

ESTUDIO EN CANINOS DE ZONAS URBANAS DE TANDIL COMO POSIBLES PORTADORES DE *ESCHERICHIA COLI* VEROCITOTOXIGÉNICOS

FERNANDEZ, D¹; ETCHEVERRIA, A. I.¹; PADOLA, N. L.¹; PARMA, A. E.¹

RESUMEN

Sesenta perros de zonas urbanas fueron estudiados con el objetivo de determinar si con los hábitos de higiene y alimentación que reciben estos animales, pueden constituir un riesgo para la salud pública como portadores de *Escherichia coli* verocitotoxigénicos. Se tomaron muestras de hisopados rectales de cada perro que luego fueron sembradas en medios apropiados para su posterior procesamiento. Se utilizó la técnica de reacción en cadena de la polimerasa a partir de la zona de crecimiento confluyente para rastrear los genes que codifican para las verocitotoxinas tipo 1 y 2, no detectándolos en ninguna de las muestras estudiadas. Estos resultados podrían deberse a que los cuidados que se tienen con perros de zonas urbanas permitirían reducir el posible contacto y colonización con *Escherichia coli* verocitotoxigénicos. Esta hipótesis debería ser confirmada mediante la realización de un estudio de similares características con perros de zonas rurales que reciben hábitos de cuidado diferentes a los caninos de zonas urbanas. Esto permitiría establecer una relación entre hábitos de cuidado de los caninos y su rol como portadores de *Escherichia coli* verocitotoxigénicos.

Palabras clave: (*Escherichia coli* verocitotoxigénico), (perros), (reacción en cadena de la polimerasa), (síndrome urémico hemolítico)

Study of dogs in Tandil`s urban-zones as possible carriers of verocytotoxin-producing *Escherichia coli*

ABSTRACT

The aim of this study was to investigate if dogs of urban areas would constitute a risk for humans as carriers of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* in spite to the care's habits to which these animals are subjected. Fecal swabs were collected from the rectum of sixty dogs and examined for the presence of verocytotoxin-producing *Escherichia coli*. The method of screening was based on

¹ Laboratorio de Inmunoquímica y Biotecnología, Dpto. de Sanidad Animal y Medicina Preventiva, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Centro, Tandil.

the polymerase chain reaction technique to detect genes encoding type 1 and 2 verocytotoxins. All samples showed to be negative for verocytotoxin-producing *Escherichia coli*. This result may be due to the current care's habits of urban dogs that could reduce the possibility of contact and colonization whit verocytotoxin-producing *Escherichia coli*. This hypothesis must be confirmed carrying out another similar study with rural dogs which receive different care that urban dogs. This would allow to establish a relationship between dogs current care habits and its role as verocytotoxin-producing *Escherichia coli*.

Key words: (Verocytotoxin-producing *Escherichia coli*), (dogs), (polymerase chain reaction), (haemolytic-uraemic syndrome).

INTRODUCCIÓN

La enterobacteria *Escherichia coli* puede encontrarse como especie predominante de la flora normal anaerobia facultativa del tubo digestivo en la mayoría de los mamíferos, colonizando el mismo durante los primeros días de vida y pudiendo excretarse a través de las heces durante toda la vida^{5, 15}.

E. coli enterotoxigénicos (ETEC) son causantes de infecciones en seres humanos y animales. Aunque comparten determinados factores de virulencia, en general poseen diferentes serotipos y presentan adhesinas específicas que son responsables de originar especificidad de huésped, por lo que cepas de ETEC patógenas para el hombre no suelen producir infecciones en animales y viceversa². Diferente es la situación epidemiológica de *E. coli* verocitotoxigénicos (VTEC). Éstos son causantes de enfermedades severas en el hombre tales como colitis hemorrágica (CH) y síndrome urémico hemolítico (SUH), y forman parte de la flora normal intestinal de los bovinos donde se comportan en la mayor parte de los casos como

comensales, siendo esta especie animal el principal reservorio de VTEC^{5, 13, 15, 18}. Todas las VTEC que comparten características clínicas, patogénicas y epidemiológicas con O157:H7 (serotipo más frecuente en diversas partes del mundo), están agrupados dentro de los *E. coli* enterohemorrágicos (EHEC)¹⁰.

Entre los factores de virulencia que contribuyen a la patogénesis de VTEC se encuentra la producción de toxinas denominadas verocitotoxinas tipo 1 (VT1), tipo 2 (VT2), y variantes de esta última. Una cepa puede expresar uno o ambos tipos de toxina, siendo éstas las responsables del daño vascular endotelial observado en pacientes con CH y SUH. Todas las verocitotoxinas se encuentran codificadas en el genoma de profagos integrados al cromosoma bacteriano^{12, 19, 20}.

El contagio de personas se da por consumo de productos cárnicos y lácteos contaminados, insuficientemente cocidos o sin pasteurizar, consumo de agua y vegetales contaminados, aunque además puede darse por contacto directo con personas o animales que eliminen la bacteria o bien por contacto con sus heces^{6, 11, 24}.

Además de los rumiantes, otras especies tales como equinos, porcinos, aves, caninos y felinos pueden actuar como potenciales reservorios de VTEC. Los caninos y felinos constituyen una importante fuente de exposición para humanos considerando su contacto frecuente con estas especies, pudiendo portar VTEC en su pelo, piel o bien excretarlo en sus heces⁹. Existen diversos estudios que confirman el rol del perro como portador de VTEC. En dos de éstos se obtuvieron frecuencias de aislamiento de 4% y 4,8%^{4, 7}. En otros estudios no se hallaron diferencias significativas de portadores de VTEC entre perros asintomáticos (3,2% - 12,3%) y perros con diarrea (8,9%)². En un trabajo reciente realizado con caninos alimentados frecuentemente con carne cruda se encontró que un 15% de los perros con diarrea fueron positivos para *E. coli* con el gen *vt1* mientras que se halló una frecuencia de 3% en los que no presentaron diarrea, encontrándose también el gen *vt2* en muestras diarreicas y no diarreicas en un 23% y 36%, respectivamente²². VTEC O157:H7 fue aislado de un perro asintomático que mantuvo contacto con un equino y un humano infectado con este serotipo²³. Por otra parte ha sido descrito en perros de raza Greyhounds una condición similar al SUH⁸.

Este trabajo tiene como objetivo determinar si perros de zonas urbanas del partido de Tandil pueden constituir un riesgo para la salud pública como portadores de VTEC.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales y toma de muestras

Se estudiaron 60 caninos que acudieron a la consulta en un período de 13 meses. Sus edades oscilaron entre 39 días y 14 años, 32 eran machos y el resto hembras. Las razas de los animales en estudio fueron 11 Labradores, 6 Boxer, 3 Cocker Spaniel, 3 Dogos Argentinos, 2 Doberman, 2 Rotweillers, 2 Bull Terrier, 1 Fox Terrier y 1 Pointer, el resto eran mestizos. De estos caninos 20 presentaban diarrea de tipo acuosa, amarillenta y no sanguinolenta. Días previos y al momento de la toma de muestra ninguno de los caninos en estudio estuvo bajo tratamiento con antimicrobianos u otro tipo de droga. Recibían plan sanitario completo en algunos casos y desparasitaciones frecuentes. La dieta que estos caninos consumían incluía balanceado comercial exclusivamente o alimentación mixta (balanceado comercial y comida elaborada por sus propietarios), siendo la bebida de consumo, en todos los casos, agua potable de red.

Las muestras se tomaron por hisopado rectal, evitando sufrimiento alguno de los animales y con la autorización correspondiente de los propietarios durante la consulta. Los hisopos fueron transportados al laboratorio dentro de las 48 horas en medio de transporte Stuart, con refrigeración.

Procesamiento de las muestras

- Siembra de las muestras en agar MacConkey (24hs a 37 °C).
- Subcultivo de una alícuota de la zona de crecimiento confluyente en 30 ml de caldo Luria Bertani (LB) en agitación (100 rpm) 4 hs a 37°C.
- Liberación de ADN por lisis celular en caliente durante 20 minutos.

Técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Se utilizó la técnica de PCR para identificar genes que codifican las toxinas VT1 y VT2 a partir de la zona de crecimiento confluyente. Las condiciones experimentales para la amplificación de *vt1* y *vt2* fueron indicados en trabajos anteriores^{13, 16, 21, 25}.

La PCR se realizó adicionando 5 µl de ADN, en una solución de KCl 50 mM, Tris-HCl 10 mM pH9, Tritón X-100 al 0,1%, 0,2 mM de cada dNTP, 0,01% gelatina, 1u de *Taq* DNA polimerasa. Para *vt1* se ajustó a 1,75 mM de Cl₂Mg y 0,6 µM de cada "primer" y para *vt2*, 3 mM de Cl₂Mg y 0,4 µM de cada "primer".

En la tabla 1 se muestran las secuencias de los "primers" utilizados para la amplificación de los genes *vt1* y *vt2*.

Las condiciones de termociclado para *vt1* fueron un ciclo inicial de 94°C-120 s, seguido de 30 ciclos de 94°C-90 s, 59°C-90 s y 72°C-120 s, y una extensión final de 72°C 300 s. Para *vt2* las condiciones fueron un ciclo inicial de 94°C-120 s, seguido de 30 ciclos de 94°C-90 s, 66°C-90 s y 72°C-120 s, y extensión final de 72°C 300 s.

El control positivo utilizado para la PCR fue la cepa de referencia ATCC43895 (*E. coli* O157:H7 *vt1*⁺, *vt2*⁺, *eaeA*⁺, Mp⁺), procedente del laboratorio de Substancias Biológicas de Referencia e Coleção de Culturas, Fundação Oswaldo Cruz, Río de Janeiro, Brasil. Como control negativo se utilizó una cepa *E. coli* negativas a *vt1* y *vt2* y como blanco de ADN se empleó agua destilada.

Para determinar el límite de detección, siguiendo los pasos de la sección "Procesamiento de las muestras", se inoculó caldo LB con la cepa control ATCC43895 y luego de un desarrollo de 18 hs a 37°C se determinó el número de unidades formadoras de colonias (duplicado). A partir de ello se efectuaron diluciones en agua bidestilada de manera que por reacción de amplificación fuera la cantidad de ADN correspondiente a 10⁰, 10¹, 10², 10³, 10⁴, 10⁵ microorganismos (duplicado).

Los productos de la PCR fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa al 1,5% en presencia de bromuro de etidio y visualizados en transiluminador UV.

RESULTADOS

En ninguna de las muestras procesadas se detectaron los genes que codifican para VT1 y/o VT2, independientemente de la condición racial, edad, sexo o tipo de alimentación recibida (dieta con balanceados; dieta mixta). En perros con cuadros de gastroenteritis los resultados también fueron negativos. Los controles positivos permitieron

descartar que estos resultados se debieran a la inhibición de la amplificación. El límite de detección

en las condiciones experimentales fue 10^2 microorganismos.

Tabla 1. Secuencia de cebadores utilizados para la amplificación por PCR de fragmentos de genes *vt1* y *vt2*.

Cebadores	Secuencia (5'→3')	Tamaño de amplímero (pb)	Referencia
VT1-I	TTAGACTTCTTCTCGACTGCAAAG	530	24
VT1-II	TGTTGTACGAAATCCCCTCTG		
VT2-I	CTATATCTGCGCCGGGTCTG	327	24
VT2-II	AGACGAAGATGGTCAAACG		

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Estudios previos han demostrado el rol de los caninos como portadores de VTEC^{2, 4, 7, 9, 22}, sin embargo pocos son los datos aportados en estos estudios sobre hábitos de cuidado, alimentación recibida, edad, sexo y raza, de los animales detectados como portadores.

Estudios anteriores realizados en Argentina han demostrado que los bovinos son portadores de varios serogrupos de VTEC y sus heces fuente de infección^{13, 14, 17, 21}. Otros investigadores han encontrado que otras especies, incluyendo a los caninos, también son portadoras de VTEC^{2, 3}. Teniendo en cuenta los resultados de estos estudios es posible que los perros de zonas

rurales de Argentina, en contacto con especies portadoras de VTEC, se encuentren expuestos a una mayor

cantidad de factores de riesgo comparados con caninos de zonas urbanas. Por otra parte esos perros reciben hábitos de cuidado diferentes a los de zona urbana, tales como consumo de carne cruda, leche sin pasteurizar, vísceras crudas, agua de los bebederos de los rumiantes y de otras especies.

La falta de resultados positivos en este estudio podrían deberse a que los cuidados que se tienen con perros de zonas urbanas tales como administración de alimentos balanceados cuya elaboración implique procesos de cocción, alimentación con comidas cocidas preparadas por sus propietarios, ingestión de agua de bebida potable

de red, permitirían reducir el contacto y colonización de estos caninos con VTEC, y disminuir de esta manera la posibilidad de que impliquen un riesgo para la salud pública en su carácter de reservorios. Para confirmar esta hipótesis se requiere en el futuro realizar un estudio de similares características en perros de zonas rurales, lo cual permitirá establecer si existe una relación entre los factores de riesgo anteriormente nombrados y el rol de los caninos como portadores de VTEC.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen la colaboración técnica de M. R. Ortiz. Este trabajo se realizó con fondos de Foncyt, CIC y UNICEN. A.E. Parma y A.I. Etcheverría son miembros de CIC.

BIBLIOGRAFIA

1. BETANCOR, A. 2005. Comunicación oral presentada en Taller de trabajo sobre prevención de SUH (Síndrome Urémico Hemolítico en Argentina-Proyecto VIGI+A 2004-2005). Coordinado por Dra. María Gracia Caletti (Hospital Garrahan). Buenos Aires, 30 de junio de 2005.
2. BEUTIN, L. 1998. *Escherichia coli* as a pathogen in dogs and cats. *Vet. Res.* 30: 285-298.
3. BEUTIN, L. 1999. *Escherichia coli* O157 and Other Types of Verocytotoxigenic *E. coli* (VTEC) Isolated from Humans, Animals and Food in Germany. In: Stewart, C. S. and Flint, H.J. (Eds.), *Escherichia coli* in Farms Animals. CABI publishing, pp 121-145.
4. BEUTIN, L.; GEIER, D.; STEINRÜCK, H.; ZIMMERMANN, S.; and SHEUTZ, F. 1993. Prevalence and some properties of verotoxin (shiga-like-toxin)- producing *Escherichia coli* in seven different species of healthy domestic animals. *Journal of Clinical Microbiology* 31: 2483-2488.
5. BLANCO, J.; BLANCO, M.; BLANCO, J.E.; MORA, A.; ALONSO, M.P.; GONZALES E.A.; BERNADEZ, M.I. 2001. Enterobacterias: características generales. Genero *Escherichia*. Capítulo 21. En Manual de Microbiología Veterinaria, S. Vadillo, S. Píriz & E. Mateos. Editorial McGRAW-HILL INTERAMERICANA, Madrid, España, pp. 301-325.
6. COIA, J.E.; SHARP, J.C. CAMPBELL, D. M.; CURNOW, J.; RAMSAY, C.N. 1998. Environmental risk factors for sporadic *Escherichia coli* O157 infections in Scotland: result of a descriptive epidemiology study. *J Infect* 36: 317-21.
7. GALLIEN, P.; KLIE, H.; LECHMANN, S.; PROTZ, D.; HELMUTH, R.; SCHAFER, R.; and EHRLER, M. 1994. Nachweis verotoxinbildender *E. coli* in Feldisolaten von Haus- und landwirtschaftlichen Nutztieren in Sachsen- Anhalt. *Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift* 107, 331-334.
8. HERTZKE, D. M.; COWAN, L.A.; SCHONING, P.; and FENWICK, B.W. 1995. Glomerular and ultrastructural lesions of idiopathic cutaneous and renal glomerular vasculopathy of greyhounds. *Vet. Pathol.* 32: 451-459.
9. JOHNSON, R.P.; WILSON, J.B.; MICHEL, P.; RAHN K.; RENWICK S.A.; GYLES, C.L. and SPIKA, J.S. 1999. Human Infection with Verocytotoxigenic *Escherichia coli* associated with Exposure to Farms and Rural Environments. In: Stewart, C. S. and Flint, H. J. (Eds), *Escherichia coli* in Farms Animals. CABI publishing, pp. 147-168.
10. LEVINE, M.M.; XU, J.G.; KAPER, J.B.; et al. 1987. A DNA probe to identify enterohemorrhagic *Escherichia coli* of O157:H7 and other serotypes that cause hemorrhagic colitis and hemolytic uremic syndrome. *J Infect Dis* 156: 175-82.
11. LOPEZ, E.L.; CONTRINI, M.M.; De ROSA, M.F. 1998. Epidemiology of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in South America. In: Kaper, J. B., O'Brien, A.D. (Eds.), *Escherichia coli* O157:H7 and other Shiga Toxin-Producing *E. coli* Strains. ASM Press, Washington, DC, pp 30-37.
12. O'BRIEN, A.D.; HOLMES, R.K. 1987. Shiga and shiga like toxins. *Microbiol Rev* 51, 206-20.
13. PADOLA, N.L.; SANZ, M.E.; BLANCO, J.E.; BLANCO, M.; BLANCO, J.; ETCHEVERRIA, A. I.; ARROYO, G.H.; USERA, M.A. and PARMA, A.E. 2004. Serotypes and virulence genes of shigatoxigenic *Escherichia coli* (STEC) isolates from a feedlot in Argentina. *Vet Microbiol* 100, 3-9.
14. PADOLA, N.L.; SANZ, M.E.; ETCHEVERRIA, A.I.; ARROYO, G.H. and PARMA, A.E. 2004a

- Importancia del muestreo seriado de feedlots en el aislamiento de VTEC O157 y no-O157. IV Congreso Argentino de Zoonosis, Buenos Aires, Argentina, 14 a 16 de abril.
15. PARMA, A.E. 1996. Género *Escherichia*. En Stanchi N.O, Martino P.E, Gentilini E., Reinoso E.H. y Pennimpede E. (ed.). Temas de Microbiología Veterinaria. Primera edición. Ediciones del Sur, La Plata, 1996, pág. 185-202.
 16. PARMA, A.E. 2003. Enfermedades transmitidas por alimentos: síndrome urémico hemolítico. In Vet 5 (1): 97-106.
 17. PARMA, A.E.; SANZ, M.E.; BLANCO, J.E.; BLANCO, J.; VIÑAS, M.R.; BLANCO, M., PADOLA, N.L and ETCHEVERRIA, A.I. 2000. Virulence genotypes and serotypes of verotoxigenic *Escherichia coli* isolated from cattle and foods in Argentina. Importance in public health. Eur J Epidemiol 16: 757-762.
 18. PARMA, A.E.; VIÑAS, M.R.; SANZ, M.E. 1996. Improvement of the polymerase chain reaction to detect *Escherichia coli* Shiga-like toxin II gene from clinical isolates. J Microbiol. Methods 26, 81-85.
 19. PATON, J.C.; PATON A.W. 1998. Pathogenesis and diagnosis of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* infections. Clin Microbiol Rev 11: 450-79.
 20. PIERARD, D.; MUYLDERMANS, G.; MORIAU, L.; STEVENS, D.; LAUWERS, S. 1998. Identification of a new verocytotoxin tipe 2 variant B-subunit genes in human and animal *Escherichia coli* isolates. J Clin Microbiol 36: 3317-22.
 21. SANZ, M.E.; VIÑAS, R.M. and PARMA, A.E. 1998. Prevalence of verotoxin-producing *Escherichia coli* in Argentina. Eur J Epidemiol 14: 399-403.
 22. STAATS, J.J; CHENGAPPA, M.M; DEBEY, M.C.; FICKBOHM, B.; OBERST, R.D. 2003. Detection of *Escherichia coli* Shiga toxin (stx) and enterotoxin (estA and elt) genes in fecal samples fro non-diarrheic and diarrheic greyhounds. Vet Microbiol 94, 303-312.
 23. TREVENA, W.B.; HOOPER, R.S; WRAY, C.; WILLSHAW, G.A.; SMITH, H.R.; CHEASTY, T.; and DOMINGUE, G. 1996. Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 associated with companion animals. Veterinary Record 138, 40.
 24. TREVENA, W.B.; WILLSHAW, G.A.; CHEASTY, T.; DOMIGUE, G.; WRAY, C. 1999. Transmission of Verocytotoxin producing *Escherichia coli* O147 infection from farm animals to humans in Cornwall and West Devon. Commun. Dis Public Health; 2: 263-8
 25. WOODWARD, M.J.; CARROLL, P.J. and WRAY, C. 1992. Detection of entero- and verocytotoxin genes in *Escherichia coli* from diarrhoeal disease in animals using the polymerase chain reaction. Vet Microbiol 31: 251-261.