, doxiciclina, oxitetraciclina, fosfomicina y sulfatrimetropin, resultado igual con lo reportado por otros autores [8,9]. El incremento de los reportes de resistencia antibiótica en *Escherichia coli* en sistemas de

producción animal viene siendo atribuido al uso de antibióticos en dosis subterapéuticas (promotores de crecimiento), el uso de antibióticos de primera y segunda línea en dosis terapéuticas y el uso excesivo de desinfectantes [8,9,10]. Sin embargo, no todas la *Escherichia coli* presentes en aves son potencialmente patógenas para humanos, pero es necesario recalcar la importancia de la potencial transmisión de factores de virulencia o genes de resistencia antibiótica de estas cepas a cepas no patógenas presentes en la microflora intestinal humana [11,12].

Nuestros resultados reportan un total de 6 cepas de *Escherichia coli* aisladas (6/46; 13.04 %) a partir de tráquea, senos infraorbitarios, sacos aéreos, cornetes nasales e hígado que amplificaron un fragmento de 584 pares de bases del gen productor de Toxina Shiga 2 (Figura 2). No se apreció amplificación en ninguna de la 46 cepas de *Escherichia coli* para gen productor de Toxina Shiga 1. Similares resultados han sido reportados para la presencia de *Escherichia coli* verotoxigénica (Toxina Shiga 2 positiva) en aves de corral con colibacilosis (23.8 %, 10/42) [13] en la India. Estudios en Canadá reportan un 53 % (52/97) de cepas portadoras de Toxina 1 o 2 en aves con cuadros clínicos de colibacilosis [1]. En contraste, [14] reportan la presencia de *Escherichia coli* O157 verotoxigénica (Toxina Shiga1 y 2 positivas) en aves de corral sanas en Eslovaquia en un orden de 9.2 %, [15]; en la India, en palomas y aves de corral clínicamente sanas, se reportan en un orden de 4.24 % [16] y en Finlandia, en palomas, se reportan un 3 %; las prevalencias más elevadas del orden del 70 % en aves sanas han sido reportadas en Nigeria [17], indicando la importancia de las aves de corral en la transmisión de esta cepa de *Escherichia coli*. Adicionalmente, reportes de la presencia de Toxina shiga 2 en heces de canarios domésticos (*Serinus canaria domestica*) sanos en Irán (6 %; 3/50) alertan de un nuevo potencial vehículo aviar para la transmisión de *Escherichia coli* verotoxigénica a humanos [18].

4. Conclusiones

El presente estudio constituye uno de los primeros reportes de *Escherichia coli*,

productora de shigatoxina 2 en sistemas de producción de pollos de carne en la costa peruana. Los resultados obtenidos indican la presencia *Escherichia coli* multidrogo resistente y productoras de Toxina Shiga 2 en cuadros clínicos de colibacilosis aviar sugiriendo la importancia de los sistemas de producción aviar en la transmisión de esta cepa de *Escherichia coli* verotoxigenica.

5. Agradecimientos

El presente estudio fue financiado por el Laboratorio de Microbiología - Bioservice S.R.L., los autores agradecen a los MV. Stephane Lovon, Brenda Jara, Madeleine Garcia, Bach. Heberht Uchuya y Jonathan Castro por el apoyo en la colección y preparación de muestras.

6. Bibliografía

- [1] Parreira V, Gyles C. Shiga toxin genes in avian *Escherichia coli*. *Vet Microbiol*. 2002; 87(4):341-352.
- [2] Gomis S, Riddell C, Potter A, Allan B. Phenotypic and genotypic characterization of virulence factors of *Escherichia coli* isolated from broiler chickens with simultaneous occurrence of cellulitis and other colibacillosis lesions. *Can. J. vet. Res*. 2001; 65:1-6.
- [3] Dorn C. Hemorrhagic colitis and hemolytic uremic syndrome caused by *Escherichia coli* in people consuming undercooked and unpasteurized milk. *J. Am. Vet. Med. Assoc. Lett*. 1988; 11:1360.
- [4] Beutin L, Geier D, Steinrück H, Zimmermann S, Scheutz F. Prevalence and some properties of verotoxin (Shiga-like toxin)-producing *Escherichia coli* in seven different species of healthy domestic animals. *J Clin Microbiol*. 1993; 31(9):2483-2488.
- [5] Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T. *Molecular Cloning – A Laboratory Manual*, 2nd Edition. Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York. 1989.
- [6] Albufera U, Bhugaloo-Vial P, Issack M, Jaufferally-Fakim Y. Molecular characterization of *Salmonella* isolates by REP-PCR and RAPD analysis. *Infection, Genetics and Evolution*. 2009; 9: 322–327.
- [7] Cebula T, Payne W, & Feng P. Simultaneous identification of strains of *Escherichia coli* serotype O157:H7 and their shiga-like toxin type by Mismatch Amplification Mutation Assay-Multiplex PCR. *Journal of Clinical Microbiology*. 1995; 33(1):248-250.
- [8] van den Bogaard E, London N, Driessen C, Stobberingh E.. Antibiotic resistance of faecal *Escherichia coli* in poultry, poultry farmers and poultry slaughterers. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2001;47: 763–771
- [9] Tadesse D, Zhao S, Tong E, Ayers S, Singh A, Barholomew M, McDermott P. Antimicrobial Drug Resistance in *Escherichia coli* from Humans and Food Animals, United States, 1950–2002. *Emerging Infectious Diseases*. 2012; 18(5):741-749.
- [10] McLaren I, Wales A, Breslin M, Davies R. Evaluation of commonly-used farm disinfectants in wet and dry models of *Salmonella* farm contamination. *Avian Pathology*. 2011; 40 (1):33-42.
- [11] Kanai H, Hashimoto H, Mitsuhashi S. Drug resistance and R plasmids in *Escherichia coli* strains isolated from broilers. *Microbiol Immunol*. 1983; 27: 471-478.
- [12] Linton A, Howe K, Bennett P, Richmond M. The colonization of human gut by antibiotic resistant *Escherichia coli* from chickens. *J Appl Bacteriol*. 1977; 43: 465-469.
- [13] Dutta T, Roychoudhury P, Bandyopadhyay S, Wani S, Hussain I. Detection & characterization of Shiga toxin producing *Escherichia coli* (STEC) & enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) in poultry birds with diarrhoea. *Indian J Med Res*. 2011;133:541-545
- [14] Pilipcinec E, Tkáčiková L, Naas H, Cabadaj R, Mikula I. Isolation of verotoxigenic *Escherichia coli* O157 from poultry. *Folia Microbiol (Praha)*. 1999; 44(4):455-456.
- [15] Farooq S, Hussain I, Mir M, Bhat M, Wani S. Isolation of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* and Shiga toxin 1 and 2f-producing *Escherichia coli* from avian species in India. *Lett Appl Microbiol*. 2009; 248(6):692-697.
- [16] Kobayashi H, Pohjanvirta T, Pelkonen S. Prevalence and characteristics of intimin- and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from gulls, pigeons and broilers in Finland. *J Vet Med Sci*. 2002; 64(11):1071-1073.
- [17] Oboegbulem S, Abiade C, Onunkwo, J, Ezenduka E, Chah F, Nwanta J, Anosike C. Incidence of verotoxigenic *Escherichia coli* in

poultry in Nsukka urban area of outtheastern Nigeria. *Animal Science Reporter* 2009;3(4): 128-131.

[18] Gholami-Ahangaran M, Zia-Jahromi N. Identification of shiga toxin and intimin

genes in *Escherichia coli* detected from canary (*Serinus canaria domestica*). *Toxicol Ind Health*. 2012; DOI: 10.1177/0748233712462480.