



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD XOCHIMILCO
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO PRODUCCIÓN AGRÍCOLA Y ANIMAL
LICENCIATURA EN MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

PROYECTO DE SERVICIO SOCIAL

“Prueba de sensibilidad antimicrobiana en cepas de *Escherichia coli* productoras de *shiga-toxinas (STEC)* y *Salmonella spp.* aisladas de muestras de caninos con problemas de gastroenteritis hemorrágica”

Presentador del Servicio Social

Sara Iliana Rosales Sotelo

Matricula: 2163025065

ASESORA INTERNA

Estela Teresita Méndez Olvera

No. Econom. 29747

ASESORA EXTERNA

Norma Angélica Serrano Aguilar

No. cedula.2657722

Lugar de realización: Laboratorio de Microbiología Agropecuaria, de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco y Hospital Veterinario de la Universidad del Valle de México- Tlalpan.

Fecha de inicio y término: 29 de agosto 2022 a 28 de febrero 2023

Introducción

La gastroenteritis hemorrágica (GEH) en perros es un problema recurrente en clínica de pequeñas especies, y las causas pueden ser de origen viral, bacteriano o parasitario (Molina, 2013). La gastroenteritis hemorrágica es un proceso inflamatorio, que afecta de manera distinta diversos órganos del aparato digestivo, principalmente el estómago y el intestino. La gastroenteritis hemorrágica se caracteriza por producir diarreas (líquidas, semilíquidas, con moco o sangre fresca o coagulada), vómitos, fiebre, deshidratación, anemia, anorexia y dolor abdominal. (Salazar, 2017). Los agentes infecciosos asociados al desarrollo de la GEH son variables y se han descrito agentes virales; como el protoparvovirus canino, virus del Distemper canino y Coronavirus, agentes bacterianos; como *E. coli*, *Salmonella* spp, *Clostridium* spp y *Campylobacter* spp, y parásitos como; Coccidias, *Ancylostoma caninum* y *Giardia* spp.

Dentro de las GEH de origen bacteriano se han asociado a *Salmonella* spp y *E. coli*, como las bacterias más comunes que afectan a las pequeñas especies (Gülersoy, et al., 2022). El género *Salmonella* está ampliamente extendido en el medio ambiente y se encuentran comúnmente en efluentes agrícolas, aguas residuales y en cualquier material con contaminación fecal (Kiflu, et al., 2017), Por su parte, *E. coli* es un microorganismo comensal que coloniza el tracto gastrointestinal de varias especies pocas horas después del nacimiento. No obstante, para este género se han descrito variantes patógenas que producen enfermedades gastrointestinales y sistémicas. De acuerdo con su mecanismo de patogenicidad y cuadro clínico, las cepas de *E. coli* se pueden clasificar de la siguiente manera: ETEC (enterotoxigénica), EHEC (enterohemorrágica), EIEC (enteroinvasiva), EPEC (enteropatógena) y EAEC (enteroagregativa). Las más relevantes en esta ocasión son EHEC y EPEC ya que ambas presentan la característica de causar lesiones de unión y esfacelamiento (A/E). Este tipo de lesiones se caracterizan por la unión íntima de las bacterias a la membrana del enterocito y por el borrado de las microvellosidades del enterocito (Blanco, et al, 2006). De igual forma ambas

presentan el gene *eae* que codifica para la proteína llamada intimina (Rodríguez, 2002).

La toxina STX es el principal mecanismo de patogenicidad de EHEC y su síntesis está relacionada con la presencia del bacteriófago STX. Las cepas de *E. coli* capaces de producir esta toxina se les da el nombre de STEC (Rodríguez, 2002). Existen dos variantes de la toxina STX, denominadas como STX1 y STX2, las cuales son inmunológicamente diferentes y se han identificado en cepas de EHEC, ya sea de manera individual o en conjunto (Blanco, et al, 2006).

EPEC no produce toxinas STX (Varela, et al, 2007), pero cuenta con los genes *eae* y *escV* que codifican para los factores de virulencia involucrados en las lesiones de unión y esfacelamiento, mencionados anteriormente, para esta variante la adherencia es el principal factor de patogenicidad (Bouzari, et al, 2011).

El objetivo de este trabajo fue aislar y evaluar la susceptibilidad a quimioterapéuticos en cepas de *Escherichia coli productoras de shiga-toxinas (STEC)* y *Salmonella spp.* procedentes de caninos con problemas de gastroenteritis hemorrágica, con el fin de aportar información clínica que apoye la terapia de las GEH en pequeñas especies.

Objetivos

Objetivo general.

Aislar y evaluar la susceptibilidad a antimicrobianos de uso común en la clínica veterinaria en cepas de *Escherichia coli productoras de shiga-toxinas (STEC)* y *Salmonella spp.* procedentes de caninos con problemas de gastroenteritis hemorrágica.

Objetivos específicos.

1. Obtener muestras de heces de perros con gastroenteritis hemorrágica.

2. Establecer la presencia de *E. coli* y *Salmonella* spp mediante aislamiento bacteriológico de las muestras de heces de perros con GEH.
3. Confirmar el diagnóstico bacteriológico mediante pruebas moleculares.
4. Analizar la susceptibilidad a antimicrobiana de las cepas obtenidas de los aislamientos bacteriológicos.
5. Determinar un tratamiento específico para los perros con problemas de GEH.

Metas.

1. Determinar la presencia de genes de virulencia *stx1* y *stx2* en cepas de *Escherichia coli*.
2. Establecer la frecuencia de *Salmonella* spp en casos clínicos de perros con GEH.
3. Establecer la frecuencia de STEC en casos clínicos de perros con GEH.
4. Establecer la susceptibilidad a quimioterapéuticos de aislamientos clínicos.

Métodos y diseño experimental

Esta investigación consistió en un estudio de tipo experimental descriptivo transversal retrospectivo donde se analizaron muestras de heces tomadas de perros con GEH para establecer la presencia de *E. coli* productoras de shiga-toxinas y *Salmonella* spp. Las muestras que se analizaron fueron tomadas de forma directa de los individuos enfermos usando hisopos, siguiendo los protocolos establecidos para el manejo y cuidado de esta especie.

Muestras.

Heces de casos clínicos de caninos con GEH, que asistieron a consulta en hospitales privados de la alcaldía de Tlalpan. Todos los casos remitidos fueron clínicamente compatibles con GEH canina.

Aislamiento de *Salmonella* spp.

Las muestras de heces se sembraron en caldo selenito y se incubaron durante 24 horas a una temperatura de 37°C. Posteriormente, el cultivo fue sembrado en cajas con agar *Salmonella-Shigella* para incubarse nuevamente 24 horas a 37°C. Las

colonias sugerentes a *Salmonella* spp. fueron analizadas siguiendo metodologías convencionales para la identificación bacteriana

Aislamiento de *Escherichia coli*.

Las muestras de heces fueron sembradas en caldo nutritivo e incubadas a 37°C durante 18 horas. Posteriormente los cultivos líquidos fueron sembrados en agar Eosina-Azul de Metileno (EMB) e incubados a 37°C durante 24 horas. Las colonias sugerentes a *E. coli* fueron recuperadas en medio EAM. De cada individuo se recuperaron 36 colonias, las cuales fueron analizadas a través de pruebas bioquímicas convencionales y por medio de PCR para la identificación de genes de virulencia.

Extracción de ADN de los cultivos de *E. coli*

Los cultivos líquidos fueron centrifugados y la biomasa fue recuperada en microtubos de 1.5 ml para realizar la extracción mediante el protocolo extracción de ADN con Tiocianato de guanidina y silica. El ADN obtenido fue visualizado en geles de agarosa al 0.8%, teñidos con Bromuro de etidio.

Genotipificación de las cepas *E. coli* aisladas de los casos clínicos.

Se determinó la presencia de los genes de virulencia: stx1, stx2, eae, bfpB y escV. Para lo cual se diseñaron oligonucleótidos específicos para cada uno de los genes antes mencionados, utilizando al menos 100 secuencias recuperadas de las bases de información pública del NCBI (National Center for Biotechnology Information). Con cada de los iniciadores se realizó la PCR con el ADN obtenido de las cepas de *E. coli*. Para la amplificación se empleó un sistema comercial (mastermix 5x, Fermentas, USA) siguiendo las indicaciones del fabricante.

Actividades realizadas

1. Recolección de muestras clínicas de heces con GEH
2. Aislamiento bacteriológico mediante procedimientos estándares.
3. Evaluación de la presencia de genes de virulencia en las cepas de *E. coli* mediante pruebas moleculares.
4. Análisis y procesamiento de resultados.

Metas alcanzadas

Todas las metas planteadas fueron alcanzadas en su totalidad.

Resultados y conclusiones

Se analizaron en total 22 muestras de heces. En ninguna de ellas se logró el aislamiento de *Salmonella* spp, no obstante, en los medios fue posible observar colonias positivas a la producción de H₂S, las que fueron descartas en la caracterización fisiológica (Figura 1).

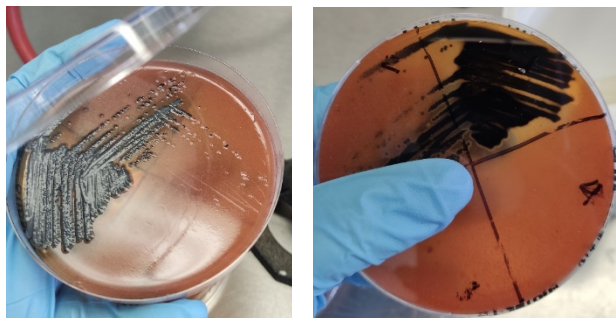


Figura 1. Fotografía de dos placas de agar Salmonella-Shigella donde se observan colonias productoras de H₂S, sugerentes de *Salmonella* spp).

En 9 muestras se logró el aislamiento de *E. coli*, cabe mencionar en este punto que, aunque *E. coli* es parte de la microflora normal, para varias de las muestras, la presencia de antibióticos pudo haber interferido con el aislamiento (Figura 2).

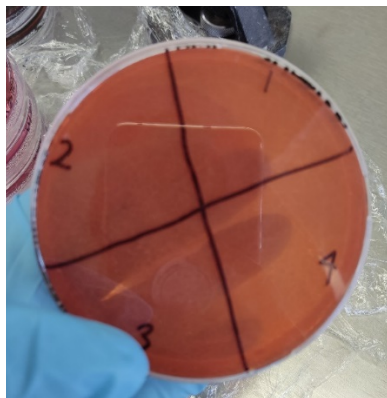


Figura 2. Fotografía de una placa de agar MacConkey donde se observa la ausencia de colonias, lo que sugiere inhibición de crecimiento por presencia de antimicrobianos en la muestra.

Los nueve aislamientos de *E. coli* fueron tipificados utilizando métodos moleculares, los resultados obtenidos determinaron la presencia de genes de virulencia en todas las cepas recuperadas. En cinco cepas se identificó la presencia del gen *stx2* (figura 3), de manera contraria en ninguna cepa fue posible amplificar el gen *stx1*.



Figura 3. Fotografía de un gel de agarosa al 1% donde se observa el producto amplificado de 325 pb correspondiente al gen *stx2*.

En lo que respecta al gene *eae*, en todas las cepas fue posible la amplificación del producto de 225 pb (figura 4), de manera coincidente en 8 cepas se logró la amplificación del gene *escV* (Figura 5). Estos datos sugieren la presencia de la isla LEE en las cepas de *E. coli* aisladas de casos clínicos de GEH.

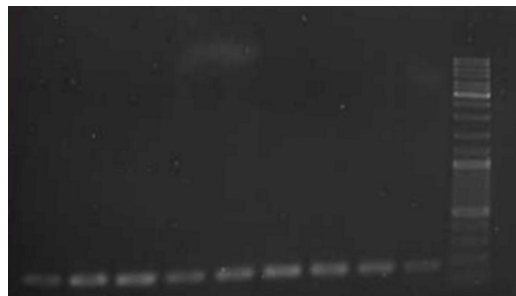


Figura 4. Fotografía de un gel de agarosa al 1% donde se observa el producto amplificado de 225 pb correspondiente al gen *eae*.

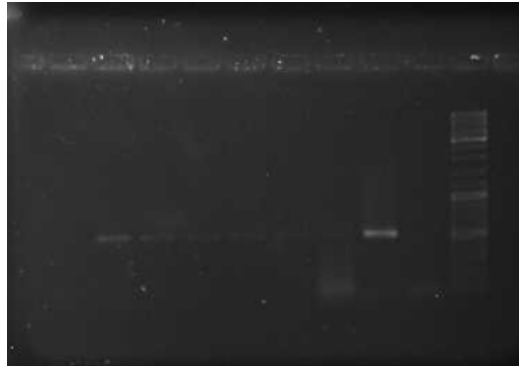


Figura 5. Fotografía de un gel de agarosa al 1% donde se observa el producto amplificado de 500 pb correspondiente al gen *escV*.

Finalmente, en la evaluación de la presencia del gen *bfpB*, los resultados mostraron su ausencia en todas las cepas recuperadas (figura 6), lo anterior coincide con reportes previos donde se menciona la existencia cepas de EPEC atípicas en muestras de animales.

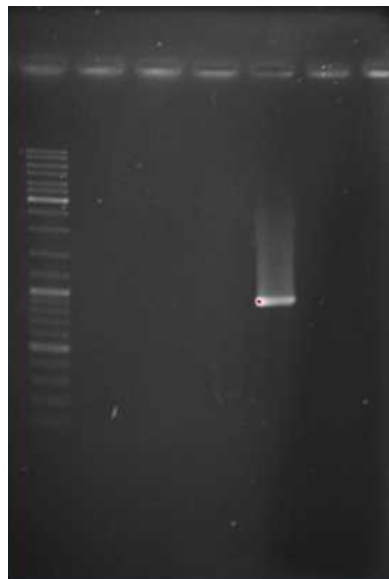


Figura 6. Fotografía de un gel de agarosa al 1% donde se observa el producto amplificado de 900 pb correspondiente al gen *bfpB* (control positivo), para el resto de las muestras no se observa ningún producto amplificado.

El análisis de los resultados obtenidos en este trabajo nos permitió establecer la presencia de cepas de *E. coli* pertenecientes a los patotipos EHEC y EPEC, en muestras de heces de canidos con GEH. En la tabla 1 se presenta de manera resumida las características de las cepas de *E. coli* analizadas en este trabajo.

Características de las cepas de <i>E. coli</i> recuperadas de casos clínicos de GEH*									
	Wendy	Amber	Tomas	Leo	Maya	Maya II	Kato	Choper	Drako
<i>eae</i>	X	X	X	X	X	X	X	X	X
<i>bfpB</i>									
<i>escV</i>		X	X	X	X	X	X	X	X
<i>stx1</i>									
<i>stx2</i>	X	X	X	X			X		

*El nombre de las cepas corresponde con el nombre de los pacientes de donde fueron recuperadas.

Con los resultados obtenidos en este trabajo se podría establecer de manera preliminar, que es posible que en varias ocasiones las GEH caninas sean producidas cepas de STEC. Así mismo se podría considerar la presencia de variantes atípicas de EPEC en estos casos. Un dato remarcable la alta frecuencia del gene *stx2* (5 de 9 cepas) en cepas portadoras del gen *eae*. Considerando que este gen es movilizado por bacteriófagos se podría considerar la presencia de estos en el intestino de caninos. Mas trabajos son necesarios para comprobar lo anterior Finalmente, la frecuencia relativamente baja de aislamientos de *E. coli* en casos de GEH podría sugerir una baja participación de este agente, sin embargo, es necesario aclarar en este punto que las muestras de las cuales no se logró el aislamiento de *E. coli*, fue debido a la presencia de antibióticos, ya que no se logró el crecimiento de ninguna enterobacteria. Los resultados obtenidos en este trabajo muestran la presencia de variantes atípicas de *E. coli* patógenas en casos de GEH canina, lo que genera varias interrogantes entre ellas los factores que pudieron haber ocasionado la presencia de *E. coli* en estos perros o las implicaciones que tendrían estas cepas en salud publica veterinaria.

En lo que respecta al estudio de sensibilidad antimicrobiana, este no fue posible realizarlo debido a un retraso en la entrega de discos con antibióticos. No obstante, se realizó un análisis de los datos clínicos y la terapia antimicrobiana que recibió cada paciente. En la Tabla 2 se muestran los antibióticos utilizados en cada caso y el resultado final obtenido, medido como respuesta o no al tratamiento.

Tabla 2. Respuesta al tratamiento en los casos clínicos analizados en este trabajo	
Paciente	Tipo de respuesta*
Amber	negativa
Maya I	positiva
Tomas	negativa
Leo	positiva
Maya II	negativa
Kato	negativa
Wendy	negativa
Choper	positiva
Drako	positiva

*Todos los individuos en este estudio recibieron en su tratamiento, antibióticos betalactámicos (ampicilina y cefalotina), quinolonas (enrofloxacina) y metronidazol.

Como se puede observar en la tabla 2, sólo un 44.4% de los pacientes se obtuvieron resultados positivos, lo que sugiere una sensibilidad a los antimicrobianos empleados en la terapia, mientras que el 55.6% de los pacientes restantes mostraron resultados negativos en el tratamiento, lo que sugiere la existencia de cepas resistentes a los tres grupos de antibióticos empleados. Considerando la dificultad para conseguir discos estandarizados para pruebas de sensibilidad a antimicrobianos, se recomienda realizar estudios moleculares con el fin de detectar genes de resistencia a antimicrobianos en las cepas de *E. coli* aisladas en este estudio.

Recomendaciones

1. Se recomienda una evaluación profunda de los expedientes de los perros para averiguar si tienen algo en común que haya podido desatar el problema como: raza o región (en este caso colonia o alcaldía).
2. Se recomienda el empleo de una PCR multiplex para evaluar de una sola corrida los distintos genes virulencia de E. coli y con ello a aportar información útil en el diagnóstico.
3. Se recomiendan estudios más profundos para confirmar la presencia de fagos stx en el intestino de caninos, lo que explicaría la presencia de este gen en variantes atípicas de EPEC.

Bibliografía

1. Bell, C. (2002). Approach to the control of entero-haemorrhagic Escherichia coli (EHEC). *International journal of food microbiology*, 78(3), 197-216.
2. Blanco, M., Blanco, JE, Dahbi, G., Mora, A., Alonso, MP, Varela, G., ... & Blanco, J. (2006). Tipificación de genes de intimina (eae) de Escherichia coli enteropatógena (EPEC) aislada de niños con diarrea en Montevideo, Uruguay: identificación de dos nuevas variantes de intimina (μ B y ξ R/ β 2B). *Revista de microbiología médica*, 55 (9), 1165-1174.
3. Bouzari, S., Aslani, M. M., Oloomi, M., Jafari, A., & Dashti, A. (2011). Comparison of multiplex PCR with serogrouping and PCR-RFLP of fliC gene for the detection of enteropathogenic Escherichia coli (EPEC). *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 15(4), 365-369.
4. Gülersoy, E., Balıkçı, C., Günal, İ., & Şahan, A. (2022). Evaluation of the Efficacy of Blood Gases and Hemogram Parameters in the Diagnosis of non Neurogenic Distemper and Parvoviral Enteritis in Dogs with Acute Gastroenteritis. *Revista Científica de La Facultad de Veterinaria*, 32, 1–8. <https://doi.uam.elogim.com/10.52973/rcfcv-e32091>

5. Kiflu, B., Alemayehu, H., Abdurahaman, M., Negash, Y., & Eguale, T. (2017). Salmonella serotypes and their antimicrobial susceptibility in apparently healthy dogs in Addis Ababa, Ethiopia. *BMC veterinary research*, 13(1), 134. <https://doi.org/10.1186/s12917-017-1055-y>
6. Molina Diaz, V. M. (2013). Efecto antihemorrágico del etamsilato comparado con placebo en gastroenteritis hemorrágica canina. *Journal of Agriculture & Animal Sciences*, 2(1), 42-54.
7. Pitcher, D. G., Saunders, N. A., & Owen, R. J. (1989). Rapid extraction of bacterial genomic DNA with guanidium thiocyanate. *Letters in applied microbiology*, 8(4), 151-156.
8. Rodríguez-Angeles, G. (2002). Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de Escherichia coli. *Salud pública de México*, 44, 464-475.
9. Salazar Campos, P. I. (2017). Valor pronóstico del hemograma en cachorros Canis familiaris con gastroenteritis hemorrágica en el distrito de Trujillo, Perú.
10. Varela, G., Jasinski, C., Gadea, P., Tanzi, M. N., Mota, M. I., Arenas, C., ... & Schelotto, F. (2007). Escherichia coli enteropatógeno clásico (EPEC) asociado a casos de diarrea en niños usuarios del Hospital Pereira Rossell. Aspectos clínicos y características de las cepas involucradas. *Revista Médica del Uruguay*, 23(3), 153-163.