

Caracterización genotípica de aislamientos de *Escherichia coli* obtenidos de cerdos con diarrea posdestete y enfermedad de los edemas

FABIANA A. MOREDO¹, JAVIER A. CAPPUCCIO², LUCAS INSARRALDE², CARLOS J. PERFUMO²,
MARÍA A. QUIROGA², GERARDO A. LEOTTA³

¹Cátedra de Microbiología, ²Cátedra de Patología Especial, Facultad de Ciencias Veterinarias, UNLP. Calle 60 y 118, (1900) La Plata, Pcia. de Buenos Aires. ³IGEVET CCT - La Plata - CONICET. Argentina.

*Correspondencia. E-mail: fmoredo@fcv.unlp.edu.ar

RESUMEN

El objetivo del trabajo fue caracterizar mediante PCR 47 aislamientos de *Escherichia coli* recuperados de 32 cerdos con diagnóstico clínico de diarrea posdestete (DPD) y de 3 cerdos con enfermedad de los edemas (ED). Sobre 44 aislamientos provenientes de cerdos con DPD, 42 (95,5 %) fueron caracterizados como *E. coli* enterotoxigénicos (ETEC) y 2 (4,5 %) como *E. coli* productores de toxina Shiga (STEC). Catorce aislamientos de ETEC (33,3 %) fueron positivos para los genes *estI/estIII/fedA*. El genotipo más complejo fue *eltA/estIII/east1/faeG/aidA*. Los aislamientos provenientes de cerdos con ED se clasificaron como STEC porcinos y fueron portadores de *stx_{2e}/aidA*. Once aislamientos (25 %) fueron portadores del gen que codifica la expresión de la adhesina AIDA-I. Sin embargo, en ningún aislamiento se detectaron los genes que codifican la expresión de las adhesinas F5, F6, F41, de intimina y de "Paa". La prevención de la DPD y de la ED podría realizarse mediante el desarrollo de vacunas que generen anticuerpos contra las adhesinas de las cepas de *E. coli* prevalentes en la Argentina.

Palabras clave: ETEC, STEC, diarrea posdestete, enfermedad de los edemas, cerdos

ABSTRACT

Genotypic characterization of toxigenic *Escherichia coli* isolated from pigs with postweaning diarrhea (PWD) and edema disease (ED). The purpose of this work was to characterize 47 *Escherichia coli* strains isolated from 32 pigs diagnosed with postweaning diarrhea and three pigs with edema disease by PCR. Forty two (95.5 %) of the strains isolated from diarrheic pigs were characterized as enterotoxigenic *E. coli* (ETEC) and 2 (4.5 %) as Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC). Fourteen (33.3 %) ETEC strains were positive for *estI/estIII/fedA* genes. The most complex genotype was *eltA/estIII/faeG/aidA*. Strains isolated from pigs with ED were classified as porcine STEC and were *stx_{2e}/aidA* carriers. Eleven (25 %) strains carried the gene encoding adhesin protein AIDA-I. However, genes coding for F5, F6, F41, intimin and Paa were not detected. The development of vaccines generating antibodies against prevalent *E. coli* adhesins in Argentina could be useful for the prevention of PWD and ED.

Key words: ETEC, STEC, postweaning diarrhea, edema disease, pigs

La diarrea posdestete (DPD) es una entidad de distribución mundial en granjas de cerdos en confinamiento (5). Sumado a factores ambientales, sociales y nutricionales (5), en la DPD actúa como agente desencadenante *Escherichia coli* enterotoxigénico (ETEC), aunque también pueden estar involucradas cepas de *E. coli* productoras de toxina Shiga (STEC) (10).

Los microorganismos del grupo ETEC se caracterizan por la producción de adhesinas fimbriales y enterotoxinas. Estas últimas se clasifican en termolábil (LT) y termoestables (STa, STb y EAST1) (5). En la DPD, estos agentes colonizan el intestino delgado de los lechones en las primeras horas posteriores al destete, adhiriéndose a las microvellosidades

de los enterocitos a través de alguno de sus factores fimbriales, particularmente F4 y F18 (3, 5).

El grupo STEC comprende cepas de *E. coli* positivas para el factor de adhesión F18, las cuales producen una variante de toxina Shiga, la Stx_{2e}, que se asocia a la enfermedad de los edemas (ED) (10). La Stx_{2e} producida en el intestino delgado se absorbe y se une a su receptor glicolipídico (Gb4) que se encuentra localizado sobre las células endoteliales, esto produce angiopatía degenerativa con aumento de la permeabilidad capilar y la presencia de edema en el meso, el estómago, el subcutis y el encéfalo; en este último caso se observan desórdenes neurológicos (11).

Recientemente se describió la presencia de un

nuevo subgrupo de ETEC aislados de cerdos con DPD o ED, negativos a factores de colonización fimbriales, pero que expresan una adhesina no fimbrial relacionada con la adherencia difusa, la AIDA-I (10). La AIDA-I puede expresarse como única adhesina o conjuntamente con F18 (5, 7). Leclerc *et al.* (7) observaron la aparición de nuevos factores de virulencia en cepas ETEC, como el denominado Paa (*porcine attaching and effacing associated*), originalmente asociado a cepas de *E. coli* enteropatógenas porcinas (PEPEC).

En la Argentina, la información sobre los patotipos y genotipos asociados a DPD y ED es escasa. Si bien se cuenta con datos acerca de la frecuencia de las toxinas LT, STa, STb y Stx_{2e} (9, 13), no se dispone de información acerca de factores de colonización, especialmente los no fimbriales. El objetivo del trabajo fue realizar la caracterización genotípica de aislamientos de *E. coli* recuperados de cerdos con diagnóstico clínico y anatomopatológico de DPD o ED.

Durante los meses de febrero y marzo de 2010 y febrero de 2011, se obtuvieron 47 aislamientos de *E. coli* toxigénicos a partir de 32 cerdos de la categoría postdestete (21 a 42 días de vida) con signología clínica característica de DPD, y de 3 cerdos con diagnóstico clínico de ED. Los cerdos pertenecían a siete granjas de producción porcina en confinamiento, localizadas en las provincias de Buenos Aires, Santa Fe y Córdoba. Por cada granja se analizaron entre 3 y 9 cerdos (Tabla 2). El aislamiento y la caracterización fenotípica se realizaron utilizando la metodología previamente descrita (9). Se seleccionaron entre 5 y 10 colonias características de *E. coli* con diferente perfil fenotípico, por cada animal. En las muestras de los 35 cerdos se identificó al menos un genotipo de *E. coli* toxigénico. Para la caracterización genotípica de ETEC y STEC, se utilizó PCR en tiempo final (1, 2, 6, 10). Del total de aislamientos analizados, 44 se obtuvieron a partir de animales con DPD y 3 de ejemplares con ED. Se utilizó como ADN templado una colonia de cada aislamiento en estudio, lisada durante 15 minutos a 100 °C en 150 µl de *buffer* Tris-EDTA/Tritón. En la Tabla 1 se describen los genes analizados, las secuencias de oligonucleótidos utilizados y el tamaño de los fragmentos amplificados. Se utilizaron como cepas de referencia *E. coli* 7805 (*eltA/estI/estII/faeG/east1*), *E. coli* 81-603 A (*fasA*), *E. coli* 1073 B44 (*fanC/F41*), *E. coli* 88-1199 (*fedA*), *E. coli* LS77-1 I (*stx_{2e}*) y *E. coli* EDL933 (*eae/paa*).

De los 44 aislamientos provenientes de cerdos con DPD, 42 (95,5 %) se clasificaron como ETEC y 2 (4,5 %) como STEC porcinos, estos últimos presentaron como único gen marcador de virulencia *stx_{2e}*. Catorce

aislamientos ETEC (33,3 %) fueron positivos para los genes que codifican STa/STb/F18. Esta combinación se observó en tres de las siete granjas estudiadas (Buenos Aires, Córdoba, Santa Fe). Siete aislamientos ETEC (16,6 %) fueron positivos para la combinación de genes que codifican STa/STb.

El genotipo más complejo fue *eltA/estIII/east1/faeG/aidA* (N = 1), seguido por *eltA/estIII/east1/faeG* (N = 1), *estI/estIII/fedA/aidA* (N = 5), *eltA/estI/estIII/east1* (N = 1), *eltA/estIII/east1* (N = 1), *east1/aidA* (N = 7).

El gen que codifica la enterotoxina enteroagregativa termoestable 1 (EAST1) se detectó en 16 cepas ETEC (36,4 %), pero solo en 7 fue este el único marcador de virulencia. Las 3 cepas aisladas a partir de cerdos con ED se clasificaron como STEC porcinos y presentaron la combinación de genes *stx_{2e}/aidA*.

Entre los genes que codifican la expresión de adhesinas, el más frecuente fue el que codifica la expresión de la adhesina fimbrial F18 (40,4 %), seguido por el gen que codifica F4 (4,2 %). Todos los aislamientos estudiados fueron negativos al investigar los genes que codifican las fimbrias F5, F6, F41 y las adhesinas afimbriales intimina y Paa. En la Tabla 2 se presentan los diferentes genotipos encontrados en cada granja.

Estos resultados coincidieron con lo encontrado en EE.UU. asociados a animales con DPD (14). Al igual que en el presente trabajo, Matiuzzi *et al.* (8) hallaron un mayor porcentaje de cepas aisladas de animales con DPD portadoras del gen que codifica las toxinas STb (68,1 %), seguido por el gen que codifica STa (61,4 %). En un estudio previo realizado en la Argentina, se detectó *estI* solo en el 21,3 % de los aislamientos (13). En el presente trabajo se detectó el gen *eltA* (toxina LT) en el 9 % de los aislamientos analizados, un porcentaje menor que el descrito en otros estudios (8, 13).

En este trabajo fue posible identificar el gen que codifica la expresión de la adhesina AIDA-I en 11 de los 44 aislamientos provenientes de animales con DPD (25 %) y en 3 aislamientos recuperados de animales con ED. En este último caso, se lo detectó como único factor de colonización. Niewerth *et al.* (11) demostraron la importancia de esta adhesina no fimbrial en asociación con F18 y Stx_{2e} en la patogénesis de la DPD y de la ED. Respecto de la producción de la EAST1, se observó la presencia del gen que la codifica en diferentes combinaciones

Tabla 1. Genes analizados y secuencias de los oligonucleótidos cebadores utilizados para la caracterización de los aislamientos ETEC y STEC recuperados de cerdos con DPD y ED

Gen	Nombre	Secuencia (5'-3')	Tamaño del fragmento amplificado (pb)	Referencia
<i>faeG</i>	F4-Fw	GGTGATTTCAATGGTTCCG	764	2
	F4-Rv	ATTGCTACGTTTCAGCGGAGCG		
<i>fanC</i>	F5-Fw	TGGGACTACCAATGCTTCTG	450	2
	F5-Rv	TATCCACCATTAGACGGAGC		
<i>fasA</i>	F6-Fw	TCTGCTCTTAAAGCTACTGG	333	2
	F6-Rv	AACTCCACCGTTTGTATCAG		
<i>fedA</i>	F18-Fw	GTGAAAAGACTAGTTTATTTTC	510	2
	F18-Rv	CTTGTAAGTAACCGCGTAAGC		
<i>F41</i>	F41-Fw	GAGGGACTTTTCATCTTTTAG	431	2
	F41-Rv	AGTCCATTCCATTATAGGC		
<i>paa</i>	Paa-Fw	ATGAGGAAACATAATGGCAGG	350	2
	Paa-Rv	TCTGGTCAGGTCGTCAATAC		
<i>aidA</i>	AIDA-I-F	ACAGTATCATATGGAGCCA	585	10
	AIDA-I-R	TGTGCGCCAGAACTATTA		
<i>eae</i>	EAE-Fw	CCCGAATTCGGCACAAGCATAAGC	864	6
	EAE-Rv	CCGGATCCGTCTCGCCAGTATTCCG		
<i>eltA</i>	LTA-1	GGCGACAGATTATACCGTGC	696	2
	LTA-2	CCGAATTCTGTTATATATGTC		
<i>estI</i>	STa1	TCTTTCCCTCTTTTAGTCAG	166	2
	STa2	ACAGGCAGGATTACAACAAAG		
<i>estII</i>	STb1	ATCGCATTCTTCTTGCATC	172	2
	STb2	GGGCGCCAAAGCATGCTCC		
<i>east1</i>	East11a	CCATCAACACAGTATATCCGA	111	2
	East11b	GGTCGCGAGTGACGGCTTTGT		
<i>stx2e</i>	Stx2eA	CCTTAACATAAAAGGAATATA	230	1
	Stx2eB	CTGGTGGTGTATGATTAATA		

DPD: diarrea posdestete; ED: enfermedad de los edemas

Tabla 2. Genotipos de los aislamientos ETEC y STEC recuperados de cerdos con DPD o ED.

Granja	Localización	Cuadro clínico	Animales analizados	Genotipo	Aislamientos
1	Buenos Aires	DPD	9	<i>stx_{2e}</i>	2
				<i>estI/estII/fedA/aidA</i>	3
				<i>estI/estIII/fedA</i>	8
2	Santa Fe	DPD	6	<i>estI/estII/fedA/aidA</i>	2
				<i>estI/estIII/fedA</i>	1
				<i>estI/estII</i>	7
3	Santa Fe	DPD	3	<i>eltA/estII/east1/faeG/aidA</i>	1
				<i>eltA/estIII/east1/faeG</i>	1
4	Santa Fe	DPD	3	<i>eltA/estI/estIII/east1</i>	1
				<i>eltA/estIII/east1</i>	1
5	Córdoba	DPD	8	<i>east1/aidA</i>	5
				<i>east1</i>	7
6	Córdoba	DPD	3	<i>estI/estIII/fedA</i>	5
7	Buenos Aires	ED	3	<i>stx_{2e}/aidA</i>	3

DPD: diarrea posdestete; ED: enfermedad de los edemas

(Tabla 2). Si bien está en discusión su valor cuando se presenta solo, en este estudio se lo observó asociado a los genes que codifican la toxina STb o el factor de adherencia AIDA-I en 9 cepas, por lo que podría considerarse como importante marcador de virulencia de *E. coli* asociado a DPD. Es interesante mencionar que en estudios previos se demostró asociación de F4/LT/STa y STb/EAST1 con casos de DPD (11, 12).

Los datos obtenidos aportan nueva información sobre los patotipos y genotipos de *E. coli* asociados a DPD y ED en nuestro país, y constituye el primer relevamiento de factores de colonización fimbriales y no fimbriales. El reconocimiento de los factores de virulencia y adherencia de las cepas de *E. coli* toxigénicas asociadas a DPD y ED en granjas de cría intensiva de cerdos permitirá implementar medidas de prevención tendientes a controlar el estado sanitario de las piaras. En ese contexto sería de gran valor el desarrollo de vacunas que generen anticuerpos contra las adhesinas de las cepas de *E. coli* productoras de DPD y de ED prevalentes en la Argentina.

Agradecimientos: Los autores agradecen al Dr. Gustavo Zielinski y a la Dra. Nora Lía Padola por la remisión de cepas de referencia. Trabajo parcialmente financiado con subsidio PICT 2005 N.º de resolución BID 1728 OC/AR PICT 2005-33987 Resolución Directorio ANPCyT 217/2006 otorgado por la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica, Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación Productiva de la Nación y subsidio perteneciente al Proyecto de Incentivos a Docentes-Investigadores V184, otorgado por la Universidad Nacional de La Plata.

BIBLIOGRAFÍA

- Blanco M, Blanco J, González E, Mora A, Jansen W, Gomes T, Zerbini F, Yano T, Pestana de Castro AF, Blanco J. Genes coding for enterotoxins and verotoxins in porcine *Escherichia coli* strains belonging to different O:K:H serotypes: relationship with toxic phenotypes. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 2958-63.
- Chapman T, Wu X, Barchia I, Bettelheim K, Driesen S, Trott D, Wilson M, Chin JJ. Comparison of virulence gene profiles of *Escherichia coli* strains isolated from healthy and diarrheic swine. *Appl Environ Microbiol* 2006; 72: 4782-95.
- Dubreuil J. STb and AIDA-I: The missing link? *Critical Rev Microbiol* 2010; 1-9.
- Dubreuil J. *Escherichia coli* STb toxin and colibacillosis: knowing is half the battle. *FEMS Microbiol Lett* 2008; 278: 137-45.
- Fairbrother J, Nadeau E, Gyles C. *Escherichia coli* in postweaning diarrhea in pigs: an update on bacterial types, pathogenesis, and prevention strategies. *Anim Health Res Rev* 2005; 6: 17-39.
- Karch H, Bohm H, Schmidt H, Gunzer F, Aleksic S, Heesemann J. Clonal structure and pathogenicity of Shiga-like-producing, sorbitol-fermenting *Escherichia coli* O157:H-. *J Clin Microbiol* 1993; 31: 1200-5.
- Leclerc S, Boerlin P, Gyles C, Dubreuil J, Mourez M, Fairbrother J, Harel J. *paa*, originally identified in attaching and effacing *Escherichia coli*, is also associated with enterotoxigenic *E. coli*. *Res Microbiol* 2007; 158: 97-104.
- Matiuzzi da Costa M, Sá e Silva M, Spricigo D, Mazzini Witt N, Beutinger Marchioro S, Kolling L, Palmira A, de Vargas C. Caracterização epidemiológica, molecular e perfil de resistência aos antimicrobianos de *Escherichia coli* isoladas de criatórios suínos do sul do Brasil. *Pesq Vet Bras* 2006; 26: 5-8.
- Moredo F, Vigo G, Sanz M, Aguirre J, Armocida A, Perfumo C. Caracterización enterotoxigénica y estudio de sensibilidad antimicrobiana *in vitro* de cepas de *Escherichia coli* aisladas de cerdos con cuadros clínicos de diarrea pre y postdestete. *Analecta Vet* 1998; 18: 29-34.
- Ngeleka M, Pritchard J, Appleyard G, Middleton D, Fairbrother J. Isolation and association of *Escherichia coli* AIDA-I/STb, rather than EAST1 pathotype, with diarrhea in piglets and antibiotic sensitivity of isolates. *J Vet Diagn Invest* 2003; 15: 242-52.
- Niewerth U, Frey A, Voss T, Le Bouguéne C, Baljer G, Franke S, Schmidt A. The AIDA autotransporter system is associated with F18 and Stx2e in *Escherichia coli* isolates from pigs diagnosed with edema disease and postweaning diarrhea. *Clin Diag Lab Immunol* 2001; 8: 143-9.
- Osek J. Detection of the enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1 (EAST1) gene and its relationship with fimbrial and enterotoxin markers in *E. coli* isolates from pigs with diarrhea. *Vet Microbiol* 2003; 91: 65-72.
- Parma A, Sanz M, Viñas M, Cicuta M, Blanco J, Boehringer S, Vena MM, Roibon WR, Benitez MC, Blanco J, Blanco M. Toxigenic *Escherichia coli* isolated from pigs in Argentina. *Vet Microbiol* 2000; 72: 269-76.
- Zhang W, Zhao M, Ruesch L, Omot A, Francis D. Prevalence of virulence genes in *Escherichia coli* strains recently isolated from young pigs with diarrhea in the US. *Vet Microbiol* 2007; 123: 145-52.