

Factores de Virulencia de *Escherichia coli* aisladas de porcinos en Argentina *

Cicuta, M.E.¹; Parma, A.E.²; Viñas, M.R.²; Sanz, M.E.²; Boehringer, S.I.¹; Roibón, W.R.¹; Benitez, M.C.¹; Barceló, M.C.¹; Vena, M.M.³

¹ Cátedra de Microbiología, Facultad de Ciencias Veterinarias, UNNE, Sargento Cabral 2139, Corrientes (3400), Tel/Fax 03783–425753, E-mail: cicuta@vet.unne.edu.ar

² Lab. Inmunoquímica y Biotecnología, FCV–UNCPBA, Pinto 399, Tandil (7000), Pcia. Bs. Aires, Tel/Fax 0293–426667, E-mail: aparma@vet.unicen.edu.ar

³ Investigaciones Biológicas S.A. F., Ameghino 1159, Florida (1602), Buenos Aires.

Resumen

Cicuta, M.E.; Parma, A.E; Viñas, M.R; Sanz, M.E; Boehringer, S.I; Roibón, W.R.; Benitez, M.C.; Barceló, M.C; Vena, M.M.: Factores de Virulencia de 'Escherichia coli' aisladas de porcinos en Argentina. En el presente trabajo se estudió la prevalencia de *Escherichia coli* toxigénicas (*ETEC* y *VTEC*) en lechones con diarrea o asintomáticos pero atrasados en el desarrollo, de un amplio sector de cría de Argentina. Con tal fin se tomaron 190 muestras de hisopados rectales, 162 de lechones de 1 semana a 3 meses de edad y 28 de madres, pertenecientes a 23 establecimientos de las provincias de Corrientes, Chaco, Santa Fe y Buenos Aires. El ADN de seis a diez cepas de *E. coli* aisladas por muestra, fue sometido a análisis de PCR con *primers* específicos para genes codificantes de *STI*-a, *LTI*, VT1, VT2 y VT2e. Se evidenció un apreciable predominio de *STI*-a (24,5%) sobre *LTI* (2,9%). Ninguna *ETEC/VTEC* fue aislada de las madres. Las cepas productoras de VT2e representaron el 2,1%, señalando el riesgo para la salud pública debido a la participación del cerdo en la cadena alimentaria.

Palabras clave: colibacilosis, cerdo, *ETEC*, *VTEC*.

INTRODUCCIÓN

Escherichia coli es el agente etiológico de un amplio espectro de enfermedades en el hombre y los animales, algunas de ellas extraintestinales y otras entéricas, dentro de las cuales se encuentra la diarrea de los lechones (colibacilosis en neonatos y post-destete) y la enfermedad de los edemas^{5,10}. Se caracterizan por ser endémicas, altamente transmisibles y por presentar un desenlace generalmente fatal, originando considerables pérdidas económicas en lechones entre las cuatro y doce semanas de edad⁸. Los signos clínicos y la mortalidad observada son el resultado de la acción de los diferentes tipos de toxinas producidas por *E. coli*^{5,11}.

En los casos de diarrea, las cepas aisladas elaboran enterotoxinas termolábil (*LT*) y termoestable (*ST*) o sólo esta última, denominándose a esta cepa *ETEC* o *E. coli* enterotoxigénica, que coloniza en intestino de animales domésticos por medio de fimbrias huésped específicas^{3,9}. Por su parte las cepas responsables de la enfermedad de los edemas sintetizan una verocitotoxina tipo 2 (VT2e), que es una variante de la citotoxina *SLTII* (*Shiga-like toxin*) responsable de enteritis hemorrágica y del síndrome urémico hemolítico del hombre (SUH)^{1,2,10}.

La toxina VT2 daña los elementos de la pared vascular induciendo a cambios degenerativos irreversibles y necrosis celular^{4,5}. Los cerdos infectados con *E. coli* productoras de toxinas *LT* y *SLTIIv* (VT2e) frecuentemente mueren de diarrea. Si las cepas infectadas son productoras de *SLTIIv* y alguna de las toxinas termoestable o ambas, el animal puede morir con signos de diarrea y/o edema^{5,8}.

Los tipos toxigénicos son susceptibles de variar sin modificación del serotipo, especialmente si las cepas provienen de diferentes regiones geográficas⁵. Por este motivo, se propuso estudiar la prevalencia de *E. coli* enterotoxigénicas y verotoxigénicas en cerdos con diarrea, atrasados en el desarrollo y asintomáticos de un amplio sector de cría de la Argentina.

MATERIAL Y MÉTODOS

Animales, muestras, cultivos: se tomaron 190 muestras por hisopado rectal, 162 de lechones de 1 semana a 3 meses de edad, de los cuales 94 presentaban diarrea, 19 sin sintomatología y 49 con atraso en el desarrollo, y 28 de madres (8 con diarrea y 20 asintomáticas) pertenecientes a 23 establecimientos de las provincias de Corrientes, Chaco, Santa Fe y Buenos Aires. Se sembraron en los medios de agar Mac Conkey y caldo tetratonato de Müller–Kauffman, con repique a agar

* Proyecto financiado por SGCYT–UNNE (PI 230).

Salmonella-Shigella para descartar *Salmonella sp.* De las colonias fermentadoras de la lactosa, se tomaron de 8 a 10 por placa y fueron confirmadas bioquímicamente como *E. coli*.

Cepas de Referencia: como controles positivos se utilizaron las siguientes cepas de referencia: *E. coli* ANASTRA E. 2539 (LT+, ST+) (FIO-CRUZ/INCQS/CCOC, Brasil) y B41: O 101: K-: F5+: F41+ ST+ (*WHO Collaborative Centre for Reference and Research on Escherichia, Statens Seruminstitut, Copenhagen*).

Ensayo de PCR:

- Preparación de las muestras:** las cepas control y las aisladas en el laboratorio se cultivaron en caldo Luria Bertani a 37°C durante 18 horas. El ADN fue extraído por calentamiento de las células empleándose entre 1 a 10 ng de ADN para su amplificación por PCR en un volumen total de 50 µl.
- Primers oligonucleotídicos:** los primers utilizados fueron STa-1/STa-2 para el gen de la toxina termoestable (STI a), LT-1/ LT-2 para la termolábil (LTI), VT-1 / VT-2 para VTI; VTII -1/ VTII-2 para VT2 y VTII-3/VTII-4 para VT2e. Alícuotas de las muestras amplificadas fueron analizadas en un gel de agarosa 1,5% con bromuro de etidio.
- Condiciones de reacción:** se efectuó en un volumen de 50 µl conteniendo 50 mM KCl 10 mM Tris-HCl pH 8,4; 0,01% (p/v) gelatina, 200 µM dATP, dGTP, dCTP y dTTP; 1,25 U Taq DNA polimerasa; 0,5 µM de cada primer. La concentración de Cl₂Mg fue de 4,7 mM (STIa) y 5,5 mM (LT I). El programa de termociclado para amplificación de STIa, LTI, VTI y VT2e fue de un ciclo inicial de 94°C – 120 s; un ciclo final de 72°C – 120 s y 30 ciclos de 94°C – 90 s, 59°C – 90 s y 72°C – 120 s¹². Para amplificar VT2, el programa térmico consistió en un ciclo inicial de 94°C – 120 s, uno final de 72°C – 300 s y 30 ciclos de 94°C – 90 s, 66 °C – 60 s y 72°C – 120 s⁷.
- Electroforesis en gel de agarosa:** alícuotas de 10 µl de cada amplificación fueron analizadas por electroforesis horizontal y transiluminación UV (300 nm). El gel estuvo constituido por 1,5 % de agarosa y 0,8 µg ml⁻¹ bromuro de etidio en tampón de corrida (89 mM Tris, 89 mM ácido bórico, 1,0 mM EDTA, pH 8,0). Como marcador de peso molecular fue usado 100 pb DNA Ladder (Promega), para el rango de 100–1500 pb.

RESULTADOS y DISCUSIÓN

Los resultados se detallan en Tabla 1.

Veinticinco sobre 102 animales con diarrea (24,5%), eran portadores de *E. coli* STI-a+. De tres sobre 102 (2,9%) se aisló *E. coli* LTI + (una de estas cepas tenía adhesina K88) y dos portaban cepas que codificaban conjuntamente para STIa y VT2e. De los lechones que pertenecían

al grupo sin diarrea pero atrasados en el desarrollo (49), se aislaron dos cepas VT2e+, una VT1+ VT2+ y dos LTI+. De los lechones sin diarrea (19), uno portaba *E. coli* VT2+. No se aislaron *E. coli* toxigénicas de las 20 madres sanas. Estos resultados se asemejan a los hallados en España⁶ y en Austria³; no así a los encontrados en Polonia⁹, donde predominó LT. No se aisló *Salmonella sp.* en ninguna de las muestras procesadas.

Se evidencia un apreciable predominio de cepas STIa+ (13,2%) sobre las LTI+ (2,6%) en el total de la población porcina estudiada (n = 190). Todas las camadas con diarrea de las que se aisló *E. coli* STIa+ provenían de madres con iguales características. De las crías sin signos de diarrea se aislaron sólo dos cepas enterotoxigénicas (LTI) correspondiendo a animales con atraso en el desarrollo. No se detectaron cepas verotoxigénicas ni enterotoxigénicas en las 20 madres asintomáticas. La casi totalidad de las cepas ETEC, VTEC, ETEC/VTEC, fueron aislados de animales con diarrea o atraso en el desarrollo.

En conclusión, el conocimiento de la prevalencia de ETEC y sus factores de virulencia es un dato de suma importancia que podría orientar para el desarrollo de futuros ensayos de inmunoprotección en Argentina. Debido a la vinculación de las cepas VTIIe+ con la enfermedad de los edemas y la merma del desarrollo de los lechones, su hallazgo (2,1 %) señala un riesgo potencial en la sanidad y rentabilidad de un establecimiento. La participación del cerdo en la cadena alimentaria del hombre, también le otorga a estos resultados significancia en la salud pública.

Abstract

Cicuta, M.E.; Parma, A.E.; Viñas, M.R.; Sanz, M.E.; Boehringer, S.I; Roibón, W.R.; Benitez, M.C.; Barceló, M.C; Vena, M.M.: Virulence factors of *Escherichia coli* isolated from pigs of Argentine. In this work we study the prevalence of porcine toxigenic *Escherichia coli* (ETEC and VTEC) in diarrhoeic or asymptomatic (but with a serious delay of growth) piglets of a wide region of Argentine. For this purpose, 190 rectal swabs were taken, 162 from animals between 1 week and 3 months old and 28 from dams, all of them from

Tabla 1. Detección por PCR de *E. coli* toxigénica en porcinos.

cat.	n	VT1	VT2	VT2e-STa	VT2e	VT1-VT2	STIa	LTI
LD+	94	0	0	2	0	0	21	3
LD-	19	0	1	0	0	0	0	0
LD-*	49	0	0	0	2	1	0	2
MD+	8	0	0	0	0	0	4	0
MD-	20	0	0	0	0	0	0	0
total	190	0	1	2	2	1	25	5
%		0	0,5	1	1	0,5	13,2	2,6

cat.: categoría, LD+: lechones con diarrea, LD-: lechones sin diarrea, LD-*: lechones sin diarrea pero atrasados en el desarrollo, MD+: madres con diarrea, MD-: madres sin diarrea.

23 farms from Corrientes, Chaco, Santa Fe and Buenos Aires provinces. By using specific primers, DNA of six strains per sample from isolated *E. coli* was screened by PCR for ST1a, LTI, VT1, VT2 and VT2e toxin genes. ST1a was predominant (24,5%), whereas LTI was detected in 2,9% and VT2e in 2,1%. No ETEC/VTEC was isolated from healthy sows. These findings remark the potencial risk for the sanitary condition of a piggery as well as for public health, taking into account the participation of this species in human food chain.

Key Words: colibacillosis, pig, ETEC, VTEC.

REFERENCIAS

1. **Aarestrup FM, Jorsal SE, Ahrens P, Wiuff C, Scheutz F.** 1996. Oedema disease caused by O-rough *Escherichia coli*. *Vet. Rec.* 139: 373.
2. **Aarestrup FM, Jorsal SE, Ahrens P, Jensen NE, Meyling A.** 1997. Molecular characterization of *Escherichia coli* strains isolated from pigs with edema disease. *J. Clin. Microbiol.* 35: 20–24.
3. **Awad M, Béla N.** 1995. Typing of *Escherichia coli* strains isolated from weaned pigs in Austria. *Magyar Allatorvosok Lapja*, 50: 771.
4. **Bertschinger HU, Stamm M, Vögeli P.** 1993. Inheritance of resistance to oedema disease in the pig experiments with an *Escherichia coli* strain expressing fimbriae 107. *Vet. Microbiol.* 35: 79–89.
5. **Bertschinger HU.** 1995. Pathogenesis of porcine post-weaning *Escherichia coli* diarrhoea and of oedema disease. *Pig New & Inform.* 16: 85N–88N.
6. **Garabal JI, González EA, Vázquez F, Blanco J, Blanco M.** 1995. Toxigenic *Escherichia coli* in Spain from 1986 to 1991. *Vet. Microbiol.* 47: 1–2.
7. **Parma AE, Viñas MR, Sanz ME.** 1996. Improvement of the polymerase chain reaction to detect *Escherichia coli* Shiga-like toxin II gene from clinical isolated. *J. Microbiol. Meth.* 26: 81–85.
8. **Rippinger P, Bertschinger HU, Imberechts H, Nagy B, Sorg I, Stamm M, Wild P, Wittig W.** 1995. Designations F18ab and F18ac for the related fimbrial types F107, 2134 P and 8813 of *Escherichia coli* isolated from porcine postweaning diarrhoea and from oedema disease. *Vet. Microbiol.* 45: 281–295.
9. **Osek J, Truszczyński M.** 1992. Occurrence of fimbriae and enterotoxins in *Escherichia coli* strains isolated from piglets in Poland. *Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis.* 15: 285–292.
10. **Wasteson Y, Lund A, Olsvik Ø.** 1992. Characterization of *Escherichia coli* strains isolated from pigs with edema disease. *Vet. Microbiol.* 30: 179–190.
11. **Wieler LH, Tigges M, Ebel F, Schäferkordt S, Djafari S, Schlapp T, Baljer G, Chakraborty T.** 1996. The enterohemolysin phenotype of bovine Shiga-like toxin producing *Escherichia coli* (SLTEC) is encoded by the EHEC-hemolysin gene. *Vet. Microbiol.* 52: 153–164.
12. **Woodward MJ, Carroll PJ, Wray C.** 1992. Detection of entero- and verocytotoxin genes in *Escherichia coli* from diarrhoea disease in animals using the polymerase chain reaction. *Vet. Microbiol.* 31: 251–261.