



**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS  
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

**CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE CEPAS DE *Escherichia coli*  
ENTEROPATÓGENA AISLADAS DESDE UN *Castor canadenses* EN  
TIERRA DEL FUEGO, CHILE.**

**Carla Andrea Carrasco Rivera**

Proyecto de Memoria para optar al  
Título Profesional de Médico  
Veterinario  
Departamento de Medicina  
Preventiva animal

PROFESOR GUÍA: PATRICIO RETAMAL MERINO  
Universidad de Chile

SANTIAGO, CHILE



**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS  
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

**CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE CEPAS DE *Escherichia coli*  
ENTEROPATÓGENA AISLADAS DESDE UN *Castor canadenses* EN  
TIERRA DEL FUEGO, CHILE.**

**Carla Andrea Carrasco Rivera**

Proyecto de Memoria para optar al  
Título Profesional de Médico  
Veterinario  
Departamento de Medicina  
Preventiva animal

NOTA FINAL .....

Prof. Guía	Patricio Retamal .....
Profesor	Corrector Consuelo Borie .....
Profesor	Corrector Lisette Lapierre .....

SANTIAGO, CHILE  
2020

2020

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

<b>CONTENIDO</b>	<b>PÁGINA</b>
RESUMEN .....	3
INTRODUCCIÓN .....	4
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA .....	6
OBJETIVO GENERAL .....	10
OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	10
MATERIALES Y MÉTODOS .....	11
RESULTADOS .....	15
.....	15
BIBLIOGRAFÍA .....	22

## RESUMEN

En la actualidad las especies invasoras se han convertido en un problema para varios países alrededor de todo el mundo y se atribuye principalmente a la introducción o transporte por el ser humano a zonas fuera del área de distribución natural del animal. El *Castor canadensis* especie invasora de Tierra del Fuego, Chile, por sus hábitos naturales se encuentra residiendo en casi la totalidad de las cuencas de agua dulce donde se sitúa, lo cual podría diseminar bacterias con potencial zoonótico. El objetivo de esta Memoria de Título fue la caracterización genética de cepas de *E. coli* patógena aisladas desde un castor en Chile y determinar la posible resistencia antimicrobiana presente en el agente.

Para ello, se utilizó la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para determinar los genes de virulencia. Los genes seleccionados fueron: *stx1*, *stx2*, *eae* y *bfp*. Para la determinación de resistencia antimicrobiana se utilizó la técnica de Kirby bauer para analizar los fenotipos de resistencia.

De las 12 colonias analizadas en esta Memoria, se encontró que la totalidad de ellas fueron positivas al gen *eae* y negativas a *bfp*, lo cual demuestra que la cepa presente corresponde a un *E. coli* Enteropatógena (EPEC). Adicionalmente, se obtuvo que las cepas analizadas en este estudio no presentan resistencia antimicrobiana.

Los resultados de esta Memoria aportan evidencia sobre la importancia de estudiar la presencia de agentes zoonóticos en especies silvestres invasoras, por su posible impacto sanitario y ecológico generado a la fauna nativa de la zona afectada, o así también a los humanos.

## INTRODUCCIÓN

En el año 1950 se descubrió que la bacteria *Escherichia coli* podría ser la causante de enfermedades en sus hospederos, ya que hasta el momento solo se había descrito como habitante normal del tracto digestivo. Este patógeno tiene la capacidad de ocasionar un cuadro diarreico importante, en varios casos, podría llevar hasta la muerte. Con los años se han podido descubrir varios patotipos de *E. coli* con diferentes mecanismos de virulencia y ocasionando diferentes patologías con una gran variedad de efectos clínicos entre ellas, a nivel intestinal como extraintestinal. Dentro de estos patotipos hallados se encuentra la *E. coli* enteropatógena (EPEC), el cual se caracteriza por producir cuadros diarreicos en donde su transmisión es a través del contacto directo con heces contaminadas. Las EPEC se han transformado en un problema de salud pública, ya que se han reportado estas bacterias en animales y alimentos de origen animal, por este motivo, con su presencia, podría existir una gran posibilidad de zoonosis, y según el hospedador que se encuentre, podría generar un brote en masa.

Por otra parte, en el año 1946 se importaron ejemplares de *Castor canadensis* a Tierra del Fuego, en territorio argentino, que con los años se han expandido exitosamente, llegando a la zona chilena de esta isla, donde actualmente tienen ocupación de casi todas las cuencas de agua del territorio. Con el gran avance de la distribución geográfica que ha tenido esta especie exótica a lo largo de los años, se ha hecho relevante saber más sobre su estado sanitario, ya que al vivir en cursos de agua existe una alta probabilidad de transmisión y propagación de enfermedades a través de esta.

En Canadá, el país de origen del *C. canadensis*, existen varios estudios sobre las enfermedades que puede transmitir esta especie por medio del agua, incluyendo agentes zoonóticos como *E. coli*, *Giardia spp* y *Cryptosporidium spp*.

En Chile, hay poca información sobre el estado sanitario de esta especie invasora, como también existen pocos estudios de *E. coli* donde los animales silvestres actúen como reservorio. El objetivo de este proyecto es caracterizar genotípica y fenotípicamente una

cepa de *E. coli* enteropatogénica, además de su resistencia antimicrobiana aislada desde un *C. canadensis* de Tierra del Fuego.

## REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### Características del agente

La bacteria Gram negativa *Escherichia coli* perteneciente a la familia Enterobacteriaceae, tiene amplia distribución y se caracteriza por residir en el intestino grueso de animales y humanos de sangre caliente. A pesar de que la mayoría de las bacterias de este género viven sin provocar enfermedades, existen cepas que generan afecciones intraintestinales y extraintestinales, en su mayoría en personas inmunodeprimidas pero así también en personas sanas (Gomes *et al.*, 2016).

En el grupo de cepas intraintestinales existen 6 patotipos descritos, *E. coli* enteropatogénica (EPEC), *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* productora de toxina shiga (STEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* de adherencia difusa (ECAB) y *E. coli* enteroinvasiva (ECEI). EPEC es una de las bacterias con mayor preocupación en cuanto a la salud pública en países subdesarrollados, ya que es una de las que provoca con mayor frecuencia la diarrea infantil. En países desarrollados tendría menor frecuencia (Vidal, *et al.*, 2016).

### *Escherichia coli* Enteropatogénica EPEC

La EPEC es un patotipo que se caracteriza por su lesión de fijación y borramiento (A/E), que se define por la destrucción de las microvellosidades del intestino y la unión íntima con las células epiteliales, logrando ingresar al hospedador por vía oral (Hu y Torres, 2015).

La patogénesis se detalla en tres pasos: primero, iniciando con la unión a través de la adherencia a la mucosa del intestino; en segunda instancia actúa un sistema de secreción tipo III, el cual está codificado en la isla de patogenicidad, llamada *locus of enterocyte effacement* (LEE), para así introducir los factores de virulencia; por último, terminando con el apego íntimo y la formación de colonias bacterianas en la pared intestinal del hospedero. Esta isla de patogenicidad LEE, además de codificar el sistema de secreción tipo III, también codifica la proteína adhesiva a la membrana externa denominada Intimina y su presencia está determinada por el gen *eae* (Hu y Torres, 2015; Robins-Browne *et al.*, 2016).

La cepa EPEC se puede clasificar como típica o atípica, según la presencia del plásmido de virulencia, denominado como plásmido del factor de adherencia (pEAF), que codifica dos loci importantes que son *bfp* y *per*. El gen *bfp* codifica el pili tipo IV (BFP), el cual se encarga de la adherencia a la célula, a través de la auto-agregación bacteriana permitiendo la formación de microcolonias bacterinas. Con lo mencionado anteriormente, la subdivisión de EPEC sería típica (tEPEC) con el loci *bfp* y atípica (aEPEC) sin éste. Además por esta diferencia, tEPEC tiene rasgos de virulencia más homogéneos que las aEPEC, y en cuanto al patrón de adherencia, la cepa tEPEC muestra una unión localizada en la pared intestinal, mientras las cepas aEPEC una adhesión más variada, tanto localizada, difusa o agregante (Farfan *et al.*, 2016; Hu y Torres, 2015).

A pesar de que no tienen el plásmido del factor de virulencia, se ha observado que las EPEC atípicas pueden tener factores de virulencia de otros patogrupos, tanto de *E. coli* diarrogénica como de *E. coli* extraintestinales. Este hallazgo hizo conjeturar que esta heterogenicidad de factores de virulencia podrían explicar la aparición de hospederos asintomáticos (Scaletsky y Fagundes, 2016).

Los serotipos que constituyen las EPEC son O:H específicos, y hasta el día de hoy se conocen más de 180 serogrupos O distintos y más de 60 antígenos H diferentes. Los más comunes de tipo somáticos son O55, O86, O111, O114, O119, O127, O142 y los más frecuentes de los antígenos flagelares son H2 y H6. Al haber esta gran variedad de serogrupos se ha descubierto que las cepas EPEC se componen de tres linajes EPEC1, EPEC2 y EPEC4, los que adquirieron el locus de la región LEE y pEAF de forma independiente, pero además se ha encontrado que, una gran cantidad de cepas atípicas pertenecen al linaje de las típicas, pero con la interacción del hospedador o medio ambiente perdieron su pEAF (Scaletsky, 2019).

## **Epidemiología**

La diarrea es una de las enfermedades que causa más muertes a nivel mundial (Hu y Torres, 2015), afectando principalmente a regiones de escasos recursos, como se a observado en varios países en el continente Africano. A su vez, los de mayor reporte en cuadros diarreicos causados por EPEC son los países del tercer mundo como Brasil, Perú, Irán y Chile. Sin embargo, con el paso del tiempo en países industrializados como en Reino

Unido, Inglaterra, Estados Unidos, China e Italia registran casos de diarrea por EPEC pero con una diferencia: se ha observado mayor incidencia de aEPEC que tEPEC, lo que anteriormente no había ocurrido (Hu y Torres, 2015).

### **Infección en seres humanos y animales**

EPEC es una bacteria que puede generar enfermedades en humanos, especialmente en niños menores de 5 años alcanzando una morbilidad del 3%, donde en menores de 2 años se asocia con mayor riesgo de muerte. La forma de presentarse de esta bacteria es de manera inespecífica con una diarrea aguda con vómitos, fiebre y malestar general. La transmisión de esta sucede por ruta fecal-oral, donde puede presentar reservorios sintomáticos como asintomáticos, tanto en lactantes como adultos (Pearson y Frankel, 2016; Scaletsky, 2019). La cepa tEPEC es la principal causa de diarrea aguda infantil, y se ha comprobado que la incidencia de este cuadro diarreico va disminuyendo con la edad, donde los adultos lo presentan solo en casos puntuales adquiriendo una inmunidad inespecífica (Hu y Torres, 2015).

En cuanto al diagnóstico de EPEC no es de rutina, solo se recomienda realizarlo en casos de un cuadro diarreico persistente de varios días, diarrea en turistas, infantes que no responden a tratamiento sintomático, pacientes inmunodeficientes con cuadro moderado a severo de diarrea y en brotes gastroentericos de gran magnitud (Vidal *et al.*, 2005).

La cepa tEPEC tiene como principal reservorio al humano, a su vez para aEPEC son los animales, donde ha sido descubierta en varios animales domésticos como silvestres y en medio ambiente. A pesar de esto, existen casos de tEPEC en animales y aEPEC en alimentos de origen animal para el consumo humano. No obstante, hasta el día de hoy no se ha corroborado la directa transmisión entre animales y humanos (Etcheverría, *et al.*, 2016; Scaletsky, 2019).

### **Resistencia antimicrobiana**

Al existir la posibilidad de que agentes patógenos puedan ocasionar algún tipo de enfermedad en los humanos, la resistencia antimicrobiana es un tema de gran relevancia para la salud pública, ya que estas cepas resistentes son un gran desafío para el tratamiento de alguna afección causada por estos patógenos (Adefisoye y Okoh, 2016). Como

característica, la resistencia antimicrobiana en EPEC tiene un patrón de variabilidad muy amplio, que puede cambiar tanto de país, comunidad o región en un tiempo determinado. Esto se debe a la capacidad de mutar y transferir genes de resistencia de una cepa a otra, otorgándoles mecanismos de resistencia a una gran variabilidad de fármacos del mercado (Canizalez *et al.*, 2019).

Para el caso de EPEC, existen registros de resistencia a ciertos antimicrobianos, como lo son tetraciclina, cefotaxima, sulfametoxazol-trimetoprima, ampicilina, gentamicina, ciprofloxacina y ácido nalidíxico en cuadros de diarrea infantil (Canizalez *et al.*, 2019). Pero a su vez, esta resistencia no solo se ha estudiado en cepas aisladas de cuadros de diarrea, sino también, desde afluentes de agua para el consumo humano, la cual puede ser una fuente de fácil y rápida propagación, tanto para humanos como animales que dependen de este recurso (Adefisoye y Okoh, 2016). En cuanto a los serotipos que presentan resistencia antimicrobiana, se ha visto una prevalencia de aEPEC O157: H16 como grupo clonal (Torres, 2016).

Con la gran expansión de territorio del *C. canadensis*, esta especie invasora se ha convertido en un potencial peligro, tanto para la salud pública como para los ecosistemas de los lugares que habita, ya que puede actuar como hospedador y un potencial transmisor de enfermedades. Por esta situación y el desconocimiento que se tiene de este animal en territorio nacional, se ha hecho de suma importancia poder tener más información del estado sanitario de este, así como la caracterización de cepas bacterianas con potencial zoonótico encontradas en esta especie.

## **OBJETIVO GENERAL**

Caracterizar genética y fenotípicamente una cepa de *Escherichia coli* enteropatógena aisladas desde un ejemplar de *Castor canadensis* en Tierra del Fuego, Chile.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Determinar la condición de típica o atípica de la cepa aislada de *E. coli* enteropatógena aislada desde un ejemplar de *Castor canadensis* en Tierra del Fuego, Chile.
2. Identificar genes y fenotipos de resistencia antimicrobiana en la cepa de *E. coli* enteropatógena aislada.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Muestras

Para realizar esta Memoria de Título se utilizaron 12 colonias de *E. coli* positivas al gen *eae*, aisladas previamente e identificadas como *E. coli* enteropatógena EPEC, obtenidas mediante la introducción de una tórula de algodón por el recto de cadáveres de castores y transportadas en medio Cary Blair en frío.

La toma de muestras tuvo una duración de un mes realizándose en el programa de control mediante trampeo del *C. canadensis*, provenientes del Parque Nacional Karunkinka, Tierra del Fuego, Chile, 2019.

### Reacción en Cadena de la Polimerasa<sub>1</sub>

Se amplificaron los genes que codifican factores de virulencia *eae* y *bfp*, característicos del subtipo *E. coli* enteropatógeno típico. Como control positivo, se utilizó una cepa de referencia de *E. coli* tEPEC que fue facilitada por el ISP (*E.coli* 2348/69), cuyos genes fueron identificados previamente por esta institución. Los genes que se evaluaron en este estudio y sus partidores respectivos se especifican en la Tabla 1.

Tabla 1: Genes asociados a factores de virulencia y características de los partidores utilizados para su detección.

Gen	Primer secuencia	Tamaño de producto	Referencia
<i>eae</i>	TCA ATG CAG TTC CGT TAT CAG TT GTA AAG TCC GTT ACC CCA ACC TG	482	Vidal <i>et al.</i> , 2005
<i>bfp</i>	GGA AGT CAA ATT CAT GGG GGT AT GGA ATC AGA CGC AGA CTG GTA GT	300	Vidal <i>et al.</i> , 2005

El procedimiento del PCR múltiple se efectuó con un volumen total de 12,5 uL, el cual comprende de 1,8 uL de 10x buffer PCR (Invitrogen ®), de 0,4 uL de 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,3 uL de 1x desoxirribonucleótido trifostado, 2 pmol de cada partidor con 0,7 uL para *bfp* y 1,25 uL para *eae* , de 0,08 uL de 1 U Taq polimerasa (Invitrogen ®), 0,5 uL de DNA templado y 7,47 uL de H<sub>2</sub>O destilada ionizada (Merk ®). También se incorporo un tubo con la mezcla anterior sin una muestra como control negativo.

La extracción del DNA se realizó con cada una de las 12 colonias seleccionadas de la muestra previamente positivas al gen *eae*, posteriormente se realizó ebullición en agua destilada estéril por 20 mín. Luego se continuó centrifugando a 5000 x g durante 3 min, y se tomó el sobrenadante obtenido directamente como templado para la reacción.

Las condiciones de la amplificación incluyeron una denaturación inicial de 94°C durante 5 min, por consiguiente, se realizaron 35 ciclos que fueron parte de la denaturación de 1,5 mín a 94°C, una hibridación de 1,5 mín a 60°C y una extensión de 1,5 mín a 70°C. Por último, se procedió a una elongación por 5 min a 72°C. Los resultados del PCR se observaron en el transiluminador después de una electroforesis en agarosa al 1,5% y tinción con Bromuro de etidio.

### **Método de difusión en agar Kirby Bauer**

Se verificó la resistencia antimicrobiana mediante el método Kirby Bauer, estandarizado por el “Clinical and Laboratory Standards institute” (CLSI, 2015). Se hizo uso como cepa control *E. coli* ATCC 25922.

El método consistió en la inoculación de las bacterias *E. coli* enteropatógena EPEC en una placa de agar Mueller-Hinton (AMH), seguido por el posicionamiento de discos de papel impregnados con antibióticos en la superficie del agar. Al momento de incubar, el antibiótico se difundió por el agar en una gradiente, la concentración del antibiótico

disminuye a medida que la distancia aumentó desde el disco. La susceptibilidad de los antibióticos se estableció al medir el diámetro de las zonas de inhibición bacteriana alrededor de los discos de antibióticos y se comparó con los criterios de interpretación de los resultados del método. Los antimicrobianos utilizados se detallan en la Tabla 2.

Tabla 2: Antimicrobianos utilizados para observar resistencia y sus valores de inhibición (mm) para la verificación de los resultados

Antibiótico	Codigo	Diámetro halo de inhibición bacteriana (mm)			
		Susceptible	Intermedia	Resistente	<i>E.coli</i> ATCC 25922
<b>Ampicilina</b>	AMP-10	≥ 17	14 - 16	≤ 13	15 – 22
<b>Amoxicilina + Ácido clavulánico</b>	AMC-30	≥ 18	14 - 17	≤ 13	18 – 24
<b>Ceftiofur</b>	EFT-30	≥ 21	18 - 20	≤ 17	26 – 31
<b>Ceftazidima</b>	CAZ-30	≥ 21	18 - 20	≤ 17	25 – 32
<b>Ceftriaxona</b>	CRO-30	≥ 23	20 - 22	≤ 19	29 – 35
<b>Cefadroxilo</b>	CFR-30	≥ 18	15 - 17	≤ 14	21 – 27
<b>Gentamicina</b>	CN-10	≥ 15	13 - 14	≤ 12	19 – 26
<b>Estreptomicina</b>	S-300	≥ 15	12 - 14	≤ 11	12 – 20
<b>Azitromicina</b>	AZM-15	≥ 13	-	≤ 12	-
<b>Tetraciclina</b>	TE-30	≥ 15	12 - 14	≤ 11	18 – 25
<b>Ciprofloxacino</b>	CIP-5	≥ 21	16 - 20	≤ 15	30 – 40
<b>Enrofloxacinó</b>	ENR-5	≥ 23	17 - 22	≤ 16	32 – 40
<b>Ácido Nalidíxico</b>	NA-30	≥ 19	15 - 18	≤ 14	22 – 28
<b>Sulfametoxazol + Trimetoprim</b>	SXT-25	≥ 16	11 - 15	≤ 10	23 – 29
<b>Trimetoprim</b>	W-5/TMP	≥ 16	11 - 15	≤ 10	21 – 28
<b>Sulfizoxazol</b>	SF-300/G	≥ 17	13 - 16	≤ 12	15 – 23
<b>Cloranfenicol</b>	C-30	≥ 18	13 - 17	≤ 12	21 – 27
<b>Fosfomicina</b>	FOT-200	≥ 16	13 - 15	≤ 12	22 – 30
<b>Ceftazidima + Ácido clavulánico</b>	CAZ/CLA	*	*	*	*

\* Se contempla como una cepa productora de Betalactamasa de espectro extendido (ESBL), cuando presenta un aumento en el diámetro del halo de inhibición de 5 mm o más en la combinación de Ceftazidima + Ácido clavulánico (CAZ/CLA) en comparación con el diámetro del halo de Ceftazidima (CAZ).

Las ESBL son enzimas que fenotípicamente se caracterizan por otorgar resistencia antimicrobiana a penicilinas y cefalosporinas, incluyendo de tercera y cuarta generación. Lo que es observado generalmente en enterobacterias, como *Klebsiella pneumoniae* y *E. coli*.

### **Bioseguridad**

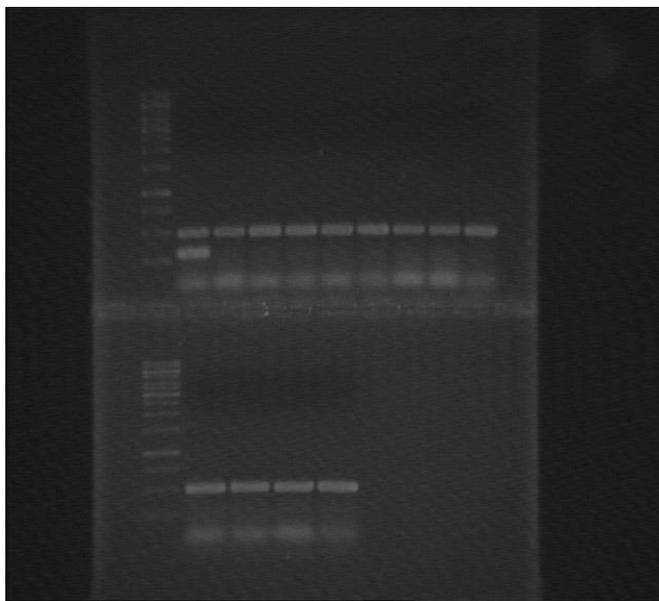
Mientras se realizó el proceso experimental, siempre se utilizó delantal y guantes como medida de protección personal. Las superficies ocupadas para trabajar y las manos fueron desinfectadas constantemente, utilizando alcohol al 70%. Al momento de manipular Bromuro de etidio se tomó el resguardo que se requirió, ya que al ser un producto cancerígeno se evitó en todo momento tener contacto directo con el químico, utilizando los implementos necesarios mencionados anteriormente. Así también su eliminación se hizo de forma especial y por los medios que dispone la facultad para eliminar residuos tóxicos. Además de tener aparatos de trabajo con la protección frente a la LUV para ver los resultados obtenidos.

## RESULTADOS

### 1. Determinación la condición de típica o atípica de la cepa aislada de *E. coli* enteropatógena aislada desde un ejemplar de *Castor canadensis* en Tierra del Fuego, Chile.

En esta Memoria de Título se obtuvo la identificación de la cepa correspondiente a *E. coli* enteropatógena *eae+*, la cual se determinó a través de la detección del gen de resistencia *eae* y la ausencia de los genes *stx1* y *stx2*, descartando así que la cepa fuera *E. coli* productora de la toxina shiga (STEC), y confirmando que la cepa presente es *E. coli* enteropatógena EPEC, asociada comúnmente a cuadros diarreicos y detectados en animales de producción.

En este estudio se observaron los productos amplificados mediante PCR, de la región de genes *eae* anteriormente mencionada, además de la región de *bfp*, componente variante para la identificación del tipo de *E. coli* EPEC. Los ensayos detectaron correctamente los dos genes de interés en la cepa control *E.coli* 2348/69.



**Figura 1.** Caracterización de EPEC atípica mediante PCR. Carriles arriba 1, ladder o marcador de peso molecular; 2, control positivo *eae+* y *bfp+*; 3, colonia<sub>1</sub>; 4, colonia<sub>2</sub>; 5, colonia<sub>3</sub>; 6, colonia<sub>4</sub>; 6, colonia<sub>5</sub>; 7, colonia<sub>6</sub>; 8, colonia<sub>7</sub>; 9, colonia<sub>8</sub>. Carriles abajo 1, ladder o marcador de peso molecular; 2, colonia<sub>9</sub>; 3, colonia<sub>10</sub>; 4, colonia<sub>11</sub>; 5, colonia<sub>12</sub>; 6, control negativo. Los productos amplificados fueron analizados por electroforesis en geles de agarosa al 1,5% y revelados en un transiluminador con luz ultravioleta en presencia de bromuro de etidio.

De las 12 colonias de EPEC analizadas en esta memoria, se encontró que la totalidad de las colonias (100%) resultaron positivas al gen *eae* y negativas al gen *bfp*. Cabe mencionar que este resultado confirma que las cepas analizadas corresponden a la cepa atípica de EPEC.

## 2. Identificación fenotipos y genes de resistencia antimicrobiana en la cepa de *E. coli* enteropatógena aislada.

En las pruebas de sensibilidad antimicrobiana por difusión (Kirby Bauer) demostró que las 12 colonias (100%) analizadas fueron susceptibles a todos lo antibióticos utilizados en el presente estudio (Tabla 3).

Tabla 3: Fenotipos de resistencia antimicrobiana y su susceptibilidad al antibiótico (Kirby Bauer).

Antibiótico	Nº Colonias											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
AMP-10	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
AMC-30	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
EFT-30	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
CAZ-30	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
CRO-30	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
CFR-30	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
CN-10	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
S-300	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
AZM-15	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
TE-30	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
CIP-5	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
ENR-5	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
NA-30	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
SXT-25	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
W-5	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
SF-300	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
C-30	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
FOT-200	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
CAZ/CLA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

S = Susceptible;

- = Cepa no productora de Betalactamasa de espectro extendido (ESBL)

## DISCUSIÓN

Las especies invasoras se define como organismo encontrado en hábitats que no le son propios, logrando establecerse y desarrollarse en la nueva región, con una abundancia inusual y provocando alteraciones en diversidad del ecosistema de la zona.

Según los datos analizados desde la liberación de 20 individuos (10 parejas) el *C. candiense* ha aumentados su población de tal manera que se estima que el día de hoy pueden alcanzar una población de 61.000 ejemplares, ocasionando grandes cambios al equilibrio ecológico de la zona, llegando a invadir a más de 20.000 hectarias de bosque nativo en la región donde habita (Molina *et al.*, 2018).

La invasión del *C. canadensis* se considera un acontecimiento reciente, por lo que los estudios en el país son escasos y enfocados principalmente en el impacto generado en los bosques destruidos por este mamífero acuático (Baldini *et al.*, 2008; Molina *et al.*, 2018; Wallem *et al.*, 2007), pero la información del estado sanitario de este animal es relativamente nula. Esta especie exótica por su hábitos de sobrevivencia habita las aguas dulceacuícolas de la zona en que se encuentra, las cuales son básicamente las mismas aguas que las personas de la región utilizan para su consumo.

En el país de origen del castor existen estudios sobre la transmisión de enfermedades que puede realizar esta especie invasora, donde se ha comprobado la prevalencia de *Giardia spp*, los que son patógenos que utilizan el agua como medio de propagación, utilizando a organismos acuáticos como foco de transmisión, comprobándose que están presentes en el castor (Fayer *et al.*, 2006). A partir de la preocupante situación que está aconteciendo con esta especie invasora en Chile, se ha hecho de suma importancia obtener más información de este animal, para así poder tener el conocimiento de si este ejemplar implica un peligro de salud pública.

En base a estos antecedentes, en esta Memoria de Título se realizó la caracterización genética y fenotípica de una cepa de *E. coli* enteropatógena (EPEC) encontrada en un castor capturado en el marco del programa de control que se realizó en el Parque Nacional Karunkinka, Tierra del Fuego, Chile.

En este estudio se detectó el gen *eae* en las muestras analizadas, pero no se detectó el gen en cuestión *bfp* en ninguna de las colonias, determinando que la cepa analizada corresponde a una EPEC atípica. Los estudios realizados anteriormente en su mayoría describen que este tipo de EPEC se encuentra con mayor prevalencia en animales, tanto domésticos, de producción como silvestres (Gomes *et al.*, 2016). Por lo tanto los resultados de este estudio concuerdan con los hallazgos de estudios anteriores, donde la prevalencia de este tipo de EPEC se encuentra mayoritariamente en animales.

La enfermedad diarreica aguda (EDA) representa un importante problema de salud pública a nivel mundial, principalmente por su fácil transmisión. Tanto para los países del tercer mundo, ocasionando graves problemas llegando incluso a ocasionar la muerte, mientras que en países desarrollados se observa cambios de comportamiento en los patógenos.

A nivel nacional la bacteria *E. coli* patógena ha sido descrita en varios estudios, donde en su gran mayoría se encuentra en animales de producción destinados a consumo animal, donde se pudo observar una gran prevalencia de las cepas STEC y EPEC, las cuales pertenecen al grupo de cepas patógenas causantes de síndromes diarreicos (Galarce *et al.*, 2019; Vélez *et al.*, 2020; Collado, 2020). A pesar que en los planteles de animales productivos la prevalencia es mayor de STEC, se ha observado que entre el 30 a 40% de las diarreas infantiles en Chile fueron causadas por EPEC (Scaletsky, 2019).

Un hallazgo interesante en este estudio se enfocó en la resistencia antimicrobiana, ya que al momento de realizar el procedimiento de Kirby Bauer esta cepa, en las colonias utilizadas no se obtuvo resistencia a ninguno de los 19 antibióticos utilizados. Para poder entender esta situación es necesario conocer las condiciones donde el *C. canadensis* ha podido invadir los bosques de Tierra del Fuego. El parque Nacional Karunkinka es uno de los parques nacionales más remotos y grandes del país, donde de sus 300.000 hectáreas solo una pequeña parte es utilizada para el turismo, dejando así mucho territorio inexplorado por sus inhóspitos paisajes, por lo que las interacciones interespecíficas que tiene el castor son con animales nativos de la región como guanacos, zorros, entre otros. Aun así, se describe la presencia de ganado proveniente de los habitantes que colindan con el parque, llegando a existir interacción entre estos animales (WCS, 2018). Bajo esta premisa, a pesar del difícil

acceso del territorio que tiene esta zona, se esperaba alguna resistencia asociada a esta interacción.

En este estudio se tuvo considerado realizar la búsqueda de genes de resistencia antimicrobiana según los resultados obtenidos en el procedimiento anterior, enfocándose en las resistencias antimicrobianas más comunes tanto en la salud humana como en la salud animal, pero en vista a los resultados del método no se aplicó.

Con respecto a la nula detección de resistencia antimicrobiana, a pesar de que no existen antecedentes de cepas resistentes en castores, este resultado difiere de los datos obtenidos en estudios previos donde se habría detectado resistencia en animales domésticos y silvestres, ambos por el uso indiscriminado de antibióticos, donde se detectó resistencia antimicrobiana a tetraciclinas, cefotaxima, ampicilina, gentamicina, ácido nalidíxico entre otros (Canizalez *et al.*, 2019).

En cuanto al *C. canadensis* no existe información disponible sobre presencia de genes de resistencia en esta especie o específicamente de EPEC. Por lo que esta memoria de título sugiere que el nivel de resistencia en cepas EPEC del castor, estaría a niveles muy bajos en la zona de estudio, aunque se requieren nuevos análisis en un mayor número de aislados para llegar a conclusiones válidas.

Por los resultados de este trabajo, donde en la totalidad de las 12 colonias analizadas presentaron las mismas características genotípicas y fenotípicas, se sugiere que corresponden a clones de la misma cepa.

A pesar de que las EPEC atípicas se describe que su principal hospedero son los animales, en los últimos años se ha observado que en países desarrollados existe un registro de mayor prevalencia de EPEC atípicas que típicas en humanos (Etcheverría, *et al.*, 2016). Esto se podría asociar a las condiciones de vida de estos países, provocando una variabilidad en estos patógenos, por lo que deja claro la importancia de controlar la rápida expansión que ha tenido el castor en territorio chileno en los últimos años, para así evitar la presencia de este animal en sectores donde la población de humanos sea de una magnitud mucho mayor.

Esta memoria de título proporciona antecedentes sobre la importancia de estudiar el rol que cumplen las especies invasoras como foco de diseminación de patógenos con la capacidad

de generar enfermedades, tanto en la fauna nativa de la zona y humanos que residen la región, a través de la contaminación del ambiente.

Estos antecedentes demuestran el valor de conocer el estado sanitario de la especie *C. canadensis*, ya que al describirse la presencia de un patógeno con la capacidad de generar cuadros diarreicos tanto en animales como humanos, evidencia la importancia para la salud pública de tener la información necesaria para poder desarrollar estrategias orientadas a la vigilancia y prevención de bacterias con potencial zoonótico.

## CONCLUSIONES

1. La cepa aislada desde un *C. canadensis* corresponde a una *E. coli* enteropatógena.
2. No existe resistencia antimicrobiana asociada a la cepa de EPEC atípica analizada en este estudio.
3. Es necesario continuar estudiando las poblaciones de castores en Tierra del Fuego en vista a la evidencia de una bacteria con potencial zoonótico presente en ellos.

## **BIBLIOGRAFÍA**

**ADEFISOYE, M.; OKOH, A.** 2016. Identification and antimicrobial resistance prevalence of pathogenic *Escherichia coli* strains from treated wastewater effluents in Eastern Cape, South Africa. *Microbiologyopen*. 5 (1): 143-151.

**BALDINI, A.; OLTREMARI, J.; RAMÍREZ, M.** 2008. Impacto del castor (*Castor canadensis*, Rodentia) en bosques de lenga (*Nothofagus pumilio*) de Tierra del Fuego, Chile. *Rev Bosque*. 29 (2): 162- 169.

**BENAVIDES, M.** 2014. Comparación de los perfiles genéticos de resistencia a antimicrobianos de cepas de *Salmonella enterica* obtenidas de distintos hoperos en Chile. Memoria Título Médico Veterinario. Santiago, Chile. U. Chile, Fac. Cs. Veterinarias y Pecuarias. 37p.

**CANIZALEZ, A.; VELAZQUEZ, J.; VALDEZ, M.; FLORES, H.; VIDAL, J.; MURO, S.; GUADRÓN, A.; GONZALEZ, E.; MEDINA, J.; TAPIA, G.; LEÓN, N.** 2019. Detection of antimicrobial-resistance diarrheagenic *Escherichia coli* strains in surface water used to irrigate food products in the northwest of Mexico. *Int J Food Microbiol*. 304: 1-10.

**COLLADO, L.** 2020. Diagnóstico microbiológico y vigilancia epidemiológica de la campilobacteriosis en Chile: Situación actual y desafíos futuros. *Rev Chil Infect*. 37 (3): 244-251.

**ETCHEVERRÍA, A.; LUCCHESI, P.; KRÜGER, A.; BENTANCOR, A.; PANDOLA, N.** 2016. *Escherichia coli* in Animals. **In:** Torres, A. P (Eds.). *Escherichia coli* in the Americas. pp 149-172.

**FARFÁN, A.; ARIZA, S.; VARGAS, F.; VARGAS, L.** 2016. Mecanismos de virulencia de *Escherichia coli* enteropatógena. *Rev Chil Infect*. 33 (4): 438-450.

**FAYER, R.; SATÍN, M.; TROUT, J.; DESTEFANO, S.; KOENEN, K.; KAUR, T.** 2006. Prevalence of Microsporidia, *Cryptosporidium* spp., and *Giardia* spp. in Beavers (*Castor canadensis*) in Massachusetts. *J Zoo Wildlife Med*. 37 (4): 492-497.

**GALARCE, N.; ESCOBAR, B.; SÁNCHEZ, F.; PAREDES, E.; ALEGRÍA, R.; BORIE, C.** 2019. Virulence Genes, Shiga Toxin Subtypes, Serogroups, and Clonal Relationship of Shiga Toxin-Producing *Escherichia Coli* Strains Isolated from Livestock and Companion Animals. *Animals*. 9 (10): 733.

**GOMES, T.; ELIAS, W.; SCALETSKY, I.; GUTH, B.; RODRIGUES, J.; PIAZZA, R.; FERREIRE, L.; MARTINEZ, M.** 2016. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Braz J Microbiol*. 47: 3-30.

**HU, J.; TORRES, A.** 2015. Enteropathogenic *Escherichia coli*: foe or innocent bystander?. *Clin Microbiol infect*. 21 (8): 729-734.

**MOLINA, R.; SOTO, N.; TAPIA, A.** 2018. Current state of distribution of the beaver *Castor canadensis* Kuhl 1820 (Rodentia) in the continental area of the Magallanes region, Chile. *An Inst Patagon*. 46 (3): 7-15.

**PEARSON, J.; FRANKEL, G.** 2016. Immunity to Enteropathogenic *Escherichia coli*. **In:** Ratcliffe, M. P (Eds.). *Encyclopedia of Immunobiology*. 4: 43-51.

**ROBINS, R.; HOLT, K.; INGLE, D.; HOCKING, D.; YANG, J.; TAUSCHEK, M.** 2016. Are *Escherichia coli* pathotypes still relevant in the era of whole-genome sequencing?. *Front Cell Infect Microbiol*. 6: 141.

**SCALETSKY, I.; FEGUNDES, U.** 2016. Typical Enteropathogenic *Escherichia coli*. **In:** Torres, A. P (Eds.). *Escherichia coli in the Americas*. pp 59-76.

**SCALETSKY, I.** 2019. Enteropathogenic *Escherichia coli*. **In:** Starčić, M. P (Eds.). *The Universe of Escherichia coli*. pp 56-74.

**VÉLEZ, M.; COLELLO, R.; ETCHEVERRÍA, A.; VIDAL, R.; MONTERO, D.; ACUÑA, P.; GUILLÉN, R.; TORO, M.; PADOLA, N.** 2020. Distribution of locus of adhesion and autoaggregation and *hes* gene in STEC strains from countries of Latin America. *Curr Microbiol*. 77 (9): 2111-2117.

**VIDAL, R.; CHAMORRO, N.; GIRÓN, J.** 2016. Enterotoxigenic *Escherichia coli*. **In:** Torres, A. P (Eds.). *Escherichia coli in the Americas*. pp 1-26.

**VIDAL, M.; KRUGER, E.; DURÁN, C.; LAGOS, R.; LEVINE, M.; PRADO, V.; TORO, C.; VIDAL, R.** 2005. Single multiplex PCR assay to identify simultaneously the six categories of diarrheagenic *Escherichia coli* associated with enteric infections. *J Clin Microbiol.* 43 (10): 5362-5365.

**WALLEN, P.; JONES, C.; MARQUET, P.; JAKSIC, F.** 2007. Identifying the mechanisms underlying the invasion of *Castor canadensis* (Rodentia) into Tierra del Fuego archipelago, Chile. *Rev Chil His Nat.* 80: 309-325

**WILDLIFE CONSERVATION SOCIETY.** 2018. Plan de manejo parque Karunkinka. Tierra del Fuego, Chile. Periodo 2018-2022. [en línea] <<https://chile.wcs.org/Portals/134/PLANMANEJOSept2018.pdf?ver=2018-12-13-181134-990>> [consulta: 08-08-2020].