

Aislamiento de *Escherichia coli* productora de toxina Shiga (STEC) en heces de ganado y detección de factores de virulencia asociados con su patogénesis

Edwin Quiguanás-Guarín^{1,2,*}, Claudia Granobles-Velandia^{1,3}, Brayan Arango-Gil^{1,4},
Valentina Giraldo-Rubio^{1,5}, Jhon Castaño-Osorio^{1,6}

Resumen

Objetivo: Aislar STEC en las heces del ganado bovino en el municipio de Ulloa, Valle del Cauca y detectar factores de virulencia asociados con la patogénesis.

Materiales y métodos: Se tomaron 21 muestras provenientes de bovinos, las cuales fueron tomadas directamente del recto del animal mediante hisopos. Las muestras se procesaron hasta obtener colonias puras a las cuales se les evaluó la presencia de los genes *stx₁*, *stx₂*, *eae*, *saa* y *hlyA* mediante PCR y posteriormente, se evaluó el efecto citotóxico de las muestras positivas sobre células Vero (ATCC-CCL-81.4).

Resultados: De las 21 muestras de heces de bovinos, 12 presentaron bacterias con uno o ambos genes *stx*. Se obtuvieron 106 aislamientos totales de STEC y se observaron diferencias en cuanto a la presencia y ausencia de los genes de virulencia evaluados en los aislamientos de cada bovino, obteniendo cinco combinaciones de genes. 48 aislamientos presentaron únicamente el gen *stx₂* y 58 presentaron tanto el gen *stx₁*, como el gen *stx₂*; de los 106 aislamientos, se detectaron 44 con el gen *hlyA* y 57 con el gen *saa*.

Conclusiones: Todos los sobrenadantes de STEC analizados mostraron actividad citotóxica sobre las células Vero, mientras que en ausencia de STEC las células formaron monocapa después de 48 h de incubación. Este trabajo es el primer reporte en Colombia que aporta información sobre la presencia de STEC en el ganado bovino, la presencia de factores de virulencia y el potencial efecto citotóxico que poseen estas cepas nativas.

Palabras clave: efecto citotóxico, *Escherichia coli* productora de toxina Shiga, toxina Shiga, virulencia.

Isolation of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) in cattle stool and detection of virulence factors associated with its pathogenesis

Abstract

Objective: To isolate STEC in stool samples from cattle in Ulloa, Valle del Cauca, and to detect virulence factors associated with its pathogenesis.

Materials and methods: We took 21 samples from cattle, which were taken directly from the rectum of the animal using swabs. The samples were processed until obtaining pure colonies and evaluated for the presence of the *stx₁*, *stx₂*, *eae*, *saa* and *hlyA* genes by PCR. Afterward, the cytotoxic effect of positive samples were evaluated on Vero cells (ATCC-CCL-81.4).

Results: We observed that from the 21 stools samples, 12 presented bacteria with one or both *stx* genes. A total of 106 isolates of STEC were obtained and differences among each other were observed regarding the presence and absence of the virulence genes, obtaining five combinations of genes. We found that 48 isolates presented only *stx₂* gene and 58 presented both the *stx₁* and *stx₂* gene. Regarding the other virulence genes, the *hlyA* gene was detected in 44 isolates and the *saa* gene was detected in 57 isolates.

Conclusions: All the STEC supernatants showed cytotoxic activity on Vero cells, while in its absence the cells formed monolayer after 48 h of incubation. This work is the first report in Colombia that provides information about the presence of STEC in stool cattle, virulence genes and its potential cytotoxic effect in native strains.

Keywords: cytotoxic effect, Shiga toxin-producing *Escherichia coli*, Shiga toxin, virulence.

1 Centro de Investigaciones Biomédicas. Grupo de Inmunología Molecular (GYMOL). Universidad del Quindío, Armenia, Quindío, Colombia

2 0000-0003-0564-6874

3 0000-0002-0742-6181

4 0000-0003-0311-3433

5 0000-0002-5592-322X

6 0000-0002-7639-3053

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: esquiguanasg@uqvirtual.edu.co

Cra 15 Calle 12 norte, Armenia, Quindío, número de teléfono: 7359300 ext 392 - 412

Recibido: 21/03/2020; Aceptado: 04/08/2020

Cómo citar este artículo: E. Quiguanás-Guarín, et al. Aislamiento de *Escherichia coli* productora de toxina Shiga (STEC) en heces de ganado y detección de factores de virulencia asociados con su patogénesis. Infectio 2021; 25(1): 33-38

Introducción

Escherichia coli productora de toxinas Shiga (STEC) es un agente zoonótico transmitido por alimentos, que puede causar enfermedades severas en humanos, como colitis hemorrágica y Síndrome Urémico Hemolítico (SUH)¹. Estudios de prevalencia realizados en distintos países confirman el rol del ganado bovino como el principal reservorio de cepas STEC, que han sido transmitidas al hombre a través de alimentos derivados del bovino contaminados con sus heces, causando brotes de infección en todo el mundo^{2,3}.

La patogénesis de STEC involucra diferentes factores de virulencia⁴, algunas cepas poseen el gen *eae*, que codifica la intimina, una proteína de membrana externa de 97 KDa responsable de la adherencia íntima de STEC a las células del enterocito y de causar el borrado de las microvellosidades intestinales (lesión *attaching/effacing*). En cepas que carecen de la proteína intimina, se ha identificado una proteína autoaglutinante de membrana externa (Saa) que permite la adherencia de la bacteria a las células del intestino⁵, lo que sugiere que las cepas STEC presentan diferentes mecanismos para la adherencia de la bacteria a la célula blanco. Además, se describe una hemolisina enterohemorrágica, codificada por el gen *hlyA*, ubicado en el megaplásmido pO157⁶, esta hemolisina se expresa durante la infección por STEC y permite captar el hierro de los eritrocitos, necesario para la supervivencia bacteriana⁷.

Las complicaciones severas de la infección por STEC se deben a la producción de toxinas, denominadas toxinas Shiga (Stxs), por su similitud con la toxina Shiga sintetizada por la bacteria *Shigella dysenteriae*⁸. Las Stxs son catalogadas como el principal factor de virulencia de STEC ya que tienen un rol crítico en la patogenia en humanos, causando daños en órganos esenciales como el riñón, el páncreas y el Sistema Nervioso Central⁹. Estas Stxs se encuentran codificadas por bacteriófagos insertos en el cromosoma bacteriano, lo que facilita la transferencia horizontal a bacterias no patógenas convirtiéndolas en patógenas⁵. La producción de Stxs está ligada a la inducción del ciclo lítico del fago que ocurre cuando la bacteria es expuesta a condiciones de estrés y agentes mutagénicos como luz UV y antibióticos¹⁰. Antígenicamente, las Stxs se han clasificado en Stx1 y Stx2, siendo estas últimas encontradas con mayor frecuencia en cepas aisladas de humanos con SUH¹¹. Aunque Stx1 y Stx2 poseen el mismo modo de acción sobre la célula blanco, sus efectos *in vitro* e *in vivo* difieren considerablemente. Stx1 se une de manera más eficiente al receptor celular y es más potente en células Vero. Sin embargo, Stx2 es 400 veces más letal para ratones que Stx1 inyectado por vía intravenosa, y es 1000 veces más tóxica en células de la microvasculatura renal humana^{12,13}.

En estudios previos se ha reportado la presencia de STEC en Colombia en poblaciones porcinas y productos cárnicos de origen bovino y porcino^{14,15,16}, sin embargo, estas investigaciones son escasas y se han centrado en el contexto de la detección de cepas del serotipo O157:H7, a través de métodos antigéni-

cos y de microbiología clásica. Actualmente, no se cuenta con reportes de la presencia y caracterización a nivel molecular de cepas STEC en heces de bovinos, y teniendo en cuenta que estas bacterias continúan representando una amenaza para las poblaciones de todo el mundo¹⁷ y que en Colombia no son incluidas en los sistemas de vigilancia epidemiológica, el objetivo de este estudio fue aislar STEC en las heces del ganado bovino en el municipio de Ulloa, Valle del Cauca y detectar factores de virulencia asociados con la patogénesis.

Materiales y Métodos

Tipo de muestreo y toma de muestras

Se realizó un estudio descriptivo de corte transversal con un muestreo a conveniencia; con previa autorización del propietario del predio, se colectaron muestras de heces por hisopado rectal en 21 bovinos en la vereda el Cofre, ubicada en el km 4 vía Ulloa-Valle del Cauca, Colombia. Los animales incluidos en el estudio correspondieron a los bovinos que se encontraban disponibles en el predio al momento del muestreo. Cada muestra fue transportada en tubos de ensayo con agua peptonada a temperatura ambiente, hasta el Centro de Investigaciones Biomédicas (CIBM) de la Universidad del Quindío para su procesamiento.

Procesamiento de las muestras

Una vez en el CIBM, cada muestra se sembró en agar MacConkey y se incubó por 24 h a 37 °C. Posteriormente, una muestra de la zona de crecimiento confluyente se cultivó en medio Brain Heart Infusion (BHI) por 4 h a 37 °C con agitación a 180 rpm. Luego se tomaron 400 µL de H₂O ultrapura y 100 µL de cultivo bacteriano, y se llevó a ebullición por 10 minutos para extracción de ADN (por lisis celular en caliente) y posteriormente se centrifugó a 11500 rpm para eliminar los restos celulares en suspensión¹⁸. El ADN recuperado se evaluó para detectar los genes *stx*₁ y *stx*₂, mediante PCR Múltiple en un equipo Applied Biosystems Veriti 96 Wells Thermal Cycler, con cebadores específicos según lo propuesto por Paton & Paton⁴ los cuales se muestran en la Tabla 1. Se utilizó como control positivo la cepa de referencia de *E. coli* EDL933, proveniente del Laboratorio de Referencia de *Escherichia coli* (LREC), Lugo-España, y como control negativo, se empleó la cepa *E. coli* ATCC 25922, que no posee factores de virulencia. Las muestras positivas para uno o ambos genes *stx* se sembraron en agar MacConkey y se cultivaron por 24 h a 37 °C. Se realizaron "pooles" de 5 colonias cada uno para detectar por PCR Múltiple los genes codificantes de Stx1 o Stx2. Las colonias de los "pooles" positivos se cultivaron individualmente en BHI durante 18 h a 37 °C y se analizaron entre 5 y 50 colonias por muestra dependiendo del número de colonias individuales que crecieran en el agar, para detectar por PCR Múltiple, los genes *eae*, *saa* y *hlyA*^{4,19}.

Las condiciones para la PCR fueron las siguientes: el volumen final de reacción fue de 25 µL, conteniendo 2 µL de ADN genómico, 2,5 µL de buffer para PCR (10X), 2 µL de MgCl₂ 50 mM, 0,2 µL de dNTP a 10 mM, 0,1 µL de Taq polimerasa

Tabla 1. Primers para PCR^{4, 19}.

Nombre	Secuencia del Primer (5'–3')	Tamaño del amplímero (bp)
<i>stx</i> ₁	stx1F-ATA AAT CGC CAT TCG TTG ACT AC	180
	stx1R-AGA ACG CCC ACT GAG ATC ATC	
<i>stx</i> ₂	stx2F-GGC ACT GTC TGA AAC TGC TCC	255
	stx2R-TCG CCA GTT ATC TGA CAT TCT G	
<i>eae</i>	eaeAF-GAC CCG GCA CAA GCA TAA GC	384
	eaeAR-CCA CCT GCA GCA ACA AGA GG	
<i>hlyA</i>	hlyAF-GCA TCA TCA AGC GTA CGT TCC	534
	hlyAR-AAT GAG CCA AGC TGG TTA AGC T	
<i>saa</i>	saaDF-CGT GAT GAA CAG GCT ATT GC	119
	saaDR- ATG GAC ATG CCT GTG GCA AC	
<i>UspA</i>	UspAF- 5' CCG ATA CGC TGC CAA TCA GT UspAR- 5' ACG CAG ACC GTA GGC CAG AT	884

Recombinante de Invitrogen, 16,2 µL de agua estéril desionizada y 1 µL de cada cebador a una concentración de 10 µM. Las muestras se sometieron a 35 ciclos de PCR, cada uno consistió en 1 min de desnaturalización a 95 °C; 2 min de anillamiento a 65 °C por los 10 primeros ciclos, disminuyendo a 60 °C para el ciclo 15; y 1,5 min de elongación a 72 °C, incrementando a 2,5 min desde el ciclo 25 a 35⁴. Los productos de PCR se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 2% (p/v) en buffer Tris-borato-EDTA (TBE), teñido con SYBR Safe marca Invitrogen, separado a 100V por 40 minutos y fotografiado a través del transiluminador GelDoc-It Imager, software UVP. Los tamaños de los productos se estimaron por comparación con el marcador de peso molecular HyperLadder II 50pb de Bioline. Posteriormente, para confirmar que los aislados correspondían a bacterias *E. coli*, se realizó una PCR convencional propuesta por Chen & Griffiths²⁰, para detectar la presencia del gen *UspA* que codifica una proteína de estrés universal de *E. coli*.

Actividad citotóxica en células Vero

Para determinar si los aislamientos positivos para los genes *stx*₁ y *stx*₂ expresaban las Stxs, se evaluó el efecto citotóxico de 14 aislamientos STEC, sobre la línea celular Vero ATCC-CLL 81.4 siguiendo la metodología propuesta por Kruger *et al.*,²¹ con algunas modificaciones. Para esto se cultivaron los aislamientos STEC en medio Luria Bertani Broth (LB) a 37 °C durante toda la noche en agitación a 100 rpm, luego, se subcultivaron en LB a 37 °C hasta alcanzar una densidad óptica a 600 nm (DO₆₀₀) de ≈ 0,2 – 0,3; en este punto se dividió el cultivo en dos, uno de los cultivos fue inducido con mitomicina C a 0,5 µg/mL y el otro no. Ambos se cultivaron en agitación a 100 rpm por 24 h a 37 °C. Luego, se tomó una alícuota de cada cultivo y se centrifugó a 11500 rpm por 10 minutos a 4 °C en una centrifuga Thermo Scientific Heraeus Megafuge 11 y se filtraron los sobrenadantes con filtros Milipore Millex-GV de 0,22 µm.

Las células Vero se cultivaron en medio D-MEM (dulbecco modified Eagles minimal essential medium) marca Gibco,

suplementado con suero fetal bovino al 10%, antibiótico antimicótico 1X (contiene 10000 unidades/mL de penicilina, 10000 µg/mL de estreptomina y 25 µg/mL de anfotericina B de Gibco) e incubadas a 37 °C en una atmósfera de 5% de CO₂. Se realizaron diluciones seriadas en base 2 en medio DMEM de los sobrenadantes filtrados anteriormente. En placas de 96 pocillos marca Nest se añadieron 150 µL de una suspensión de células Vero de 2 x 10⁴ cel/mL en cada pozo, y una vez establecida la monocapa celular, se agregaron 40 µL de cada dilución. Las placas se incubaron a 37 °C y 5% de CO₂ por 48 h. Las monocapas celulares se fijaron con formaldehído al 10% y se tiñeron con cristal violeta al 0,2% (p/v) en buffer fosfato salino (PBS, phosphate buffered saline) por 30 minutos. Por último, se tomó como CC₅₀ la dilución donde se observó el 50% de destrucción de la monocapa celular utilizando el Microscopio invertido Olympus CK2. Para evaluar el efecto de la mitomicina C en los cultivos STEC frente a la CC₅₀, se realizó la prueba de Kruskal Wallis.

Resultados

Aislamiento de STEC y detección de factores de virulencia

De los 21 hisopados rectales, nueve (42,85%) fueron negativos y 12 (57,14%) fueron positivos para uno o ambos genes codificantes de toxinas Shiga. De todas las muestras analizadas se obtuvo un total de 106 aislamientos STEC. Se observaron diferencias en cuanto a la presencia y ausencia de los genes de virulencia evaluados en los aislamientos de cada bovino, obteniendo cinco combinaciones de genes (1. *stx*₂; 2. *stx*₁/*stx*₂; 3. *stx*₁/*stx*₂/*saa*/*hlyA*; 4. *stx*₂/*saa*/*hlyA* y 5. *stx*₁/*stx*₂/*saa*). En dos de los bovinos STEC positivos, fue posible obtener aislamientos con diferentes combinaciones de genes dentro de la misma muestra (Tabla 2). De los 106 aislamientos STEC, 48 presentaron únicamente el gen *stx*₂ y 58 aislamientos presentaron tanto el gen *stx*₁ como el gen *stx*₂. En cuanto a los otros factores de virulencia, se detectaron 44 muestras que portaban el gen *hlyA* y 57 muestras el gen *saa*. Se verificó que todos los aislamientos evaluados fueran de la especie *Escherichia coli* por medio de la detección del gen *UspA* que codifica para una proteína de estrés universal y el cual estuvo presente en todos los aislados (Tabla 2).

Actividad citotóxica en células Vero

De un total de 106 aislamientos se seleccionó un aislamiento representante de cada bovino STEC positivo, obteniendo así, 14 aislamientos (Figura 1) a los cuales se les evaluó el efecto citotóxico sobre la línea celular Vero. Se observó que todos los sobrenadantes de los 14 aislamientos STEC evaluados, mostraron efecto citotóxico sobre las células Vero; las células de la monocapa, originalmente alargadas, se tornaron redondeadas y posteriormente, sufrieron destrucción celular pasadas 48 horas de incubación (Figura 2A). Por otra parte, en los pozos donde no se agregó sobrenadante de cultivo bacteriano (control celular), así como donde se agregó el sobrenadante puro de la cepa *E. coli* ATCC 25922 (control negativo), no se observó cambio en la morfología de la monocapa ni se observó destrucción celular (Figura 2B).

Tabla 2. Caracterización de aislamientos STEC por PCR multiplex. Presencia/ausencia de factores de virulencia

Etiqueta	Número de aislamientos	Factor de virulencia						Actividad citotóxica	
		<i>stx</i> ₁	<i>stx</i> ₂	<i>eae</i>	<i>saa</i>	<i>hlyA</i>	<i>UspA</i>	Condición inducida	Condición no inducida
								Factor de dilución (CC50)	Factor de dilución (CC50)
102	4	-	+	-	-	-	+	1	4
103	5	+	+	-	+	+	+	64	16
105	12	+	+	-	+	+	+	128	8
*106 ₍₁₀₎	9	-	+	-	-	-	+	2	4
*106	3	+	+	-	+	+	+	8	4
392	20	+	+	-	+	+	+	64	8
600	4	-	+	-	+	+	+	32	8
N108	13	-	+	-	-	-	+	8	4
*N3	1	+	+	-	+	-	+	32	8
*N3	3	+	+	-	-	-	+	16	8
621	12	+	+	-	+	-	+	128	8
110T	2	+	+	-	-	-	+	16	8
505	14	-	+	-	-	-	+	4	2
615	4	-	+	-	-	-	+	8	4
EDL	-	+	+	+			+	32	16

+, presencia del gen; -, ausencia del gen

* Etiqueta del animal portador de dos combinaciones de genes diferentes

La etiqueta representa cada bovino en la finca.

Al realizar la prueba de Kruskal Wallis se observaron diferencias en cuanto a la CC_{50} ($P = 0,024$), evidenciando valores más altos de citotoxicidad en los cultivos inducidos con mitomicina C. Se destacan cuatro aislamientos STEC portadores de los genes *stx*₁ y *stx*₂ que según los ensayos *in vitro* mostraron un efecto citotóxico mayor a la EDL933 (control positivo) en condición inducida; a diferencia de dos aislamientos portadores del gen *stx*₂, los cuales evidenciaron una mayor CC_{50} en condiciones basales (Figura 3).

Discusión

STEC se encuentra asociado a brotes y casos esporádicos de enfermedad en el hombre como colitis hemorrágica y SUH. Esta bacteria produce dos tipos de toxinas, Stx1 y Stx2 o ambos, codificadas por los genes *stx*₁ y *stx*₂, respectivamente, responsables de muchas de las características patológicas y de las complicaciones severas de la infección por STEC¹. Las muestras estudiadas en este trabajo se evaluaron con el fin

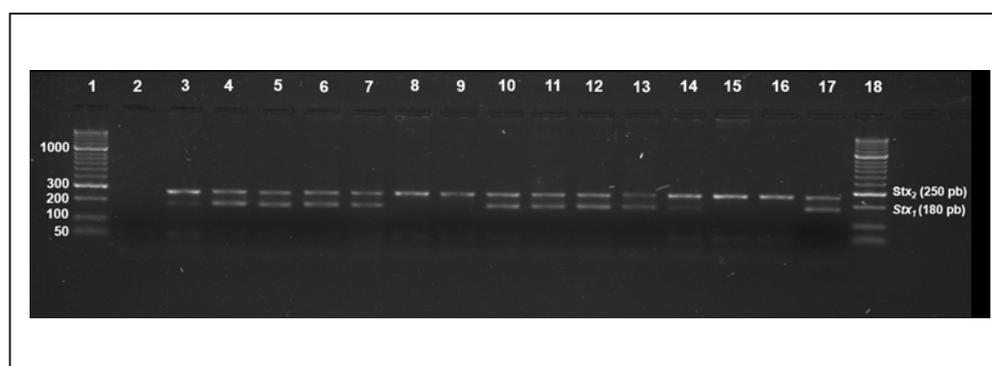


Figura 1. Amplificación por PCR de genes de toxina Shiga. Se amplificó un producto de 180 y 250 pb usando las secuencias de oligonucleótidos que flanquean los genes *stx*₁ y *stx*₂. Carril 1 y 18, marcador de peso molecular HyperLader II 50 pb. Carril 2, cepas de *E. coli* ATCC 25922 como control negativo. Los carriles 3 a 16 muestran los productos de PCR amplificados a partir de muestras de ganado. Carril 17, cepa de *E. coli* EDL933 como control positivo.

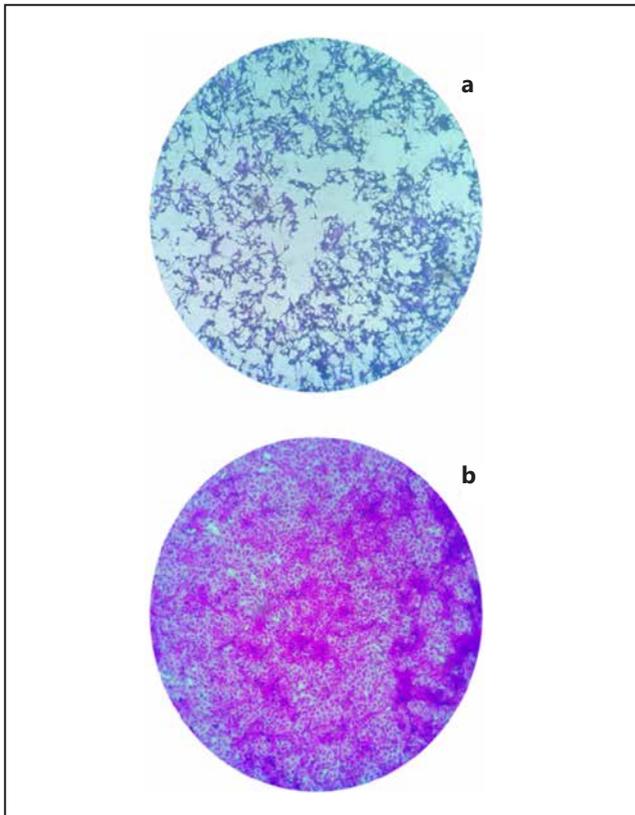


Figura 2. Efecto citotóxico en las células Vero después de 48 horas de incubación con sobrenadantes de cultivo STEC, tinción con cristal violeta al 0,2%. Vista en Microscopio invertido Olympus CK2 a objetivo 10X. **a.** Destrucción celular. **b.** Monocapa de células.

de detectar la presencia de los genes codificantes de toxina Shiga y de otros genes de virulencia que portan los aislamientos STEC y evaluar el efecto citotóxico sobre la línea celular Vero. Esta investigación aporta los primeros datos en Colombia sobre la presencia de STEC en muestras de hisopado rectal en ganado bovino, y su relevancia está, dado que en Colombia son escasos los estudios acerca de la presencia de esta bacteria en animales bovinos, los cuales son el principal reservorio de esta bacteria².

En los aislamientos STEC evaluados se encontraron cinco perfiles de genes de virulencia (Tabla 2.), siendo más frecuentes los perfiles *stx*₂ (41,5%) y *stx*₁/*stx*₂/*saa*/*hlyA* (37,7%). Estos mismos perfiles fueron encontrados en heces de bovinos en Argentina con porcentajes del 35,6% y 25,5%²²; en Brasil con 6,6% y 50,5% en bovinos de lechería²³ y en la región metropolitana de Chile en heces de bovinos con 9,8% y 15,8% respectivamente²⁴.

Se ha reportado que la presencia del gen *stx*₂ aumentan la patogenicidad con relación a los aislamientos que portan únicamente el gen *stx*₁. Según la literatura, las muestras positivas para el gen *stx*₂ son un importante factor de riesgo debido a la asociación con enfermedades humanas más graves en comparación con las cepas STEC portadoras de *stx*₁. Louise & Obri¹³ demostraron que la toxina Stx2 es mil veces más potente que Stx1 en las células endoteliales microvasculares renales humanas y es más probable que se encuentre relacionada con la producción de SUH²⁶.

Es importante destacar que ninguno de los aislamientos presentó el gen *eae* que codifica la proteína intimina, involucrada en la unión de la bacteria al enterocito. Se ha reportado que el gen *eae* no está presente en todas las STEC aisladas de bovinos y no parece ser esencial para la patogénesis¹⁹, sin embargo, algunas cepas STEC presentan el gen *saa* como otro mecanismo de adhesión a las células epiteliales⁴, influyendo en la colonización de la bacteria al intestino bovino²⁷. Por otra parte, el gen *saa* ha sido encontrado en mayor proporción en aislados bovinos que en aislados humanos²⁸, lo que explicaría que en este estudio se encontraran aislamientos *saa* positivos y *eae* negativos. Lo anterior sugiere que la población bovina se encuentra expuesta a STEC en su tracto gastrointestinal, es excretada en las heces y se transmite al hombre a través de la ingestión de alimentos o agua contaminados con heces o por medio del contacto directo con estos animales y con su medio ambiente^{2,3,29}.

Los ensayos de citotoxicidad mostraron que todos los sobrenadantes ensayados tuvieron efecto citotóxico sobre las células Vero. Al igual que Kruger *et al.*,²¹ se encontró que, en la mayoría de los aislamientos, al agregar mitomicina C a los cultivos bacterianos presentaban un aumento en la citotoxicidad, no obstante, en este estudio se observó mayor grado de citotoxicidad entre los aislamientos que portan ambos genes de toxina (*stx*₂/*stx*₁), a diferencia de lo reportado por Kruger *et al.*,²¹ donde los aislamientos portadores del gen *stx*₂ mostraban mayor citotoxicidad. Por otro parte, en este estudio se evidenció que los aislamientos 106₍₁₀₎ y 102 presentaron mayor citotoxicidad basal; quizás este comportamiento estaría asociado a que estos dos podrían portar un subtipo de Stx2 diferente al de los demás aislamientos.

En este estudio se destaca que todos los aislamientos STEC evaluados tuvieron la capacidad de producir toxina, debido a que se evidenció la destrucción de las monocapas celulares.

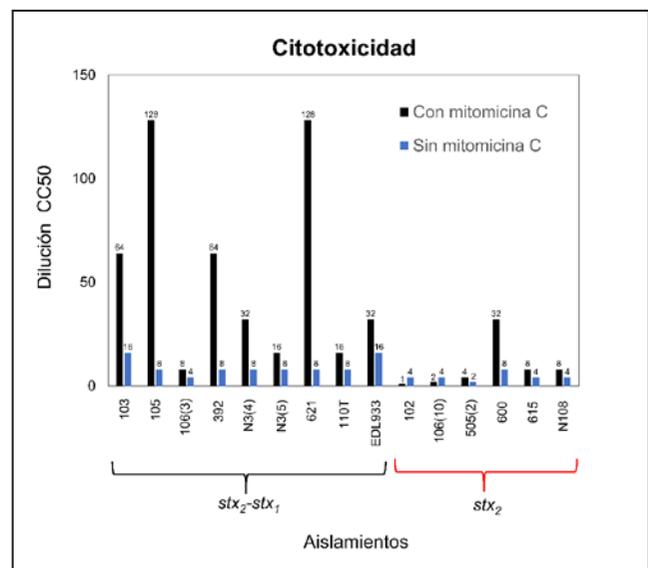


Figura 3. Análisis del título citotóxico. Las barras negras indican la CC₅₀ de los sobrenadantes de cada aislamiento en condiciones inducidas (con mitomicina) y las barras azules indican la CC₅₀ de los sobrenadantes de cada aislamiento STEC en condiciones no inducidas (sin mitomicina).

En contraste, Koitobashi *et al.*,³⁰ reporta que la presencia de los genes *stx* en las cepas STEC no implica que las bacterias los expresen, como se han documentado algunos casos de aislamientos STEC del continente asiático que portan genes *stx* pero al ser inducidos con mitomicina C, no hay expresión y producción de toxinas.

En este estudio se demostró que en los aislamientos STEC predominó la presencia del gen *stx_{2c}*, el cual ha sido asociado a enfermedades graves en humanos y se comprobó la actividad citotóxica de las Stx a través del efecto que producen sobre las células Vero. Finalmente, y como perspectiva, se recomienda continuar con esta investigación aumentando el muestreo y realizando una caracterización más amplia de los aislamientos STEC que permita identificar el serotipo y la prevalencia de STEC en esta región.

Agradecimientos

Agradecemos al Laboratorio de Referencia *Escherichia coli* (LREC), Lugo-España, por la cepa de referencia *Escherichia coli* EDL933.

Responsabilidades éticas

Protección de personas y animales. Los autores declaran que para esta investigación no se han realizado experimentos en seres humanos ni en animales.

Confidencialidad de los datos. Los autores declaran que ha seguido los protocolos de su centro de trabajo sobre la publicación de datos de pacientes.

Derecho a la privacidad y consentimiento informado. Los autores declaran que en este artículo no aparecen datos de pacientes

Conflictos de interés. Los autores declaran no tener conflictos de interés con relación al artículo

Financiación. Este trabajo fue financiado por la vicerrectoría de investigaciones de la Universidad del Quindío a través del apoyo a semilleros de investigación.

Referencias

- Scallan E, Mahon B, Hoekstra R, Griffin P. Estimates of illnesses, hospitalizations and deaths caused by major bacterial enteric pathogens in young children in the United States. *The Pediatric Infectious Disease Journal*. 2013; 32:217–5
- Persad A, Lejeune J. Animal Reservoirs of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli*. In: Sperandio V, Hovde C editors. *Enterohemorrhagic Escherichia coli and Other Shiga Toxin-Producing E. coli*. Washington DC. ASM Press;2015. pp. 231-244
- Heredia N, García S. Animals as sources of food-borne pathogens: A review. *Animal nutrition*. 2018; 4:250–6.
- Paton C, Paton A. Pathogenesis and diagnosis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. *Clinical Microbiology Reviews*. 1998; 11:450-30.
- Polifroni R, Etcheverría A, Arroyo H, Padola. Supervivencia de VTEC O157 y no-O157 en agua de bebederos y materia fecal de bovinos. *Revista Argentina de Microbiología*. 2014; 46:126–7.
- Schmidt H, Beutin L, Karch H. Molecular analysis of the plasmid encoded hemolysin of *Escherichia coli* O157:H7 strain EDL933. *Infection and immunity*. 1995; 63:1055-7
- Newton H, Sloan J, Bulach D, et al. Shiga Toxin-producing *Escherichia coli* Strains Negative for Locus of Enterocyte Effacement. *Emerging Infectious Diseases*. 2009; 15:372–9.
- O'Loughlin E, Robins-Browne R. Effect of Shiga toxin and Shiga-like toxins on eukaryotic cells. *Microbes and Infection*. 2001; 3:493–15
- Karpman D, Ståhl A. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* pathogenesis and the host response. In: Sperandio V, Hovde C editors. *Enterohemorrhagic Escherichia coli and Other Shiga Toxin-Producing E. coli*. Washington DC. ASM Press;2015. pp. 403-417
- Zhang X, McDaniel D, Wolf L, Keusch G, Waldor M, Acheson D. Quinolone Antibiotics Induce Shiga Toxin-Encoding Bacteriophages, Toxin Production, and Death in Mice. *The Journal of Infectious Diseases*. 2000;181;664–7.
- Rivas M, Chinen I, Guth B. Enterohemorrhagic (Shiga Toxin-Producing) *Escherichia coli*. In: Torres A editor. *Escherichia coli in the Americas*. Springer, Cham; 2016. pp. 97-123
- Tesh V, Burris J, Owens J, et al. Comparison of the relative toxicities of Shiga-like toxins type I and type II for mice. *Infection and Immunity*. 1993; 61:3392–11.
- Louise C, Obrig T. Specific interaction of *Escherichia coli* O157:H7-derived Shiga-like toxin II with human renal endothelial cells. *J Infect. Dis*.1995;172: 1397–5.
- Piedrahita D, Márquez T, Máttar S. Detección de *Escherichia coli* O157:H7 en poblaciones porcinas, canal bovino y productos cárnicos en el departamento de Córdoba. *Revista MVZ Córdoba*. 2001; 6:119-8.
- Franco A, Orozco U, Ramírez M, López G. Determinación de *Escherichia coli* e identificación del serotipo O157:H7 en carne de cerdo comercializada en los principales supermercados de la ciudad de Cartagena. *Revista Lasallista de investigación*. 2013;10: 91-10
- Herrera F, Buelga J, Villamizar R. Primer reporte de *Escherichia coli* Productora de Toxina Shiga no O157 que codifica el gen de la enterohemolisina en carne cruda en Colombia. *Archivos latinoamericanos de nutrición*. 2019; 69:1.
- Karmali M. Emerging public health challenges of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* related to changes in the pathogen, the population, and the environment. *Infection clinical diseases*. 2017; 64:371–6.
- Ennis C, McDowell D, Bolton D. The prevalence, distribution and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) serotypes and virulotypes from a cluster of bovine farms. *Journal of Applied Microbiology*. 2012; 113:1238-11.
- Paton A, Paton J. Direct Detection and Characterization of Shiga Toxigenic *Escherichia coli* by Multiplex PCR for *stx1*, *stx2*, *eae*, *ehxA*, and *saa*. *Journal of Clinical Microbiology*. 2002;40: 271–4.
- Chen J, Griffiths M. PCR differentiation of *Escherichia coli* from other Gram-negative bacteria using primers derived from the nucleotide sequences flanking the gene encoding the universal stress protein. *Letters in applied microbiology*. 1998; 27:369-3.
- Krüger A, Lucchesi P, Parma A. Verotoxins in bovine and meat verotoxin-producing *Escherichia coli* isolates: type, number of variants, and relationship to cytotoxicity. *Appl. Environ. Microbiol.*2011;77:73-7.
- Masana M, D'Astak B, Palladino P, et al. Genotypic characterization of non-O157 Shigatoxin-producing *Escherichia coli* in beef abattoirs of Argentina. *Journal of Food Protection*. 2011;12: 2008-10
- Oliveira M, Brito J, Gomes T, et al. Diversity of virulence profiles of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* serotypes in food-producing animals in Brazil. *International Journal of Food Microbiology*. 2008; 127:139-8.
- Galarce N, Escobar B, Sánchez F, Paredes O, Alegría R, Borie C. Virulence Genes, Shiga Toxin Subtypes, Serogroups, and Clonal Relationship of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Strains Isolated from Livestock and Companion Animals. *Animals*. 2019; 9:733.
- Boerlin P, McEwen S, Boerlin F, Wilson J, Johnson R, Gyles C. Associations between virulence factors of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* and disease in humans. *J Clin Microbiol*. 1999; 37:497–7.
- Siegler R, Obrig T, Pysker T, Tesh V, Denkers N, Taylor F. Response to Shiga toxin 1 and 2 in a baboon model of hemolytic uremic syndrome. *Pediatric Nephrology*. 2003; 18:92–5.
- Sheng, H.; Lim, J.I.; Knecht, H.J.; Li, J.; Hovde, C.J. (2006). Role of *Escherichia coli* O157:H7 virulence factors in colonization at the bovine terminal rectal mucosa. *Infection and Immunity* 74, 4685-4693.
- Jenkins, C.; Perry, N.T.; Cheasty, T.; Shaw, D.J.; Frankel, G.; Dougan, G.; Gunn, G.J.; Smith, H.R.; Paton, A.W.; Paton, J.C. (2003). Distribution of the *saa* gene in strains of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* of human and bovine origins. *Journal of Clinical Microbiology* 41, 1775-1778. Doi: 10.1128/JCM.41.4.1775-1778.2003
- Hong S, Oh K, Cho S, et al. Asymptomatic healthy slaughterhouse workers in South Korea carrying Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*. 2009; 56:41-7
- Koitobashi T, Vuddhakul V, Radu S, et al. Genetic Characterization of *Escherichia coli* O157: H7–Strains Carrying the *stx_{2c}* Gene but Not Producing Shiga Toxin 2. *Microbiology and immunology*. 2006; 50:135-14.