



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

“IDENTIFICACIÓN DE LOS GENES: *Stx1*, *Stx2*, *eaeA* Y *hlyA*,
EN CEPAS DE *Escherichia coli* AISLADAS DE CANALES Y
CARNE PROCESADA DE OVINOS.”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

PRESENTA:

PABLO GONZÁLEZ ANTONIO

ASESORES:

Dr. En CARN. HUMBERTO GUSTAVO MONROY SALAZAR
Dr. En C. ROBERTO MONTES DE OCA JIMÉNEZ
Dr. En CARN. JORGE ANTONIO VARELA GUERRERO

REVISORES:

Dr. En C. José Simón Martínez Castañeda
Ph. D. Juan Carlos Vázquez Chagoyán

Toluca, México; Enero de 2018.



DEDICATORIAS

Al M.V.Z. Teófilo González Antonio por la dicha de ser hermanos, amigos y colegas.

AGRADECIMIENTOS

A los colaboradores del cuerpo Académico de Epidemiología y Salud Pública Veterinaria, Secretaria de Investigación y Estudios Avanzados, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia y Universidad Autónoma del Estado de México.

Al M.V.Z. Teófilo González Antonio por su confianza al creer en mí formación como Médico Veterinario Zootecnista.

TÍTULO

Identificación de los genes: *Stx1*, *Stx2*, *eaeA* y *hlyA*, en cepas de *Escherichia coli* aisladas de canales y carne procesada de ovinos.

FINANCIAMIENTO

El presente trabajo de tesis, se realizó con el auspicio de la Universidad Autónoma del Estado de México, Secretaria de Investigación y Estudios Avanzados, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia y el Cuerpo Académico de Epidemiología y Salud Pública Veterinaria.

En el proyecto de investigación 3863/2015PIC.

“Caracterización molecular de *Escherichia coli* enterohemorrágica en carne ovina, con determinación inicial de contaminación por biosensores y cultivo bacteriano”

RESUMEN

E. coli productora de toxina shiga (ECST) y *E. coli* enterohemorrágica (ECEH) pertenecen a los grupos patógenos de *Escherichia coli* causantes de enfermedades diarreicas. La presencia de ECST y ECEH en estas enfermedades diarreicas se atribuye principalmente al consumo de vegetales y carnes provenientes de bovinos y ovinos contaminados con estos grupos patógenos y que actualmente se encuentran dentro de las etiologías más importantes del grupo de Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETA). ECST y ECEH presentan los genes *Stx1*, *Stx2*, *eaeA* y *hlyA* que codifican a proteínas con cualidades tóxicas para el hombre ocasionando graves enfermedades como la colitis hemorrágica (CH), síndrome urémico hemolítico (SUH) y púrpura trombocitopénica trombótica (PTT). Por lo tanto, el objetivo de esta investigación es identificar la presencia de los genes *Stx1*, *Stx2*, *eaeA* y *hlyA* en los aislamientos de *E. coli* obtenidos de canales de ovinos en rastro municipal de Capulhuac y en carne procesada de ovinos provenientes de la ciudad de Toluca. Se analizaron 71 aislados de *E. coli* para la identificación genes característicos de los grupos patógenos de ECST y ECEH. Los resultados encontrados indican: los 18 aislamientos de *E. coli* obtenidos de la carne procesada de ovinos no se identifica la presencia los genes analizados y, por otro lado, de los 53 aislados obtenidos de las canales de ovinos en el rastro municipal de Capulhuac, México, amplificaron los genes *Stx1* en 3.7% (2/53), *Stx2* en 5.6% (3/53), *eaeA* en 3.7% (2/53) y *hlyA* en 3.7% (2/53). De tal manera, que estas canales puede ser una fuente potencial de infección por *E. coli* productora de toxina shiga y *E. coli* enterohemorrágica.

Palabras clave: *Escherichia coli*, *Stx1*, *Stx2*, *eaeA*, *hlyA*.

ABSTRACT

Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC) and enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC) belong to the pathogenic groups of *Escherichia coli* that cause diarrheal diseases. The presence of ECST and EHEC in these diarrheal diseases is attributed mainly to the consumption of vegetables and meats from cattle and sheep contaminated with these pathogenic groups and which are currently among the most important etiologies of the group of Foodborne Diseases (ETA). STEC and EHEC present the genes *Stx1*, *Stx2*, *eaeA* and *hlyA* that encode proteins with toxic qualities for humans, causing serious diseases such as hemorrhagic colitis (HC), hemolytic uremic syndrome (HUS) and thrombotic thrombocytopenic purpura (TTP). Therefore, the objective of this research is to identify the presence of the *Stx1*, *Stx2*, *eaeA* and *hlyA* genes in the *E. coli* isolates obtained from ovine carcasses in the municipal slaughterhouse of Capulhuac and in processed meat from sheep from the city of Toluca. We analyzed 71 isolates of *E. coli* for the identification of genes characteristic of the pathogenic groups of STEC and EHEC. The results indicate that the 18 isolates of *E. coli* obtained from the processed meat of sheep does not identify the presence of the analyzed genes and, on the other hand, of the 53 isolates obtained from the sheep carcasses in the municipal slaughterhouse of Capulhuac, Mexico, amplified the *Stx1* genes in 3.7% (2/53), *Stx2* in 5.6% (3/53), *eaeA* in 3.7% (2/53) and *hlyA* in 3.7% (2/53). In such a way, that these carcasses can be a potential source of infection by Shiga toxin-producing *E. coli* and enterohemorrhagic *E. coli*.

Key words: *Escherichia coli*, *Stx1*, *Stx2*, *eaeA*, *hlyA*.

ÍNDICE GENERAL

DEDICATORIAS	I
AGRADECIMIENTOS	II
TÍTULO.....	III
FINANCIAMIENTO.....	IV
RESUMEN	V
ABSTRACT	VI
ÍNDICE GENERAL	VII
ÍNDICE DE TABLAS	IX
ÍNDICE DE FIGURAS	X
I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA.....	2
2.1. ANTECEDENTES.....	2
2.2. CARACTERÍSTICAS.....	3
2.3. CLASIFICACIÓN.....	3
2.4. <i>E. COLI</i> PRODUCTORA DE TOXINA SHIGA.....	4
2.5. <i>E. COLI</i> ENTEROHEMORRÁGICA.....	4
2.6. FACTORES DE PATOGENICIDAD Y VIRULENCIA.....	5
2.7. EPIDEMIOLOGÍA	5
2.8. TOXINA SHIGA (<i>STX</i>).....	6
2.9. ENTEROHEMOLISINA (<i>HLYA</i>).....	7
2.10. INTIMINA (<i>EAEA</i>)	8
2.11. RESERVORIO DE <i>ESCHERICHIA COLI</i> PATÓGENOS	8
2.12. MECANISMO DE PATOGENICIDAD.....	10
2.13. MANIFESTACIONES CLÍNICAS	11
2.14. TRASMISIÓN	12
2.15. TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO.....	13
2.16. LA PRODUCCIÓN Y CONSUMO DE LA CARNE DE OVINO EN MÉXICO.....	13
III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	15
IV. JUSTIFICACIÓN	16

Identificación de los genes: *Stx1*, *Stx2*, *eaeA* y *hlyA*, en cepas de *Escherichia coli* aisladas de canales y carne procesada de ovinos.

V.	HIPÓTESIS	18
VI.	OBJETIVO.....	19
6.1.	OBJETIVO GENERAL	19
6.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	19
VII.	MATERIAL Y MÉTODO	20
7.1.	AISLADOS.....	20
7.2.	REACTIVACIÓN DE AISLADOS	20
7.3.	EXTRACCIÓN DE ADN POR SHOCK TÉRMICO	20
7.4.	AMPLIFICACIÓN POR PCR MÚLTIPLE	21
7.5.	ELECTROFORESIS Y VISUALIZACIÓN EN TRASLUMINADOR DE LUZ UV	22
VIII.	LÍMITE DE ESPACIO	23
IX.	LÍMITE DE TIEMPO	24
X.	RESULTADOS	25
XI.	DISCUSIÓN.....	27
XII.	CONCLUSIONES.....	30
XIII.	SUGERENCIAS	31
XIV.	LITERATURA CITADA.....	32

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1. NÚMERO DE AISLAMIENTOS DE <i>E. COLI</i> DISPONIBLES PARA EL ESTUDIO.....	20
TABLA 2. SECUENCIA DE OLIGONUCLEÓTIDOS Y CONDICIONES DE PCR MÚLTIPLE.....	21
TABLA 3. RESUMEN E INTERPRETACIÓN MOLECULAR DE LOS AISLAMIENTOS DE <i>E. COLI</i> OBTENIDOS DE CANALES DE OVINOS.	25
TABLA 4. CLASIFICACIÓN DE LOS AISLAMIENTOS DE <i>E. COLI</i> OBTENIDOS DE CANALES DE OVINOS.....	26

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. AMPLIFICACIÓN POR PCR MÚLTIPLE DE LOS GENES *Stx1*, *Stx2*, *eaeA* Y *hlyA* EN AISLAMIENTOS DE *E. coli* OBTENIDAS DE CANALES DE OVINOS. COLUMNAS: M, MARCADOR DE PESO MOLECULAR; CC, CEPA CONTROL; CN, CONTROL NEGATIVO; AISLAMIENTOS: 8, *Stx1+* Y *hlyA+*; 92, *Stx2+*; 93, *Stx2+*; 94, *eaeA+*; 96, *Stx1+*, *Stx2+*, *hlyA+*; 99, *eaeA+* 25

I. INTRODUCCIÓN

Escherichia coli (*E. coli*), es el microorganismo más abundante de la microbiota gastrointestinal humana y desempeña un papel importante en la salud del sistema digestivo. Sin embargo, existen grupos de *E. coli* capaces de causar un amplio rango de enfermedades en el hombre de acuerdo a su naturaleza patógena (Méndez y Pérez, 2004), siendo los grupos *E. coli* productora de toxina shiga (ECST) y *E. coli* enterohemorrágica (ECEH) las de mayor importancia, por la capacidad de producir infecciones entéricas y enfermedades extraintestinales, debido a que poseen genes para la síntesis de toxinas, capacidad de adhesión e invasión de las células del hospedero, interferencia con el metabolismo celular y destrucción de los tejidos (Méndez y Pérez, 2004). La producción de toxina shiga (*Stx*) representa el atributo de patogenicidad más importante de ECST y es el factor que define este patotipo. ECEH, no sólo expresan la toxina shiga si no que poseen otros factores significativos de patogenicidad como, la intimina, una proteína de superficie esencial para la formación de las lesiones de adherencia y esfacelamiento (lesiones A/E) en las células del epitelio gastrointestinal y la enterohemolisina, que actúa en la lisis de los eritrocitos (Hannaoui *et al.*, 2009). La contaminación de los canales con material fecal en el proceso de sacrificio del ganado bovino y ovino (Rahimi *et al.*, 2012) y el consumo de alimentos contaminados o la contaminación cruzada durante la preparación, han sido señalados como las vías más importantes de transmisión de ECST y ECEH (Paton y Paton, 1998). Por lo tanto, el objetivo de la presente investigación es identificar la presencia de los genes *Stx1*, *Stx2*, *eaeA* y *hlyA* en los aislamientos de *Escherichia coli* obtenidos de canales de ovinos en rastro municipal de Capulhuac y en carne procesada de ovinos provenientes de la ciudad de Toluca.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Antecedentes

Las enfermedades gastrointestinales son uno de los principales problemas de salud pública en México. Se transmiten, ya sea por vía fecal-oral, o bien por el consumo de agua y alimentos contaminados (ETA's: Enfermedades Transmitidas por Alimentos), afectando principalmente a la población infantil y adultos mayores, en tanto, que su incidencia y prevalencia dependen del nivel socioeconómico de los pacientes. Entre los patógenos bacterianos emergentes asociados a ETA's, se destacan: *Salmonella Enteritidis* en huevos, *Salmonella Typhimurium* fagotipo 104, *Escherichia coli* O157:H7 en carnes y vegetales, *Listeria monocytogenes* en carnes y quesos, *Campylobacter jejuni* y *Yersinia enterocolitica* en carne de cerdo y aves, *Shigella dysenteriae* en agua y *Enterobacter sakasaki* en productos lácteos y deshidratados (Rivas *et al.*, 2008).

La importancia de *E. coli* como patógeno humano, ha sido reconocida prácticamente desde su descubrimiento y el microorganismo ha sido relacionado con la diarrea (especialmente en niños), la colitis hemorrágica (CH), disentería, infecciones en las vías urinarias, síndrome urémico hemolítico (SUH), purpura trombocitopénica trombótica (PTT), neumonía y con la meningitis: algunas de estas enfermedades pueden acabar en muerte (Bell y Kyriakides, 1998). Esta bacteria Gram negativa predomina en forma aerobia y anaerobia facultativa en el tubo digestivo de la mayor parte de los mamíferos, se puede encontrar en el medio ambiente ya que es capaz de sobrevivir durante cierto tiempo en el agua y los alimentos, de manera que su aislamiento es un indicador de contaminación fecal reciente (Mundo *et al.*, 2013).

Los cambios de hábitos y tendencias de consumo; la existencia de poblaciones especialmente susceptibles debido al envejecimiento, la desnutrición, personas inmunosuprimidas, niños, mujeres embarazadas, y los cambios en las poblaciones microbianas también representan un riesgo desde el punto de vista de las ETA's (Rivas *et al.*, 2008). Y de acuerdo con la Organización de las Naciones Unidas para

la Alimentación y la Agricultura (FAO), existe seguridad alimentaria cuando: “todas las personas tienen en todo momento acceso físico y económico a suficientes alimentos inocuos y nutritivos para satisfacer sus necesidades y sus preferencias, a fin de llevar una vida activa y sana”. Por el contrario, un acceso nulo o incierto a los alimentos se ha definido como inseguridad alimentaria (Mundo *et al.*, 2013).

2.2. Características

E. coli es un bacilo Gram negativo de 3 µm. de longitud, fermenta la glucosa, es oxidasa negativa, catalasa positiva, no esporulado, aerobio facultativo, fermentador de lactosa (Reyes, 2007) y es parte de la flora normal del intestino grueso en el hombre y de los animales (Martínez *et al.*, 2007).

2.3. Clasificación

Escherichia coli diarreogénica ha sido clasificada con base en criterios clínicos, epidemiológicos y moleculares en 6 grupos bien definidos: *E. coli* enteropatógena (ECEP), *E. coli* enteroinvasiva (ECEI), *E. coli* enterotoxigénica (ECET), *E. coli* enteroagregativa o enteroadherente (ECEAgg o ECEA), *E. coli* de adherencia difusa (ECAD) y *E. coli* productora de toxina shiga (ECST), dentro de la que se encuentra *E. coli* enterohemorrágica (ECEH) (Hannaoui *et al.*, 2009). Y para determinar el grupo patógeno al que pertenecen, Kauffman, desarrolló un esquema de serotipificación que continuamente varía y que actualmente tiene 176 antígenos somáticos (O), 112 flagelares (H) y 60 capsulares (K). El antígeno “O” es el responsable del serotipo; la determinación del antígeno somático “O” y “H” el flagelar y la unión entre ambos (O: H) indica el serotipo, el cual en ocasiones se asocia con un cuadro clínico en particular (Rodríguez, 2002).

A pesar de esta distinción, las categorías presentan coincidencias: interactúan con la mucosa intestinal, producen enterotoxinas o citotoxinas y pertenecen a ciertos serotipos O: H (Stanchi *et al.*, 2010).

2.4. *E. coli* productora de toxina shiga

E. coli productora de toxina shiga ha recibido diversas designaciones, una de ellas es *E. coli* verotoxigénica (ECVT), nomenclatura que le fue dada, haciendo mención a que la bacteria produce una citotoxina con actividad sobre las células Vero y la otra denominación empleada es *E. coli* shigatoxigénica o productor de toxina shiga (ECST). Estas diferentes denominaciones que le ha dado la literatura han generado confusión, pero en ambos casos (ECVT y ECST) se está refiriendo al mismo "patotipo", es decir, productoras de una o más toxinas de la familia shiga (*Stx1* y *Stx2*), toxinas con características similares a la que produce *Shigella dysenteriae* tipo 1 (Hannaoui *et al.*, 2009). Se han identificado ambas formas de toxina, *Stx1* y *Stx2* y se ha demostrado que los aislados de *E. coli* productora de toxina shiga producen una o ambas toxinas (Paton y Paton, 1998).

2.5. *E. coli* enterohemorrágica

El término "*E. coli* enterohemorrágica" (ECEH), fue originalmente acuñado para denotar las cepas que causan colitis hemorrágica (CH), síndrome urémico hemolítico (SUH) y la purpura trombocitopénica trombótica (PTT) debido a que producen la toxina shiga *Stx*, la intimina que ocasiona las lesiones A/E en las células epiteliales del intestino y la enterohemolisina que tendrá acción en la lisis de eritrocitos (Nataro y Kaper, 1998).

Por lo tanto, ECEH pertenece a un subgrupo de ECST e incluye una connotación clínica importante, no todas las ECST son patógenas, mientras que todas las ECEH sí lo son (Hannaoui *et al.*, 2009).

En las cepas ECEH aisladas, se han encontrado las variantes *Stx1* y *Stx2* que son inmunológicamente diferentes, de tal manera que se pueden aislar bacterias que sintetizan alguna de las toxinas o ambas (Rodríguez, 2002).

2.6. Factores de patogenicidad y virulencia

La producción de toxina shiga (*Stx*) representa el atributo de virulencia más importante para ECST y es el factor que define este patotipo. Las cepas ECEH, además de la capacidad de producir *Stx*, presentan factores de virulencia como el que se encuentra en una isla de patogenicidad denominada LEE (*locus of enterocyte effacement*) de 35 kb, ubicada en el cromosoma bacteriano que contiene, entre otros, el gen *eaeA* que codifica la intimina y un plásmido (pO157) que codifica una enterohemolisina (ECEH-*hlyA*) (Varela *et al.*, 2008).

2.7. Epidemiología

E. coli productora de toxina shiga y *E. coli* enterohemorrágica, son patógenos emergentes que ha alcanzado preponderancia en Norteamérica, Europa, Japón, y también se ha encontrado en países en vías de desarrollo como, México, Chile, Argentina, Brasil, Colombia y Venezuela (Hannaoui *et al.*, 2009). Su distribución en el ambiente está determinada por su presencia en el intestino. Por ser un habitante normal del intestino se usa desde hace un siglo como el mejor indicador de contaminación de los alimentos con materia fecal (Michanie, 2003).

Desde 1982 en EE.UU, ECEH serotipo O157:H7 se le ha asociado a brotes de enfermedades intestinales y extraintestinales por el consumo de alimentos contaminados con esta bacteria, y que más tarde se presentaría en Japón y otros países. Entre los primeros brotes relacionados se producirían por el consumo de hamburguesas poco cocidas en una cadena de comidas rápidas “Jack in the Box” en los EE.UU (1993), este brote produjo 700 enfermos y 4 muertos. El brote desencadenó la aplicación del Sistema HACCP (Análisis de Peligros y Puntos de Control Críticos) en la industria de la carne de ese país y en los que exportan a ese destino (Michanie, 2003). En Escocia (1996), se produjo un brote de *E. coli* ECEH O157: H7, 496 casos estaban relacionados y la muerte de 21 personas infectadas. La causa del brote se debió a la contaminación de la carne procedente de una carnicería, posiblemente de la contaminación cruzada entre la carne cruda y la

cocida (FAO, 2002). Durante la primavera de 2006, en Noruega, se reportó un brote de enfermedad por ECST O103:H25 siendo la fuente del brote el consumo de salchichas fermentadas de carne de oveja (Sekse *et al.*, 2009). Y recientemente en Europa y Norteamérica en 2011, la Organización Mundial de la Salud (WHO: del inglés, " World Health Organization") informo sobre un brote de ECEAgg y ECST O104:H4, presentándose 4075 casos y 50 personas fallecidas. Las evidencias epidemiológicas y alimentarias indica que los productos vegetales fueron el vehículo del brote (WHO, 2011).

2.8. Toxina Shiga (*Stx*)

Los genes que codifican a la toxina shiga *Stx*, se consideran como el principal factor de patogenicidad de ECST. Las *Stx*'s son de tipo AB5, que consisten en una subunidad A con actividad enzimática y cinco subunidades B con la capacidad de unión al receptor (Amézquita *et al.*, 2017). Los receptores de *Stx*, globotriaosilceramida (Gb3 y GB4) se encuentran en riñón humano particularmente en la región cortical, sitio principal de lesiones renales en pacientes con SUH (Paton y Paton, 1998).

Las *Stx*'s se han dividido en dos grupos principales, *Stx1* y *Stx2* y cada grupo tiene varios Subtipos de importancia clínica: el grupo *Stx1* está compuesto por tres subtipos *Stx1a*, *Stx1c* y *Stx1d*, el subtipo *Stx1a* puede potencializar SUH y se encuentra con mayor frecuencia en cepas ECST de origen ovino, mientras que aquellos que albergan *Stx1c* y *Stx1d* se les ha asociado con enfermedades en menor grado o ser portadores asintomáticos. (Gyles, 2008) y el grupo *Stx2* consta de los subtipos *Stx2c*, *Stx2d*, *Stx2e*, *Stx2f* que difieren en su actividad biológica y su asociación con la enfermedad, siendo la variante *Stx2c* asociada a la diarrea y al SUH en humanos y comúnmente se encuentra en cepas de ECST de origen ovino, *Stx2d* está asociado con cepas ECST ocasionando enfermedad en menor grado en humanos y son altamente virulentas en células vero debido a su citotoxicidad que se incrementa de 10 a 1000, *Stx2e* es responsable de la enfermedad de los edemas

en los cerdos y enfermedades humanas asociadas a diarrea en menor grado o infecciones asintomáticas y *Stx2f* una variante frecuentemente encontrada en excrementos de paloma y raramente se presenta en enfermedades humanas. Se han informado otras variantes de *Stx* (*Stx2a*, *Stx2b* y *Stx2g*) pero no hay información sobre su importancia clínica en humanos (Gyles, 2008). De tal forma que las cepas de ECST positivas a *Stx2* pueden ser más virulentas que aquellas que expresan *Stx1* (Amézquita *et al.*, 2017). Además, pueden producir *Stx1*, *Stx2* o variantes de *Stx1* o *Stx2*, solas o en combinación de dos o más toxinas (Leotta *et al.*, 2005).

2.9. Enterohemolisina (*hlyA*)

Las cepas de *E. coli* que causan infecciones extraintestinales como las ECEH poseen otros factores de virulencia como la enterohemolisina.

El plásmido de 60 MDa (pO157) encontrado en las cepas de ECEH O157:H7 alberga el operón ECEH-*hly*, que codifica una toxina RTX denominada enterohemolisina. El operón de ECEH-*hly* consiste en los cuatro genes: ECEH *hlyC*, *hlyA*, *hlyB* y *hlyD*, que son necesarios para la síntesis y exportación de esta toxina RTX (Schmidt y Karch, 1996).

De manera general la forma en que la enterohemolisina (ECEH-*hlyA*) contribuye a la patogénesis, se debe a que ocasiona lisis de los eritrocitos *in vivo* a fin de que estos liberen hemoglobina proporcionando una fuente de hierro que mejora el crecimiento de ECEH en el intestino (Paton y Paton, 1998) (Nataro y Kaper, 1998).

El gen *hlyA* es uno de los más importantes dentro del operón ECEH-*hly* y su función es lisar las células mediante la creación de poros en la membrana celular de los eritrocitos, leucocitos y las células tubulares renales. Su actividad sobre los granulocitos polimorfonucleares libera leucotrienos, histamina y ATP (Kerényi *et al.*, 2005).

2.10. Intimina (*eaeA*)

El estudio de la adhesión en cepas de *E. coli* que producen una unión íntima al epitelio se remonta a 1990, cuando se descubrió un solo gen, *eaeA*, en *E. coli* enteropatógena. El producto de este gen se estableció como necesario para la formación de lesiones de adherencia y esfacelación (lesiones A/E). En un estudio de seguimiento se indicó que este gen se conservó en ECEH y los primeros estudios *in vivo* demostraron que el producto de la proteína de este gen, la intimina, era importante para la unión íntima y la colonización del intestino tanto en lechones como en humanos (McWilliams y Torres, 2014). La intimina es una proteína de membrana externa de 97 kDa y su interacción con las microvellosidades da lugar a la lesión característica de adherencia íntima con formación de un cáliz, elongación y caída de las microvellosidades del epitelio gastrointestinal (lesiones A/E). Aunque, el gen *eaeA* es el principal implicado en estas lesiones, existen otros genes involucrados en este fenómeno (genes: *esp*, *sep* y *tir*) y se agrupan en una isla de patogenicidad cromosómica LEE ("*Locus Enterocyte Effacement*") (Hannaoui *et al.*, 2009). El LEE se describió por primera vez como un locus de 35 kb que se conservó en diferentes aislados de ECEH, ECEP y no presente en cepas no patógenas de *E. coli*. Dado que la LEE y sus proteínas efectoras asociadas desempeñan un papel significativo en la virulencia de la ECEH (McWilliams y Torres, 2014).

2.11. Reservorio de *Escherichia coli* patógenos

E. coli se puede encontrar en medio ambiente ya que es capaz de sobrevivir durante cierto tiempo en el agua y los alimentos, de manera que su aislamiento es un indicador de contaminación fecal reciente (Chávez *et al.*, 2007).

Varios factores influyen en la supervivencia y crecimiento de ECST y ECEH en los alimentos, entre ellos se encuentran la temperatura, el pH y la actividad del agua. Se toma como referencia a ECEH O157: H7 ya que es uno de los patógenos emergentes que se encuentran dentro de las ETA's. Estudios sobre la sensibilidad térmica de *E. coli* O157:H7 en la carne de res molida indican que el patógeno no

posee una resistencia al calor y se destruye cociendo los alimentos hasta que todas las partes alcancen una temperatura de 70°C o más (FAO y OMS, 2004). La temperatura óptima para la multiplicación de *E. coli* O157:H7 es aproximadamente 37°C, por lo tanto, no crece a temperaturas inferiores de a 10°C o superiores de 44°C. Sin embargo, puede sobrevivir al proceso de congelación, presentando una reducción en la concentración de la misma, sus valores de pH favorecen el crecimiento en pH 4 a 9, debido a su resistencia al ácido confiere la capacidad de sobrevivir durante su circulación por el estómago y en alimentos ligeramente ácidos, y con una actividad de agua (aW) mínima de 0,95. El grado de resistencia al ácido varía entre las distintas cepas de ECEH y es influenciado por la fase de crecimiento y otros factores ambientales (OMS, 2016). *E. coli* O157:H7 puede estar presente en una gran variedad de animales silvestres y domésticos entre los cuales se encuentran bovinos, porcinos y ovinos, siendo principalmente los rumiantes y sus heces fecales un reservorio natural de este patógeno (Gallegos *et al.*, 2009). De tal manera que puede estar presente en granjas o en corrales de alimentación, con la capacidad de sobrevivir por lo menos cuatro meses en sedimentos o en abrevaderos y más de 2 meses en áreas de pastos o cultivos fertilizados con estiércol de ganado especialmente en tiempos lluviosos (FAO y OMS, 2004).

El ganado y otros rumiantes, en particular, los ovinos y sus productos han sido documentados como reservorios de ECST, ECEH y *E. coli* no O157, además, de estar implicados en enfermedades humanas en diferentes partes del mundo (Amézquita *et al.*, 2017).

La resistencia a los ácidos es una característica del serotipo ECEH O157:H7 y otros serotipos de ECST. ECST positivo al gen *eaeA* forma una lesión de adherencia y esfacelación (A/E) en células epiteliales intestinales. La mayoría de las ECEH son positivas a *eaeA* y se ha identificado como un factor de riesgo para SUH (Gyles, 2008).

2.12. Mecanismo de patogenicidad

Al igual que otras infecciones entéricas por *E. coli* patogénicas, el proceso de la enfermedad implica la colonización del intestino. La colonización es el proceso mediante el cual ECST y ECEH superan la acidez gástrica como mecanismo de defensa del huésped y se establece en el intestino (Gyles, 2008), para iniciar con las lesiones de A/E que involucran cambios estructurales que provocan la pérdida de las microvellosidades de los enterocitos y la adherencia íntima entre la bacteria y la superficie celular con la alteración del citoesqueleto, que resulta de la formación de estructuras conocidas como pedestales que incluyen actina polimerizada, α -actinina, talina, enzimas, cadenas ligeras de miosina, microtúbulos, filamentos intermedios y redes de filamento (Reyes, 2007).

La adherencia íntima de la bacteria con la célula epitelial está mediada por la intimina y *EspE*, en donde la bacteria inserta su propio receptor en la superficie de la célula y cuando es endocitado por las células blanco produce el bloqueo de la síntesis proteica y se adhiere a la célula para generar la destrucción de las microvellosidades lo que provoca muerte celular. La lesión causada en los enterocitos induce a liberar citocinas proinflamatorias como la interleucina 8 (IL-8). Simultáneamente intervienen células del sistema inmune. Las células M del epitelio detectan los antígenos bacterianos e inducen a los macrófagos a liberar interleucina 1 (IL-1) y el factor de necrosis tumoral (TNF), lo que ocasiona un incremento de la citotoxicidad y daño a las células endoteliales de los pequeños vasos sanguíneos (Reyes, 2007).

En humanos los órganos blancos que poseen el receptor Gb3; el LPS bacteriano y las citocinas del hospedero aumentan la sensibilidad a las *Stx* incrementando la disponibilidad de dichos receptores. Las lesiones histopatológicas principales ocurren por interacción de la *Stx* con las células endoteliales, las cuales se hinchan y se desprenden a nivel del glomérulo, simultáneamente se produce un depósito de fibrina y plaquetas en la microvasculatura renal, oclusión de los capilares y

reducción del flujo sanguíneo provocado la insuficiencia renal y ruptura de los glóbulos rojos. En los vasos sanguíneos se produce ulceración endotelial, con depósito de fibrina; las plaquetas se activan y se adhieren ocasionando trombosis y alteración de la función del órgano blanco. Debido al consumo de plaquetas se produce trombocitopenia y por consecuencia hemorragias espontáneas. La interacción endotelial-plaquetaria y el reclutamiento de leucocitos polimorfonucleares agrava aún más el daño endotelial por lo que se produce anemia hemolítica debido a la destrucción de los glóbulos rojos en la sangre al circular por los vasos dañados. Principalmente, se afectan intestino, riñón y sistema nervioso central (Reyes, 2007).

2.13. Manifestaciones clínicas

Tras la ingestión de ECEH o ECST, la respuesta humana varía desde una infección asintomática hasta la muerte. El período de incubación desde el momento de ingestión hasta la aparición de los primeros síntomas varía de uno a ocho días. Típicamente la enfermedad comienza con cólicos y diarrea sin hemorragia que puede avanzar, aunque no necesariamente a una diarrea hemorrágica en un período de dos a tres días y usualmente la diarrea hemorrágica se presenta en el 70% o más de los pacientes sintomáticos. Las infecciones por cepas ECST, varía desde una infección asintomática, diarrea acuosa, hasta presentarse colitis hemorrágica y síndrome urémico hemolítico, mientras que en las infecciones por ECEH, las manifestaciones clínicas se tornan aún más severas ya que además de presentar la colitis hemorrágica (CH) y el síndrome urémico hemolítico (SUH) presentan la púrpura trombocitopénica trombótica (PTT) (FAO y OMS, 2004).

Los síntomas de la CH incluyen cólicos severos seguidos por una diarrea voluminosa y hemorrágica, erosión y hemorragia de la mucosa del colon. La CH puede ser la única manifestación de una infección por ECEH y puede preceder el desarrollo del SUH, existen complicaciones de la CH asociada con ECEH que incluyen hemorragia digestiva alta y embolia cerebral. Se calculan que el índice de

mortalidad para aquellas personas que padecen de colitis hemorrágica sin avance al SUH es del 1% (FAO y OMS, 2004).

El SUH se caracteriza por una insuficiencia renal aguda, uremia, anemia hemolítica, trombocitopenia (deficiencia de plaquetas) y puede causar complicaciones neurológicas (convulsiones, accidentes cerebrovasculares y coma) en el 25% de los pacientes. Las lesiones son causadas por la circulación de *Stx* libre soluble o por unión en la sangre. Aproximadamente 50% de los supervivientes pueden padecer secuelas renales crónicas (WHO, 2011).

De vez en cuando, los pacientes con una infección por ECEH contraen la púrpura trombocitopénica trombótica (PTT), una condición similar al SUH pero que tiene más probabilidades de presentarse en adultos con lesiones neurológicas más prominentes y menos efectos renales que en el SUH (FAO y OMS, 2004).

La Organización Mundial de la Salud, indica que los antibióticos no deben formar parte del tratamiento de los pacientes con enfermedad por ECST Y ECEH ya que posiblemente aumenten el riesgo de SUH posteriormente (OMS, 2016) (FAO y OMS, 2004). La incidencia de infección con ECEH varía por grupo de edades, con la incidencia más alta de casos informados en niños. Además de los niños, se sabe que los ancianos también son susceptibles a la infección (FAO y OMS, 2004).

2.14. Trasmisión

ECEH y ECST pueden ser transmitidos a los seres humanos por la carne contaminada poco cocida, productos lácteos, jugo de frutas, por contacto directo con animales o estiércol, contacto persona a persona y a través del consumo de agua. Sin embargo, la contaminación de la carne con material fecal en el proceso de sacrificio del ganado bovino y ovino es la principal vía de transmisión (Rahimi *et al.*, 2012). Gran parte de las infecciones han sido atribuidas al consumo de alimentos contaminados, en particular, la carne molida se considera un medio de vehículo debido a la contaminación cruzada que ocurre previo o durante su preparación, además, de la dispersión en frutas y vegetales como resultado de una

Ineficaz muerte de este patógeno en la carne durante la preparación para la cocción (Amézquita *et al.*, 2017). Estudios epidemiológicos muestran que el estiércol del ganado es la fuente principal de la mayoría de las infecciones por ECST y ECEH que se presentan en los seres humanos, por consiguiente, los alimentos asociados ya sea directa o indirectamente con estos animales (carne y productos lácteos de consumo, pieles y otros como abonos a base de estiércol) son frecuentemente implicados como vehículos de transmisión a las poblaciones humanas (FAO y OMS, 2004).

2.15. Técnicas de diagnóstico

Para el aislamiento, la identificación y la caracterización de cepas de *E. coli* se aplican métodos convencionales *in vivo* e *in vitro* y de biología molecular; aislamiento bacteriano, pruebas bioquímicas, pruebas de aglutinación, la demostración de la producción de la toxina *Stx* mediante un modelo *in vitro* que permita observar el efecto citopático en cultivo de células Vero (células de riñón de mono verde), CHO (células de ovario de hámster chino) o HeLa (células de carcinoma cérvico-uterino), otro método y aplicado en este estudio es la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR: del inglés, "*Polymerase Chain Reaction*"), que consiste en la amplificación *in vitro* de un fragmento de ADN específico, en donde la hibridación se realiza entre el ADN blanco y el iniciador (una secuencia conocida de un fragmento específico de un gen) (Rodríguez, 2002). En la tabla 2, se presentan las secuencias de iniciadores empleadas para la identificación de los genes involucrados en la patogenicidad de ECST y ECEH.

2.16. La producción y consumo de la carne de ovino en México

De acuerdo a los datos publicados por el Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP), en 2014, se tiene una producción nacional 114,167 toneladas de carne de ovino. Particularmente el Estado de México registró 16,909 toneladas, ubicándolo como el estado con mayor producción (SIAP, 2014). Actualmente la ovinocultura mexicana es primordialmente hacia la producción de carne lo cual llega

Identificación de los genes: *Stx1*, *Stx2*, *eaeA* y *hlyA*, en cepas de *Escherichia coli* aisladas de canales y carne procesada de ovinos.

a constituir una muy importante proporción en la dieta cárnica de diversas regiones. La mayor demanda se localiza en el centro del país, siendo sus mayores consumidores el Estado de México y Distrito Federal, además de los estados de Monterrey, Guadalajara y Puebla (Orona *et al.*, 2014).

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Desde el último brote de *E. coli* ocasionado por ECET, ECEI, ECEP, ECEH y *E. coli* no O157:H7 que afectó a la población de Chalco en México en el año 2000, no se tiene registro de nuevos brotes de *E. coli* que hayan afectado a la población mexicana. Sin embargo, en las investigaciones realizadas por Amézquita *et al.*, en 2012, identificaron ECEH O157:H7 en heces de ovinos y en 2014 identifican ECST en heces de ovinos, investigaciones realizadas en Culiacán y en otras investigaciones realizadas por Reyes *et al.*, en 2013, identifican ECEH O157:H7 en las canales de bovinos de rastros del centro y norte del Estado de México, de tal manera, que se ponen en manifiesto la existencia de ECST y ECEH O157:H7 en el estado de Culiacán y el Estado de México, patógenos que podrían causar un problema de salud pública en México.

IV. JUSTIFICACIÓN

Las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) constituyen una importante causa de morbilidad, mortalidad y un significativo impedimento al desarrollo socioeconómico en todo el mundo, ya que ha seguido sin conocerse la carga de enfermedades que generan los alimentos insalubres. Una información precisa sobre la carga de las ETA's puede orientar adecuadamente a los planificadores de políticas a la hora de asignar recursos apropiados al control de la inocuidad de los alimentos y a las intervenciones en este ámbito (WHO, 2015).

Las ETA's se han relacionado a enfermedades diarreicas según la OMS (WHO, 2015) y entre los principales agentes etiológicos se encuentran *Salmonella enteritidis*, *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter jejuni*, *Yersinia enterocolitica*, *Shigella dysenteriae*, *Enterobacter sakasaki*, y *Escherichia coli*. (Rivas *et al.*, 2008) la cual se clasifica según su presentación clínica en 6 grupos; *E. coli* enteropatógena (ECEP), *E. coli* enteroinvasiva (ECEI), *E. coli* enterotoxigénica (ECET), *E. coli* enteroagregativa o enteroadherente (ECEAgg o ECEA), *E. coli* de adherencia difusa (ECAD) y *E. coli* productora de toxina shiga (ECST), dentro de este último grupo se encuentran las *E. coli* enterohemorrágicas (ECEH) (Hannaoui *et al.*, 2009).

Las bacterias *E. coli* que se encuentran en los grupos ECST y ECEH son de mayor patogenicidad debido a que poseen genes que codifican a la toxina shiga (*Stx1*, *Stx2*), a la proteína intimina (*eaeA*) y la enterohemolisina (*hlyA*), de manera que estos genes son responsables de causar desde una diarrea acuosa y sanguinolenta hasta la colitis hemorrágica, síndrome urémico hemolítico y purpura trombocitopénica trombótica en el hombre. Estas enfermedades son de importancia en salud pública ya que su origen principalmente ha sido por el consumo de vegetales y carnes provenientes de bovinos y ovinos contaminados con estos patógenos.

En Europa y Estados Unidos de América han reportado brotes de estas enfermedades y casos de muerte relacionadas con la bacteria *E. coli*. En México el

brote más reciente relacionado a estos grupos de *E. coli* fue en el 2000 en Chalco, en donde se reportaron los grupos ECET, ECEI, ECEP y *E. coli* no O157:H7 como los agentes etiológicos que ocasionaron diarrea a causa del desbordamiento de aguas negras (Cortés *et al.*, 2002).

Actualmente en México no se tiene registro de nuevos brotes de enfermedades diarreicas ocasionadas los grupos patogénicos de ECST y ECEH, sin embargo, en las investigaciones realizadas por Amézquita *et al.* (2012 y 2014) en Culiacán y Reyes *et al.* (2013) en el Estado de México identificaron estos grupos en heces de ovinos y canales de bovinos.

Debido a su constante producción en el centro del país y el alto consumo de la carne de ovino localizada en el Estado de México y el Distrito Federal, y los hallazgos encontrados en las investigaciones anteriores que indican la presencia de los patógenos ECST y ECEH en la especie ovina en México, surge la necesidad de identificar la presencia de los genes *Stx1*, *Stx2*, *eaeA* y *hlyA* que caracterizan a los grupos patógenos de ECST y ECEH en los aislamientos de *Escherichia coli* obtenidos de canales de ovinos de rastro municipal de Capulhuac y en carne procesada de ovinos provenientes de la ciudad de Toluca, a fin de que los resultados obtenidos indiquen la presencia o ausencia de estos grupos patogénicos *E. coli* que podrían ser un riesgo para la salud pública de la entidad.

V. HIPÓTESIS

Los genes *Stx1*, *Stx2*, *eaeA* y *hlyA* se encuentran presentes en aislamientos de *Escherichia coli* obtenidas de canales y carne procesada de ovinos.

VI. OBJETIVO

6.1. Objetivo general:

Identificar la presencia de los genes *Stx1*, *Stx2*, *eaeA* y *hlyA* en los aislamientos de *Escherichia coli* obtenidos de canales de ovinos en rastro municipal de Capulhuac y en carne procesada de ovinos provenientes de la ciudad de Toluca.

6.2. Objetivos específicos:

1. Obtener la frecuencia de los genes *Stx1*, *Stx2*, *eaeA* y *hlyA* en aislamientos de *E. coli* obtenidos de canales y carne procesada de ovinos.
2. Clasificar los aislamientos de *E. coli* dentro de los 6 grupos descritos con base a criterios moleculares mediante la amplificación de los genes *Stx1*, *Stx2*, *eaeA* y *hlyA*.

VII. MATERIAL Y MÉTODO

7.1. Aislados

Para este estudio, se contó con un cepario de 71 aislamientos de *E. coli* mantenidos a -80°C resguardados en el Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal (CIESA) de la FMVZ-UAEM y que constan de 53 aislamientos obtenidos de canales de ovinos procedentes del rastro municipal de Capulhuac, Estado de México, durante el periodo de Enero a Junio de 2015 y 18 aislamientos obtenidos de la carne procesada de ovinos procedentes de puntos de venta al público de la ciudad de Toluca, durante el periodo de Julio a Diciembre de 2015 (Tabla 1).

Tabla 1. Número de aislamientos de *E. coli* disponibles para el estudio.

Aislamientos de <i>E. coli</i>			
Número de aislamientos obtenidos de canales en unidad de sacrificio (rastro).	Número de aislamientos obtenidos de carne procesada en puntos de venta al público.	Total de aislamientos.	
53	18	71	

* Los aislamientos fueron mantenidos a -80°C.

7.2. Reactivación de aislados

Los aislados se tomaron con el asa bacteriológica de cada uno de ellos y fueron sembrados en placas de agar MacConkey (MAC) e Infusión Cerebro Corazón (BHI) y se incubaron a 37°C durante 24 horas, posteriormente se observaron las placas y se verificaron las características morfológicas y fenotípicas de *E. coli* (Rodríguez, 2002).

7.3. Extracción de ADN por shock térmico

En viales de 1.5 ml. se agregó 1 ml. de agua destilada estéril, posteriormente se agregó una asada del cultivo bacteriano, paso seguido se centrifugó a 14,341

gravidades por 10 min. y se eliminó el sobrenadante, este proceso se realizó tres veces, al finalizar se agregaron 200 µl de H₂O estéril y se homogeneizó, en seguida se colocaron los viales en agua a 100°C por 5 min., posteriormente se agitó por 1 min. y se colocaron los viales a -20°C por 5 min., este proceso se realizó tres veces, al concluir se centrifugó a 14,341 gravidades por 3 min., el sobrenadante fue trasvasado a un vial estéril y conservado a -20°C hasta su utilización.

7.4. Amplificación por PCR múltiple

La reacción total de PCR fue de un volumen de 25 µl: 13.3 µl H₂O, 2.5 µl ADN 100 ng, 2.5 µl Buffer, 2 µl Cl₂ Mg 25 mM, 0.5 µl dNTPs 200 µM, 0.5 µl C/Oligonucleótido 100 Ng (*Stx1*, *Stx2*, *eaeA*, *hlyA*) (Tabla 2) y 0.2 µl de Taq. polimerasa 0.5 U. El programa de amplificación fue de 10 ciclos con una desnaturalización a 95°C por 1 min., hibridación a 65.5°C por 2 min. y una extensión a 72°C por 1.30 min., 1 ciclo de desnaturalización a 95°C por 1 min., hibridación a 64.5°C por 2 min. y una extensión a 72°C por 1.30 min. y 13 ciclos de desnaturalización a 95°C por 1 min., hibridación a 60°C por 2 min. y una extensión a 72°C por 2.30 min. (Paton y Paton, 1998). Como control positivo se utilizó una cepa control *Escherichia coli* O157: H7 ATCC BAA-460 RIMD 0509952 (Sakai).

Tabla 2. Secuencia de oligonucleótidos y condiciones de PCR múltiple.

Primer.	Secuencia (5'--3').	Tamaño de fragmento.	Temperatura de alineación.	Referencia.
<i>Stx1</i> F	5' ATAAATCGCCATTCGTTGACTAC 3'	180		
<i>Stx1</i> R	5' AGAACGCCCCACTGAGATCATC 3'			
<i>stx2</i> F	5' GGCACTGTCTGAAACTGCTCC 3'	255		
<i>Stx2</i> R	5' TCGCCAGTTATCTGACATTCTG 3'		65°C	Paton y Paton 1998.
<i>eaeA</i> F	5' GACCCGGCACAAGCATAAGC 3'	384		
<i>eaeA</i> R	5' CCACCTGCAGCAACAAGAGG 3'			
<i>hlyA</i> F	5' GCATCATCAAGCGTACGTTCC 3'	534		
<i>hlyA</i> R	5' AATGAGCCAAGCTGGTTAAGCT 3'			

7.5. Electroforesis y visualización en trasluminador de luz UV

La reacción de PCR se sometió a electroforesis en geles de agarosa al 2% y se corrió a 80 volts durante 60 minutos, posteriormente fue teñido con bromuro de etidio y visualizado en un trasluminador de luz ultravioleta (UV) para observar el producto amplificado.

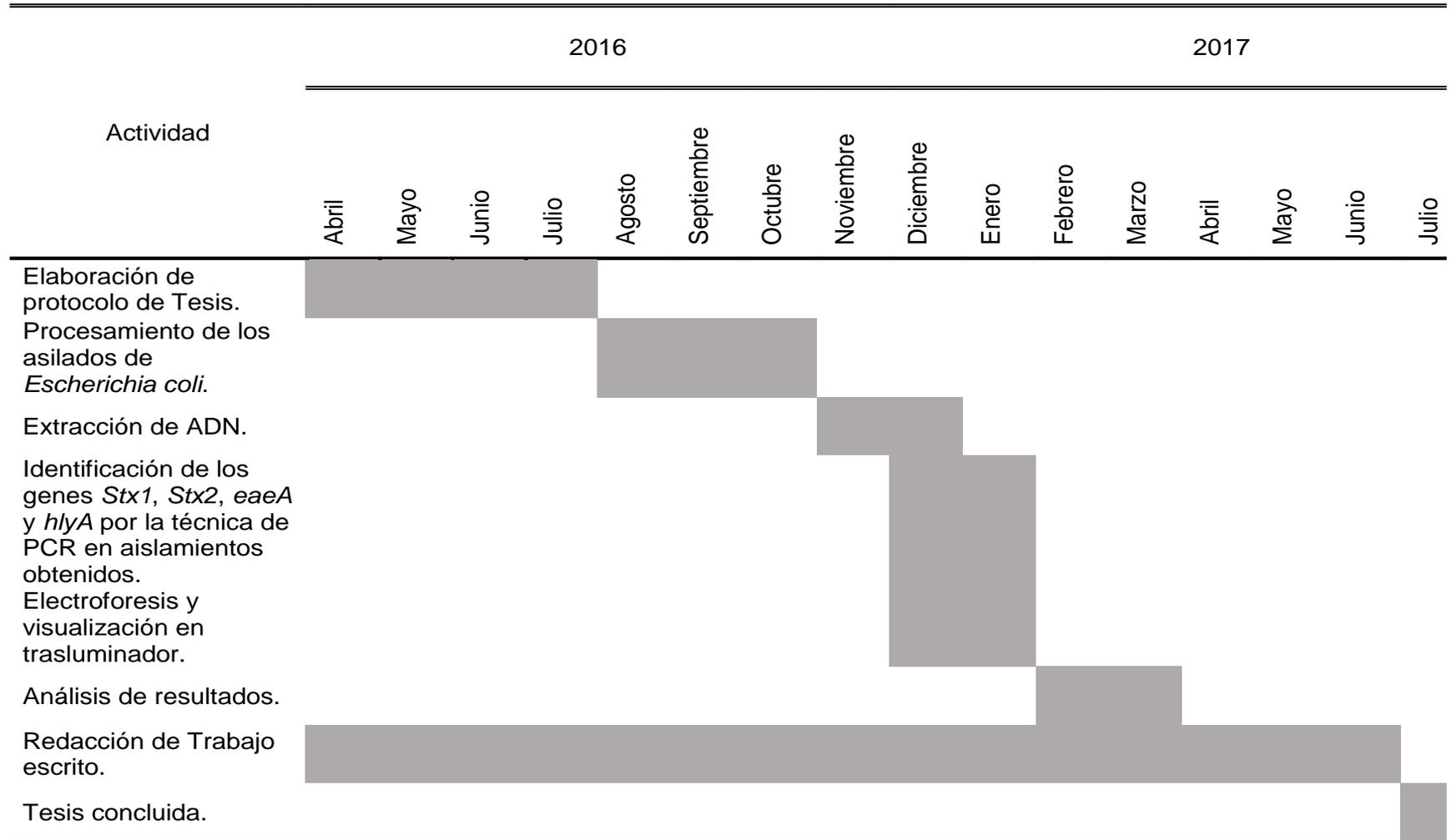
VIII. LÍMITE DE ESPACIO

El presente proyecto se llevó a cabo en laboratorios y áreas de estudio del Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal (CIESA) de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (FMVZ) de la Universidad Autónoma del Estado de México (UAEM).

Con dirección: kilómetro 15.5 Carretera Panamericana Toluca-Atlacomulco, Estado de México, México, (Latitud Norte: 19° 23' 57'' y Longitud Oeste 99° 42' 47'').

Los aislamientos de *Escherichia coli* que se ocuparon en este estudio se encuentran en un cepario del CIESA de la FMVZ-UAEM y son provenientes de canales de ovinos del rastro municipal de Capulhuac, Estado de México, durante el periodo de Enero a Junio de 2015 y los aislamientos obtenidos de carne procesada son procedentes de puntos de venta al público de la ciudad de Toluca, durante el periodo de Julio a Diciembre de 2015.

IX. LÍMITE DE TIEMPO



X. RESULTADOS

Se analizaron 71 Aislamientos de *E. coli* mediante PCR para la detección de los genes *Stx1*, *Stx2*, *eaeA* y *hlyA* y se obtuvo los siguientes resultados: en ninguno de los aislados de *E. coli* obtenidos en carne procesada se encontraron los genes de patogenicidad buscados (0/18). En tanto que en los aislados encontrados de las canales de ovinos, se presentaron los genes *Stx1* en 3.7% (2/53), *Stx2* en 5.6% (3/53), *eaeA* en 3.7% (2/53) y el gen *hlyA* en 3.7% (2/53) (figura 1) (Tabla 3).

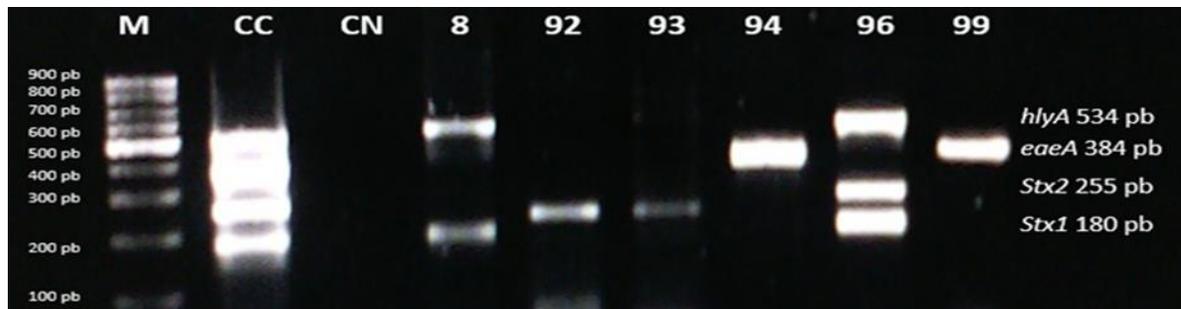


Figura 1. Amplificación por PCR múltiple de los genes *Stx1*, *Stx2*, *eaeA* y *hlyA* en aislamientos de *E. coli* obtenidas de canales de ovinos. Columnas: M, Marcador de Peso Molecular; CC, Cepa Control; CN, Control Negativo; Aislamientos: 8, *Stx1+* y *hlyA+*; 92, *Stx2+*; 93, *Stx2+*; 94, *eaeA+*; 96, *Stx1+*, *Stx2+*, *hlyA+*; 99, *eaeA+*.

Tabla 3. Resumen e Interpretación molecular de los aislamientos de *E. coli* obtenidos de canales de ovinos.

Aislado	Procedencia	Gen			
		<i>Stx1</i>	<i>Stx2</i>	<i>eaeA</i>	<i>hlyA</i>
8	Canal	+	-	-	+
92	Canal	-	+	-	-
93	Canal	-	+	-	-
94	Canal	-	-	+	-
96	Canal	+	+	-	+
99	Canal	-	-	+	-
		3.7% (2/53)	5.6% (3/53)	3.7% (2/53)	3.7% (2/53)

+, gen presente; -, gen ausente.

Identificación de los genes: *Stx1*, *Stx2*, *eaeA* y *hlyA*, en cepas de *Escherichia coli* aisladas de canales y carne procesada de ovinos.

Con los resultados obtenidos de la amplificación de los genes blanco, se presenta *E. coli* productora de toxina shiga (ECST) en 3.7% (2/53) en los aislamientos 92 (*Stx2*) y 93 (*Stx2*) y *E. coli* enterohemorrágica (ECEH) en una frecuencia del 7.5% (4/53) en los aislados 8 (*Stx1* y *hlyA*) y 96 (*Stx1*, *Stx2* y *hlyA*), 94 (*eaeA*) y 99 (*eaeA*) (Tabla 4).

Tabla 4. Clasificación de los aislamientos de *E. coli* obtenidos de canales de ovinos.

Aislado	Procedencia	Gen				<i>E. coli</i>
		<i>Stx1</i>	<i>Stx2</i>	<i>eaeA</i>	<i>hlyA</i>	
8	Canal	+	-	-	+	Enterohemorrágica.
92	Canal	-	+	-	-	Productora de toxina shiga.
93	Canal	-	+	-	-	Productora de toxina shiga.
94	Canal	-	-	+	-	Enterohemorrágica.
96	Canal	+	+	-	+	Enterohemorrágica.
99	Canal	-	-	+	-	Enterohemorrágica.

+, gen presente; -, gen ausente.

XI. DISCUSIÓN

En el presente estudio, los aislamientos obtenidos presentaron variación en la presencia de los genes patogénicos. En ninguno de los aislados de *E. coli* obtenidos de carne procesada (0/18) se encontraron los genes de patogenicidad buscados. Esto lo relacionamos a que el origen de los aislamientos es diferente y al no presentar los genes *Stx1*, *Stx2*, *eaeA* y *hlyA* no se clasifican en los grupos ECST y ECEH, sin embargo, podrían pertenecer a los otros grupos patógenos de *E. coli*. La ausencia de los genes *Stx1*, *Stx2*, *eaeA* y *hlyA* en dichos aislamientos se podría relacionar a las condiciones tanto de conservación de las canales como a la cocción de la carne de ovino, debido a lo reportado en la investigación de Lenahan *et al.*, (2007), en donde identifico 6 aislamientos de *E. coli* que expresaron los genes *Stx1* 0/6, *Stx2* 4/6, *eaeA* 6/6 y *hlyA* 5/6 previo al enfriamiento de las canales y después del enfriamiento de las canales solo encontró 4 aislamientos de *E. coli* los cuales expresaron los genes *Stx1* en 1/4, *Stx2* en 3/4, *eaeA* en 4/4 y *hlyA* en 4/4, esto indica que la presencia de los genes puede variar dependiendo del ambiente en el que se conservan las canales.

Por otro lado, en las canales de ovinos en rastro, el gen *Stx1* se presentó en 3.7% (2/53) de los aislados y *Stx2* en 5.6% (3/53), genes que se asocian al desarrollo de colitis hemorrágica (CH), síndrome urémico hemolítico (SUH) y púrpura trombocitopénica trombótica (PTT) (Reyes *et al.*, 2013). El gen *eaeA* se encontró en 3.7% de los aislados (2/53), éste codifica a la proteína intimina responsable de las lesiones de adhesión y esfacelamiento o borrado de las microvellosidades del epitelio intestinal y el gen *hlyA* se identificó en 3.7% (2/53) de los aislados y codifica a la enterohemolisina, una proteína que actúa en la lisis de los eritrocitos y la con liberación de la hemoglobina proporciona una fuente de hierro que mejora el crecimiento de ECEH en el intestino (Paton y Paton, 1998).

A nivel internacional los grupos de ECST y ECEH son de importancia en salud pública debido a que han sido responsables de brotes epidémicos en diferentes

partes del mundo (FAO y OMS, 2004) e investigaciones realizadas indican que los ovinos son reservorios importantes de estos patógenos.

La prevalencia de los genes *Stx1*, *Stx2*, *eaeA* y *hlyA* es variable en el mundo, Kamel *et al.*, (2015) en Egipto, identifica los genes *Stx1* en 23% (3/13), *Stx2* en 62% (8/13), *eaeA* en 85% (11/13) y el gen *hlyA* en 85% (11/13) en cepas de *E. coli* O157:H7 obtenidas de muestras fecales de ovinos. En India Wani *et al.*, (2003), identificó en muestra fecales de corderos 2.2% (1/45) de los genes *Stx1*, *Stx2* y *eaeA*, cabe mencionar que en estos animales no se presentó ningún signo que indicara la presencia de la enfermedad, confirmando lo mencionado anteriormente que los ovinos son reservorios importantes de estos patógenos, sin embargo, en algunos estudios como el realizado por Shekarforoush *et al.*, (2008), reporta la presencia del *Stx2* en 3.9% (6/153) en ovejas sacrificadas en mataderos en Irán, Rahimi *et al.*, (2012), en Irán encontraron en carne cruda de ovinos el gen *Stx2* en 1.6% (1/62) en cepas *E. coli* O157: H7, Tahamtan *et al.*, (2010), al sur de Irán identifico en canales de ovejas los genes *Stx1* y *Stx2* en 73.68% (14/19). Los estudios mencionados anteriormente podrían indicar una posible contaminación cruzada por este patógeno entre las canales de ovinos durante el proceso de sacrificio; siendo un vehículo de transmisión de esta enfermedad de origen alimentario, incrementando el riesgo en la salud pública. En el presente estudio se encontró una baja presencia de los genes *Stx1*, *Stx2*, *eaeA* y *hlyA* en aislamientos obtenidos de canales de ovinos en comparación a los estudios realizados en otras naciones y dichos aislamientos podrían pertenecer a los grupos patógenos ECST y ECEH de *E. coli*.

En México, Amézquita *et al.*, (2012), identificaron en heces de ovinos 27% (10/37) de ECEH O157:H7 expresando los genes *Stx1* en 62% (23/37), *Stx2* en 94% (35/37), *eaeA* en 32% (12/37) y *hlyA* en 65% (24/37), nuevamente Amézquita *et al.*, (2014), identifican los genes *Stx1a* en 62.5% (10/16), *Stx1c* en 56.25% (9/16), *Stx2b* en 26.25% (9/16), *Stx2c* en 31.25% (5/16) y *Stx2d* en cepas de *E. coli* O157 y *E. coli* no 157 aisladas de heces de ovejas, ambos estudios realizados en Culiacán,

México y Reyes *et al.*, (2013), identificaron los genes *Stx1* en 0.8% (2/228), *Stx2* en 2.6% (6/228) y el gen *eaeA* en 2.1% (5/228), en aislamientos de *E. coli* O157:H7 y *E. coli* O157: NM obtenidos de contenido de colon y canales de bovinos en rastro del altiplano central de México e indica el riesgo que existe en la línea de matanza al tener un animal infectado con los grupos ECST y ECEH que pueden llegar a contaminar las canales y de esta forma poder llegar a afectar en los humanos como lo menciona Askari *et al.*, (2015), al identificar los genes; *Stx1* y *hlyA* en *E. coli* aisladas de niños con diarrea o como sucedió en brotes en Estados Unidos (1993), por el consumo de hamburguesas con carne de bovino poco cocidas (Michanie, 2003), en Escocía (1996), por consumo de productos cárnicos de bovinos contaminados (FAO, 2002), en Noruega (2006), el consumo de salchichas de origen ovino fueron la fuente de infección (Sekse *et al.*, 2009) y recientemente en 2011, en Europa y América del Norte se presentó ECEAgg y ECST O104:H4 debido al consumo de productos vegetales (WHO, 2011).

Con estos resultados se puede determinar que la prevalencia de los genes patogénicos *Stx1*, *Stx2*, *eaeA* y *hlyA* de ECST y ECEH son menores en el Estado de México a los presentados en Culiacán, México y a los reportados en otras naciones del mundo.

Se considera a estos aislamientos de *E. coli* obtenidos de las canales de ovinos como un riesgo para la salud pública al haber expresado los genes patogénicos *Stx1*, *Stx2*, *eaeA* y *hlyA* los cuales causan graves enfermedades en el hombre. De tal manera, que existe el riesgo de infección a través de la ingesta de carnes o vegetales contaminadas con estos grupos patógenos de *E. coli* (ECST y ECEH). Además, de indicar que el ganado ovino es un reservorio natural que puede portar este patógeno en lana, piel y tracto gastrointestinal.

XII. CONCLUSIONES

Los resultados encontrados en este estudio indican la presencia de los genes patogénicos *Stx1*, *Stx2*, *eaeA* y *hlyA* en los aislamientos de *E. coli* obtenidos de canales de ovinos en rastro. Por lo tanto, las canales de ovinos puede ser una fuente potencial de infección por *E. coli* productora de toxina shiga y *E. coli* enterohemorrágica.

Por otra parte, los aislamientos de *E. coli* obtenidas de carne procesada no amplificaron los genes analizados.

XIII. SUGERENCIAS

Determinar los serotipos O: H en los aislamientos positivos a los genes *Stx1*, *Stx2*, *eaeA* y *hlyA*.

Identificar las variantes *Stx1a* de *Stx1* y *Stx2c* de *Stx2*, ya que son los genes que se han reportado con mayor frecuencia en la presentación del síndrome urémico hemolítico y se encuentran principalmente en los ovinos.

Realizar pruebas de sensibilidad antimicrobiana.

Continuar con investigaciones que determinen la prevalencia de los genes patogénicos *Stx1*, *Stx2*, *eaeA* y *hlyA* de ECST y ECEH en la especie ovina (en heces, canales o en la carne para consumo humano). De tal forma, que se pueda determinar el origen o el punto de contaminación por estos patógenos que son un riesgo para salud pública.

XIV. LITERATURA CITADA

Amézquita LBA, Quiñones B, Cooley MB, Leon JF, Castro del Campo N, Mandrell RE, Jimenez M, Chaidez C. (2012): Genotypic Analyses of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* O157 and Non-O157 Recovered from Feces of Domestic Animals on Rural Farms in México, PLoS One Journal, 7(12):e51565.

Amézquita LBA, Quiñones B, Lee BG, Chaidez C. (2014): Virulence profiling of Shiga toxin producing *Escherichia coli* recovered from domestic farm animals in North western México, Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 4 (7): 1.

Amézquita LBA, Beltrán MS, Lee BG, Yambao JC, Quiñones B. (2017): Isolation, genotyping and antimicrobial resistance of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*, Journal of Microbiology, Immunology and Infection, XX 1-10.

Askari BM, Jajarmi M, Mirsalehian A. (2015): Virulence profiling and genetic relatedness of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from humans and ruminants, Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases, 38: 15-20.

Bell C, Kyriakides A, (1998): *E. coli*, Una aproximación práctica al microorganismo y su control en los alimentos. 1ª ed., Acribia, Zaragoza, España.

Chávez BE, García VMR, Avelino FF, Gil JC, Castañeda RE. (2007): Identificación de tres factores de virulencia en cepas de *Escherichia coli* aisladas de humanos, Enfermedades Infecciosas y Microbiológicas, 27(4):114-7.

Cortés OIA, Rodríguez AG, Moreno EEA, Tenorio LJM, Torres MBP, Montiel VE. (2002): Brote causado por *Escherichia coli* en Chalco, México, Salud Publica México 2002; 44:297-302.

FAO (2002): *Escherichia coli* O157: H7 outbreak in Scotland in 1996/97, FAO/WHO global forum of food safety regulators, Morocco. <http://www.fao.org/docrep/MEETING/004/X6925E.HTM> (6 de agosto de 2017).

FAO y OMS (2004): Documento de debate sobre el perfil de riesgos para *Escherichia coli* enterohemorrágica, incluida la identificación de los productos básicos de interés, entre ellos las semillas germinadas y la carne molida de res y puerco, Trigésima sexta reunión, Washington DC, Estados Unidos de América, del 29 de marzo al 3 de abril de 2004, 2-29.

Gallegos M, Morales A, Álvarez G, Vásquez J, Morales L, Martínez I, Maldonado J. (2009): Caracterización de aislado de *Escherichia coli* O157:H7 en canales de bovinos y porcinos mediante PCR, Revistas científica FCV LUZ, 19(2):139-146.

Gyles CL. (2008): Shiga toxin producing *Escherichia coli*: An overview, American Society of Animal Science, 85 (E. Suppl.):E45-E62.

Hannaoui REJ, Bettina VL, Martínez N. (2009): *Escherichia coli* shigatoxigénica: Patogénesis, diagnóstico y tratamiento, Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología 29:13-20.

Kamel M, El-Hassan DGA, y El-Sayed A. (2015): Epidemiological studies on *Escherichia coli* O157:H7 in Egyptian sheep, Trop. Anim. Health Prod 47(6):1161-7.

Kerényi M, Allison HE, Bártai I, Sonnevend A, Emödy L, Plaveczyk N, Pál T. (2005): Occurrence of *hlyA* and *sheA* Genes in Extraintestinal *Escherichia coli* Strains, Journal of Clinical Microbiology 43(6):2965-8.

Lenahan M, O'Brien S, Kinsella K, Sweeney T, Sheridan JJ. (2007): Prevalence and molecular characterization of *Escherichia coli* O157:H7 on Irish lamb carcasses, fleece and in faeces samples, The Society for Applied Microbiology, Journal of Applied Microbiology 103:2401- 9.

Leotta GA, Chine I, Epszteyn S, Miliwebsky, E, Melamend IC, Motter M, Ferrer M, Marey E, Rivas M. (2005): Validación de PCR múltiple para la detección de *Escherichia coli* productor de toxina Shiga, Revista Argentina de Microbiología, 37:1-10.

Martínez TMA, Azuara SJC, Castillo CB, Cruz PW, Rivera SG, Bocanegra GV. (2007): Detección de factores de patogenicidad de *E. coli* enteropatogena y enterohemorrágica a partir de muestras de alimentos mediante PCR, *Bioquímica*, 32: 116.

McWilliams BD y Torres AG. (2014): Enterohemorrhagic *Escherichia coli* Adhesins, *Microbiol Spectrum* 2(3).

Méndez AS y Pérez RE. (2004): La PCR múltiple en microbiología clínica, *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 22(3):183-192.

Michanie S. (2003): *Escherichia coli* O157:H7. La bacteria que disparó el HACCP en la industria de la carne, *Ganados & Carnes*. Buenos Aires, Año 3, N° 17: 40-42.

Mundo RV, Shamah L, Rivera DJA, (2013): Epidemiología de la inseguridad alimentaria en México, Grupo de Seguridad Alimentaria en México, *Salud Publica México*; 55(2): 206-213.

Nataro JP and Kaper JB (1998): Diarrheagenic *Escherichia coli*, *Clinical Microbiology Reviews*, 11 (1): 142–201.

OMS (2016): *E. coli*, <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs125/es/> (24 de agosto de 2017).

Orona CI, López JDM, Vásquez VC, Salazar SE, Ramírez RME. (2014): Análisis microeconómico de una unidad representativa de producción de carne de ovino en el Estado de México bajo un sistema de producción semi intensivo, *Revista Mexicana de Agronegocios*, 18(34):720-728.

Paton AW y Paton JC. (1998): Detection and Characterization of Shiga Toxigenic *Escherichia coli* by Using Multiplex PCR Assays for *stx1*, *stx2*, *eaeA*, Enterohemorrhagic *E. coli* *hlyA*, *rfbO111*, and *rfbO157*, *Journal of Clinical Microbiology*, 36 (2): 598-602.

Paton CJ y Paton WA. (1998): Pathogenesis and Diagnosis of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Infections, *clinical Microbiology Reviews*, 11(3):450-479.

Rahimi E, Kazemeini RH, Salajegheh M. (2012): *Escherichia coli* O157:H7/NM prevalence in raw beef, camel, sheep, goat, and water buffalo meat in Fars and Khuzestan provinces, Iran, *Veterinary Research Forum*, 3(1):13-7.

Reyes RNE. (2007): Prevalencia de *Escherichia Coli* O157:H7 y factores de riesgo, en canales de bovinos del centro-norte del Estado de México, Maestro en Ciencias y Recursos Naturales, Universidad Autónoma Del Estado de México, Toluca, México.

Reyes RNE, Talavera RM, Varela GJA, Barba LJ, Gutiérrez CAC, Alonso FU. (2013): Prevalencia y resistencia a antibióticos de *Escherichia coli* O157:H7 aislada de canales de bovinos sacrificados en rastros del altiplano central mexicano. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, 4(2):235-242.

Rivas M, Leotta G, Chinen I. (2008): Manual de procedimientos, diagnóstico y caracterización de *Escherichia coli* O157 productor de toxina Shiga a partir de alimentos, Departamento Bacteriología Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas, Centro Regional de Referencia del WHO Global Salm-Surv para América del sur, pág. 1-2.

Rodríguez AG. (2002): Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*, *Salud Publica México* 44:464-475.

Schmidt H. y Karch H. (1996): Enterohemolytic Phenotypes and Genotypes of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* O111 Strains from Patients with Diarrhea and Hemolytic-Uremic Syndrome, *Journal of Clinical Microbiology*, 34 (10): 2364-2367.

Sekse C, O'Sullivan K, Granum PE, Rorvik LM, Wasteson Y, Jorgensen HJ. (2009): An outbreak of *Escherichia coli* O103:H25 - bacteriological investigations and genotyping of isolates from food, *International Journal of Food Microbiology*, 133 (3): 259-264.

Shekarforoush S, Tahamtan Y, Pourbakhsh A. (2008): Detection and frequency of *Stx2* gene in *Escherichia coli* O157 and O157:H7 strains isolated from sheep carcasses in Shiraz-Iran, Journal of biological sciences 11(8):1085-1092.

SIAP (2014): Producción, precio, valor y peso en pie de ganado ovino, México, <http://www.siap.gob.mx/ganaderia-resumen-estatal-pecuario/> (4 de diciembre 2015).

Stanchi ON, Martino PE, Gentilini E, Reinoso HE, Echeverría GM, Leardini AN, Copes JA. (2010): Microbiología Veterinaria, 1ª ed., Intermedica, Argentina.

Tahamtan Y, Hayati M, Mehdi Namavari M. (2010), Contamination of Sheep Carcasses with Verocytotoxin Producing *Escherichia coli* during Slaughtering. Transboundary and Emerging Diseases, 57(1-2):25–27.

Varela G, Chinen I, Gadea P, Miliwebsky E, Mota IM, González S, González G, Gugliada JM, Carbonari CC, Algorta G, Bernarda M, Sabelli R, Pardo L, Rivas M, Schelotto F. (2008): Detección y caracterización de *Escherichia coli* productor de toxina Shiga a partir de casos clínicos y de alimentos en Uruguay, Revista Argentina de Microbiología 40:93-100.

Wani SA, Bhat MA, Samanta I, Nishikawa, Buchh AS. (2003): Isolation and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) from calves and lambs with diarrhoea in India, Letters in Applied Microbiology, 37:121-6.

WHO (2011): Outbreaks of *E. coli* O104:H4 infection: update 30, World Health Organization, Regional Office for Europa. <http://www.euro.who.int/en/health-topics/emergencies/international-health-regulations/news/news/2011/07/outbreaks-of-e.-coli-o104h4-infection-update-30> (6 de Agosto, 2017).

WHO (2015): WHO estimates of the global burden of foodborne diseases, http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/200046/1/WHO_FOS_15.02_eng.pdf?ua=1 (16 de Noviembre, 2017).