

Artículo Original/ Original Article

Portación de *fimH* en aislados de *Escherichia coli* productor de Toxina Shiga provenientes de ganado bovino, Departamento Cordillera, Paraguay

Melisa Florentín, Patricia Acuña, Natalia Rojas, Fátima Rodríguez, Rosa Guillén*

Departamento de Microbiología, Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud, UNA. Campus Universitario, San Lorenzo – Paraguay

Cómo referenciar este artículo/
How to reference this article:

Florentín M, Acuña P, Rojas N, Rodríguez F, Guillén R. Portación de *fimH* en aislados de *Escherichia coli* productor de Toxina Shiga provenientes de ganado bovino, Departamento Cordillera, Paraguay. *Mem. Inst. Investig. Cienc. Salud.* 2018; 16(1): 33-38

RESUMEN

Ciertas cepas de *Escherichia coli* productoras de toxina Shiga (STEC) tienen la capacidad de formar biofilm en alimentos y otras superficies, aumentando su potencial como fuente de contaminación. El gen *fimH* se ha asociado a la capacidad de formación de biofilm en *E. coli*. Este estudio observacional descriptivo de corte transversal se realizó con el objetivo de describir la portación de *fimH* en aislados STEC provenientes de muestras de materia fecal de ganado bovino del Departamento de Cordillera en el 2016. Los aislados de STEC se obtuvieron por cultivos, extracción de ADN y amplificación por PCR de genes *stx1* y *stx2*. El gen *fimH* se detectó por PCR convencional. Un total de 1006 aislamientos de *E. coli* se sometieron a extracción de ADN y amplificación por PCR para genes *stx1* y *stx2*. De éstos, 269 se identificaron como STEC, en los que la detección del gen *fimH* se realizó por PCR convencional. Un producto de PCR representativo se sometió a secuenciación del gen *fimH* y mostró 100% de homología con secuencias de la Base de Datos de GenBank. De 269 aislamientos STEC, 129 aislamientos (48%) resultaron ser portadores del gen *fimH* y por tanto con potencial de formar biofilm. Esta frecuencia elevada representa un riesgo de persistencia de estos patógenos en elementos y superficies de trabajo de sitios de expendio y manipulación de productos cárnicos. Este trabajo contribuye como una herramienta esencial para seguir con la línea de investigación, obteniendo datos de suma importancia que ayuden a describir la situación de riesgo de contaminación alimentaria en que se encuentra el país.

Palabras clave: STEC, biofilm, ganado bovino.

Portability of *fimH* in isolates of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from cattle, Department of Cordillera, Paraguay

ABSTRACT

Certain strains of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) have the ability to form biofilm in food and other surfaces, increasing their potential as a source of contamination. The *fimH* gene has been associated with the capacity for biofilm formation in *E. coli*. This cross-sectional descriptive observational study was carried out with the aim of describing the carrying of *fimH* in STEC isolates from faecal samples of bovine cattle from the Department of Cordillera in 2016. STEC isolates were obtained by cultures, extraction of DNA and PCR amplification of *stx1* and *stx2* genes. The *fimH* gene was detected by conventional PCR. A total of 1006 isolates of *E. coli* were subjected to DNA extraction and PCR amplification for *stx1* and *stx2* genes. Of these, 269 were identified as STEC, in which

Fecha de recepción: diciembre 2017. Fecha de aceptación: febrero 2018

*Autor correspondiente: Dra. Rosa Guillén, Departamento de Microbiología. Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud. Universidad Nacional de Asunción, Paraguay

Email: rmgullenf@gmail.com

the detection of the *fimH* gene was carried out by conventional PCR. A representative PCR product was subjected to sequencing of the *fimH* gene and showed 100% homology with sequences from the GenBank Database. Of 269 STEC isolates, 129 isolates (48%) were found to be carriers of the *fimH* gene and therefore with the potential to form biofilm. This high frequency represents a risk of persistence of these pathogens in elements and work surfaces of meat products sale and handling sites. This work contributes as an essential tool to continue with the line of research, obtaining data of great importance that help to describe the situation of food contamination risk of the country.

Keywords: STEC, biofilm, cattle.

INTRODUCCIÓN

Escherichia coli productor de toxina Shiga (STEC) es un patógeno de importancia alimentaria mundial. Los brotes causados por este microorganismo se asocian típicamente con alimentos contaminados de origen bovino o productos vegetales contaminados con heces bovinas. Las STEC, también conocidas como *E. coli* verotoxigénicas (VTEC) o enterohemorrágicas (EHEC), se caracterizan por la producción de dos potentes citotoxinas llamadas toxinas Shiga 1 y 2, codificadas respectivamente por los genes *stx1* y *stx2*. En los seres humanos estas bacterias se asocian con un amplio espectro de manifestaciones clínicas que varían desde diarrea leve y autolimitada hasta procesos más graves, muchas veces con secuelas importantes, como colitis hemorrágica (CH) o síndrome urémico hemolítico (SUH)^(1,2). El SUH es un cuadro clínico que se caracteriza por la tríada diagnóstica de: anemia hemolítica microangiopática, trombocitopenia e insuficiencia renal aguda (IRA). Es una enfermedad que afecta principalmente a los niños y que se presenta fundamentalmente como casos esporádicos en los países del Cono Sur, especialmente Argentina ocupando el primer lugar en el mundo en incidencia del síndrome que es alrededor de 200 a 400 casos por año^(3,4).

Algunos estudios previos han demostrado que ciertos aislados STEC tienen la capacidad de unir, colonizar y formar biofilm en alimentos y otras superficies⁽⁵⁾. Los biofilm son comunidades complejas de microorganismos que crecen embebidos en una matriz orgánica polimérica autoproducida y adherida a una superficie viva o inerte, aumentando su potencial como fuente de contaminación, además de reducir la eficacia de desinfección de las superficies^(6,7).

Las fimbrias se han asociado con la adhesión tisular de importantes cepas patógenas de *E. coli* como las STEC⁽⁸⁾. Las fimbrias de tipo 1 codificada por el gen *fimH* son las adhesinas más comunes que se encuentran en los aislamientos comensales y patógenos de *E. coli*, así como en otras *Enterobacteriaceae*. Son orgánulos de superficie adhesiva de aproximadamente 7 nm de ancho y 1 µm de longitud. El análisis de la formación de biofilm en cepas de *E. coli* con *fimH* mutada indicó que son drásticamente defectuosos en la unión inicial a superficies abióticas⁽⁹⁾. Estas observaciones ilustran que las fimbrias de tipo 1 son críticas para la unión inicial estable de célula a superficie para varias cepas de *E. coli*.

En la industria alimentaria es muy común la presencia de biofilm en tuberías, equipos y materiales ya que pueden formarse en cualquier tipo de superficie, incluyendo plástico, cristal, madera, metal y sobre los alimentos⁽⁷⁾.

Puesto que estas formaciones pueden contener microorganismos patógenos y presentan una mayor resistencia a la desinfección, se incrementan las probabilidades de contaminación del producto y de provocar infecciones alimentarias, razón por la que se considera que la presencia de biofilm en las superficies de contacto de la industria alimentaria constituye un evidente riesgo para la salud.

Según una investigación anterior se demostró que la frecuencia de *E. coli* patógena en ganado bovino paraguayo fue elevada, detectándose en más del 90% de las muestras al menos un factor de virulencia compatible con el patotipo STEC⁽¹⁰⁾. Sin embargo, aún no existen estudios que registren la portación del gen *fimH* y la capacidad de formación de biofilm en aislados STEC proveniente de ganado bovino paraguayo. En este contexto, el presente trabajo determinó mediante el uso de técnicas moleculares la frecuencia de portación del gen *fimH* en aislados STEC provenientes de ganado bovino, generando así los primeros datos nacionales. Esta información es de suma importancia para fortalecer medidas de control que puedan generar soluciones para combatir la formación de biofilm y permitir situarnos en la problemática que conlleva este fenómeno en las industrias alimentarias a nivel país.

MATERIALES Y MÉTODOS

Este estudio es observacional, descriptivo, de corte transversal. El protocolo de estudio cuenta con la aprobación de Comités Científicos y de Ética del IICS con código M09/17. Los aislados empleados en este estudio provinieron de un proyecto marco denominado "Caracterización molecular de factores de virulencia de *Escherichia coli* aislados del ganado bovino" que también cuenta con la aprobación de Comités Científicos y de Ética del IICS con el código de aprobación P06/2013. Los mismos han sido criopreservados en el biobanco del IICS. La caracterización molecular y fenotípica del proyecto marco incluyó la determinación de especie por PCR del gen *16S* y pruebas bioquímicas, así como la detección por PCR de los genes *stx1* y *stx2*. En el proyecto marco se analizaron un total de 1006 aislados de los cuáles 269 fueron identificados como STEC. Las muestras biológicas han sido manipuladas cumpliendo medidas estrictas de bioseguridad y todos los datos han sido codificados a fin de mantener la confidencialidad. Se realizó la detección del gen *fimH* por medio de PCR convencional. Se utilizó el protocolo descrito por Johnson *et al.*⁽¹¹⁾ con algunas modificaciones que se describen a continuación. Las secuencias de oligonucleótidos se muestran en la Tabla 1. El producto generado fue un fragmento de ADN de 508 pb.

Las condiciones de la mezcla para cada reacción de PCR fueron las siguientes: solución buffer 1X (Bioron, Alemania), MgCl₂ 4 mM (Bioron, Alemania), dNTP 0,2 mM (Bioron, Alemania), primers para el gen *fimH* 0,6 µM (Macrogen, Corea), Taq polimerasa 1U (Bioron, Alemania). El volumen final de la reacción fue de 25 µL conteniendo 2,5 µL de muestra de ADN como molde.

Las condiciones de termociclado fueron las siguientes: 25 ciclos de 95°C por 4 minutos inicialmente, luego 95°C por 30 segundos, 63°C por 30 segundos y 72°C por 1 minuto, un paso final de 10 minutos a 72°C. Se empleó el termociclador Applied Biosystems-2720 Thermal Cycler (Singapur).

Como no se contaba con cepa control del gen *fimH* se realizó un sistema *screening* a los 269 aislados STEC para determinar la portación del gen mencionado. Se conformaron 27 pooles de un promedio de 10 aislados por pool. De los pooles de ADN que presentaron productos amplificados de tamaño esperado se sometieron al análisis individual de ADN extraído de cada aislado que conformaba el pool, con la finalidad de individualizar cuál de ellos era el portador del gen.

Para confirmar la identidad de los amplicones obtenidos en las reacciones de PCR, se secuenció por el método de Sanger un producto positivo de tamaño esperado para el gen *fimH* (Macrogen, Corea) y se analizó la secuencia obtenida mediante el alineamiento con las de la base de datos de GenBank. La muestra con 95 % o más de homología fue empleada posteriormente como control positivo para las reacciones de PCR.

La visualización de los productos de PCR se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%. Para tal fin, se sembraron 5 µL de producto con loading buffer a una concentración final 1X y se realizó la corrida en cubas electroforéticas con buffer TAE (Tris, acetato, EDTA) al 1X a 120V por 40 min aproximadamente. La tinción se realizó empleando sybr safe al 10% (Invitrogen, USA). Un marcador molecular de 100 pb (Thermo Scientific GeneRuler, USA) fue utilizado para estimar el tamaño de los productos separados. Las bandas de los geles de agarosa se visualizaron mediante el uso del transluminador UV con cámara digital (UVDI, Taiwán).

Tabla 1. Secuencias de oligonucleótidos utilizados para las reacciones de PCR y tamaño de productos

Gen	Secuencias de oligonucleótidos (5' - 3')	Tamaño (pb)	Autor
<i>fimH</i>	TGCAGAACGGATAAGCCGTGG GCAGTCACCTGCCCTCCGGTA	508	Jhonson <i>et al.</i> , 2000 (11)

RESULTADOS

El sistema de *screening* empleado para encontrar los aislados portadores del gen *fimH* en las STEC en estudio fue exitoso (Figura 1). Se analizaron 269 aislados STEC agrupados en 27 pooles, identificándose a los aislados portadores del gen *fimH* en cada pool positivo en

las reacciones de PCR. La secuenciación de un producto representativo y su posterior alineamiento con secuencias almacenadas en la base de datos del GenBank permitió la confirmación de la presencia del gen analizado, con porcentaje de identidad del 100% (Figura 2 y Tabla 2). El aislado cuyo producto de amplificación se secuenció fue empleado como control positivo en las reacciones de PCR.

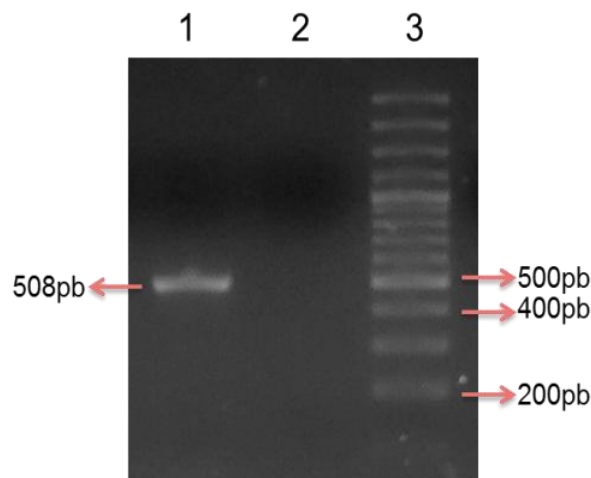


Figura 1: Amplificación por PCR del gen *fimH*. Electroforesis en gel de agarosa al 2% con tinción de sybr safe al 10%. Carril 1: Aislado positivo para el gen *fimH* (508pb), Carril 2: Control negativo, Carril 3: Marcador de peso molecular de 100 pb.

Escherichia coli isolate APEC 121 FimH (fimH) gene, complete cds
 Sequence ID: [AF490845.1](#) Length: 903 Number of Matches: 1
 ▶ See 2 more title(s)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
902 bits(488)	0.0	488/488(100%)	0/488(0%)	Plus/Plus
Query 5	AGAACGGATAAGCCGTGCGGGTGGCGCTTATTTGACGCCTGTGAGCAGTGCGGGCGGG	64		
Sbjct 355	AGAACGGATAAGCCGTGCGGGTGGCGCTTATTTGACGCCTGTGAGCAGTGCGGGCGGG	414		
Query 65	GTGGCGATTAAAGCTGGCTCATTAAATGGCCGTGCTTATTTTGGCAGACACCAACAATAT	124		
Sbjct 415	GTGGCGATTAAAGCTGGCTCATTAAATGGCCGTGCTTATTTTGGCAGACACCAACAATAT	474		
Query 125	AACAGCGATGATTTCCAGTTTGTGTGGAATATTTACGCCAATAATGATGTGGTGGTGCCT	184		
Sbjct 475	AACAGCGATGATTTCCAGTTTGTGTGGAATATTTACGCCAATAATGATGTGGTGGTGCCT	534		
Query 185	ACTGGCGGCTGCGATGTTTCTGCTCGTGATGTCACCGTTACTCTGCCGGACTACCCTGGT	244		
Sbjct 535	ACTGGCGGCTGCGATGTTTCTGCTCGTGATGTCACCGTTACTCTGCCGGACTACCCTGGT	594		
Query 245	TCAGTGCCAATTCTCTTACCCTTTTATTGTGCGAAAAGCCAAAACCTGGGGTATTACCTC	304		
Sbjct 595	TCAGTGCCAATTCTCTTACCCTTTTATTGTGCGAAAAGCCAAAACCTGGGGTATTACCTC	654		
Query 305	TCCGGCACAACCGCAGATGCGGGCAACTCGATTTTACCAATACCGCGTCGTTTTACCA	364		
Sbjct 655	TCCGGCACAACCGCAGATGCGGGCAACTCGATTTTACCAATACCGCGTCGTTTTACCA	714		
Query 365	GCGCAGGGCGTCGGCGTACAGTTGACGCGCAACGGTACGATTATTCCAGCGAATAACACG	424		
Sbjct 715	GCGCAGGGCGTCGGCGTACAGTTGACGCGCAACGGTACGATTATTCCAGCGAATAACACG	774		
Query 425	GTATCGTTAGGAGCAGTAGGGACTTTCGGCGGTAAGTCTGGGATTAACGGCAAATTACGCA	484		
Sbjct 775	GTATCGTTAGGAGCAGTAGGGACTTTCGGCGGTAAGTCTGGGATTAACGGCAAATTACGCA	834		
Query 485	CGTACCGG	492		
Sbjct 835	CGTACCGG	842		

Figura 2: Confirmación de aislado a emplear como control positivo. Alineamiento de la secuencia del producto de PCR de 508 pb obtenido por amplificación de *fimH* con una secuencia del gen *fimH* de *E. coli* almacenada en la base de datos del NCBI, obteniéndose 100% de identidad (Código de acceso de la secuencia alineada en el GenBank: AF490854.1).

Tabla 2: Aislado STEC portador del gen *fimH*

Gen	Aislado portador	Secuencia alineada*	Identidad	Código de acceso**
<i>fimH</i>	212.9	<i>Escherichia coli</i> isolate APEC 121 <i>FimH</i> (<i>fimH</i>) gene, complete cds	100%	AF490845.1

*Datos obtenidos mediante el empleo de la herramienta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool).

** Código de acceso a la secuencia en la base de datos del GenBank.

Habiendo realizado la estandarización de las condiciones de PCR fueron analizados los 269 aislados STEC para determinar la frecuencia de portación del gen *fimH*, resultando el 48% (n: 129) portador de dicho gen y por tanto con potencial de formar biofilm (Figura 3).

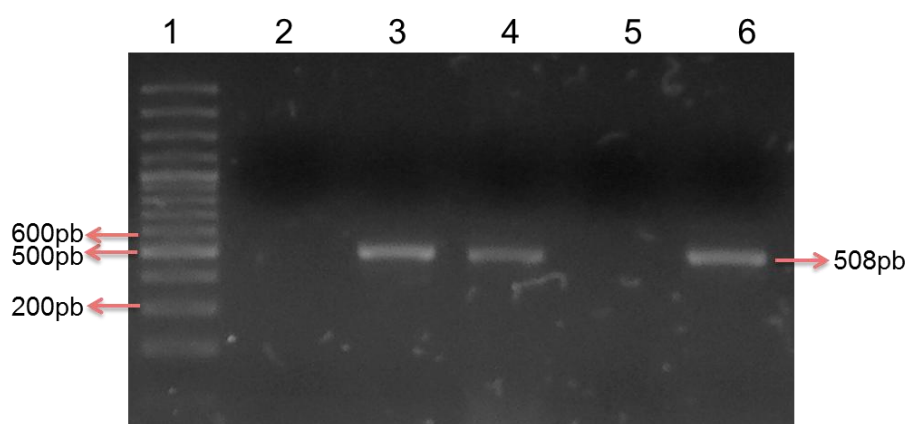


Figura 3: Detección del gen *fimH* en STEC provenientes de material fecal de bovinos. Electroforesis en gel de agarosa al 2% con tinción de sybr safe al 10%. Carril 1: Marcador de peso molecular de 100 pb, Carril 2: Control negativo, Carril 3: Control positivo para el gen *fimH* (508 pb). Carriles 4 y 6: Aislados positivos para el gen *fimH*. Carril 5: Aislado negativo para el gen *fimH*.

En adición se comparó la frecuencia de portación de los genes *stx1*, *stx2* y *stx1/stx2* con la frecuencia de portación del gen *fimH* en los aislados STEC. Se observó que el 40% (2/5) de los aislados STEC que portaban sólo el gen *stx1* resultaron ser portadores del gen *fimH*, las STEC que portaban sólo el gen *stx2* presentaron 54,6% (77/141) de portación de *fimH* y las STEC con *stx1* y *stx2* presentaron 40,6% (50/123) de portación del gen *fimH*. (Tabla 3).

Tabla 3: Frecuencia de portación de los genes *stx1* y/o *stx2* con respecto a la frecuencia de portación del gen *fimH* en aislados STEC

Portación de <i>stx1</i> y /o <i>stx2</i> (N)	Portación de <i>fimH</i> n (%)
<i>stx1</i> + (n: 5)	2 (40%)
<i>stx2</i> + (n: 141)	77 (54,6%)
<i>stx1</i> + <i>stx2</i> + (n: 123)	50 (40,6%)
Total de aislados STEC (n: 269)	129 (48%)

DISCUSIÓN

En Paraguay actualmente no existen investigaciones acerca del desarrollo de biofilm por parte de aislados STEC, por lo que se planteó estudiar este mecanismo de resistencia que generan las bacterias y analizar su comportamiento. En cuanto al porcentaje de portación genotípica realizada se observó una elevada frecuencia del gen en estudio, siendo el 48% de los aislados STEC portadores del gen *fimH*, lo que representa un alto potencial de formar biofilm. Se requiere una investigación adicional de la expresión de dicho gen para determinar su importancia relativa en la formación de biofilm. Esta frecuencia de portación se comparó con los resultados de Biscola *et al.* 2011⁽⁵⁾ también encontraron frecuencias

elevadas (98%) en cepas STEC no-O157 aisladas de bovinos. Los mismos sugieren que se debe tener en cuenta que la expresión de los genes de biofilm está en general relacionada con condiciones de cultivo particulares y que puede variar entre diferentes cepas incluso dentro del mismo serotipo. Al igual que Polifroni y Angel Villegas que presumen que la formación de biofilm no depende sólo de la información genética, sino también del ecosistema y las condiciones que rodean a la bacteria^(3,10-13).

Aunque los brotes de infecciones por STEC se han relacionado principalmente con comer carne molida de res mal cocida, también se han implicado una variedad de otros alimentos como vehiculos. Además, puede ocurrir contaminación cruzada en las plantas procesadoras de alimentos, durante su manipulación y preparación, lo que resulta en una amplia gama de alimentos que están implicados en los brotes de infecciones por STEC. La capacidad de las bacterias para adherirse y producir biofilm en las superficies puede influir en su persistencia durante la fabricación y el comercio minorista, así como en su capacidad de causar enfermedades. Considerando a las cepas STEC patógenas asociados directamente al SUH, se fortalece la importancia en la prevención de la contaminación de cualquier alimento⁽¹⁴⁾.

Las características propias de estas estructuras bacterianas implican un comportamiento diferente ante los procesos de desinfección, por lo tanto, con el fin de proporcionar al consumidor un producto con riesgos mínimos es necesario considerar como estrategias futuras para controlar las STEC medidas que controlen eficazmente el biofilm⁽¹⁴⁾.

Si bien las muestras analizadas provienen de un solo establecimiento, esta técnica queda disponible para ser aplicada futuramente al resto de los aislados STEC del Biobanco del IICS que cuenta con el mayor número de aislados STEC del país, contribuyendo así con una herramienta esencial para seguir con la línea de investigación, obteniendo datos de suma importancia que ayuden a describir la situación de riesgo de contaminación alimentaria en que se encuentra el país.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Brusa V, Aliverti V, Aliverti F, Ortega EE, de la Torre JH, Linares LH, et al. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in beef retail markets from Argentina. *Front Cell Infect Microbiol*. 2012;2:171.
2. Hur J, Jeon BW, Kim YJ, Oh IG, Lee JH. *Escherichia coli* isolates from calf diarrhea in Korea and their virulent genetic characteristics. *J Vet Med Sci*. 2013;75(4):519-22.
3. Varela G, Chinen I, Gadea P, Miliwebsky E, Mota MI, González S, et al. Detección y caracterización de *Escherichia coli* productor de toxina Shiga a partir de casos clínicos y de alimentos en Uruguay. *Rev Argent Microbiol*. 2008;40(2):93-100.
4. Etcheverría AI, Padola NL. Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *Virulence*. 2013;4(5):366-72.
5. Biscola FT, Abe CM, Guth BEC. Determination of adhesin gene sequences in, and biofilm formation by, O157 and non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from different sources. *Appl Environ Microbiol*. 2011;77(7):2201-8.
6. Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms. *Science*. 1999;284(5418):1318-22.
7. Chmielewski R, Frank J. Biofilm Formation and Control in Food Processing Facilities. *Compr Rev Food Sci Food Saf*. 2003;2(1):22-32.
8. Finlay BB, Falkow S. Common themes in microbial pathogenicity revisited. *Microbiol Mol Biol Rev*. 1997;61(2):136-69.
9. Pratt LA, Kolter R. Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilm formation: roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili. *Mol Microbiol*. 1998;30(2):285-93.
10. Rivelli SM, Guillén R. Caracterización molecular de factores de virulencia de aislados de *Escherichia coli* provenientes de ganado bovino del Paraguay. [master's thesis]. Paraguay: Universidad Nacional de Asunción; 2015.
11. Johnson JR, Stell AL. Extended Virulence Genotypes of *Escherichia coli* Strains from Patients with Urosepsis in Relation to Phylogeny and Host Compromise. *J Infect Dis*. 2000;181(1):261-72.
12. Polifroni R, Etcheverría AI, Padola NL, Parma AE. *Escherichia coli* verocitotoxigénico (VTEC): Características de virulencia y persistencia en el medio ambiente. *InVet*. 2009;11(1):65-70.
13. Villegas N, Baronetti J, Albesa I, Polifroni R, Parma A, Etcheverría A, et al. Relevance of Biofilms in the Pathogenesis of Shiga-Toxin-Producing *Escherichia coli* Infection. *Sci World J*;2013.
14. Carpentier B. Biofilms and their consequences, with particular reference to hygiene in the food industry. *Journal of Applied Microbiology*. 2008;75(6):499-511.